

Aus dem Institut für Virologie
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Identifikation von Ziel-mRNAs der microRNA miR-142

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2020**

vorgelegt von:
Maryam Yazdani
geb. am 21.01.1984
in Teheran

Tag der Promotion: 24.02.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Friedrich Grässer

Prof. Dr. Eckart Meese

Prof. Dr. Michael Hummel

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Überblick.....	3
2.2 RNA-Interferenz.....	3
2.3 microRNAs (miRNAs).....	4
2.3.1 Die Rolle von miRNAs bei der Krankheitsentstehung.....	6
2.3.2 miR-142.....	7
2.4 MORF4L2 (MRGX).....	10
2.5 AKT1S1 (PRAS40).....	12
2.6 Tetraspanine.....	16
2.6.1 TSPAN3 (TM4F8).....	19
2.7 Ziele dieser Arbeit.....	20
3. Materialien	21
3.1 Geräte.....	21
3.2 Chemikalien.....	21
3.3 Puffer und Lösungen.....	22
3.4 Enzyme.....	24
3.5 DNA-Größenmarker.....	24
3.6 Bakterienstämme.....	25
3.7 Adhärente Zelllinien.....	25
3.8 Nähr- und Kulturmedien.....	25
3.8.1 Nährmedium für Bakterien.....	25
3.8.2 Kulturmedium für Säugerzellen.....	26
3.9 Vektoren.....	27
3.9.1 pGEM [®] -T.....	27
3.9.2 pSG5.....	28
3.9.3 pMIR-REPORT [™]	29
3.10 Expressionsplasmide.....	30
3.11 Reporterplasmide.....	30
3.12 Oligonukleotidprimer.....	31
3.13 Computersoftware.....	32
4. Methoden	34
4.1 Bakterielle Zellkultur.....	34
4.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien.....	34
4.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien (Rubidium-Methode).....	34
4.1.3 Transformation kompetenter Bakterien.....	35
4.1.4 Blau-Weiß-Selektion mittels pGEM.....	35
4.2 Eukaryotische Zellkultur.....	36

4.2.1 Kultivierung von Monolayer Zellkulturen	36
4.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Nanofectin™	36
4.3 DNA-Techniken.....	36
4.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	36
4.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	38
4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
4.3.4 Zielgerichtete Mutagenese	41
4.3.5 Agarosegelelektrophorese.....	43
4.3.6 NucleoSpin™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
4.4 Enzymatische Modifikation von DNA.....	45
4.4.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	45
4.4.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	46
4.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten	46
4.4.4 Poly-A-tailing und Ligation in pGEM	47
4.5 Dual-Luciferase® Reporter Assay	48
5. Ergebnisse.....	50
5.1 Fragestellung	50
5.2 Amplifikation und Klonierung.....	54
5.3 Mutation der miRNA-Bindestellen in der 3'UTR	54
5.4 Die pMIR-MORF4L2-3'UTR als Target für die miR-142 und miR-29.....	56
5.5 Die pMIR-AKT1S1-3'UTR als Target für die miR-142, miR-146 und miR-125.....	59
5.6 Die pMIR-TSPAN3-3'UTR als Target für die miR-142.....	62
6. Diskussion.....	68
6.1 Identifikation von miRNA Bindestellen in der MORF4L2-3'UTR	68
6.2 Identifikation von miRNA Bindestellen in der AKT1S1-3'UTR	69
6.3 Identifikation von miRNA Bindestellen in der TSPAN3-3'UTR.....	70
7. Anhang.....	71
7.1 Sequenzierungsergebnisse	71
7.1.1 Reporterplasmid pMIR-MORF4L2-3'UTR.....	71
7.1.2 Reporterplasmid pMIR-MORF4L2-Mut142-3'UTR.....	71
7.1.3 Reporterplasmid pMIR-MORF4L2-Mut29-3'UTR.....	72
7.1.4 Reporterplasmid pMIR-AKT1S1-3'UTR.....	72
7.1.5 Reporterplasmid pMIR-AKT1S1-Mut1-3'UTR.....	73
7.1.6 Reporterplasmid pMIR-AKT1S1-Mut2-3'UTR.....	74
7.1.7 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-3'UTR	75
7.1.8 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR	75
7.1.9 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-T1-3'UTR.....	76
7.1.10 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-TM1-3'UTR.....	76
7.1.11 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-T2-3'UTR.....	77

7.1.12 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-TM2-3'UTR.....	78
7.1.13 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-TM3-3'UTR.....	78
7.2 Target-Scan Vorhersagen, Schnittstellen der Mutagenese und Primerherstellung.....	79
7.2.1 MORF4L2.....	79
7.2.2 AKT1S1.....	81
7.2.3 TSPAN3.....	83
8. Abbildungsverzeichnis.....	88
9. Tabellenverzeichnis.....	89
10. Abkürzungsverzeichnis.....	90
11. Literaturverzeichnis.....	92
12. Danksagung.....	118
13. Lebenslauf.....	119

1. Zusammenfassung

In den 1990er Jahren wurde die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch nicht-kodierende RNA-Moleküle beschrieben. Diese sogenannten microRNAs (miRNAs) sind seitdem Gegenstand intensiver Forschung, insbesondere im Zusammenhang mit menschlichen (Tumor-) Erkrankungen und können als Onkogene und Tumorsuppressoren agieren. Der miRNA precursor von ca. 80 Nukleotiden (nt) wird zu zwei funktionellen reifen 3p- und 5p-Fragmenten prozessiert, die mit ihrer „Seed“-Sequenz an die 3' untranslatierte Region (3'UTR) ihrer Ziel messenger RNA (mRNA) binden und hierdurch die Proteinsynthese verringern. Anhand mehrerer Publikationen war ersichtlich, dass die miR-142 in vielen malignen Erkrankungen erniedrigt ist. Weiterhin war bekannt, dass das miR-142 Gen in diffus großzelligen B-Zell Lymphomen (DLBCL= diffuse large B cell lymphoma) sowie in akuten myeloischen Leukämien (AML) von Mutationen betroffen ist, die u.a. die „Seed“-Sequenz von miR-142-3p und -5p betreffen. Ziel dieser Dissertation war es Targets der miR-142-3p und miR-142-5p, welche über die PAR-CLIP-Methode identifiziert worden waren, experimentell zu bestätigen. Zu diesen Targets gehörten MORF4L2, AKT1S1 sowie TSPAN3, welche mit verschiedenen malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können. Die Amplifikation dieser Targets erfolgte initial aus Testis cDNA, abschließend erfolgte die Klonierung in den pMIR-Vektor, mithilfe dessen mRNA/miR-142-Interaktionen anhand von Luciferase-Assays bestätigt werden konnten. Neben der miR-142 wurden miR-142 Mutanten, welche durch ihre Mutation in der 3p oder 5p „Seed“-Sequenz ihre Fähigkeit zur spezifischen Interaktion verloren haben, verwendet. Hierdurch sollte bestätigt werden, dass eine Aussage über die mRNA/miRNA-Interaktion möglich ist, ohne vorher die Bindestelle in der 3'UTR zu mutieren.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Mutation der Bindestellen im Target, sowohl MORF4L2 als auch AKT1S1 stellten sich als Target für die miR-142-3p dar. Eine Interaktion mit MORF4L2 war, nach Mutation der Bindestelle in der 3'UTR, nicht mehr nachweisbar. Bei AKT1S1, welche zwei potentielle Bindestellen aufwies, konnte nach Mutation der Bindestelle mit der höheren Affinität zur miRNA, keine Interaktion mehr nachgewiesen werden.

Eine Besonderheit stellte das TSPAN3 dar, welches als einziges ein 5p-Target darstellte. Hier konnte trotz Mutation der vorhergesagten Bindestelle eine anhaltende Interaktion dargestellt werden. Innerhalb eines Fragments von 270 nt konnte auch nach Mutation der potentiellen 5p-Bindestelle eine Interaktion weiterhin nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt sich nur durch das Vorhandensein einer weiteren nicht identifizierten 5p- Bindestelle erklären.

Summary

Post-transcriptional regulation of gene expression by so-called microRNAs was identified in the early 1990's. Since their discovery, the function of miRNAs has been the subject of intense research, in particular in respect to their role in human disease. MiRNAs have been assigned various functions in biological processes; in particular, some are considered to represent either tumour suppressors or oncogenes. The miRNA precursor of about 80nt is further processed into a 3' and a 5' miRNA which target with their "seed"-sequence the 3' untranslated region ("3'UTR") of messenger RNAs (mRNAs) and down-regulate their protein synthesis. Specific miRNAs have been implicated in the formation of certain malignant tumours. Various publications have shown that miRNA miR-142 is down-regulated in a variety of different tumours. Further, the miR-142 gene has been shown to harbour mutations in diffuse B-cell lymphoma (DLBCL) and acute myeloid leukaemia (AML) which affects the mature 3' and 5' miRNAs and most likely inactivate their functionality. The goal of this dissertation was the experimental confirmation of targets of miR-142-3p and miR-142-5p that were predicted by the "PAR-CLIP" method.

The targets that were analysed in detail were the mRNAs of the MORF4L2, AKT1S1 and TSPAN3 genes which had been found to be associated with various human diseases. The amplification of the target sequences within the 3' untranslated regions ("3'UTR") was carried out using human testis cDNA libraries. The PCR products were inserted into the reporter vector pMIR. The regulation of the different 3'UTRs within pMIR were then assayed by co-transfection of expression vectors for miR-142-wt or different miR-142 mutants that harbour mutations in their so-called "seed-sequence". The idea of this procedure was to show that the use of these mutants abolished the need to mutate the respective target sequence within the mRNA.

In addition, the target sequences were mutated in the cloned 3'UTRs to demonstrate that they are valid targets for miR-142. It was demonstrated that MORF4L2 and AKT1S1 were indeed targets for miR-142-3p. We found that MORF4L2 had one binding site for miR-142-3p, while only one of two potential binding sites in the AKT1S1 3'UTR was a target for miR-142-3p.

For the TSPAN3 mRNA, which is a potential target of miR-142-5p, the results were ambiguous. After mutation of the predicted target sequence within a fragment of 270 nt, the reporter was still responsive to miR-142. The results could be explained by the presence of an additional non-identified miR-142-5p binding site.

2. Einleitung

2.1 Überblick

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Bestätigung potentieller regulatorischer Vorgänge zwischen 3' untranslatierten Regionen (3'UTRs) auf messenger RNAs (mRNAs) und microRNAs (miRNAs). Der Ausgangspunkt der Arbeit war die „PAR-CLIP“ Methode (*Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation*) [Hafner et al., 2010], mit der eine Bestimmung von Protein-RNA-Interaktionen möglich ist. Es werden photoreaktive Nukleosid-Analoga, welche in die mRNA eingebaut werden, mit UV-Licht (365nm) bestrahlt. Es kommt dabei zu einer Vernetzung von mRNA/miRNA-Komplexen mit interagierenden „Argonate“ (Ago)-Proteinen, welche dann durch eine Immunpräzipitation der Ago-Proteine, isoliert werden können. Nach Isolation und Sequenzierung der mRNAs konnte eine cDNA Bank erstellt werden, in der verschiedene 3'UTRs sowie miRNAs identifiziert wurden, für die bioinformatisch eine Interaktion vorhergesagt wurde. Die Vorhersagen von insgesamt drei 3'UTRs mit der miR-142 sollten in dieser Arbeit experimentell untersucht werden.

2.2 RNA-Interferenz

Der posttranskriptionelle, sequenzspezifische Mechanismus zur Regulation der Genexpression, an dem nicht-kodierende RNA-Moleküle beteiligt sind, wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. 1990 gab es im Rahmen biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen erstmals Hinweise auf ein mögliches posttranslationales inhibitorisches Regulationssystem [Napoli et al., 1990]. Durch die Übertragung einer dsRNA eines Schlüsselenzyms in Petunien sollte die Farbstoffsynthese angeregt werden, um die Farbe der Blätter zu intensivieren. Jedoch blieb die stärkere Blütenfärbung aus und es zeigten sich gegen alle Erwartungen hellere und sogar entfärbte weiße Blütenblätter [Napoli et al., 1990]. Dieses Phänomen wurde als Cosuppression bezeichnet, da nicht nur die Ausbildung der Merkmale des transduzierten Gens, sondern auch die des endogenen Gens unterdrückt wurden. 1993 entdeckten Wissenschaftler bei Studien zu Entwicklungsmutanten von *Caenorhabditis elegans* ein 22nt-langes Transkript namens lin-4. Es stellte sich heraus, dass lin-4 selbst nicht für ein Protein kodiert, sondern komplementär zu mehreren Abschnitten der 3'untranslatierten Region der lin-14-mRNA ist und so zu einer Inhibierung der lin-14 Translation führt [Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993]. 1998 publizierten Andrew Fire und Craig Mello einen Artikel in der Zeitschrift „Nature“, diese hatten zur Muskelkraftverstärkung der Nematode *Caenorhabditis elegans* eine messenger RNA für ein Muskelprotein injiziert, in der Erwartung, dass dieses in entsprechende Proteine umgesetzt wird. Jedoch wurde durch

das Injizieren einer doppelsträngigen RNA auch das normale Muskeleiweiß in den Würmern ausgeschaltet [Fire et al., 1998]. Diese Entdeckung wurde 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigt. Im Jahr 1999 konnte nachgewiesen werden, dass solche RNA-Moleküle eine Länge von 21-23 Nukleotiden haben [Hamilton und Baulcombe, 1999]. Erst 2001 wurden diese kleinen ca. 22nt langen, nicht-kodierenden, endogenen RNA-Moleküle als „mircoRNA“ bezeichnet, welche in der Lage sind sequenzspezifische Regulation der Genexpression vorzunehmen [Ambros et al., 2003; Ruvkun, 2001].

2.3 microRNAs (miRNAs)

MiRNAs konnten in vielen eukaryotischen Organismen (Säugetern, Fischen, Insekten und Pflanzen) aber auch in verschiedenen Viren (EBV, CMV, KSHV, SV40) identifiziert werden [Bartel, 2004; Cullen, 2006; Pfeffer, 2005]. 2014 veröffentlichten Kozomara und Griffiths-Jones, dass es 24.521 miRNA-Loci in 206 Spezies gibt, welche zu 30.424 reifen miRNAs prozessiert werden können [Kozomara und Griffiths-Jones, 2014]. Es wird geschätzt, dass etwa 3% der menschlichen Gene für miRNAs kodieren und dass bis zu 30% der menschlichen, proteinkodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden [Sassen et al., 2008]. Die entsprechenden Gene der miRNAs können einzeln oder als Cluster angeordnet sein und befinden sich in Introns oder Exons kodierender und nichtkodierender Gene, sodass sie gemeinsam transkribiert werden [Rodriguez et al., 2004]. Es sind jedoch auch miRNAs beschrieben worden, die über eigene Promotoren verfügen [Aravin et al., 2003; Lai et al., 2003]. Die miRNA-Biogenese ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Diese beginnt mit der Transkription eines miRNA-Gens im Zellkern. Die Transkription erfolgt hauptsächlich durch die RNA-Polymerase II [Lee et al., 2004], selten auch durch die RNA-Polymerase III [Borchert et al., 2006]. Es entsteht hierbei das primäre Transkript (pri-miRNA), welches eine typische Haarnadelstruktur sowie eine für mRNAs typische m⁷G-Cap-Struktur am 5'Ende und einen Poly(A)Schwanz am 3'Ende aufweist [Borchert et al., 2006; Lee et al., 2004]. Die pri-miRNA wird durch einen Mikroprozessorkomplex gebunden (bestehend aus dsRNA-spezifischen RNase III „Drosha“ und Protein DGCR8 (Di-George Syndrom critical region Gen 8)) [Cai et al., 2006; Han et al., 2004]. Hierbei werden durch den Komplex die 5'-Cap- und 3'-Poly(A)-Strukturen entfernt, es entsteht die 60-100 Nukleotid lange Vorläufer-miRNA (pre-miRNA). Diese pre-miRNA können alternativ direkt durch Spleißen aus Introns erzeugt werden, sie werden dann „MiRtrons“ genannt [Berezikov et al., 2007].

Einleitung

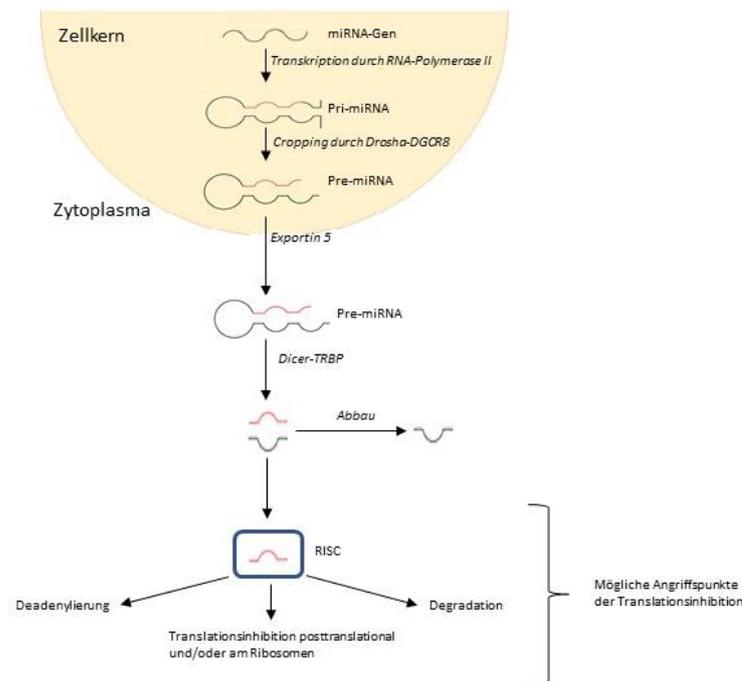


Abbildung 1: Schematische Darstellung der miRNA-Biogenese (in Anlehnung an: van Rooij und Olson, 2012). Nach Transkription und Cropping durch Drosha/DGCR8 gelangt die pre-miRNA über den Exportin 5 Transporter ins Zytoplasma. Hier entsteht durch Bindung an den zweiten Mikroprozessorkomplex (Dicer-TRBP) eine doppelsträngige RNA, von dem ein Strang in den RISC eingebaut wird.

Die pre-miRNA wird unter Verbrauch von GTP durch Bindung an Exportin 5 aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert, dort wird diese durch den nächsten Mikroprozessor gebunden [Lund et al., 2004; Yi et al., 2003] welcher aus der RNase III Dicer und dem Protein TRBP (= immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein) besteht. Dieser Komplex entfernt die Schleifenstruktur der pre-miRNA, wodurch ein ca. 22 nt langer miRNA-Doppelstrang mit 2 nt-Überhängen entsteht [Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001]. Einer der Stränge wird durch „Argonaprotein 2“ (Ago2) rekrutiert und so einem Multiproteinkomplex RISC (= RNA-induced silencing complex) zugeführt. Es stellte sich heraus, dass typischerweise diejenige miRNA in den RISC eingebaut wird, welche am 5'-Ende die schwächere Basenpaarbindung aufweist [Khvorova et al., 2003]. Nach der Inkorporation der miRNA in den RISC-Komplex wird dieser zur Ziel-mRNA transportiert. Die nun folgende Inhibition der Proteinexpression kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die perfekte Komplementarität der miRNA zur 3'UTR führt zu einer Degradation der Target-mRNA, während eine imperfekte Komplementarität die Repression der Translation zur Folge hat [Bartel, 2004; Engels und Hutvagner, 2006]. Eine Bindung der miRNA an ihre Target-mRNA führt aber letztendlich zu einem Abbau der Target-mRNA. Es zeigte sich hierbei, dass die Nukleotide 2-8 der miRNA ("Seed-Sequenz") eine kritische Rolle bei deren Bindung

spielen [Lewis et al., 2005]. Es werden verschiedene Hypothesen zur miRNA-vermittelten Translationsinhibition diskutiert [Fabian et al., 2010]. Zum einen könnte ein mRNA-Abbau durch Deadenylierung (mit Entfernung der 5`Cap-Struktur) oder durch eine direkte proteolytische Spaltung durch den RISC-Komplex erfolgen. Zum anderen wäre eine Hemmung der Translation durch miRNA-RISC-Komplex möglich, wobei dieser die Zusammenlagerung der ribosomalen Untereinheiten oder die Erkennung der 5`-m⁷G-Struktur verhindert. Auch eine vorzeitige Termination der Translation oder Elongationshemmung werden diskutiert. Andere Studien zeigten, dass mRNAs die bereits aufgrund von miRNA-Bindung nicht translatiert wurden in sogenannte „P-Bodies“ (Processing Bodies) gelagert werden, um später wieder signalabhängig translatiert zu werden [Bhattacharyya et al., 2006; Filipowicz et al., 2008; Liu et al., 2005]. Neben diesem klassischen Modell werden auch posttranskriptionelle Regulationen der Genexpression beobachtet in denen miRNAs an Sequenzen innerhalb der 5`-untranslatierten Region von mRNAs binden [Moretti et al., 2010; Zhou und Rigoutsos, 2014]. Statt einer Inhibition wurde auch von einer Induktion der Zielgen-Translation berichtet [Vasudevan et al., 2007].

2.3.1 Die Rolle von miRNAs bei der Krankheitsentstehung

Mit zunehmendem Bekanntheitsgrad der miRNAs wurde der Forschungsschwerpunkt schrittweise von der Identifikation neuer miRNAs auf die funktionelle Charakterisierung von miRNAs, insbesondere im Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungen, verschoben [Li und Kowdley, 2012]. Es zeigte sich, dass miRNA-Expressionsmuster gewebespezifisch sind und in vielen Fällen die physiologische Natur der Zelle definieren [Lim et al., 2005; Lagos-Quintana et al., 2002]. Zum Beispiel passte sich das Genexpressionsprofil einer nichtneuronalen Zelle dem eines Neurons an, wenn die neuronenspezifische miR-124 künstlich überexprimiert wurde [Lim et al., 2005]. Eine umfassendere miRNA-Profilings-Studie, zeigte dass verschiedene miRNA-Expressionsmuster spezifisch für verschiedene Krebsarten waren und so in der Lage waren, die Entwicklungslinie und den Differenzierungsstatus von Tumoren widerzuspiegeln [Lu et al., 2005]. Es zeigte sich zudem, dass viele miRNAs Schlüsselrollen in wichtigen biologischen Prozessen wie Zellteilung und Tod [Ng et al., 2012], Zellstoffwechsel [Rayner et al., 2011], intrazelluläre Signalübertragung [Zhang et al., 2012], Immunität [Taganov et al., 2006] und Zellbewegung [Png et al., 2012] haben. Dementsprechend werden zahlreiche Erkrankungen mit dysregulierter miRNA-Expression in Verbindung gebracht. Erstmals konnte um die Arbeitsgruppe um Carlo Croce, eine Beteiligung von miRNA bei menschlichen Krebserkrankungen nachgewiesen werden. Diese konnten zeigen, dass eine chromosomale Deletion des Lokus13q14, welche die miR-15 und -16 kodierenden Gene betrifft, häufig mit einer „B-cell chronic lymphocytic

leukemia“ (B-CLL) einhergeht [Calin et al., 2002]. MiRNAs können darüber hinaus als Onkogene (z.B. miR-17-92-Cluster) und Tumorsuppressoren (z.B. miR-15a/16) agieren [Olive et al., 2010; Aqeilan et al., 2010]. Es konnte anhand weiterer Studien demonstriert werden, dass aufgrund von miRNA-Dysregulationen in Tumorzellen, die Stoffwechsellage sich zugunsten der Tumorzellen verändert [Cosmopoulos et al., 2009; Hart et al., 2014; Imig et al., 2011; Jansson und Lund, 2012; Pena-Chilet et al., 2014]. Eine veränderte miRNA-Expression kann unterschiedliche Ursachen haben. Es zeigte sich zum einen eine Korrelation zwischen der genomischen miRNA-Lokalisation und den Tumor-assoziierten Regionen, die für Translokationen, Amplifikationen oder fragilen chromosomalen Abschnitten prädisponiert sind [Ferdin et al., 2010]. Zum anderen können epigenetische Veränderungen (z.B. Histonmodifikationen oder veränderte DNA-Methylierung) wie auch Defekte der miRNA-Prozessierungsmaschinerie das miRNA-Expressionsprofil beeinflussen [Agirre et al., 2009; Saito und Jones, 2006; Ting et al., 2008; Kumar et al., 2007; Newman und Hammond, 2010].

2.3.2 miR-142

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist das mit 30% am häufigsten vorkommende Non-Hodgkin Lymphom weltweit und mit fast 90% der aggressiven B-Zell-Lymphome in der westlichen Welt vertreten [Swerdlow et al., 2008]. Unbehandelt endet diese aggressive, aus mehreren Subtypen bestehende Erkrankung, tödlich. Durch eine Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika und einem CD-20-Antikörper konnte das Gesamtüberleben signifikant gebessert werden, jedoch stellt ein Rezidiv dieser Erkrankung eine neue Herausforderung dar [Pfreundschuh et al., 2008]. Bereits 1989 wurde über eine Translokation in humaner aggressiver B-Zell-Leukämie, die den miR-142-Locus (dort als bcl3-Gen bezeichnet) und c-myc umfasst, berichtet [Gauwerky et al., 1989]. Es zeigte sich jedoch in EBV-positiven B-Zell-Lymphomen keine signifikante Veränderung der miRNA-Levels von miR-142-3p und 5-p [Imig et al., 2011]. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass in ca. 20% der untersuchten DLBCL die Gene für die miR-142-Vorläufersequenzen mutiert waren. Eine Mutation der miR-142 selbst war zuvor nicht beschrieben worden [Kwanhian et al., 2012]. Diese Ergebnisse konnten von Hezaveh et al. (2016) bestätigt werden [Hezaveh et al., 2016]. Weiterhin konnten Mutationen der miR-142 in Verbindung mit akuter myeloischer Leukämie gebracht werden [Trissal et al., 2018]. Das Gen der miR-142 befindet sich auf Chromosom 17q22. Es zeigte sich, dass aus der Haarnadel-pre-miRNA-142 sowohl die „Führungs“-miR-142-3p als auch der „Schwesternstrang“-142-5p hervorgeht und auch in Zellen exprimiert wird [Shrestha et al., 2017]. Der miR-142 wird eine Schlüsselrolle in der Differenzierung von Stammzellen zugesprochen, da sie (als miR-142-3p) in den undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen hochreguliert aber in den

Einleitung

differenzierten Zellen herunterreguliert ist. Zudem spielt die miR-142 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen während der Organogenese [Sladitschek und Neveu, 2015; Chen et al., 2004]. Bei Experimenten mit miR-142 Knock-out Mäusen zeigte sich, dass diese zwar lebensfähig waren, jedoch litten sie an verschiedenen hämatologischen Anomalien (Leukozytopenie, Thrombozytopenie) und Immunschwäche [Shrestha et al., 2015, Kramer et al., 2015]. Die miR-142-3p ist zudem an der Entwicklung des Lungenmesenchyms während der Embryonalentwicklung [Carraro et al., 2014], an der Entwicklung von Neutrophilen [Fan et al., 2014], an der Megakaryopoese [Chapnik et al., 2014] und an der Spezifikationsregulation definierter Hämangioblasten während der Organogenese [Nimmo et al., 2013] beteiligt. Weiterhin wird sie mit der Entstehung von Tumoren wie Glioblastom [Chiou et al., 2013], Brustkrebs [Isobe et al., 2014], testikulären Keimzelltumoren [Tanaka et al., 2013] und HIV-Enzephalitis [Chaudhuri et al., 2013] in Verbindung gebracht. Eine Überexpression von miR-142-5p führte zu einer erhöhten Tumorzellproliferation und verminderter Apoptose, während Silencing von miR-142-5p gegensätzliche Effekte zeigte [Ma et al., 2016]. RNA-Viren können zudem die miR-142-3p binden und so eine angeborene Immunität unterdrücken, sodass neurologische Erscheinungen gefördert werden [Trobaugh et al., 2014]. Zudem wird in verschiedenen Studien vorgeschlagen, miR-142 als Biomarker zu verwenden, unter anderem zur Früherkennung von chronischer antikörpervermittelter Abstoßung nach Nierentransplantation (miR-142-5p zusammen mit miR-486-5p) [Iwasaki et al., 2016] oder als Marker nach perkutaner koronarer Intervention bei bekannter koronarer Herzerkrankung (unter dualer Plättchenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel). Bei letzterem waren hohe Plasma-miR-142-Spiegel mit einem hohen Risiko für schwere unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse (MACE) assoziiert [Tang et al., 2018]. In den verschiedenen Studien zeichnete sich ab, dass jede Isoform (miR-142-3p vs. -5p) sowohl gemeinsame als auch eigene Transkriptionsziele haben kann, zudem kam es in einigen Fällen zu gegensätzlichen Auswirkungen auf spezifische Signalwege [Shrestha et al., 2017].

Tabelle 1 gibt einen kleinen Überblick über einige Erkrankungen mit denen die miR-142 in Verbindung gebracht wird.

Erkrankung	miR-142-3p	miR-142-5p	Anmerkung	Publikation
Kardiale Hypertrophie	erniedrigt	erniedrigt	Überexpression von miR-142-5p war mit Apoptose und kardialer Dysfunktion verbunden	Sharma et al., 2012

Einleitung

Lungenadenokarzinom	erhöht			Kaduthanam et al., 2013
Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom		erniedrigt	Überexpression von miR-142-5p unterdrückte die Tumorzellproliferation; Hemmung von miR-142-5p förderte Lungenkrebswachstum	Wang et al., 2017
Akute/Chronische Herzinsuffizienz	erniedrigt	erniedrigt		Vegter et al., 2016
EBV-positive T-Zellen/ NK-Lymphomen	erniedrigt			Motsch et al., 2012
Akute Leukämie	erniedrigt			Wang et al., 2012
Duktales Pankreasadenokarzinom	erniedrigt			Godfrey et al., 2018
Magenkarzinom		erniedrigt	Kombination mit hohem miR-375-Spiegel war mit schlechterem Überleben und erhöhter Rezidivrate verbunden	Zhang et al., 2011
MALT-Lymphom des Magens		erhöht		Saito et al., 2012
HCC (Hepatocellular carcinoma)	erniedrigt	erniedrigt	Überexpression von miR-142-5p reduzierte HCC-Zellwachstum	Law und Wong, 2011 Lou et al., 2017 Tsang et al., 2015
Ösophagus-Plattenepithelkarzinom	erhöht		Höhe korrelierte mit schlechterer Prognose	Lin et al., 2012
Artherosklerose		erhöht		Xu et al., 2015
Zervixkarzinom	erniedrigt			Deng et al., 2015
Glioblastom	erniedrigt			Chiou et al., 2013
Kardiovaskuläre Erkrankungen	erniedrigt	erniedrigt		Sharma et al., 2012
Brustkrebs	erhöht	erhöht		Isobe et al., 2014

Tabelle 1: Übersicht über einige miR-142 assoziierte Erkrankungen

2.4 MORF4L2 (MRGX)

1999 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Bertram die Entdeckung einer Gruppe von Genen, welche in der Lage waren in unsterblichen Zellen einen Alterungsprozess und somit eine Zellsterblichkeit hervorzurufen [Bertram et al., 1999; Bertram und Pereira-Smith, 2001]. Der Mortalitätsfaktor auf Chromosom 4 (MORF4) wurde basierend auf dieser Fähigkeit isoliert. Basierend auf Sequenzhomologien wurden MORF4-verwandte Gene (MORF-related genes = MRG) identifiziert, welche als MRG/MORF-Transkriptionsregulatoren zusammengefasst werden. Es handelt sich hierbei unter anderem um MORF4L1 (Mortality factor 4 like 1 oder auch MRG-15), dessen Gen sich auf Chromosom 15 befindet und MORF4L2 (Mortality factor 4 like 2 oder auch MRGX), dessen Gen sich auf Chromosom X q22.2 befindet. Beide zeigten Veränderungen in der RNA-Expression während der Zellteilung und der Zellalterung [Bertram et al., 1999; Tominaga et al., 2005]. Das Gen für MORF4L2, welches sich auf dem X-Chromosom befindet, kodiert für ein 288 Aminosäuren langes Protein. Abbildung 2 zeigt schematisch die Struktur des MORF4L2:

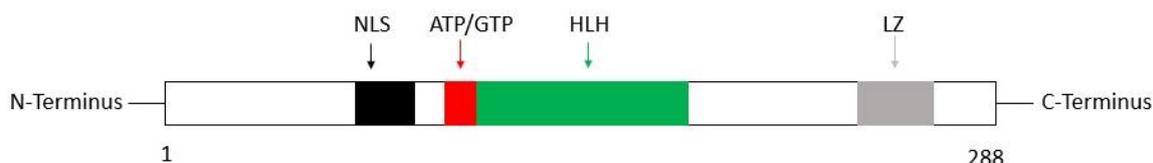


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur des MORF4L2 mit einem C- und N-Terminus. Die 288 Aminosäuren lange Sequenz besitzt eine NLS-Sequenz (nuclear localisation signal), welche auf eine Lokalisation im Zellkern hinweist. Zudem besitzt es eine ATP/GTP-Binderegion gefolgt von einer HLH (Helix-Loop-Helix) Domäne und einem Leucin-Zipper am C-Terminus.

MORF4L2 wird ubiquitär in allen Zellen exprimiert. Es hat eine ATP/GTP Binderegion gefolgt von einer Helix-Loop-Helix (HLH) und einem Leucin-Zipper (LZ) am C-Terminus. Zudem besitzt MORF4L2 ein Kernlokalisierungsmotiv (NLS= nuclear localisation signal) [Bertram et al., 1999; Chen et al., 2010] und eine N-terminale Sequenz, die keine Homologie zu anderen Proteinen aufweist [Tominaga et al., 2003]. Entsprechend der Anwesenheit einer NLS ist MORF4L2 im Zellkern lokalisiert. MORF4L2 und auch MORF4L1 sind integrale Bestandteile der NuA4/Tip60-Histon-Acetyltransferase (HAT) und auch der Histondeacetylase (HDAC) Komplexe [Doyon et al., 2004; Hayakawa et al., 2007]. Beide Proteine interagieren mit Histon-Deacetylasen und Acetyltransferasen, was darauf hindeutet, dass sie bei der Regulierung der Chromatindynamik und vermutlich der Transkriptionskontrolle eine Rolle spielen [Chen et al., 2010]. Zudem wird ihnen eine Rolle in der DNA-Reparatur nach Einwirkung von ionisierender Strahlung zugesprochen [Sy et al., 2009]. MORF4L2 sowie MORF4L1 beeinflussen den Zellzyklus- sowie die Zellproliferation [Pena und Pereira-Smith, 2007]. Je nach untersuchtem Zelltyp hatte MORF4L2 sowohl eine repressive als auch eine

Einleitung

stimulierende Wirkung bei der Transkriptionsregulation des Transkriptionsfaktors B-myb, sodass von einer zellspezifischen Aktivität ausgegangen wurde. Für die stimulierende Wirkung in HeLa-Zellen wurde die HLH – Region sowie der LZ benötigt. Eine Transkriptionsrepression, welche in der Blasenkarzinomlinie EJ beobachtet wurde, ging nach Mutationen der Regionen HLH und LZ verloren [Tominaga et al., 2003; Joaquin und Watson, 2003]. Diese Repression wurde durch ein Histondeacetylase (HDAC)–Hemmer verstärkt; dies könnte ein möglicher Wirkmechanismus der MRG-Familie sein, da diese durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonen die zelluläre Proliferation beeinflussen [Yochum und Ayer, 2002]. Als zusätzlichen Hinweis auf den Einfluss von MORF4L2 auf die Transkription kann der Umstand gewertet werden, dass ein Fusionsprotein aus MORF4L2 mit der Gal4-DNA-bindenden Domäne an den mSin3A-TLE-Corepressor-Komplex bindet und die Transkription des Gal4-abhängigen Luciferase-Reporters inhibiert [Yochum und Ayer, 2002]. Daher wird MORF4L2 eine Transkriptionsaktivierung als auch Repression zugesprochen. MORF4L2 spielt eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung und Chemotherapieresistenz. Es zeigte sich eine bis zu 20fach erhöhte Menge an MORF4L2 in CIN III-Läsionen (CIN = Cervicale Intraepitheliale Neoplasie) welches mit einer Chromatinremodelling und schlussendlich erhöhter Neigung zu Zervixkarzinomen einherging [Shadeo et al., 2008]. Eine erhöhte Expression von MORF4L2 wurde auch bei der Therapie von Lungenadenokarzinomen dokumentiert. Die erhöhte Expression ging mit einer Medikamentenresistenz des Karzinoms einher [Kuo et al., 2015]. Auch bei Patienten welche 5-Fluorouracil (5-FU) im Rahmen der Therapie eines kolorektalen Karzinoms erhielten, war eine erhöhte Expression von MORF4L2 mit einem schlechteren Ansprechen auf das Medikament verbunden [Pezo et al., 2008]. In Glioblastomzellen führte eine MORF4L2 Überexpression zu Zellkernveränderung mit induziertem Zelltod. Dies wurde durch Koexpression von PCD17 (Paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen PCD17/cdr2) verhindert, sodass davon ausgegangen wird, dass PCD17/cdr2 einen regulatorischen Effekt auf MORF4L2 in Purkinje-Zellen hat [Sakai et al., 2002]. MORF4L2 wird zudem eine Rolle beim Medikamentenstoffwechsel, Lipidstoffwechsel als auch bei der Entwicklung und Funktion des endokrinen Systems zugesprochen [Kuete et al., 2012].

2.5 AKT1S1 (PRAS40)

AKT1S1 (AKT1S1=AKT1 substrate 1; PRAS40=Proline-rich Akt substrate of 40kDa) wurde 2003 als ein prolinreiches 40kDa großes Protein identifiziert, welches an 14-3-3 Protein in insulinbehandelten Leberzellen von Ratten bindet [Kovacina et al., 2003]. 2004 wurde es durch die Arbeitsgruppe um Beausoleil als Phosphoprotein aus Zellkernextrakten von Helazellen isoliert [Beausoleil et al., 2004]. Es zeigte sich, dass es ein Substrat von Akt, ein Raptor-Bindeprotein und somit ein physiologisches mTORC1 Substrat ist [Oshiro et al., 2007; Sancak et al., 2007; Thedieck et al., 2007; Van der Haar et al., 2007]. Das Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 19q13.33 und kodiert für ein 256 Aminosäuren langes Protein [Kovancina et al., 2003; Nascimento et al., 2006; Pallares-Cartes et al., 2012]. Es kommt ubiquitär in Hirn-, Muskel- und Herzmuskelzellen, sowie in Leber- und Körperfettzellen vor [Kovacina et al., 2003; Beausoleil et al., 2004; Shimay et al., 2004; Nascimento et al., 2006]. Es enthält am N-Terminus zwei prolinreiche Regionen, deren genaue Funktion bisher unbekannt ist [Kovacina et al., 2003], jedoch könnten diese Regionen potentielle Bindungspartner für Proteine mit SH3- (Scr homology 3) und/oder WW-Domänen darstellen [Macias et al., 2002]. Diesen prolinreichen Regionen folgen zwei kurze Sequenzen, die bei der mTORC1- Bindung und Phosphorylierung von mTORC1 Substraten eine Rolle spielen: TOS-motif und RAIP-motif [Schalm und Blenis, 2002; Tee und Proud, 2002; Schalm et al., 2003]. Das TOS-motif befindet sich zwischen den Aminosäuren 129–133 [Fonseca et al., 2007; Oshiro et al., 2007; Wang et al., 2007], die Lys-Ser-Leu-Pro-Sequenz welche dem RAIP-motif sehr ähnlich ist [Tee und Proud, 2002; Beugnet et al., 2003], befindet sich zwischen den Aminosäuren 182-185. Das Carboxylende des AKT1S1 enthält eine 10-Aminosäuren lange Sequenz (Position 218-227), welche mit einer leucinreichen Kernexportsequenz (NES=nuclear export sequence) übereinstimmt [La Cour et al., 2003]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass AKT1S1 sowohl im Zytosol als auch im Zellkern vorkommt [Kim und Chen, 2000; Saji et al., 2005; Furuya et al., 2006; Panasyuk et al., 2006; Rosner und Hengstschlager, 2007; Rosner und Hengstschlager, 2008; Beausoleil et al., 2004]. Im Zellkern dominiert das an Position Thr²⁴⁶ phosphorylierte AKT1S1 [Saito et al., 2004; Nascimento et al., 2006; Saito et al., 2006].

Abbildung 3 zeigt schematisch die Struktur von AKT1S1.

Einleitung

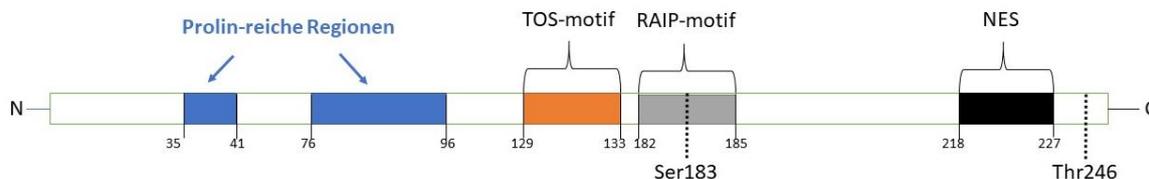


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur von AKT1S1 mit regulatorischen Regionen. Die 256 Aminosäure lange Sequenz besitzt am N-Terminus zwei prolinreiche Regionen (blau). Denen folgen 2 kurze Sequenzen (TOS- (orange) und RAIP-motif (grau)), welche bei der Bindung von mTORC1 (Mammalian target of rapamycin complex 1) eine Rolle spielen. Am C-Terminus befindet sich die Kernexportsequenz (NES= nuclear export sequence) (schwarz). Zudem werden hier Phosphorylierungspositionen Ser¹⁸³ (Phosphorylierung durch mTORC1) sowie Thr²⁴⁶ (Phosphorylierung u.a. durch AKT) angegeben, die bei der Regulation des mTORC1 eine wichtige Rolle spielen.

Zahlreiche Arbeiten beschäftigten und beschäftigen sich mit der Regulation des AKT1S1 durch Phosphorylierung. Dies kann an verschiedenen Positionen und v.a. an Thr²⁴⁶ AKT-abhängig und AKT-unabhängig geschehen. Die Phosphorylierung an Thr²⁴⁶ ist jedoch größtenteils AKT-abhängig [Nascimento et al., 2010]. AKT selbst ist eine dem Signalweg vorgeschaltete Serin-/Threonin-Proteinkinase (Proteinkinase B), welche Phosphatgruppen auf Substrate überträgt. Der mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) ist ein Proteinkomplex aus verschiedenen Proteinen und besitzt eine katalytische Untereinheit (mTOR) sowie ein regulatorisch assoziiertes Protein (Raptor) [Hara et al., 2002; Kim et al., 2002; Loewith et al., 2002; Kim et al., 2003]. Manche Autoren beschreiben AKT1S1 als festen, inhibitorischen Bestandteil des mTORC1. Der Komplex ist an zahlreichen Regulationen von zellulären Prozessen beteiligt unter anderem an der Regulation der Zellgröße, mRNA Translation, Ribosomenbiogenese, Lipidbiogenese, vesikulärer Transport, Autophagie und mitochondrialen Funktionen [Sengupta et al., 2010; Zoncu et al., 2011]. Abbildung 4 zeigt beispielhaft die Darstellung der intrazellulären Signalkaskade, an der AKT1S1 beteiligt ist.

Einleitung

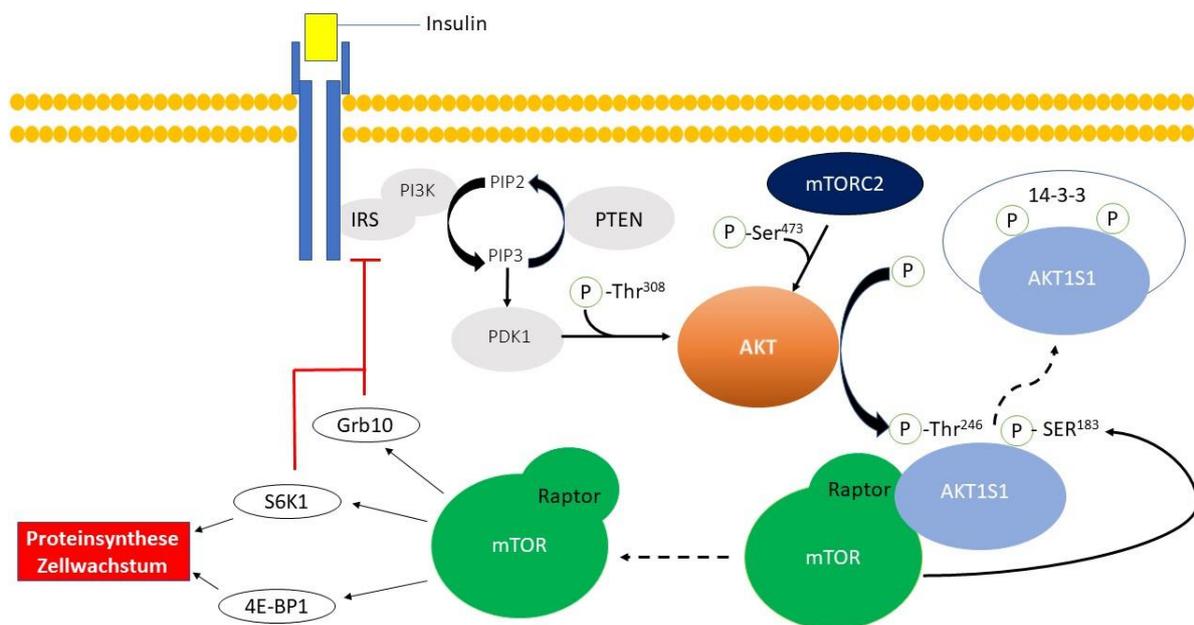


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der intrazellulären Signalkaskade von AKT1S1. Nach Bindung des Insulins an seinen Rezeptor kommt es über Phosphorylierungen mehrerer Substrate zu einer Phosphorylierung von Akt an Thr³⁰⁸ durch PDK1. Durch das phosphorylierte Akt erfolgt die Phosphorylierung von AKT1S1 an Position Thr²⁴⁶ sodass dieses hierdurch von mTORC1 dissoziiert und an Protein 14-3-3 bindet. Eine Dissoziation von AKT1S1 vom mTORC1 erfolgt ebenfalls durch eine Phosphorylierung des Akt durch mTORC2 an Ser⁴⁷³.

AKT1S1 wird zudem mit vielen verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht. Der Signalweg ist meist hyperphosphoryliert, sodass die mTORC1-Aktivität gesteigert ist. Hieraus resultieren eine reduzierte Apoptose und eine Steigerung der Proliferation. In aggressiven Melanomen sowie in Tumorzell-Progressionsmodellen konnte man eine Steigerung der AKT-Menge und des Thr²⁴⁶-phosphoryliertem AKT1S1 nachweisen [Madhunapantula et al., 2007; Vivanco und Sawyers, 2002; Robertson, 2005; Cheng et al., 2005]. Eine regulatorische Komponente in der Regulation der p53-vermittelten und der Caspase 3-vermittelten Apoptose wird diskutiert [Patel und Player, 2008, Havel et al., 2015]. Aufgrund seiner mTOR-inhibitorischen Funktion wird dem AKT1S1 eine Regulation in der Autophagie zugesprochen [Chan et al., 2009; Jung et al., 2009]. Weitere Studien belegen, dass in HER2-positiven Brustkrebszellen bei Anwesenheit von Thr²⁴⁶-phosphoryliertem AKT1S1, ein erhöhtes Risiko einer Tumorzellprogression besteht. Yuan und Mitarbeiter gingen zudem davon aus, dass dies ein Biomarker für einen Trastuzumab-resistenten Brustkrebs sei [Yuan et al., 2015]. Bei Patienten mit Magenkrebs war eine Phosphorylierung des AKT1S1 an Thr²⁴⁶ mit Lymphknotenmetastasen, lymphatischer und vaskulärer Infiltration und einem niedrigeren Überleben assoziiert [Lu et al., 2014]. In Melanomzellen zeigte sich durch Absenkung des Thr²⁴⁶-phosphoryliertem AKT1S1 eine Steigerung der Apoptose in

Einleitung

Tumorzellen, sowie eine Sensitivitätssteigerung der Melanomzellen auf apoptoseinduzierende Agentien [Madhunapantula et al., 2007; Malla et al., 2015; Saito et al., 2004]. Mit einem AKT-Inhibitor GSK690693 konnte eine Reduktion von AKT und AKT-nachgeschalteten Substraten, vor allem AKT1S1 nachgewiesen werden. Es kam hierbei zu einer signifikanten Tumorreduktion beim Leberzellkarzinom (HCC=hepatocellular carcinoma) und bei Brustkrebs [Rhodes et al., 2008; Ma et al., 2015]. Es werden zudem weitere verschiedene Erkrankungen aufgrund der aktuellen Studienlage mit AKT1S1 in Verbindung gebracht. Hierzu zählen u.a. das Ewing Sarkom [Huang et al., 2012], Radiatio-resistentes-nicht-kleinzelliges-Bronchialkarzinom [Kim et al., 2011], Alzheimer [Shang et al., 2012], zerebrale Ischämie [Saito et al., 2004], Prostatakrebs [Zhang et al., 2009] und Diabetes mellitus [Nascimento et al., 2006; Wiza et al., 2014] mit den diabetogenen Folgeerkrankungen [Chong, 2016]. In Darmkrebsexperimenten konnte eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT, AKT1S1 und p70S6K mit assoziierter Chemotherapieresistenz beobachtet werden [Baricevic et al., 2014]. Darüber hinaus wird bei einer AKT1S1-Überexpression von einer neuroprotektiven Wirkung, durch Dämpfung der Apoptose nach transitorischer ischämischer Attacke, zerebraler Ischämie sowie Rückenmarksverletzungen, ausgegangen [Sharma et al., 2009; Saito et al., 2004]. Die neuroprotektiven Effekte wurden mit einer erhöhten AKT1S1-Bindung an Protein 14-3-3 in Verbindung gebracht [Yu et al., 2008], zudem wurde eine Minderung der prioneninduzierten Apoptose in neuronalen Zellen nachgewiesen, in denen AKT1S1 überexprimiert wurde [Yang et al., 2017].

2.6 Tetraspanine

Die Tetraspanine (TM4SF) umfassen eine Gruppe von Transmembranproteinen, welche bei der Regulation von molekularen Signalwegen, Zelladhäsion, Migration, Fusion und Apoptose eine Rolle spielen. Sie wurden erstmals 1996 von der Arbeitsgruppe um Berditchevski als eigenständige Gruppe von Zelloberflächenkomplexen, an der medizinischen Hochschule Harvard publiziert [Berditchevski et al., 1996]. Bereits in den frühen 1990er Jahren wurden bei Klonierungen von Membran-Antigenen eine Gruppe von Proteinen (u.a. Tetraspanin 8) kloniert, dessen Funktion bis dato unbekannt war [Boucheix und Rubinstein, 2001; Charrin et al., 2009; Hemler, 2003; Maecker et al., 1997; Yanez-Mo et al., 2009]. In Säugetierzellen sind 33 verschiedene Tetraspanine beschrieben worden [Charrin et al., 2014]. Tetraspanine bestehen aus 200-350 Aminosäuren und besitzen 4 hydrophobe transmembrane Helices (TM1-TM4), einen kleinen extrazellulären Loop (SEL= small extracellular Loop; ca. 13-31 Aminosäuren) und großen extrazellulären Loop (LEL= long extracellular Loop; ca. 69-132 Aminosäuren) mit variabler Größe und Sequenz [Kitadokoro et al., 2001; Hemler, 2005]. Der große Loop beeinflusst die Interaktionen mit anderen Proteinen, wohingegen die intrazellulären Regionen, das N-terminale und C-terminale Ende, möglicherweise eine Kommunikation mit Signalwegen und zytoskelettalen Molekülen ermöglichen [Stipp et al., 2003; Levy und Shoham, 2005]. Der große Loop enthält eine konstante Region, welche in 3 Alpha-Helices unterteilt ist (A,B,E), sowie eine variable Region, welche verschiedene Regionen für alle bisher bekannten Protein-Protein-Interaktionen enthält [Hemler, 2005]. Der B-Helix folgt eine Cystein-Cystein-Glycin-Sequenz (CCG-motif), die in allen Tetraspaninen vorhanden ist. Die erste, dritte und vierte transmembrane Domäne enthalten polare Reste mit bisher unklarer Funktion. Tetraspanine sind in unterschiedlichem Ausmaß glykosyliert und durch posttranslationale Addition von Palmitat an membranproximalen Cysteinresten modifiziert [Lazo, 2007; Stipp, 2003; Hemler, 2001; Brown und London, 1998; Berditchevski et al., 2002; Charrin et al., 2002; Yang et al., 2002].

Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau eines Tetraspanins.

Einleitung

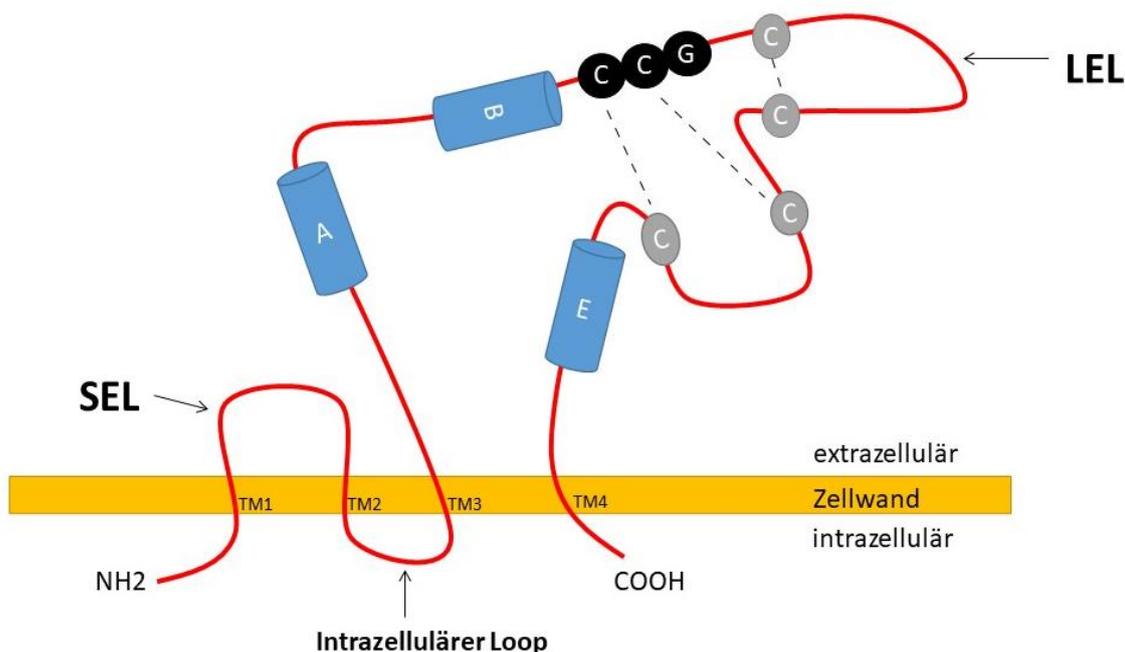


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Tetraspanins: Tetraspanine enthalten 4 transmembrane Domänen (TM 1-TM 4), einen kleinen extrazellulären Loop (SEL = small extracellular loop), einen kurzen intrazellulären Loop (ca. 4 Aminosäuren) und einen langen extrazellulären Loop (LEL = long extracellular loop). Der LEL enthält eine konstante Region (welche in 3 Alpha-helices (A,B,E) unterteilt ist) sowie eine variable Region (welche Regionen für Protein-Protein-Interaktionen enthält). Alle Tetraspanine enthalten ein CCG-Motiv, welches der B-Helix folgt. Die Cysteine dieser Region bilden mit anderen Cysteinen des LEL intramolekulare Disulfidbrücken. Zudem besitzen viele Tetraspanine andere Cysteine, welche ebenfalls intramolekulare Disulfidbrücken bilden können. Die transmembranen Domänen 1, 3 und 4 enthalten typischerweise polare Aminosäuren Asn/Glu/Gln, mit bisher unklarer Funktion. Fast alle Tetraspanine enthalten membranproximal Cysteine, welche eine Palmitoylierung eingehen können und für die Bildung von TEM relevant sind [Kitadokoro et al., 2001; Charrin et al., 2002; Helmer, 2005].

Obwohl unterschiedliche Tetraspanine von verschiedenen Zelltypen in einer Anzahl von 30.000-100.000 Kopien pro Zelle, so z.B. auch Immunzellen (ausgenommen Erythrozyten), exprimiert werden, ist ihre genaue Funktion noch Gegenstand laufender Forschungen. Sie haben im Gegensatz zu anderen Zelloberflächenproteinen die Fähigkeit, untereinander als auch mit verschiedenen Enzymkaskaden, Signalmolekülen und Rezeptoren (Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Laminin, EGFR, Proteinphosphatasen, konventionelle PKCs, Typ II Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI4K), (ERK1/2)/ MAPK-Signalweg) zu interagieren und Mikrodomänen (Tetraspanin-enriched microdomains = TEM) zu organisieren [Berditchevski et al., 1996; Hemler, 2003 und 2005; Boucheix und Rubinstein, 2001; Charrin et al., 2009; Yanez-Mo et al., 2009; Wright et al., 2004]. Der genaue Mechanismus der Tetraspanin-enriched microdomains (TEM) ist noch nicht vollständig verstanden. Die verfügbaren Daten unterstützen die These, dass TEM dynamische Organisatoren der Zellmembran darstellen und die interagierenden Bindepartner zusammenbringen, um als Plattform für die intrazelluläre Signalübertragung zu dienen

[Yamada et al., 2008; Carloni et al., 2004]. Hierfür besitzen die Tetraspanine die Fähigkeit, Dimere und Multimere zu bilden; dies wird durch die Palmitoylierung der Cysteine der Transmembrandomänen reguliert. Diese Tetraspanin-Homodimere stellen mithilfe der Palmitoylierung der Cysteine das Grundgerüst der TEM dar. Diese können direkt und indirekt mit anderen Tetraspaninen und nicht-Tetraspaninproteinen interagieren. Es können unterschiedliche Partnerproteine, in funktionell wichtige Komplexe, rekrutiert werden [Stipp et al., 2003; Kovalenko et al., 2004]. Durch diese Interaktion mit anderen Tetraspaninen und Proteinen wird ein weitreichendes und membranübergreifendes Proteinnetzwerk aufgebaut. Solche Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen (TEM oder Tetraspanin web) tragen zur Bildung und Stabilität der funktionellen Signalübertragung von Komplexen bei, die an Zellaktivierung, Adhäsion, Motilität, Differenzierung und Malignität beteiligt sind. Tarrant et al. (2003) sehen die Hauptrolle der Tetraspanine in der Organisation von Zelloberflächenproteinen für die Signaltransduktion [Tarrant et al., 2003], da es zahlreiche cis-Wechselwirkungen zwischen Tetraspaninen und benachbarten Membranproteinen in TEM gibt [Hemler, 2005]. Es wird davon ausgegangen, dass Tetraspanine die Post-Liganden-Bindung sowie eine Integrin-vermittelte Adhäsionsverstärkung regulieren [Hemler, 2005]. Tetraspanine werden zudem aufgrund verschiedener Studien mit unterschiedlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Verschiedene Mutationen in Tetraspaninen zeigten Zusammenhänge mit X-chromosomaler geistiger Behinderung (TM4SF2) [Zemni et al., 2000; Abidi et al., 2002], Netzhautdystrophien [Kohl et al., 1998] sowie Nephritis im Endstadium mit prätibialer Epidermolysis bullosa [Karamatic et al., 2004]. Es wird den Tetraspaninen eine Rolle bei Virusinfektionen in verschiedenen Stadien des Virusreplikationszyklus zugesprochen [Florin und Lang, 2018], zudem gibt es Hinweise darauf, dass sie eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr haben [Jones et al., 2011; Levy, 2014; van Spriell, 2011]. Eine Regulation der Proteolyse des Amyloidvorläuferproteins bei Alzheimererkrankungen [Seipold und Saftig, 2016] macht Tetraspanine auch neurologisch interessant für therapeutische Ansätze. Besondere Aufmerksamkeit erhalten Tetraspanine, da von einer ihnen zugesprochenen regulatorischen Komponente bei der Krebsentstehung und Metastasierung ausgegangen wird. Möglicherweise besitzen sie die Fähigkeit die Migration von Krebszellen in die umgebende Matrix zu regulieren [Boucheix und Rubinstein, 2001; Hemler, 2014; Zöller, 2009]. Je nach Tetraspanin werden diesen sowohl Metastasen-fördernde (CD151 und TSPAN8) als auch Metastasen-supprimierende (CD9 und CD82) Eigenschaften zugesprochen [Hemler, 2014; Romanska und Berditschewski, 2011; Zöller, 2009]. Eine gentechnische Entfernung des CD151 bei Mäusen reduzierte die metastatische Ausbreitung von Prostatakrebs [Copeland et al., 2013]. Die Verwendung von CD151-Antikörpern konnte eine Lungenmetastasierung bei Epidermoidkarzinomen, Fibroblastomen

und Kolonadenokarzinomen verhindern [Testa, 1999; Kohno, 2002]. Im kleinzelligen Lungenkarzinom wurde eine Überexpression von CD9 nachgewiesen, der Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen CD9 konnte die Apoptose chemotherapieresistenter Krebszellen triggern [Kohmo, 2010]. Zudem werden CD9 verschiedene Schlüsselrollen bei der Entstehung von Magenkarzinomen, Melanomen und Lymphomen zugesprochen (Soyuer et al., 2010; Hori et al., 2004; Ikeyama et al., 1993; Yoon et al., 2010).

2.6.1 TSPAN3 (TM4F8)

Über das Tetraspanin 3, dessen 3'UTR für diese Arbeit kloniert und untersucht wurde, ist wenig bekannt. Das Gen befindet sich im menschlichen Genom auf Chromosom 15q24.3 und wurde erstmals 1998 beschrieben [Todd et al., 1998]. Es ist eng verwandt mit dem TSPAN 4 und TSPAN 7 und ließ sich beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) in allen Phasen der Embryogenese durchgehend in ähnlichen Mengen nachweisen [Kashef et al., 2013]. Es zeigte sich, dass TSPAN3 sowie TSPAN4 und TSPAN 7 in Zellen mit einem hohen Migrationspotential, z.B. Neuralleistenzellen, exprimiert werden, sodass man davon ausgeht, dass sie eine wichtige Rolle in der Regulierung von Migrationsprozessen spielen [Kashef et al., 2013]. Eine Hochregulation von TSPAN3 war mit Wilms-Tumoren assoziiert [Maschietto et al., 2011] und wird mit dem Chronic-Fatigue Syndrom in Verbindung gebracht [Aspler et al., 2008]. Zudem ist es in einer Region lokalisiert, die an chromosomalen Re-Lokalisationen (Translokationen) t(1; 15) (p22; q22) beteiligt ist, die häufig beim Prostatakarzinom auftritt [Strefford et al., 2006]. Tiwari-Woodruff et al. (2004) identifizierten im Mausmodell ein neues Oligodendrozyten-spezifisches Protein/Claudin-11-assoziiertes Protein, welches auch OAP-1 genannt wurde, und das Pendant des humanen TSPAN3 darstellt [Tiwari-Woodruff et al., 2001 und 2004]. Des Weiteren stellten sie fest, dass das TSPAN3 einen Komplex mit OSP/claudin-11 und integrin- β 1 in Oligodendrozyten bildet. Eine TSPAN3 Überexpression erhöhte die Proliferation der Oligodendrozyten, eine Inkubation mit einem TSPAN3 Antikörper hemmte die Migration von primären Oligodendrozyten. Diese Daten zeigten eine regulatorische Wirkung des TSPAN3 in Proliferation und Migration von Oligodendrozyten. Dies ist für eine normale Myelinisierung sowie Reparatur essentiell. Eine Hemmung des TSPAN3-Gens in Dickdarmkrebszelllinien führte zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation [Moss et al., 2007]. Anhand von TSPAN3 Knockout-Mäusen zeigte sich, dass TSPAN3 eine wichtige Rolle bei der Regulation von aggressiven myeloischen Leukämien spielt. Sowohl die maligne Zellerneuerung sowie das Fortschreiten der Erkrankung wurden im Mausmodell beeinträchtigt, sodass die Überlebenszeit anstieg [Kwon et al 2015]. Zudem wird TSPAN3 sehr stark von Stammzellen und von Vorläuferzellen des normalen hämatopoetischen Systems exprimiert, welche durch Msi2 (Musashi2; RNA-

Bindeprotein) reguliert wird. TSPAN3 wurde durch Inhibition von Msi2 in leukämischen Zellen herunterreguliert [Kwon et al., 2015; Yang, 2016].

2.7 Ziele dieser Arbeit

In den 3'UTRs der Gene MORF4L2, AKT1S1 und TSPAN3 waren potentielle Bindestellen für die miR-142-3p bzw. -5p vorhergesagt worden [Ohler, MDC Berlin-Buch, pers. Mitteilung]. In der vorliegenden Arbeit sollten die entsprechenden 3'UTRs in geeignete Reportervektoren kloniert werden um eine Regulation durch die miR-142 experimentell nachweisen zu können. Anschließend wurden durch „site-directed mutagenesis“ die Bindestellen der miR-142 in den 3'UTRs verändert. Dadurch sollte in den anschließenden Luciferase-Assays gezeigt werden, dass eine Regulation über die miRNA nicht mehr stattfindet.

Neben der Identifikation von neuen Ziel-mRNAs der miR-142-3p und -5p sollte die Arbeit die Grundlage für eine erleichterte Identifikation von Zielen liefern, indem gezeigt wird, dass die wt-miRNA die Reporter-Aktivität einer unveränderten 3'UTR verringert, nicht jedoch eine miRNA mit Mutation in der „Seed“-Sequenz. Somit entfielen die Herstellung einer Mutante des 3'UTR Reporterkonstruktes.

3. Materialien

3.1 Geräte

Gerät	Modell/Hersteller
Brutschrank	Hera Cell150 (Thermo Scientific), 37°C und 5% CO ₂
Gelelektrophorese-geräte	Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia) Electrophoresis Power Supply EPS 200 (Pharmacia Biotech)
Luminometer	Lumat LB 9501 (Berthold Technologies GmbH & Co.KG)
PCR-Maschine	Peltier Thermal Cycler 200 (Firma MJ Research)
Photometer	NanoDrop™ 2000c (PEQLAB)
UV-Dokumentation	ChemiDoc™XRS + Imaging System (Bio-Rad)
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1,0 R (mit Kühlung) Heraeus Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung) Sigma 202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung)

Tabelle 2: Geräte mit jeweiligen Herstellern

3.2 Chemikalien

Agarose	Invitrogen und Roth
Ampicillin (Binotal™)	Bayer
Bromphenolblau	Serva
Difco™LB-Agar	Becton Dickinson (BD)
Difco™ LB-Broth	Becton Dickinson (BD)
Dulbecco´s modified eagle´s medium (DMEM)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Sigma und Roth
Ethanol	Roth
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Isopropanol	Roth
Kb plus Leiter	Invitrogen; New England Biolabs
Nanofectin™	PAA Laboratories GmbH

Materialien

Nukleotide (dNTPs)	Sigma
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
pGEM®-T	Promega
Taq DNA Polymerase	Roche
Trypsin-EDTA-Solution	Sigma
X-Gal	Sigma

Tabelle 3: Chemikalien mit jeweiligen Herstellern

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.3 Puffer und Lösungen

Blaumarker	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Glycerol	50% (v/v)
	EDTA	50 mM
dNTPs	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 10 mM
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml H ₂ O
Puffer N2 (Equilibrierungspuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15% (v/v)
	KCl	900 mM
	Triton X-100	0,15% (v/v)
	ad pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
Puffer N3 (Waschpuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15% (v/v)
	KCl	1,15 M
	ad pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
Puffer N5 (Elutionspuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15% (v/v)
	KCl	1 M
	ad pH 8,5 mit H ₃ PO ₄	
PBS	NaCl	140 mM
	KCl	25 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Na-K-Phosphat	10 mM

Materialien

PBS für Zellkulturen	NaCl	8,0 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,9 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	ad pH 7,4	
S1-Puffer (Resuspensionspuffer)	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
	pH 8,0	
S2-Puffer (Lysepuffer)	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)
S3-Puffer (Neutralisationspuffer)	Kaliumacetat	2,8 M
	pH 5,1	
SOB-Medium	Trypton	20,0 g
	Hefe-Extrakt	5,0 g
	NaCl	0,6 g
	KCl	0,5 g
	ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} autoklaviert	
	Zugabe von 20 mM MgCl ₂ direkt vor Gebrauch	
T4-Ligasepuffer (10x)	ATP	10 mM
	MgCl ₂	50 mM
	DTT	10 mM
	Tris/HCl (pH 7,5)	660 mM
TAE-Puffer 50x	Tris	2 M
	Natriumacetat	25 mM
	EDTA	0,5 M
	ad pH 7,8 mit Essigsäure	
TE-Puffer	Tris/HCL	10 mM
	EDTA	1 mM
	ad pH 7,6 mit Essigsäure	
10x Polymerase-Reaktionspuffer (Sigma)	KCl	500 mM
	Tris-HCl, pH 8,3	100 mM
	Gelatine	1 mg/ml

Tabelle 4: Puffer und Lösungen mit Inhaltsstoffen

3.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Roche (calf intestinal phosphatase, CIP)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Boehringer
Phusion-Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq- Polymerase	Sigma

Tabelle 5: Enzyme mit jeweiligen Herstellern

3.5 DNA-Größenmarker

Die Größenbestimmung von elektrophoretisch aufgetrennter linearer DNA-Fragmente erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe der „1 Kb Plus DNA-Ladder“ (Invitrogen) und der „2-Log DNA Ladder“ (New England Biolabs). Hiermit sind Bestimmung von Fragmentgrößen zwischen 100bp-12kbp (1Kb-Plus Ladder, Invitrogen) und zwischen 100bp-10kbp (2-Log DNA Ladder, New England Biolabs) möglich.

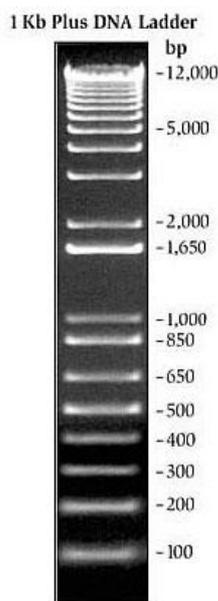


Abbildung 6: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) zur Bestimmung von DNA-Fragmenten zwischen 100bp und 12kbp

Materialien

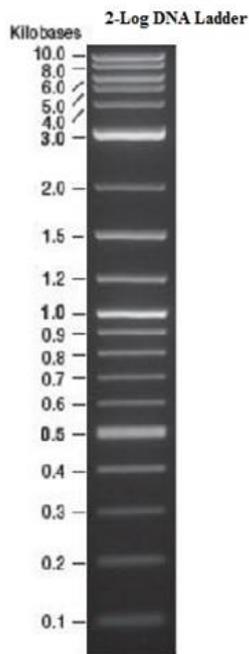


Abbildung 7: 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs) zur Bestimmung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 10 kbp

3.6 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme zur Blau-Weiß-Selektion rekombinanter DNA als auch zur Vermehrung rekombinanter DNA verwendet.

- E. coli-Stamm „pMOS BlueT-Vektor“, ein Kit der Firma Amersham
- E. coli-Stamm „DH5- α “, kompetente Zellen der Firma Invitrogen

3.7 Adhärenente Zelllinien

HEK-293T: Es handelt sich dabei um "human embryonic kidney" Zellen, die als Epithelzellen adhärenent wachsen. Sie sind in der Lage konstitutiv das große T-Antigen des SV40-Virus zu exprimieren. So wird eine gesteigerte Expression von episomalen Plasmiden möglich, die ein „SV40 origin of replication“ besitzen [Shein et al., 1962; Zur Hausen, 1967].

3.8 Nähr- und Kulturmedien

3.8.1 Nährmedium für Bakterien

Die Bakterienanzucht erfolgte entweder in zuvor autoklaviertem 2,5%-igem LB-Medium (Luria Broth Base (Becton Dickinson)) oder auf Agarplatten welche mit autoklaviertem 3,75% Luria's Agar (Becton Dickinson) gegossen wurden. Um eine Selektion transformierter

Bakterien zu gewährleisten wurden die Nährmedien mit 0,1% (w/v) Ampicillin versetzt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

3.8.2 Kulturmedium für Säugerzellen

DMEM: Die HEK-293T-Zelllinie wurde in "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (Sigma) kultiviert. Das Medium wurde zuvor mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und einem „4er-Antibiotikum“ (40 U/ml Penicillin-G40, 10U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat, 50 µg/ml Streptomycinsulfat) versetzt.

3.9 Vektoren

3.9.1 pGEM[®]-T

In dieser Arbeit wurde der pGEM-T Vektor der Firma Promega verwendet. Dieser diente zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten. Der pGEM[®]-T Vektor entstand durch einen Restriktionsverdau des pGEM-5Zf(+)-Vektors durch EcoRV und dem gleichzeitigen Anfügen von Thymidin an das terminale 3'-Ende. Die 3'-terminalen Thymidine des Vektors erfüllen hierbei mehrere Aufgaben. Zum einen wird somit eine Rezirkularisation des Vektors verhindert und zum anderen bietet der Thymidinüberhang die Möglichkeit einer direkten Insertion von PCR-Produkten, welche durch entsprechende Polymerasen einen 3'-Adenosinüberhang besitzen. Ein vorheriger Restriktionsverdau von Vektor oder PCR-Produkt ist somit nicht nötig. Eine Ligation von PCR-Produkten welche keine Adenosin-Überhänge besitzen ist über die Multiple-Cloning-Site (MCS) möglich. Diese wird von den T7- und SP6-RNA-Polymerase Promotoren flankiert und enthält mehrere Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Das Besondere an der MCS des pGEM-T Vektors ist, dass sie innerhalb des β -Galaktosidase-Gens liegt. Durch die Ligation eines Inserts in die MCS wird das β -Galaktosidase-Gen zerstört. Dies ermöglicht es positive Klone (farblos, mit enthaltendem Insert) von negativen Klonen (blau, ohne Insert) mittels Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal-haltigen Platten zu unterscheiden. Ein Ampicillinresistenzgen dient zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien.

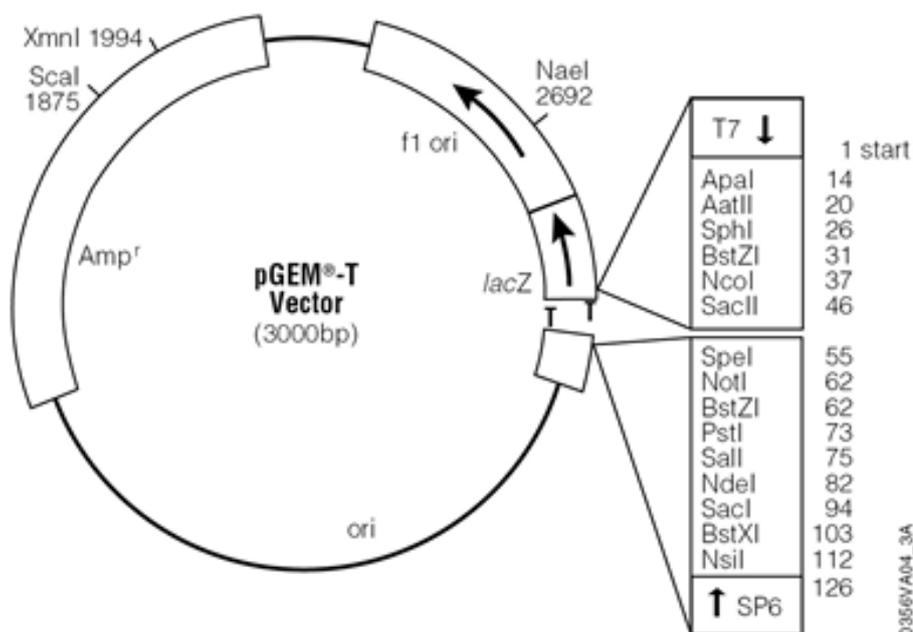


Abbildung 8: pGEM-T Vektor der Firma Promega (Quelle: Promega)

3.9.2 pSG5

In dieser Arbeit wurde der pSG5 Vektor der Firma Stratagene verwendet. Dieser diente zur Klonierung von PCR-miRNA-Produkten. Mit dem eukaryotischen high-copy Expressionsvektor ist es möglich, hohe Expressionsraten in vivo und in vitro zu gewährleisten. Der Vektor enthält einen SV40-Promoter, ein β -Globin-Intron und ein SV40 Polyadenylierungssignal, welche eine effiziente RNA bzw. Protein-Expression in vivo ermöglicht. Der T7-Promotor ermöglicht hingegen die in vitro Transkription. Die MCS enthält die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme EcoRI, BamHI und BglII, wodurch die Ligation von entsprechend verdauten PCR-Produkten ermöglicht wird. Zusätzlich dazu enthält der Vektor einen bakteriellen Replikationsursprung (pUC ori), der zur autonomen Replikation im prokaryotischen System dient. Der Replikationsursprung f1 ori dient der Synthese von Einzelstrang-DNA. Auch hier wird die Selektion der Bakterien durch ein Ampicillinresistenzgen sichergestellt.

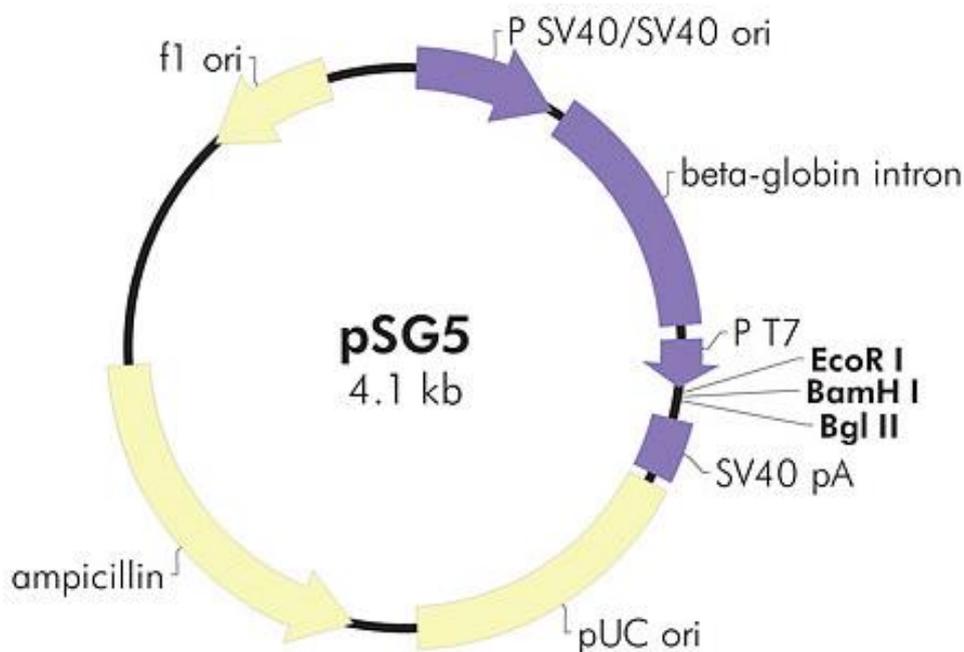


Abbildung 9: pSG5 Vektor der Firma Stratagene (Quelle: Stratagene)

3.9.3 pMIR-REPORT™

Um den Einfluss von miRNAs auf entsprechende Zielgene zu untersuchen, wurde der eukaryotische Reportervektor pMIR-Report™ verwendet. Hierbei wurde die zu untersuchende Sequenz der entsprechenden 3'UTR hinter das Firefly-Luciferase Gen im Vektor kloniert. Für diese Dissertation wurde ein modifizierter Reportervektor "pMIR-RNL-TK" verwendet. Hier wurde durch die Arbeitsgruppe Meister (Max-Planck-Institut, Martinsried) ein zusätzliches Renilla-Gen unter die Kontrolle eines TK-Promoters eingebracht. Dies ermöglicht eine interne Normalisierung, um Unterschiede in der Transfektionseffizienz auszugleichen.

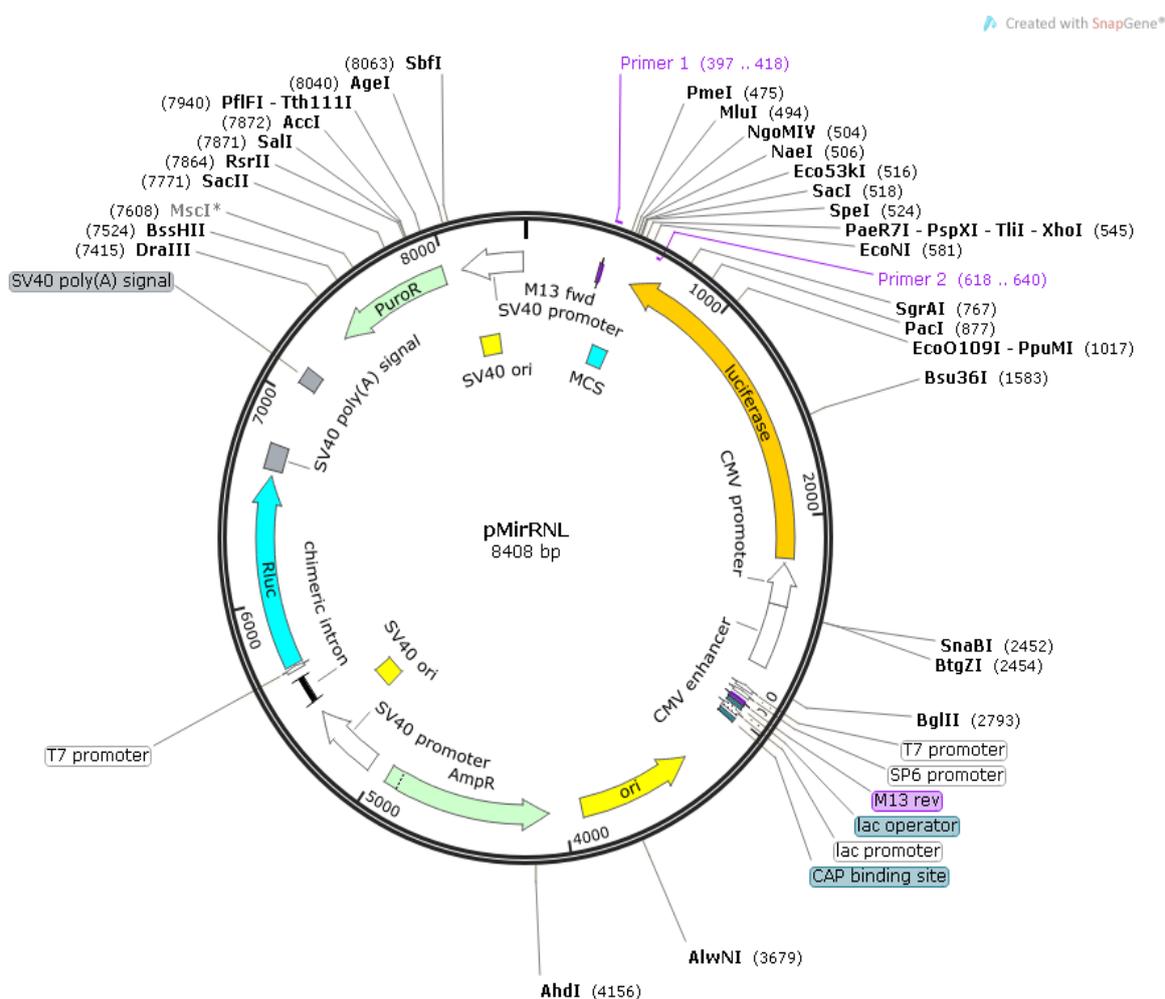


Abbildung 10: pMIR-REPORT™

3.10 Expressionsplasmide

Die miRNA-Sequenzen wurden aus humaner genomischer DNA amplifiziert. Um eine effiziente Expression bzw. eine Prozessierung zu reifen miRNAs zu gewährleisten, wurden zusätzlich zur miRNA-Vorläufersequenz noch 100bp an das 5' und an das 3' Ende amplifiziert.

miRNA	Plasmid	Restriktionsenzyme	Fragmentlänge
miR-142-wt	pSG5	EcoRI/BamHI	4100 + 314
miR-142-M1	pSG5	EcoRI/k.A.	4100 + keine Angabe
miR-142-M3	pSG5	EcoRI/BglII	4100 + 340
miR-29a	pSG5	EcoRI/BamHI	4100 + 500
miR-29b	pSG5	EcoRI/BamHI	4100 + 390
miR-146	pSG5	k.A.	4100 + keine Angabe
miR-125	pSG5	k.A.	4100 + keine Angabe

Tabelle 6: Expressionsplasmide mit Schnittstellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

3.11 Reporterplasmide

Um den Effekt einer miRNA auf die zu untersuchende 3'UTR zu testen wurde diese in die „multiple cloning site“ (MCS) kloniert, welche sich hinter dem 3'-Ende des Firefly-Luciferase Gens des pMIR-RNL-TK befindet. Die Amplifikation der Sequenz erfolgte mit spezifischen Primern aus Testis-cDNA oder der jeweiligen Originalen 3'UTR und wurde anschließend über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe von Restriktionsenzymen in die MCS (Multiple Cloning Site) des Vektors kloniert.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die für diese Arbeit amplifizierten 3'UTR Sequenzen, welche in die MCS des pMIR-RNL-TK kloniert wurden.

Reporterplasmide	Fragmentlänge in bp	Restriktionsenzyme
pMIR-TSPAN3-3'UTR	8400 + 834	SacI, Ngo IV
pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR*	8400 + 830	SacI, Ngo IV
pMIR-TSPAN3-T1-3'UTR	8400 + 654	SacI, Ngo IV

Materialien

pMIR-TSPAN3-TM1-3'UTR*	8400 + 654	Sacl, Ngo IV
pMIR-TSPAN3-T2-3'UTR	8400 + 504	Sacl, Ngo IV
pMIR-TSPAN3-TM2-3'UTR*	8400 + 504	Sacl, Ngo IV
pMIR-TSPAN3-TM3-3'UTR*	8400 + 270	Sacl, Ngo IV
pMIR-AKT1S1-3'UTR	8400 + 984	SpeI, SacI
pMIR-AKT1S1-Mut1-3'UTR**	8400 + 977	SpeI, SacI
pMIR-AKT1S1-Mut2-3'UTR**	8400 + 981	SpeI, SacI
pMIR-MORF4L2-3'UTR	8400 + 483	SpeI, SacI
pMIR-MORF4L2- Mut142-3'UTR*	8400 + 483	SpeI, SacI
pMIR-MORF4L2-Mut29-3'UTR***	8400 + 483	SpeI, SacI

Tabelle 7: Reporterplasmide

* Hier wurde gezielt die Bindestelle der miR-142 im Reporterplasmid durch die Sequenz der Endonuklease PmlI ersetzt.

** Da hier 2 Bindestellen in der 3'UTR für die miR-142 zur Verfügung standen, wurden die Bindestellen einzeln verändert. Mut1 entspricht der Mutation der ersten, 5'-gelegenen Bindestelle, während die zweite, 3'-gelegene Bindestelle unverändert ist. Mut2 entspricht der veränderten zweiten Bindestelle, während die erste unverändert ist. Hier wurden die Bindestellen im Reporterplasmid gezielt durch die Endonuklease AfeI ersetzt.

*** Hier wurde gezielt die Bindestelle der miR-29 durch die Sequenz der Endonuklease PmlI ersetzt.

3.12 Oligonukleotidprimer

Zur Klonierung der Plasmide wurden folgende Oligonukleotidprimer verwendet, welche über die Firma MWG Biotech bezogen wurden:

3'UTR	FOR/REV Primer	Primer-Sequenz
TSPAN3-3'UTR	5' SacI-FOR	CCCGAGCTCCATCACTGGCGGAACCTATG
	3' NgoIIV-REV	GCCGGCGTTGGGGGCTGATACAGAG
TSPAN3-Mut-3'UTR	5' SacI-FOR	GTTTTTAATCAAAGTTGGCACGTGAGGAGGAGTATA ATG
	3' NgoIIV-REV	CATTATACTCCTCCTCACGTGCCAACTTTGATTAAAA AC
TSPAN3-T1-3'UTR TSPAN3-TM1-3'UTR	5' SacI-FOR	CCCGAGCTCGAAGGTGAATTGAGCAGG
	3' NgoIIV-REV	GCCGGCGACTTACCATGAATGGGC
TSPAN3-T2-3'UTR	5' SacI-FOR	CCCGAGTCTGACTCTTCATGCCCTAAG

Materialien

TSPAN3-TM2-3'UTR		
	3'NgOIV-REV	GCCGGCGACTTACCATGAATGGGC
TSPAN3-TM3-3'UTR	5'Sacl-FOR	CCCGAGTCTGTTAACACCAGATGGTGC
	3'NgOIV-REV	GCCGGCGACTTACCATGAATGGGC
AKT1S1-3'UTR	5'Spel-FOR	CGGACTAGTGATGAGGAGAATGGGCCGCC
	3'Sacl-REV	CGAGCTCCAACCCCTCACTCTCTCCCC
AKT1S1-Mut1-3'UTR	5'Spel-FOR	CGTCCGCCCCGTCCCTTAGCGCTCCCCGCCCCAC TCC
	3'Sacl-REV	GGAGTGGGGCGGGGGAGCGCTAAGGGACGGGGC GGACG
AKT1S1-Mut2-3'UTR	5'Spel-FOR	CAATTTACGTTCTTTTTAGCGCTGGGACTGGGGTCG TC
	3'Sacl-REV	GACGACCCCAGTCCCAGCGCTAAAAAGAACGTAAAT TG
MORF4L2-3'UTR	5'Spel-FOR	GGACTAGTGCTGAGTACCACCGCAAAGCC
	3'Sacl-REV	CGAGCTCGGACTTGCAGAGGATGGGCTG
MORF4L2-Mut142-3'UTR	5'Spel-FOR	G TTCCTATCCCTTTGCACGTGTGCAATTTTCTAATAT G
	3'Sacl-REV	CATATTAGAAAATTGCACACGTGCAAAGGGATAGGA AC
MORF4L2-Mut29-3'UTR	5'Spel-FOR	CTTTTTTTTTTTTTACACGTGATGAAGTAAACAGCC
	3'Sacl-REV	GGCTGTTTTACTTCATCACGTGTAATAAAAAAAAAAAG

Tabelle 8: 3'UTR mit jeweiligen Oligonukleotidprimern

3.13 Computersoftware

Textverarbeitung	Microsoft Word 2010™ (Microsoft Corp.)
Datenverarbeitung	Microsoft Excel 2010™
Grafiken	CorelDRAW 12.0™ (Corel Corp.) Quantity One (Bio-Rad) Microsoft Paint, Microsoft Power Point
Sigma Plot 10.0 und 13.0 (Systat Software)	statistische Auswertung von Luciferase-Assays.
Nukleotid- und Protein Sequenzabgleiche	Internetseite des NCBI (National Center of Biotechnology

Materialien

	Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) und angeschlossene Dienste
miRNA Target Vorhersage	Target Scan und RNA-Hybrid

Tabelle 9: Computersoftware

4. Methoden

4.1 Bakterielle Zellkultur

4.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Durch die Transformation von kompetenten Bakterien mit einem Plasmid wird eine schnelle und effektive Amplifikation des Plasmides ermöglicht. Eine Selektion der transformierten Bakterien fand nach Ausplattieren der Bakteriensuspension auf LB-Amp-Agarplatten und anschließender Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C statt. Am Folgetag wurden 2 ml LB Medium (plus 0,1% (w/v) Ampicillin) mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert (siehe 4.3.1.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA). Nach Verschluss der Agarplatten mit Parafilm sind diese für eine kurzfristige Lagerung bei 4°C geeignet. Um eine große Menge Plasmid-DNA zu amplifizieren, wurden 100 ml mit Ampicillin versetztes LB-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C aerob und schüttelnd inkubiert (siehe 4.3.1.2 Präparative DNA-Isolierung (NucleoBond™-Präparation)). Eine Langzeitlagerung der Bakterien bei -70°C wurde durch Mischen von 400 µl Bakteriensuspension mit 20%(v/v) DMSO ermöglicht. Diese diente alternativ auch zur Beimpfung einer 100 ml LB-Kultur.

4.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien (Rubidium-Methode)

Da E. coli-Bakterien sich vor der Aufnahme von Fremd-DNA durch z.B. Restriktionsenzyme schützen, müssen die Bakterien, um Plasmid-DNA effizient zu vermehren, kompetent gemacht werden. Es wurde hierfür die Rubidium-Methode angewandt, um eine Kompetenz der Bakterien zu induzieren. Hiernach kann Fremd-DNA künstlich in die Bakterien eingebracht werden. Zunächst wurde SOB-Medium mit einer MgCl₂-Lösung versetzt und mit E. coli-pMOS-Suspension beimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C schüttelnd und aerob inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde SOB-Medium mit einigen ml der Vorkultur beimpft und solange schüttelnd inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine OD_{550nm} von 0,3 erreicht hat. Eine OD_{550nm} weist daraufhin, dass sich die Bakteriensuspension in der exponentiellen Wachstumsphase befindet. Anschließend wurde die Suspension auf verschiedene Gefäße aufgeteilt und nach Inkubation auf Eis zentrifugiert. Zu den Bakterienpellets wurde Transformationspuffer 1 hinzugegeben und die Pellets damit aufgenommen. Nach erneuter Inkubation auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation. Die Pellets wurden daraufhin in Transformationspuffer 2 resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend konnten die kompetenten Bakterien bei -70°C gelagert werden [CaCl₂/RbCl-Methode; Kushner, 1978].

Die in dieser Arbeit verwendeten kompetenten Bakterien wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

4.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Das Einbringen von DNA in kompetente Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Dies kann durch Elektroporation oder Hitzeschock ermöglicht werden. In dieser Arbeit wurde nur die Hitzeschock Transformation angewandt. Zuerst wurden 50 µl einer auf Eis aufgetauten, kompetenten Bakteriensuspension mit 5 µl eines Ligationsansatzes gemischt und auf Eis inkubiert. Hierbei kann sich die DNA an die Zellwand anlagern. Nach 20 Minuten Inkubationszeit erfolgte für 90 Sekunden der Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Es wird gemutmaßt, dass die Bakterienzellwand durch den plötzlichen Temperaturanstieg kurzzeitig permeabel wird und dadurch die DNA ins Zytosol gelangt. Nach dem Hitzeschock wurde die Bakterien-Ligation-Suspension für kurze Zeit auf Eis abgekühlt und mit 100 µl antibiotikafreiem LB-Medium versetzt, um den Bakterien den Übergang in die exponentielle Phase zu erleichtern. Anschließend erfolgte eine Inkubation für ca. 30 Minuten bei 37°C. Danach wurden diese Vorkulturen auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das den Agarplatten zugesetzte Ampicillin ermöglichte eine effiziente Selektion der transformierten Bakterienzellen [Lederberg und Cohen, 1974].

4.1.4 Blau-Weiß-Selektion mittels pGEM

Das Blau-Weiß-Selektionsprinzip dient dem Nachweis einer erfolgreichen Ligation. Durch eine enzymatische Reaktion, wobei X-Gal als Substrat, in Anwesenheit von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) als Induktor, von dem Enzym β-Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Dieses Prinzip kann nur angewandt werden, wenn der Bakterienstamm β-Galaktosidase-defizient ist, wie z.B. pMOS und der verwendete Vektor innerhalb seines β-Galaktosidase-Gens (lacZ) eine Multiple Cloning-Site besitzt (z.B. pGEM®-T). Vor dem Ausplattieren der Suspension musste IPTG und X-Gal auf den LB-Agarplatten ausgestrichen werden. Bei einem erfolgreichen Einbau des DNA-Inserts in den entsprechenden Vektor wurde das β-Galaktosidase-Gen zerstört, wodurch die enzymatische Reaktion nicht mehr ablaufen konnte und die Bakterien in weißen Kolonien wuchsen. Im Gegensatz dazu wuchsen Bakterien ohne Insert blau, da das β-Galaktosidase-Gen intakt war und die enzymatische Reaktion ablaufen konnte.

4.2 Eukaryotische Zellkultur

4.2.1 Kultivierung von Monolayer Zellkulturen

Die in dieser Arbeit verwendete, adhärenz HEK-293T Zelllinie wurde in 75cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Medium diente das bereits oben beschriebene DMEM (siehe 3.8.2 Kulturmedium für Säugerzellen), welches mit einem „4er Antibiotikum“ versetzt wurde. Die Zelllinie wurde montags und freitags, unter sterilen Bedingungen, 1:10 gesplittet. Hierbei wurde zuerst das verbrauchte Medium entfernt und der Zellrasen vorsichtig mit 1 ml Trypsin/EDTA gespült. Die Zellen wurden hiernach mit 1 ml Trypsin/EDTA für 2-5 min in einem Brutschrank inkubiert (37°C und 5% CO₂). Es kam hierbei zu einer Ablösung der Zellen und des Zellrasens, da die Zelloberflächenproteine durch die Protease Trypsin zerstört wurden. Nach der Inkubationszeit wurde, um diese Trypsin-Reaktion zu stoppen, DMEM-Medium hinzugegeben. Es erfolgte daraufhin, in einer neuen Kulturflasche, eine Verdünnung der Suspension mit DMEM auf ein Endvolumen von 20ml.

4.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Nanofectin™

In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz Nanofectin™ (Firma PAA) zur Transfektion der eukaryotischen Zellkultur verwendet. Diese weist eine hohe Transfektionseffizienz bei niedriger Zytotoxizität auf. Hierbei bindet die zu transformierende DNA an ein von einem porösen Nanopartikel umschlossenes, positiv geladenes Polymer. Es entsteht ein Komplex aus der DNA, dem Polymer und dem Nanopartikel, welcher von Zellen endozytotisch aufgenommen werden kann. Hierbei schützt, der Nanopartikel die DNA vor dem Abbau. Einen Tag vor Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen ausgesät und nach Herstellerangaben transfiziert. Danach wurden diese für weitere 48 h bei 37°C und 5% CO₂ bis zur Weiterverwendung gelagert.

4.3 DNA-Techniken

4.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

4.3.1.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Boiling Präparation)

Hierfür wurden insgesamt 10 Reaktionsgefäße mit jeweils 2 ml LB Ampicillin-Medium und jeweils einer einzelnen Bakterienkultur beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden hiervon jeweils 1,5 ml in passende Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das hieraus entstehende Bakterienpellet wurde durch Zugabe von 200µl STET-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden, durch Zugabe von 1 µl Lysozym (0,5 mg/ml), die Bakterien lysiert. Nach

zehnminütiger Inkubation auf Eis erfolgte für 45 Sekunden ein kochendes Wasserbad bei 98,5°C mit daraufhin kurzer Abkühlung auf Eis. Hiernach erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und 4°C. Das dabei entstandene Pellet aus Zelltrümmern und Proteinen wurde mittels eines Zahnstochers entfernt. Die DNA wurde nach Zugabe von 200 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation über 30 min bei 14000 rpm und 4°C gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wurde daraufhin in 20 µl S1-Puffer (mit RNase versetzt) aufgenommen und zum Abbau der RNA für 10 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend bei 55°C für 5 min gelöst [modifiziert nach Birnboim und Doly J., 1979].

4.3.1.2 Präparative DNA-Isolierung (NucleoBond™-Präparation)

Zur Aufreinigung größerer Mengen an Plasmid-DNA, wurden in dieser Arbeit die Anionenaustauscher-Säulen der Firma Machery-Nagel (NucleoBond™) verwendet. Über die NucleoBond™ AX 100-Säulen konnte die DNA einer Bakterienkultur von ca. 100ml aufgereinigt werden. Hierfür wurde die Übernachtbakterienkultur in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführt, diese wurden für 15 min, bei 5000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand beider wurde verworfen. Eines der Pellets wurde in 4 ml S1-Puffer resuspendiert, in das zweite Gefäß überführt und das zweite Pellet ebenfalls resuspendiert. Es wurde daraufhin 4 ml S2-Puffer dazugegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen durch das enthaltene SDS zu lysieren. Durch das enthaltene NaOH wurden gleichzeitig die chromosomale DNA, Plasmid-DNA und Proteine denaturiert. Es erfolgte die Hinzugabe von 4ml S3 Puffer zur Neutralisierung. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis, liegt die kleinere Plasmid-DNA renaturiert in Lösung vor, wohingegen die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und mit den ebenfalls denaturierten Proteinen ausfällt. Es folgt eine Zentrifugation über 25 min bei 6000 rpm und 4°C. Kurz vor Ende der Zentrifugation wird eine NucleoBond™-AX 100-Säule mit 2,5 ml N2-Puffer äquilibriert und anschließend wird der in der Zentrifugation gebildete Überstand, welcher die Plasmid-DNA enthält, auf die Säule gegeben. Der pH-Wert und die in dem Lysat vorherrschende Salzkonzentration ermöglichen den stark negativ geladenen Nukleinsäuren die Bindung an die Säulenmatrix. Die Säule wurde zweimalig mittels je 5 ml N3-Puffer gewaschen, um die Reinheit der DNA zu erhöhen, anschließend wurde die DNA mit Hilfe von 5 ml N5-Puffer eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und darauffolgender Zentrifugation (30 min, 6000 rpm, 4°C). Zum Schluss wurde die DNA mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen (10 min, 6000 rpm, RT), getrocknet und das Pellet, je nach Größe, in 50-100 µl TE-Puffer aufgenommen und 1 ½ h bei 50°C oder alternativ über Nacht bei 4°C gelöst. Die DNA-Konzentration und der Reinheitsgrad wurden anschließend photometrisch bestimmt.

4.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration und den Reinheitsgrad der DNA-Proben zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit diese Messung am NanoDrop™2000c (PEQLAB) vorgenommen. Hierbei wird die Fähigkeit der Nukleinsäuren, Licht der Wellenlänge 260nm zu absorbieren, genutzt. Die Absorption bildet somit ein Maß für den DNA-Gehalt einer Lösung. Proteine absorbieren Licht der Wellenlänge 280 nm, so kann der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} als Maß für die Reinheit der Lösung betrachtet werden. Der Wert sollte somit zwischen 1,8 und 2,0 liegen, sodass von einer reinen DNA-Probe gesprochen werden kann. Ist die Probe mit Proteinen verunreinigt, liegt der Wert darunter. Bei einer OD_{260nm} von 1,0 wird bei doppelsträngiger DNA von einer Konzentration von 50 mg/ml ausgegangen. Die Messungen erfolgten mit 2 µl unverdünnter DNA-Lösung. Als Referenzwert wurde H₂O_{bidest} eingesetzt [Maniatis et al., 1989].

4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion lässt sich *in vitro* eine definierte Nukleinsäuresequenz in Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuren amplifizieren. Hierbei macht man sich die Fähigkeit von DNA-Polymerasen zu Nutze, ausgehend von einem freien 3'-Hydroxy-Ende einer einzelsträngigen DNA-Matrize, den komplementären DNA-Gegenstrang zu synthetisieren. Ein PCR-Zyklus besteht hierbei aus 3 Einzelschritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA auf 94°C erhitzt, so dass diese in zwei Einzelstränge zerfällt. Während des Annealing findet eine Abkühlung der Einzelstränge statt. Hierbei wird eine Anlagerung der Primer, die je zu einer spezifischen DNA-Sequenz komplementär sind, ermöglicht. Die Annealingtemperatur ist hierbei vom GC-Gehalt und der Länge der Primer abhängig und schwankt häufig zwischen 50-65°C. Bei der Primersynthese* musste berücksichtigt werden, dass beide Primer eine ähnliche Schmelztemperatur haben und dass sie keine Sequenzhomologien zueinander besitzen. Hierdurch wurde die Möglichkeit der Primerdimerbildung minimiert. Durch die Hybridisierung der Primer mit dem Matrizenstrang entsteht das für die Polymerase notwendige freie 3'-OH-Ende. Dieses dient als Startpunkt für die nachfolgende Elongation. Die Elongation läuft bei dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase ab (Taq-Polymerase: 72°C, Phusion: 72°C). Hierbei fügt die Polymerase freie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) an die 3'-OH-Enden, komplementär zum Matrizenstrang, an. In den folgenden sich wiederholenden Zyklen können diese neu entstandenen Tochterstränge ebenfalls als Templates dienen. Durch diese zyklische Wiederholung kann eine nahezu exponentielle Vermehrung der gewünschten Sequenz erfolgen [Mullis et al., 1986].

Methoden

In dieser Arbeit wurden die Taq-Polymerase, sowie die Phusion-Polymerase verwendet. Tabelle 10 zeigt ein Pipettierschema mit der Taq- und Phusion- Polymerase

* Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer wurden in lyophilisierter Form von der Firma MWG Biotech bezogen. Vor Verwendung wurden diese in sterilem, DNase-freiem Wasser gelöst.

Volumen	PCR mit Phusion (chimäres Enzym)	PCR mit Taq (aus dem thermophilen Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>)	Kontrolle
5µl	2x Phusion-Puffer	Sigma-Taq-Puffer	10µl Phusion-Puffer oder 5µl Sigma-Taq- Puffer
2µl	dTNP	dTNP	dTNP
1µl	Primer FOR (1:4)	Primer FOR (1:4)	Primer FOR (1:4)
1µl	Primer REV (1:4)	Primer REV (1:4)	Primer REV (1:4)
1µl	2x Template 1:10 (cDNA)	Template 1:10 (cDNA)	-
0,5µl	Phusion	Sigma-Taq	Phusion oder Sigma Taq
Ad 50µl H ₂ O	33,5µl H ₂ O	39,5µl H ₂ O	35,5µl oder 40,5µl

Tabelle 10: Pipettierschema PCR

Die Pipettierschemata der beiden Polymerasen unterschieden sich nur in der Polymerase und dem entsprechenden Reaktionspuffer. An der Endkonzentration der Ansätze änderte sich nichts. Um eine Kontamination der Komponenten auszuschließen, wurde in jeder PCR eine Wasserprobe, die alle Komponenten bis auf das Template enthielt, durchgeführt. In dieser Arbeit wurde für die PCR der Peltier Thermal Cycler 200 verwendet. Die verwendeten Programme richteten sich, wie oben bereits erwähnt, nach den Primern und der verwendeten Polymerase. Zu beachten war, dass die Elongationszeit an die Sequenzlänge angepasst wurde.

Die nachfolgende Tabelle 11 zeigt exemplarisch den Ablauf eines PCR-Programms mit der Phusion-Polymerase.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	2,5 min
Denaturierung	94°C	min

Methoden

Annealing	Primerabhängig (<i>siehe Tabelle 12</i>)	min	x 38
Elongation	72°C		
Letzte Extension	72°C	10 min	
Kühlung	4°C	Bis Entnahme	

Tabelle 11: Ablauf PCR mit Phusion

Tabelle 12 zeigt das Target, Annealingtemperatur, Elongationszeit, cDNA/Template sowie die jeweils verwendete Polymerase an

3'UTR	Annealing-Temperatur	Elongationszeit	cDNA/Template (1:10)	Polymerase
TSPAN3-3'UTR	51°C	2min	Testis cDNA	Sigma-Taq
TSPAN3-Mut142-3'UTR	57°C	2min	TSPAN3-3'UTR	Phusion
TSPAN3-T1- 3'UTR	57°C	2min	TSPAN3-3'UTR	Phusion
TSPAN3-TM1- 3'UTR	57°C	2min	TSPAN3-Mut142-3'UTR	Phusion
TSPAN3-T2-3'UTR	57°C	2min	TSPAN3-3'UTR	Phusion
TSPAN3-TM2-3'UTR	57°C	2min	TSPAN3-Mut142-3'UTR	Phusion
TSPAN3-TM3-3'UTR	57°C	2min	TSPAN3-Mut142-3'UTR	Phusion
AKT1S1-3'UTR	56°C	2min	Testis cDNA	Sigma-Taq
Akt1S1-Mut1-3'UTR	66°	2,5min	AKT1S1-3'UTR	Phusion
Akt1S1-Mut2-3'UTR	66°	2,5min	AKT1S1-3'UTR	Phusion
MORF4L2-3'UTR	57°C	45s	Testis cDNA	Phusion
MORF4L2- Mut142-3'UTR	57°C	2min	MORF4L2-3'UTR	Phusion
MORF4L2-Mut29-3'UTR	57°C	90s	MORF4L2-3'UTR	Phusion

Tabelle 12: Annealingtemperatur, Elongationszeit, cDNA/Template

4.3.3.1 Colony PCR

Basierend auf einer einfachen PCR ermöglicht die Colony PCR eine Identifikation einer erfolgreichen Ligation nach Transformation in eine kompetente Bakterienzelle. Hierfür wurden die Sequenzierprimer eingesetzt, die für die MCS des Zielvektors (pMIR) flankieren. Hierdurch unterscheidet sich die Fragmentgröße des PCR Produktes der Colony PCR von dem des zuvor amplifizierten Inserts um ca. 200bp. Da für die Colony PCR mehrere Ansätze benötigt werden, wurde ein Mastermix fertiggestellt, der alle in Tabelle 13 genannten Komponenten, bis auf die Taq-Polymerase, enthielt. Dieser Mastermix wurde zu je 50µl in kleine PCR-Eppis aliquotiert. Anschließend wurde mit einem sterilen Zahnstocher ein Bakterienklon von der Agarplatte gepickt und in das jeweilige Reaktionsgefäß eingetaucht und kurz vermischt. Dieser Zahnstocher mit dem angepickten Klon wurde daraufhin auf eine Masterplatte überführt. Hierbei musste auf eine genaue Durchnummerierung der Klone geachtet werden. Anschließend wurde die Taq-Polymerase in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und die PCR nach Standard Programm gestartet. Bei jeder Colony PCR lief zusätzlich eine Negativkontrolle/Wasserkontrolle mit, um eine Kontamination der Komponenten auszuschließen. Zusätzlich lief immer eine Positivkontrolle, welche keine Bakterienkolonie sondern pMIR enthielt mit. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass die PCR funktioniert hat, da die 200bp große MCS des Vektors amplifiziert wurde.

	Pro Ansatz	Mastermix	Positivkontrolle	Negativkontrolle
10x taq-Puffer	5µl	50µl	5µl	5µl
dNTP´s	2µl	20µl	2µl	2µl
5´ Sequenzierprimer	1µl	10µl	1µl	1µl
3´ Sequenzierprimer	1µl	10µl	1µl	1µl
H ₂ O _{bidest}	40,625µl	405,25µl	39,625µl	40,625µl
Bakterienkolonie	Je 1	Insg. 10 Kolonien	1µl pMIR	-
Taq-Polymerase	0,375µl	3,75µl	0,375µl	0,375µl

Tabelle 13: Colony PCR für insg. 12 Ansätze inkl. Positiv- und Negativkontrolle

Zur Erfolgskontrolle wurde 25µl der PCR-Produkte mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und über die Gelelektrophorese aufgetrennt.

4.3.4 Zielgerichtete Mutagenese

Um zielgerichtete Punktmutationen in die miRNA-Target-Sequenz der 3´UTR einzubringen, wurde in dieser Arbeit die sogenannte Overlap-Extension-Mutagenese-PCR verwendet.

Methoden

Diese besteht aus drei einzelnen PCR-Schritten und der Verwendung von zwei komplementären Mutagenese Primern (MutFOR und MutREV) und den zwei Original-Primern, welche bereits zum Amplifizieren der 3'UTR verwendet wurden (FOR/REV).

In der ersten PCR wurde zum einen der Primer FOR und MutREV und in der zweiten PCR der Primer MutFOR und REV verwendet. Das Resultat dieser beiden PCR-Reaktionen sind zwei DNA-Fragmente, welche die gewünschte Mutation tragen und deren Sequenzen sich im zu mutierenden Bereich überlappt. Die einzelnen DNA-Fragmente der beiden PCR wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, steril herausgeschnitten und reisoliert. Diese dienen in der abschließenden dritten PCR als Template, hierfür wurden die Original Primer (FOR/REV) verwendet. Die Reaktionsansätze sind in Tabelle 14, Tabelle 15 und Tabelle 16 dargestellt. Bei allen 3 PCR-Ansätzen wurde das Standardprogramm aus Tabelle 11 verwendet.

Volumen	Komponente	Endkonzentration
5µl	10x Phusion-Polymerase-Reaktions-Puffer	1x
2µl	dTNP	100mM
1µl	Original 5'Primer FOR (1:4)	50µM
1µl	3'Primer MUT REV (1:4)	50µM
1µl	pMIR-3'UTR Reporterkonstrukt (1:10)	100ng
0,5µl	Phusion Polymerase	5U
39,5 µl	H ₂ O _{bidest}	

Tabelle 14: PCR Ansatz 1

Volumen	Komponente	Endkonzentration
5µl	10x Phusion-Polymerase-Reaktions-Puffer	1x
2µl	dTNP	100mM
1µl	Original 3'Primer FOR (1:4)	50µM
1µl	5'Primer MUT REV (1:4)	50µM
1µl	pMIR-3'UTR Reporterkonstrukt (1:10)	100ng
0,5µl	Phusion Polymerase	5U
39,5 µl	H ₂ O _{bidest}	

Tabelle 15: PCR Ansatz 2

Methoden

Volumen	Komponente	Endkonzentration
5µl	10x Phusion-Polymerase-Reaktions-Puffer	1x
2µl	dTNP	100mM
1µl	Original 5'Primer FOR (1:4)	50µM
1µl	Original 3'Primer REV (1:4)	50µM
1µl	PCR Produkt aus Ansatz 1	100ng
1µl	PCR Produkt aus Ansatz 2	100ng
0,5µl	Phusion Polymerase	5U
38,5 µl	H ₂ O _{bidest}	

Tabelle 16: PCR Ansatz 3

Um den Erfolg der PCR zu überprüfen wurden 25µl des PCR-Ergebnisses gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die für diese Arbeit mutierten 3'UTR in Tabelle 23 (Seite 55) dargestellt.

4.3.5 Agarosegelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet, um verschieden große DNA-Fragmente voneinander zu trennen. Man macht sich das Prinzip zu Nutze, dass die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur positiven Anode wandern. Das Agarosegel dient hierbei als Molekularsieb. Hierdurch können kleine Fragmente schneller durch die Poren des Gels wandern als große Fragmente. Die Porengröße dieses Molekularsiebes wird durch die Agarosekonzentration des Gels bestimmt. Hierdurch konnte durch Anpassung der Agarosekonzentration des Gels eine Optimierung der aufzutrennenden Fragmente erfolgen [Maniatis et al., 1989].

4.3.5.1 Herstellung Agarosegel

Es wurde die benötigte Menge an Agarose (z.B. 4,5 g bei 1%igem Gel) in 450 ml 1xTAE-Puffer gelöst und das Gemisch in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurde es auf einem Magnetrührer auf ca. 60°C abgekühlt und mit 23 µl Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml in H₂O) versetzt. Dieses Gemisch wurde noch in flüssiger Form auf eine Glasplatte gegossen, die von einem Messingrahmen umgeben war und mit 1%-iger Agarose abgedichtet wurde. In bereitgestellten Halterungen sorgten insgesamt 3 Messingkämme, dass die ca. 35 µl fassenden Probetaschen ausgespart wurden. Als Endergebnis entstand ein Agarosegel von 24,5 x 24,5 x 1 cm. Die Kämme konnten nach Auspolymerisierung aus

Methoden

dem Gel gezogen werden. Das Gel wurde daraufhin in Frischhaltefolie verpackt und bei 4 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Agarosemenge (mg)	Agarosekonzentration im Gel (%)	DNA-Trennbereich (kb)
2,25	0,5	1 – 30
3,15	0,7	0,8 – 12
4,5	1	0,5 – 7
5,4	1,2	0,4 – 6
6,75	1,5	0,2 – 3
9	2	0,1 – 2

Tabelle 17: Agarosekonzentrationen und die dazugehörigen DNA-Trennbereiche

Den DNA-Proben wurden vor dem Pipettieren in die Taschen des Gels glycerolhaltiger Blaumarker zugefügt. Es wurde ein Gelstück mit der benötigten Anzahl an Probestaschen in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und die DNA-Proben in die Taschen gefüllt. Um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente ermitteln zu können, wurde zusätzlich ein DNA Größenstandard (siehe 3.5 DNA-Größenmarker) mit auf das Gel aufgetragen. Diese Proben wurden dann 1 h lang bei 150V mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid, welches mit doppelsträngiger DNA interkaliert, ließ die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar werden. Normalerweise würde die Dokumentation bei $\lambda=254$ nm stattfinden. Allerdings würde dieses kurzwellige Licht die DNA so stark schädigen, dass sie nicht mehr zur Weiterverarbeitung geeignet wäre. Daher wurden bei $\lambda=365$ die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten.

4.3.6 NucleoSpinTM-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das NucleoSpinTM-Extraktions Kit der Firma Macherey-Nagel wurde verwendet, um die DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu extrahieren. Mit diesem Kit konnten ebenfalls DNA-Lösungen aufgereinigt werden (PCR-Clean-up). Hierbei erfolgte die Aufreinigung bzw. Extraktion nach Herstellerangaben. Diese Methode beruht auf dem Prinzip einer Ionenaustauschchromatographie. Hierbei bindet die negativ geladene DNA an die silicagelhaltige Säule und wird, nach einem anschließenden Waschschrift, eluiert. Bei einer Klonierung konnte die dadurch erhaltene DNA im Anschluss entweder mit Restriktionsenzymen geschnitten oder zur direkten Ligation in den pGEM-T®-Vektor eingesetzt werden.

4.4 Enzymatische Modifikation von DNA

4.4.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (REN, Restriktionsenzyme) kommen natürlicherweise überwiegend in Bakterien vor und schützen diese vor Eindringen von Fremd-DNA, welche sie unter anderem anhand fehlender Methylierungsmuster erkennen. Hauptsächlich werden in der Molekularbiologie die Restriktionsenzyme der Klasse II eingesetzt. Diese schneiden direkt in oder in der direkten Nähe der Erkennungssequenz und benötigen kein ATP. REN erkennen eine spezifische Sequenz, die meist palindromisch angeordnet ist und über vier, sechs oder acht Basenpaaren verläuft. Dabei können sie zwei unterschiedliche Arten von Schnitten erzeugen. Von „blunt ends“ wird gesprochen, wenn ein direktes Schneiden zwischen zwei gegenüberliegenden Basenpaaren erfolgt. Hierbei entstehen gerade Enden. Schneiden die Enzyme so, dass 3`-bzw. 5`-Überhänge entstehen, spricht man von „sticky ends“. Eine Ligation von sticky ends verläuft meist einfacher, da die Überhänge hybridisieren können und so leichter zueinander finden. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird über die Menge an Enzym definiert, welche benötigt wird, um 1 µg DNA unter optimalen Bedingungen (optimales Milieu; optimale Temperatur) in einer Stunde zu schneiden. Diese Menge wird als eine Unit [U] definiert [Maniatis et al., 1989].

Tabelle 18 zeigt die jeweiligen 3'UTR-Sequenzen und die hierfür verwendeten Restriktionsenzyme.

pMIR- 3'UTR	Restriktionsenzyme zur Größenkontrolle FOR/REV	Restriktionsenzyme zur Orientierungskontrolle FOR/REV
pMIR-TSPAN3-3'UTR	Sac I/NgoMIV	Spe I/NgoMIV
pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR	Sac I/NgoMIV	Spe I/NgoMIV
pMIR-TSPAN3-T1-3'UTR	Sac I/NgoMIV	Spe I/NgoMIV
pMIR-TSPAN3-TM1-3'UTR	Sac I/NgoMIV	Spe I/NgoMIV
pMIR-TSPAN3-T2-3'UTR	Sac I/NgoMIV	Spe I/NgoMIV
pMIR-TSPAN3-TM2-3'UTR	Sac I/NgoMIV	Spe I/NgoMIV
pMIR-TSPAN3-TM3-3'UTR	Sac I/NgoMIV	Spe I/NgoMIV
pMIR-AKT1S1-3'UTR	Spe I/Sac I	Spe I/NgoMIV
pMIR-AKT1S1-Mut1-3'UTR	Spe I/Sac I	Spe I/NgoMIV
pMIR-AKT1S1-Mut2-3'UTR	Spe I/Sac I	Spe I/NgoMIV

Methoden

pMIR-MORF4L2-3'UTR	Spe I/Sac I	Spe I/NgoMIV
pMIR-MORF4L2-Mut142-3'UTR	Spe I/Sac I	Spe I/NgoMIV
pMIR-MORF4L2-Mut29-3'UTR	Spe I/Sac I	Spe I/NgoMIV

Tabelle 18: 3'UTR-Sequenzen und verwendete Restriktionsenzyme

4.4.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Mithilfe der alkalischen Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) bzw. antarktischen Phosphatase wurde die reaktive Phosphatgruppe am 5'-Ende des verdauten Vektors entfernt. Dadurch wird eine Rezirkularisation bzw. Konkaterisierung (Zusammenlagerung mehrerer Vektoren) des Vektors verhindert. Dies fand zeitgleich mit dem Restriktionsverdau statt, sodass hier von einem Doppelverdau gesprochen wurde. Dieser diente dazu einen gerichteten Einbau des Inserts in einen Vektor zu ermöglichen. Hierbei war zu beachten, dass ein Puffer verwendet wurde, in dem alle Enzyme eine möglichst hohe Restriktionsaktivität besitzen. Nach einer Inkubationszeit von 3 h oder über Nacht wurde der Restriktions- und Dephosphorylierungsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und der geschnittene Vektor mit Hilfe des NucleoSpinTM-Extraktions Kit reisoliert. Dieser nun linearisierte Vektor konnte zur Ligation von DNA-Fragmenten weiterverwendet werden [Bolivar et al., 1977; Chaconas und van de Sande, 1980].

Tabelle 19 zeigt das Pipettierschema eines Standard-Restriktionsansatzes eines Inserts und des dazugehörigen Vektors

Komponente	Menge für Insert	Menge für Vektor
Restriktionsenzym 1 und /oder 2	1U (zwischen 0,5-1µl)	1U (zwischen 0,5-1µl)
10x Reaktionspuffer (Cutsmart Buffer)	2µl	2µl
PCR-Produkt (DNA)	14µl	-
Vektor (pMIR)	-	2µg
Alkalische Phosphatase	-	2µl
H ₂ O _{bidest}	Ad 20µl	Ad 20µl

Tabelle 19: Pipettierschema eines Standard-Restriktionsansatzes

4.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Nach Restriktionsverdau von DNA-Insert und zusätzlicher Dephosphorylierung des nun linearisierten Vektors erfolgte die Ligation dieser beiden DNA-Fragmente miteinander. Hierfür wurde die, aus E. coli Bakterien, welche mit dem Bakteriophagen T4 infiziert waren, isolierte T4-DNA Ligase verwendet. Die Ligase katalysiert in vitro unter ATP-Verbrauch die

Methoden

Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3`-Hydroxy- und 5` Phosphatenden. Hierdurch entsteht eine intakte, rekombinante doppelsträngige Plasmid-DNA. Das ATP als Energiequelle wurde im Reaktionspuffer zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationen der Vektor- und Insert-DNA wurden so gewählt, dass sie zueinander äquimolar im Reaktionsansatz vorlagen. Hierdurch konnte eine effektive Ligation gewährleistet werden. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend wurden 5µl jedes Ligationsansatzes zur Transformation in kompetente Bakterienzellen verwendet. Zusätzlich lief immer eine Ligationskontrolle mit, die den Vektor aber nicht das Insert enthielt [Dugaiczky et al., 1975; Sgaramella et al., 1970].

Komponente	Ligationsansatz 1	Ligationsansatz 2	Kontrolle
Vektor	2µl	3µl	2µl
Insert	6µl	5µl	-
T4-Ligase	1µl	1µl	1µl
10xT4-Ligase Buffer	1µl	1µl	1µl
H ₂ O	-	-	6µl

Tabelle 20: Pipettierschema Ligationsansatz

4.4.4 Poly-A-tailing und Ligation in pGEM

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Vektor pGEM-T®-Vektor der Firma Promega nur zur Zwischenklonierung von Sequenzen verwendet. Hierfür benötigten die Sequenzen einen Adeninüberhang, welche durch verschiedene Polymerasen ermöglicht wird. Die Taq-Polymerase, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, fügt Adenine direkt in der PCR an die DNA-Sequenz an. Da die Phusion-Polymerase hierzu nicht in der Lage ist, wurde bei PCR-Produkten, welche mit der Phusion Polymerase amplifiziert worden sind, ein nachträgliches Anfügen der Adenine notwendig, um diese dann in den pGEM-Vektor zu klonieren.

Hierfür wurden folgende Einzelkomponenten kombiniert und bei 70°C 30 Minuten lang inkubiert.

- 5µl des PCR-Produktes
- 1µl taq-Reaktionspuffer
- 2µl dATP
- 1µl H₂O
- 1µl taq-Polymerase

Methoden

In diesen 30 Minuten bringt die Polymerase die Adenine an das PCR-Produkt an. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des NucloeSpin™-Extraktions Kits aufgereinigt und konnte zur Ligation in den pGEM-T®-Vektor benutzt werden.

In dieser Doktorarbeit wurde das Ligationskit der Firma Promega verwendet, welches den pGEM-Vektor, Puffer und Ligase enthielt.

Komponente	Menge
pGEM-Vektor	1µl
PCR-Produkt nach Poly-A-Tailing	3µl
2x T4-Ligasepuffer	5µl
T4 DNA-Ligase	1µl

Tabelle 21: pGEM-Ligationsansatz

4.5 Dual-Luciferase® Reporter Assay

Um Genexpressionen und daran gekoppelte zelluläre Abläufe zu untersuchen wurde in dieser Arbeit das Dual-Luciferase® Reporter Assay der Firma Promega verwendet. Es enthält das Enzym Luciferase, welches in Anwesenheit von O₂, ATP und Mg₂₊ die Oxidation von Luciferin katalysiert. Hierbei wird Licht in Form eines Photons emittiert. Die entstandene Emission ist proportional zur Menge an Luciferase und kann in einem Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold Technologies GmbH & Co.KG) detektiert werden. Mit diesem auch duale Reportersystem genannte Verfahren kann die Aktivität beider Luciferasen in einem Assay bestimmt werden. Hierbei wird zuerst die Aktivität der Firefly-Luciferase durch Zugabe des spezifischen Substrates (LARII; Promega) im Luminometer gemessen. Durch Zugabe eines Renilla-Substrates (STOP&GLO Lösung (Promega)) wurde diese Reaktion gestoppt und gleichzeitig die Aktivität der Renilla-Luciferase bestimmt. Es wurde für die Dual-Luciferase-Assays in dieser Arbeit der pMIR-RNL-TK Vektor verwendet. Die zu untersuchende 3' UTR Sequenz wurde hierfür hinter das Firefly-Luciferase Gen kloniert. Hierdurch ist die Aktivität der Luciferase vom Effekt der zu testenden microRNA auf die 3' UTR abhängig. Zur Kontrolle diente die Renilla-Luciferase Aktivität, da ihre Expression unabhängig von der klonierten Sequenz ist. Es wurden zunächst 293T-Zellen in 24 Lochplatten ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank (Hera Cell150 (Thermo Scientific)) gelagert. Am Folgetag wurden diese Lochplatten mittels Nanofectin transfiziert. Hierbei wurden jeweils 0,8µl Effektorplasmid- und 0,2µl Reporterplasmid-DNA eingesetzt (siehe Tabelle 22 Transfektionsbeispiel). Nach weiteren 48 Stunden im Brutschrank wurden Zelllysate nach Herstellerangaben angefertigt und mit 1x PLB 1:100 verdünnt. Es wurden Luminometerröhrchen aufgestellt und zunächst 50µl LARII in jedes Röhrchen vorgelegt, 10µl

Methoden

des 1:100 verdünntem Zelllysate wurden hinzugegeben und im Luminometer wurde die Lumineszenz detektiert. Danach wurde zügig 50µl STOP&GLO zugegeben und erneut die Lichtemission gemessen. In der Auswertung wurden die Aktivität der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase in Bezug zueinander gesetzt. Durch entsprechend mitlaufenden Kontrollen wurde sichergestellt, dass ein Effekt der microRNA auf den Leervektor auszuschließen ist. Darüber hinaus wurden neben der Wildtyp miRNA auch mutierte miRNAs getestet. Da hierdurch allerdings nicht sichergestellt ist, dass die richtige Site der miRNA auch an der richtigen Bindestelle im Reporterplasmid bindet, wurde nach positivem Ergebnis die bekannte Sequenz (siehe 4.3.4 Zielgerichtete Mutagenese) mutiert und die miRNAs noch einmal getestet.

Abschließend wurden die Ergebnisse in der Software Sigma Plot eingetragen und der enthaltene T-Test ausgeführt. Eine statistische Signifikanz lag bei einem Wert ≤ 0.05 vor.

Nummer	pSG5	pSG5-miRNA	pMIR	pMIR-3'UTR
1	0,8 µl		0,2 µl	
2	0,8 µl		0,2 µl	
3		0,8 µl	0,2 µl	
4		0,8 µl	0,2 µl	
5	0,8 µl			0,2 µl
6	0,8 µl			0,2 µl
7		0,8 µl		0,2 µl
8		0,8 µl		0,2 µl

Tabelle 22: Transfektionsbeispiel

5. Ergebnisse

5.1 Fragestellung

Die miR-142 spielt eine wichtige Rolle bei der immunologischen Antwort sowie bei verschiedenen Erkrankungen und Malignomen (siehe Tabelle 1: Übersicht über einige miR-142 assoziierte Erkrankungen, Seite 8-9). Eine Assoziation des miR-142-Plasmaspiegels wird zudem in Verbindung mit verschiedenen Erkrankungen gebracht, unter anderem mit schweren unerwünschten kardiovaskulären Ereignissen nach Koronarintervention [Tang et al., 2018] oder erhöhter Tumorzellproliferation mit verminderter Apoptose [Ma et al., 2016]. Die Erfassung der miR-142-Spiegel in Gewebe oder im Plasma könnte also in Zukunft als Biomarker eine Rolle spielen. Im Rahmen von Arbeiten am diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) zeigten sich in ca. 20% aller untersuchten Fälle, Mutationen in den 3' und 5' Seed-Sequenzen der miR-142 [Kwanhian et al 2012]. Dies ging mit einem Funktionsverlust der miRNA einher. Eine miRNA, welche in der 3'-Seed-Sequenz eine Mutation aufweist kann ein 3'Target nicht mehr regulieren, analog verhalten sich 5'-Seed-Sequenz-Mutationen und 5'Targets. Umgekehrt ist durch Mutation der entsprechenden miRNA-Bindestelle im Target eine Regulation aufgrund fehlender Interaktion mit der miRNA nicht mehr möglich. Alternativ kommt jedoch auch ein Zugewinn an Zielgenen in Betracht, wenn die „Seed-Sequenz“ eine Mutation aufweist. In der vorliegenden Arbeit sollten potentielle Targets der miR-142, die durch die Methode des PAR-CLIP identifiziert worden waren, experimentell bestätigt werden. Die Targets wurden auf Grund bioinformatischer Vorhersagen (Ohler, MDC, Berlin) ausgewählt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt der miRNA, sowie der Effekt der miR-142-3p und -5p Mutanten an den entsprechend klonierten 3'UTRs getestet. Hierbei handelt es sich um die 3'UTRs in den mRNAs der Gene von MORF4L2 (siehe 2.4 MORF4L2, Seite 10), AKT1S1 (siehe 2.5 AKT1S1, Seite 12) und TSPAN3 (siehe 2.6.1 TSPAN3, Seite 19).

Für MORF4L2 wurde über TargetScan eine Bindestelle für die miR-142-3p vorhergesagt. Abbildung 11 zeigt die potentielle Bindestelle. Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine potentielle Bindestelle der miR-29a/b, die in der MORF4L2-3'UTR ebenfalls vorhergesagt wurde, mitgetestet, da im Labor Grässer die entsprechenden miRNA Expressionskonstrukte vorhanden waren.

Ergebnisse

```

CTGTGAGCGTCTACAGACAGCTCACCATTTTTGTCCTGTATCTGTAAACACTTTTTGTTCTTAGTCTTTTT
CTTGAAAAATTGATGTTCTTTAAAATCGTTAATGTATAACAGGGCTTATGTTTCAGTTTGTTTTCCGTTCTG
TTTTAACAGAAAATAAAAGGAGTGAAGCTCCTTTTCTCATTTCAAAGTTGCTACCAGTGTATGCAGTAA
TTAGAACAAGAAGAAACATTCAGTAGAACATTTTATTGCCTAGTTGACAACATTGCTTGAATGCTGGTG
GTTCTATCCCTTTGACACTACACAATTTTCTAATATGTGTTAATGCTATGTGACAAAACGCCCTGATTCC
TAGTGCCAAAGGTTCAACTTAATGTATATACCTGAAAACCCATGCATTTGTGCTCTTTTTTTTTTTTATGG
TGCTTGAAGTAAAA
TGA = Stop-Codon
ACACTACA = Bindestelle der miR-142-3p
TGGTGCT = Bindestelle der miR-29a und miR-29b

```

Abbildung 11: Darstellung der Nukleotidsequenz von MORF4L2-3'UTR mit dargestelltem Stop-Codon (rot), Bindestelle der miR-142-3p (blau) und Bindestelle der miR-29a und miR-29b (grün). Die oben gezeigte Sequenz wurde in den Reportervektor pMIR kloniert.

Es wurde angenommen, dass sowohl der Wildtyp der miR-142 („miR-142-wt“) als auch die miR-142-M3, mit einer Mutation der „5p-Seed“-Sequenz, die 3'UTR des MORF4L2 herunterreguliert. Eine Regulation dieser 3'UTR durch miR-142-M1, in welcher eine Mutation in der „3p-Seed“-Sequenz vorliegt, sollte umgekehrt nicht erfolgen (siehe Ergebnisse 5.4 Die pMIR-MORF4L2-3'UTR als Target-mRNA für die miR-142 und miR-29, Seite 56-58).

Für AKT1S1 wurden zwei Bindestellen für die miR-142-3p vorhergesagt. Für die zweite Bindestelle wurde durch das Programm „TargetScan“, eine stärkere Affinität vorausgesagt; diese Bindestelle ist in Abbildung 12, welche die Nukleotidsequenz von AKT1S1-3'UTR darstellt, in der Farbe Magenta und Fettdruck, dargestellt.

Zudem stellt Abbildung 12 die in dieser Arbeit mitgetesteten Bindestellen der miR-125 und miR-146 dar.

Ergebnisse

```

CTCTTCGCCCGACCTGGACCGCATCGCGGCGAGCATGCGCGCGCTGGTGCTGCGAGAGGCCGAGGAC
ACCCAGGTCTTCGGGGACCTGCCACGGCCGCGGCTTAACACCAGCGACTTCCAGAAGCTGAAGCGGAA
ATATTGAAGTCCAGGGAGGGAGCGCCCCGGGCGCGTCCGCCCGTCCACACTACGCCCCCGCCCC
ACTCCCGGGGCTGCTAATCTGAGGCCGATCCGGGACCGGCCTCCTTGCGTCTCCCATTCCCAAGATTG
TCCCGCCTCTGCCAATCCCCGCCGTCTTCCAGCCCACGACCTGCCGCGCCGAGGAGCGGCATCTGTC
CCGTTTCCCGATTGGGTCTGTCGTCTCTCTCCGCCTAGCGACAGATTCTTCTATTAAGGGATTGGCTCG
CTGAGTTCTAAGCTCTAAATGGGTCAACTCCTTTGTTTTCCGCCTAGCGACAAGGGATTGCTCGCACGG
CATTGGCTCCATCCCCTAGTCGCTGGACAGCTCTTTTTTTGATTGGCTCAAATCCTGTAAAGGGCTTGAC
CAGTCTCTACATAGTCACCGTCCGCTTTTCCTGAGTTCTCCCTCCCAATTGGCTCCAGCTTCTGGGGGC
GTGGCCAAGCCCTCCTCTTCCAGAAATTGGCCCGGGGCTTCAATTTACGTTCTTTACACTACGGGGAC
TGGGGTCGTCTTTGCCACGTCCCGACAACCTGTTCCCTGACCCCCTCAGGGATGGCCCCAAACTGTCC
CTGCCTCTGGCACCCCTTTCATTGGTTCCATCCATCCCCACAACAGCCTGCCAATCGAAGCCCGTCCCT
GCATCCAGGATGGTACCAGCTCCCGCCCTCGCCCCCACCTCCACAGGTGCCTTAAAGGGCCCTCGT
CCACCCAAGGTGGGGGGCAGGGGCCCTCACTCTCCGGCCCTGGTGTG

```

TGA = Stop-Codon

ACACTACA = Bindestelle der miR-142-3p

ACACTACA = Bindestelle mit stärkerer Affinität für die miR-142-3p

CTCAGGGA = Bindestelle der miR-125a-5p/125b-5p

AGTTCTC = Bindestelle der miR-146-5p

Abbildung 12: Darstellung der Nukleotidsequenz von AKT1S1-3'UTR mit dargestelltem Stop-Codon (rot), Bindestellen der miR-142-3p (magenta), Bindestelle der miR-125a/b-5p (gelb) sowie Bindestelle der miR-146-5p (blau). Durch das Programm TargetScan wurde für die zweite Bindestelle in der 3'UTR eine stärkere Affinität der miR-142 vorhergesagt (magenta & fett).

Auch hier wurde eine Erniedrigung der Aktivität des AKT1S1-Reporterplasmids mit der miR-142-wt und der miR-142-M3 erwartet. Jedoch war die Auswirkung der einzelnen Bindestellen in der 3'UTR nicht genau abzuschätzen. Es wurde davon ausgegangen, dass trotz Mutation einer Bindestelle in der 3'UTR, eine Regulation aufgrund der zweiten Bindestelle vorhanden sein müsste. Daher wurden die Bindestellen einzeln im Rahmen dieser Arbeit mutiert und getestet (siehe Ergebnisse 5.5 Die pMIR-AKT1S1-3'UTR als Target-mRNA für die miR-142, miR-146 und miR-125, Seite 59-61).

TSPAN3 wurde von TargetScan als Target der miR-142-5p vorhergesagt und unterscheidet sich daher von den beiden vorherigen Genen, die potentielle Bindestellen für miR-142-3p enthalten. Zu Beginn dieser Arbeit im Oktober 2013 waren nur wenige 5'Targets der miR-142 bekannt.

Abbildung 13 zeigt die potentielle Bindestelle für miR-142-5p in der TSPAN3-3'UTR. Zudem wurde freundlicherweise durch Analysen von Dr. Martin Hart (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg) eine potentielle 6mer Bindestelle der miR-142-3p angegeben.

Ergebnisse

```

CATAGTTGACAACCTCAAGCCTGAGCTTTTTGGTCTTGTTCTGATTTGGAAGGTGAATTGAGCAGGTCTGC
TGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCATTTAGTTAAAGCACATGTACACTGGTGTGGACAGAGCAGCTTGGCTT
TTCATGTGCCACCTACTTACCTACTACCTGCGACTTCTTTTTCTTGTCTAGCTGACTCTTCATGCCC
CTAAGATTTTAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTCAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGGTAGAAT
TAAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGACTGATGCCGAAATGTCACCAGG
TCCTTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTTGCGGGGAGGAGGAAACCAGCTT
TCTGGTTAAGGTTAACACCAGATGGTGCCTCATTGGTGTCTTTTAAAAAATATTTACTGTAGTCCAAT
AAGATAGCAGCTGTACAAAATGACTAAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCA
AAATCAGAGACTGAGCTTTGAAACTAGTGGTTTTTAATCAAAGTTGGCTTTATAGGAGGAGTATAATGTAT
GCACTACTGTTTTAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTGTATGAATGAGCCATTTCATGGTAAGTCTTAA
GCTTGTGGAAATAATGTACCCATGTAGACTAGCAAATAGTATGTAGATGTGATCTCAGTTGTAATAGA
AAAATCTAATTCAATAAA

```

TAG = Stop-Codon

GCACTAC = potentielle Bindestelle der miR-142-3p

CTTTAT = Bindestelle der miR-142-5p

Abbildung 13: Darstellung der Nukleotidsequenz von TSPAN3-3'UTR mit dargestelltem Stop-Codon (rot) und Bindestelle der miR-142-5p (blau). Zudem wurde eine potentielle Bindestelle der miR-142-3p durch Dr. Hart zur Verfügung gestellt (magenta). Die oben genannte Sequenz wurde in den Reportervektor pMIR kloniert.

Es wurde angenommen, dass durch die miR-142-5p als auch durch die miR-142-M1 eine Regulation der 3'UTR erreicht wird jedoch nicht durch die miR-142-M3, in welcher die 5'-Seed-Sequenz mutiert ist (siehe Ergebnisse 5.6 Die pMIR-TSPAN3-3'UTR als Target für die miR-142, Seite 62-67). Diese Interaktion-Vorhersagen der miR-142 mit diesen Genen sollte im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden. Durch Mutationen der miRNA-Bindestelle in der 3'UTR sowie durch den Einsatz von Mutanten der miR-142 sollte geprüft werden, ob weitere nicht beschriebene Interaktionen stattfinden. Abbildung 14 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten der miR-142, welche freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden und aus der Arbeit Kwanhian et al. (2012) stammen.

Original-Seed-Sequenz der miR-142-3p: GUAGUGU
Original-Seed-Sequenz der miR-142-5p: AUAAAGU
miR-142-M1 (mutierte 3p Site): GUAGUG C
miR-142-M3 (mutierte 5p Site): AUAA UU

Abbildung 14: Darstellung der Seed-Sequenz der Original miR-142-3p, miR-142-5p sowie der miR-142-M1 und M3. Die Punktmutationen (gelb) befinden sich bei der M1 an Position 7 der Seed-Sequenz bzw. an Position 6 der Seed-Sequenz der M3. Diese Daten wurden dem Paper von Kwanhian et al. (2012) entnommen.

5.2 Amplifikation und Klonierung

Für diese Arbeit wurden insgesamt 13 verschiedene 3'UTR Sequenzen hinter das Firefly-Luciferase-Gen des pMIR-RNL-TK Vektor kloniert (siehe Tabelle 7: Reporterplasmide, Seite 31). Es wurden zunächst spezifische 3' und 5' Primer konstruiert, welche von der Firma MWG Biotech bezogen wurden. Aus Testis-cDNA oder durch Mutagenese der fertigen Vorläufer 3'UTR wurde in einer PCR die entsprechende Ziel-3'UTR amplifiziert. Diese wurde über die Gelelektrophorese aufgetrennt und mit NucleoSpin™-Kits der Firma Macherey-Nagel reisoliert (siehe 4.3.6 NucleoSpin™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Seite 44).

5.3 Mutation der miRNA-Bindestellen in der 3'UTR

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war nur TSPAN3 als potentiell Ziel der miR-142-5p beschrieben worden. Daher sollte der relevante Teil der 3'UTR von TSPAN3 mit der Bindestelle für miR-142-5p in den Luciferase-Reportervektor kloniert werden (siehe Abbildung 13, Seite 53). Dies wurde auch für die 3'UTR des MORF4L2 und des AKT1S1 durchgeführt, für diese waren potentielle Bindestellen für die miR-142-3p vorhergesagt worden (siehe Abbildung 11 und 12, Seite 51-52). Weiterhin standen für die Experimente verschiedenen miR-142-Mutanten aus der Arbeit von Kwanhian et al. (2012) zur Verfügung. Die Mutante miR-142-M1 wies eine Mutation in der „Seed“-Sequenz der miR-142-3p auf, die Mutante miR-142-M3 wies eine Mutation in der „Seed“-Sequenz der miR-142-5p auf [Kwanhian et al., 2012] (siehe Abbildung 14, Seite 53). In der genannten Arbeit wurde für die Mutante M1 gezeigt, dass die Mutation die Reaktivität hinsichtlich der 3'UTR der RAC1 bzw. ADCYM9 3'UTR aufhob. Es stand daher zu erwarten, dass die Mutante M3 ihre Reaktivität hinsichtlich der potentiellen Bindestelle in der TSPAN3-3'UTR verlieren sollte. Analoge Überlegungen galten für die potentiellen Ziele MORF4L2 und AKT1S1 hinsichtlich ihrer Beeinflussung durch miR-142-3p. Weiterhin konnten in der genannten Arbeit durch die Verwendung der Mutanten initiale Hinweise auf das tatsächliche Vorhandensein einer entsprechenden Bindestelle erzielt werden. Dadurch würde sich in zukünftigen Arbeiten hinsichtlich Zielgenen der miR-142 prinzipiell die Mutation einer Bindestelle in der 3'UTR erübrigen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher für die Mutante in der 5p-Bindestelle der Beweis („proof of principle“) für diese Hypothese erbracht werden. Darüber hinaus wurden daher die Zielsequenzen der miRNAs im Reporterplasmid mutiert (siehe 4.3.4 Zielgerichtete Mutagenese, Seite 41) und dieses dann gegen die miRNAs als auch die mutierten miRNAs getestet. Tabelle 23 zeigt, die Bindestellen der miR-142 im Reporterplasmid, welche verändert wurden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Basenpaare der Austauschsequenz so unterschiedlich wie möglich waren. Es wurden als

Ergebnisse

Mutationssequenzen Zielsequenzen von Endonukleasen gewählt, um in der Klonierung bei Kontrollbedarf eine zusätzliche neue Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym zu besitzen. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Endonuklease sonst keine weitere Schnittstelle im Target aufweist.

Die Sequenz der miRNA-Bindestelle und die Position der Bindestelle in der 3'UTR wurde der Internetseite www.targetscan.org (Stand Oktober 2014) entnommen.

Reporterplasmid	miRNA	Sequenz der miR-Bindestelle in der 3'UTR (original)	Position in der 3'UTR	miR-Bindestelle (verändert)
pMIR-TSPAN3-3'UTR	miR-142-5p	CTTTAT	606-612	Nein
pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR	miR-142-5p	CTTTAT	606-612	PmlI-Site: CACGTG
pMIR-TSPAN3-T1-3'UTR	miR-142-5p	CTTTAT	606-612	Nein
pMIR-TSPAN3-TM1-3'UTR	miR-142-5p	CTTTAT	606-612	PmlI-Site: CACGTG
pMIR-TSPAN3-T2-3'UTR	miR-142-5p	CTTTAT	606-612	Nein
pMIR-TSPAN3-TM2-3'UTR	miR-142-5p	CTTTAT	606-612	PmlI-Site: CACGTG
pMIR-TSPAN3-TM3-3'UTR	miR-142-5p	CTTTAT	606-612	PmlI-Site: CACGTG
pMIR-AKT1S1-3'UTR	miR-146-5p	AGTTCTC	441-448	Nein
pMIR-AKT1S1-3'UTR	miR-125-5p	CTCAGGGA	592-599	Nein
pMIR-AKT1S1-3'UTR	miR-142-3p	ACACTAC	43-49 und 534-540	Nein
pMIR-AKT1S1-Mut1-3'UTR	miR-142-3p	ACACTAC	43-49	AfeI-Site: AGCGCT
pMIR-AKT1S1-Mut2-3'UTR	miR-142-3p	ACACTAC	534-540	AfeI-Site: AGCGCT
pMIR-MORF4L2-3'UTR	miR-142-3p	ACACTACA	294-301	Nein
pMIR-MORF4L2-Mut142-3'UTR	miR-142-3p	ACACTACA	294-301	PmlI-Site: CACGTG
pMIR-MORF4L2-Mut29-3'UTR	miR-29a/b	TGGTGCT	418-425	PmlI-Site: CACGTG

Tabelle 23: Reporterplasmide, miRNAs und ihre Bindestellen in der 3'UTR sowie die Endonukleasen, durch welche die miRNA-Bindestellen im Reporterplasmid ersetzt wurden

5.4 Die pMIR-MORF4L2-3'UTR als Target für die miR-142 und miR-29

Durch Luciferase-Assays (siehe 4.5. Duale-Luciferase® Reporter Assay Seite 48-49) wurde eine mögliche Regulation der pMIR-MORF4L2-3'UTR durch die vorhergesagten miRNAs miR-142 und miR-29 untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 15-17 dargestellt.

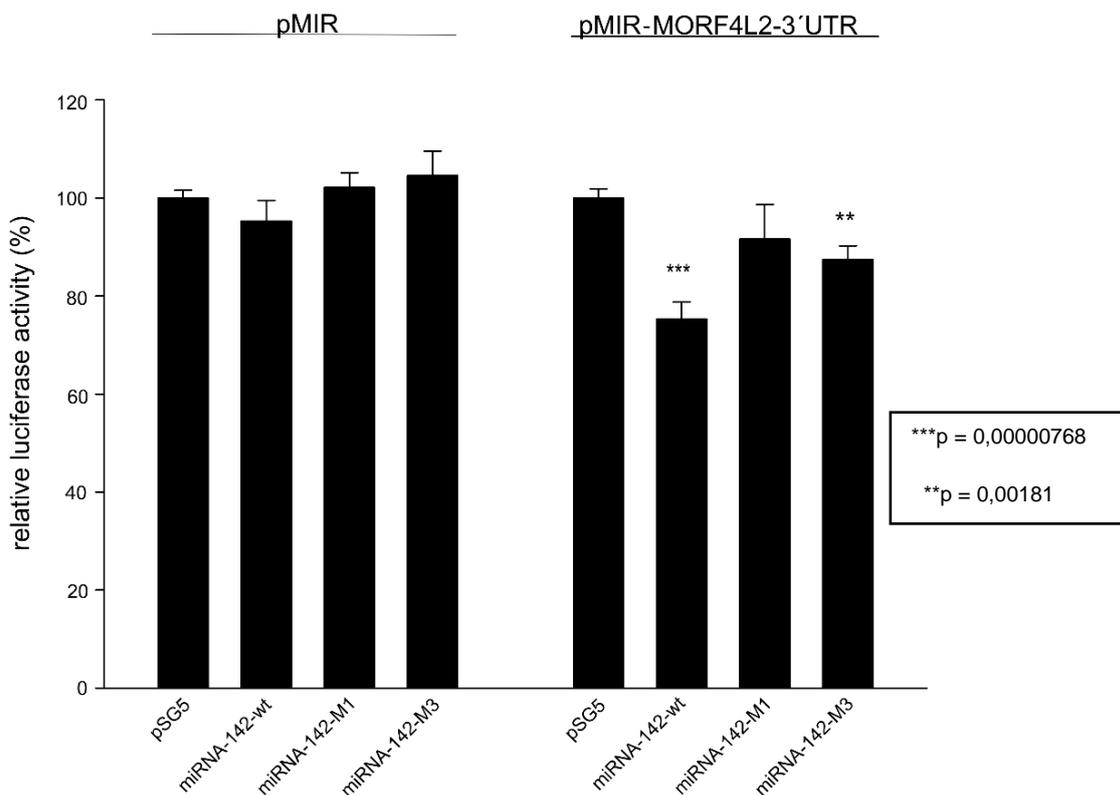


Abbildung 15: Einfluss der hsa-miR-142-wt, hsa-miR-142-M1 und hsa-miR-142-M3 auf den Leervektor pMIR und auf pMIR-MORF4L2-3'UTR

Die Luciferaseaktivität der kontroll-transfizierten-Zellen wurde auf 100% gesetzt. Es zeigte sich (siehe Abbildung 15) eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität bei Verwendung des Wildtyp der miR-142 auf 75% ($p^{***} = 0,00000768$). Darüber hinaus konnte eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität auf 87% ($p^{**} = 0,00181$) bei Verwendung der miR-142-M3, welche eine Mutation der „Seed“-Sequenz der miR-142-5p trägt, beobachtet werden. Aufgrund dieser Reduktion der Luciferaseaktivität ist davon auszugehen, dass der Effekt auf die miR-142-3p zurückzuführen ist. Diese These wird durch eine nichtsignifikante Reduktion der Luciferaseaktivität mit der miR-142-M1 gestützt ($p = 0,177$). Bei dieser miRNA liegt eine Mutation der „Seed“-Sequenz der miR-142-3p vor [Kwanhian et al., 2012]. Da die Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant abgefallen ist, ist hier von einer nicht relevanten Interaktion der 5p Site der miRNA mit MORF4L2-3'UTR auszugehen, d.h. der Effekt ist auf die 3p-Site der miR-142 zurückzuführen. Um diese These zu stützen wurde die miRNA Bindestelle in der 3'UTR mutiert und erneut in den pMIR-Vektor kloniert. Das

Ergebnisse

Reporterplasmid wurde pMIR-MORF4L2-Mut142-3'UTR genannt. Abbildung 11 (Seite 51) und Tabelle 23 (Seite 55) geben einen Überblick darüber gegen welche Sequenz die Bindestelle ausgetauscht wurde.

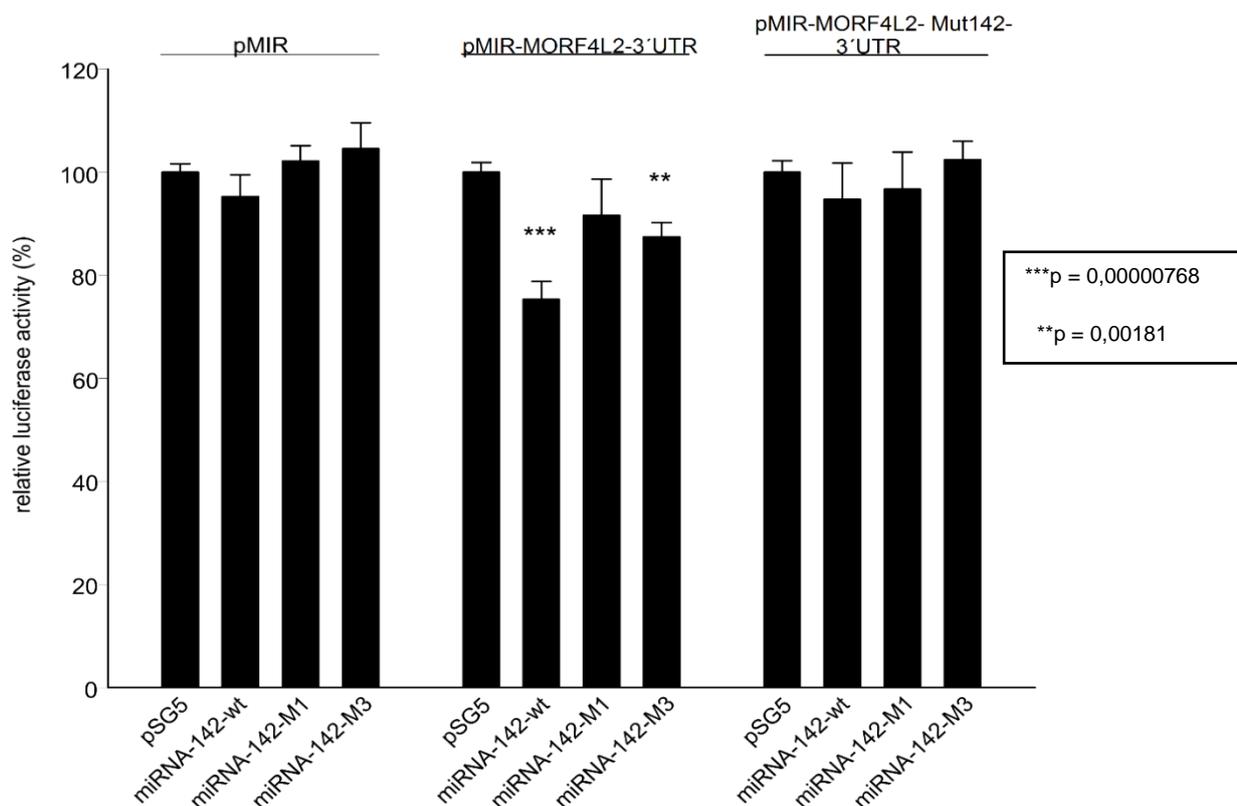


Abbildung 16: Einfluss der hsa-miR-142-wt, hsa-miR-142-M1 und hsa-miR-142-M3 auf den Leervektor pMIR, pMIR-MORF4L2-3'UTR und pMIR-MORF4L2-Mut142-3'UTR

Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, findet nach Mutation der Bindestelle in der 3'UTR keine signifikante Regulierung durch die miR-142 statt. Weder durch den miR-142-wt noch durch die entsprechenden mutierten Versionen der miRNA. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich hierbei um die Bindestelle der miR-142-3p handelt. Eine Interaktion konnte durch Mutation der Bindestelle in der 3'-UTR als auch durch eine Mutante der miRNA, welche einen Basenaustausch der in der „Seed“-Sequenz der miR-142-3p aufweist, verhindert werden. Die MORF4L2-3'UTR wurde durch das Programm Target-Scan (Stand Oktober 2014) als mögliches Target der miR-29a/b identifiziert. Da die miRNAs miR-29a und -29b im Labor Grässer vorhanden waren, wurde die MORF4L2-3'UTR auch mit diesen miRNAs getestet. Es zeigte sich sowohl eine Reduktion der Luciferaseaktivität bei Verwendung von miR-29a als auch miR-29b. Da die bioinformatische Vorhersage für beide miRNAs die identische Bindestelle vorhersagte, wurde diese unter Einführung einer Bindestelle für das Restriktionsenzym PmlI zerstört.

Ergebnisse

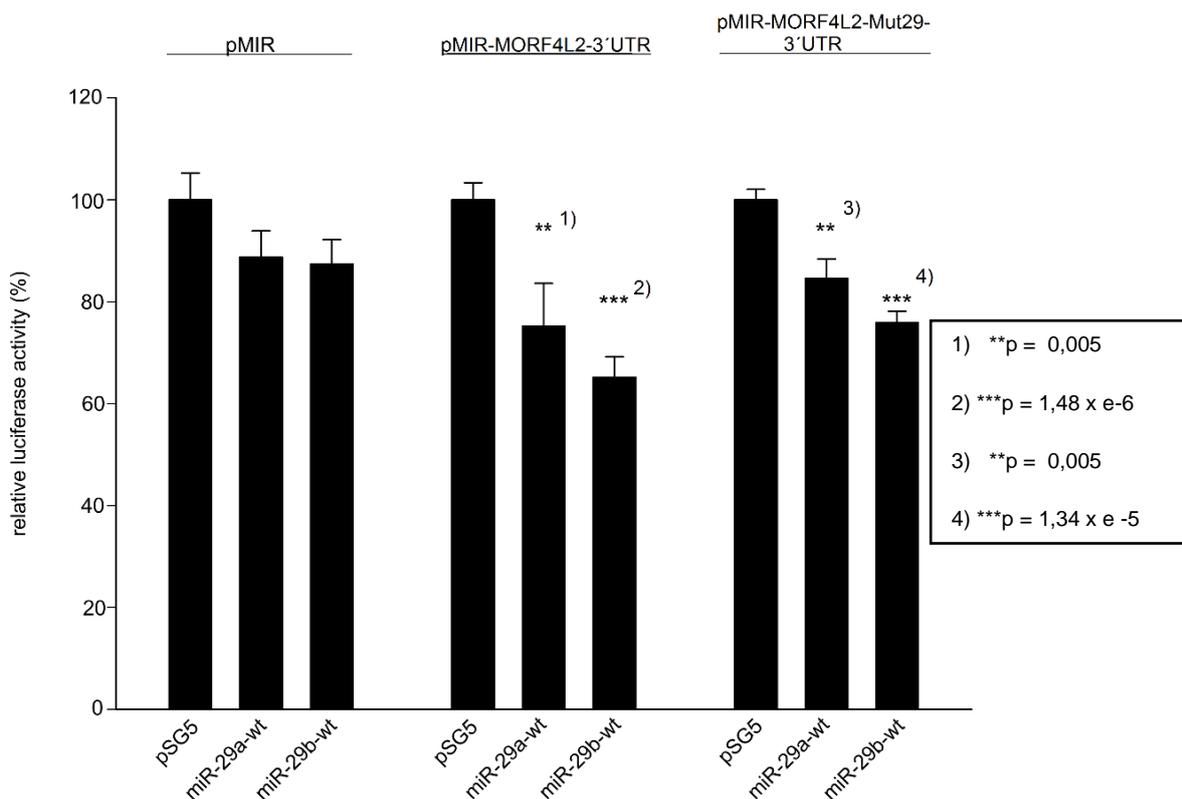


Abbildung 17: Einfluss der hsa-miR-29a-wt und hsa-miR-29b-wt auf den Leervektor pMIR, pMIR-MORF4L2-3'UTR und pMIR-MORF4L2-Mut29-3'UTR

Abbildung 17 zeigt, dass sowohl die miR-29a als auch die miR-29b bereits einen geringen, jedoch nicht signifikanten Effekt auf den pMIR Leervektor ($p=0,16$ für miR-29a; $p=0,09$ für miR-29b) haben. Während durch die miR-29a eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf 75,2% (1. $p^{**}=0,005$) erfolgte, konnte eine noch stärkere Reduktion der Luciferaseaktivität auf 65,2% (2. $p^{***}=1,48 \times 10^{-6}$) bei Verwendung der miR-29b erzielt werden. Dieser Effekt der Reduktion der Luciferaseaktivität konnte trotz Mutation der Bindestelle in der 3'UTR nicht aufgehoben werden. Sowohl die miR-29a konnte die Luciferaseaktivität weiterhin auf 84,6% (3. $p^{**}=0,005$) senken, als auch die miR-29b auf 75,9% (4. $p^{***}=1,34 \times 10^{-5}$). Sodass hier der Verdacht auf eine weitere bisher nicht identifizierte Bindestelle der miRNA bestand. Auf die Identifikation dieser zusätzlichen Bindestelle(n) wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

5.5 Die pMIR-AKT1S1-3'UTR als Target für die miR-142, miR-146 und miR-125

Im Folgenden wurden neben der miR-142 auch die miR-146 und miR-125 hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, die AKT1S1-3'UTR zu regulieren. Für diese miRNAs hatte das Programm TargetScan potentielle Bindestellen vorhergesagt. Auch hier wurde die Luciferaseaktivität der mit dem Leervektor transfizierten-Zellen auf 100% gesetzt. In der AKT1S1-3'UTR wurden 2 Bindestellen für die miRNA-142 vorhergesagt. Die potentiellen Bindestellen sind der Abbildung 12 (Seite 52) sowie der Tabelle 23 (Seite 55) zu entnehmen. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Luciferase Assays.

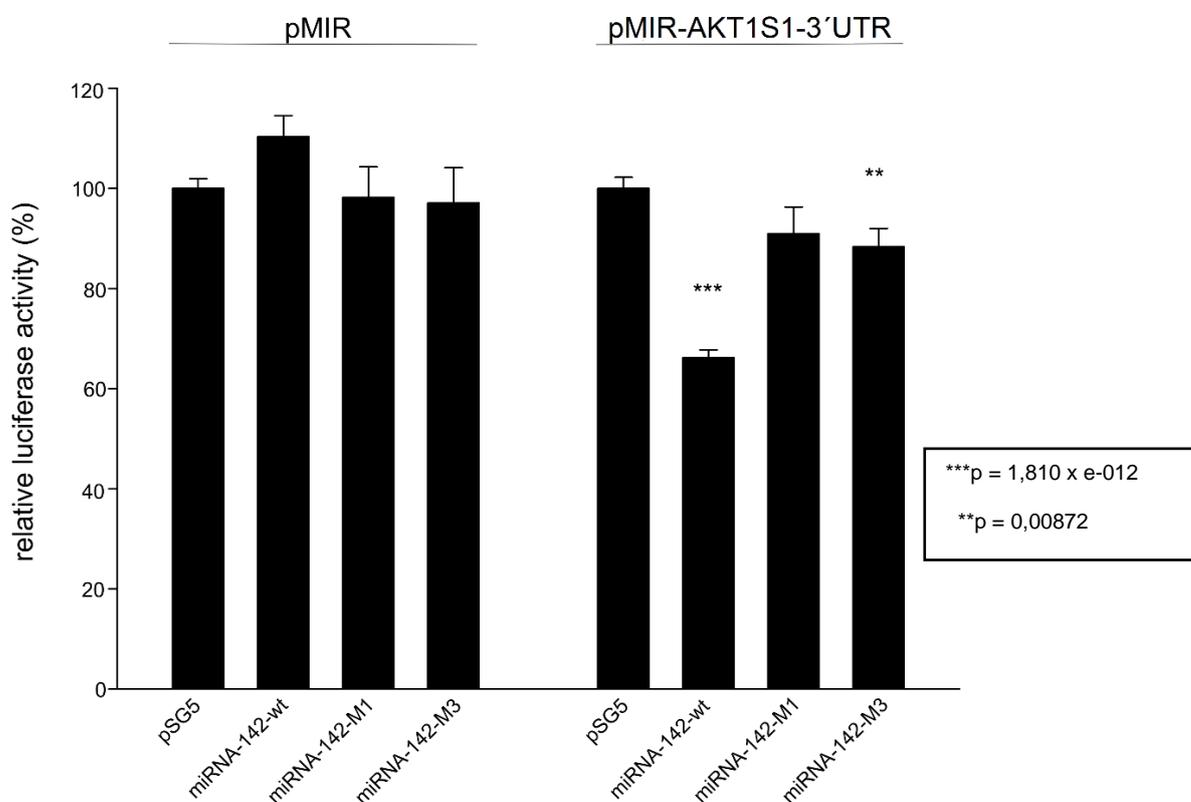


Abbildung 18: Einfluss der hsa-miR-142-wt, hsa-miR-142-M1 und hsa-miR-142-M3 auf den Leervektor pMIR und pMIR-AKT1S1-3'UTR

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität bei Verwendung der der miR-142-wt auf 66,2% % (**p= 1,810 x e-012). Weiterhin konnte eine Reduktion der Luciferaseaktivität bei Verwendung der miR-142-M3 auf 88,4% beobachtet werden (** p = 0,00872). Die Reduktion der Aktivität ist auf miR-142-3p zurückzuführen, miR-142-5p hat offenbar keinen Einfluss auf die AKT1S1-3'UTR da ihre „Seed“-Sequenz in der Mutante M3 verändert ist. Anhand dieser Daten war nicht ersichtlich, welche der beiden Bindestellen funktionell ist. Es wurde daher zuerst nur die am 5'-Ende gelegene Bindestelle der miRNA in

Ergebnisse

der 3'UTR mutiert, das resultierende Reporterplasmid wurde pMIR-AKT1S1-Mut1-3'UTR genannt.

Abbildung 19 stellt die Ergebnisse dieser Luciferase-Assays dar.

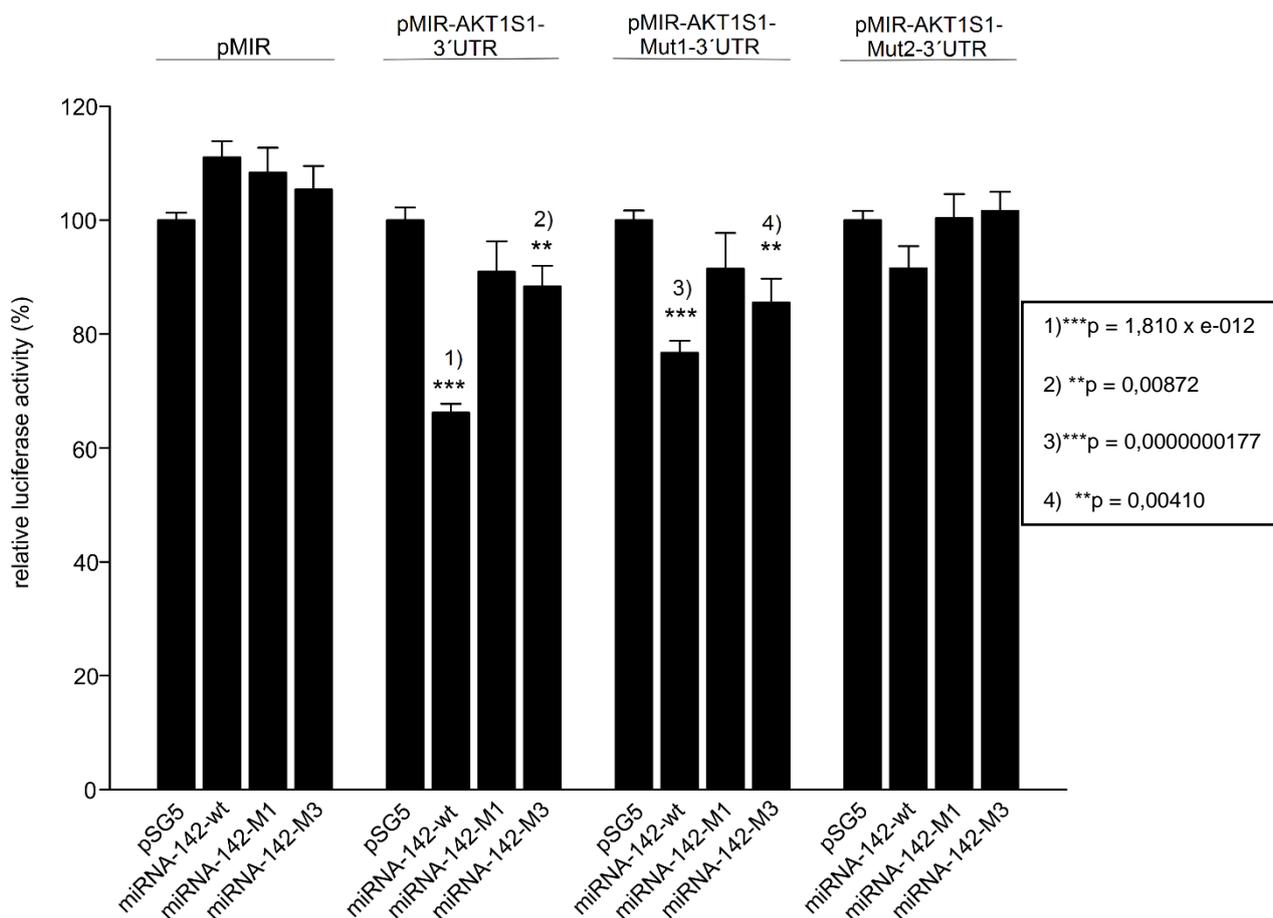


Abbildung 19: Einfluss der hsa-miR-142-wt, hsa-miR-142-M1 und hsa-miR-142-M3 auf den Leervektor pMIR, pMIR-AKT1S1-3'UTR, pMIR-AKT1S1-Mut1-3'UTR und pMIR-AKT1S1-Mut2-3'UTR

Wie bereits oben erwähnt zeigte sich eine deutliche Reduktion der Luciferaseaktivität der original 3'UTR mit der miR-142-wt auf 66,2% (1. ***p= 1,810 x e-012) sowie eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf 88,4% mit der miR-142-M3 (2. **p= 0,00872). Nachdem die erste Bindestelle (am 5'Ende) in der Original 3'UTR mutiert wurde (entsprechend pMIR-AKT1S1-Mut1-3'UTR) zeigte sich weiterhin eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf 76,7% (3. ***p = 0,0000000177) mit der miR-142-wt. Die miR-142-M3, in der die „Seed“-Sequenz der miR-142-5p mutiert ist, zeigte ebenfalls eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf 85,5% (4. **p= 0,00410). Es ist hier also auszugehen, dass der Einfluss der miR-142-3p, auch nach Mutation der 5'-gelegenen Bindestelle in der 3'UTR, erhalten blieb. Daher wurde von einer Interaktion der miRNA mit der 2.ten potentiellen Bindestelle, welche durch TargetScan vorhergesagt worden war, ausgegangen. Es erfolgte daher eine Testung der miRNA und

Ergebnisse

Ihrer Mutationen mit pMIR-AKT1S1-Mut2-3'UTR. In dieser 3'UTR wurde nur die zweite Bindestelle der miRNA am 3'Ende mutiert, während die erste Bindestelle unverändert blieb. Anhand Abbildung 19 ist zu erkennen, dass sich keinerlei Interaktionen zwischen der miR-142-wt und ihrer Mutanten mit pMIR-AKT1S1-Mut2-3'UTR nachweisen lassen. Die bisherigen Reduktionen der Luciferaseaktivität sind also auf die zweite Bindestelle der 3'UTR zurückzuführen. Somit fungiert nur die 2.te Bindestelle als Interaktionspartner der miR-142. Aufgrund der Verfügbarkeit weiterer im Labor vorhandener miRNAs, welche laut TargetScan mit AKT1S1-3'UTR interagieren, wurden diese miRNAs ebenfalls mit der Original 3'UTR getestet. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse.

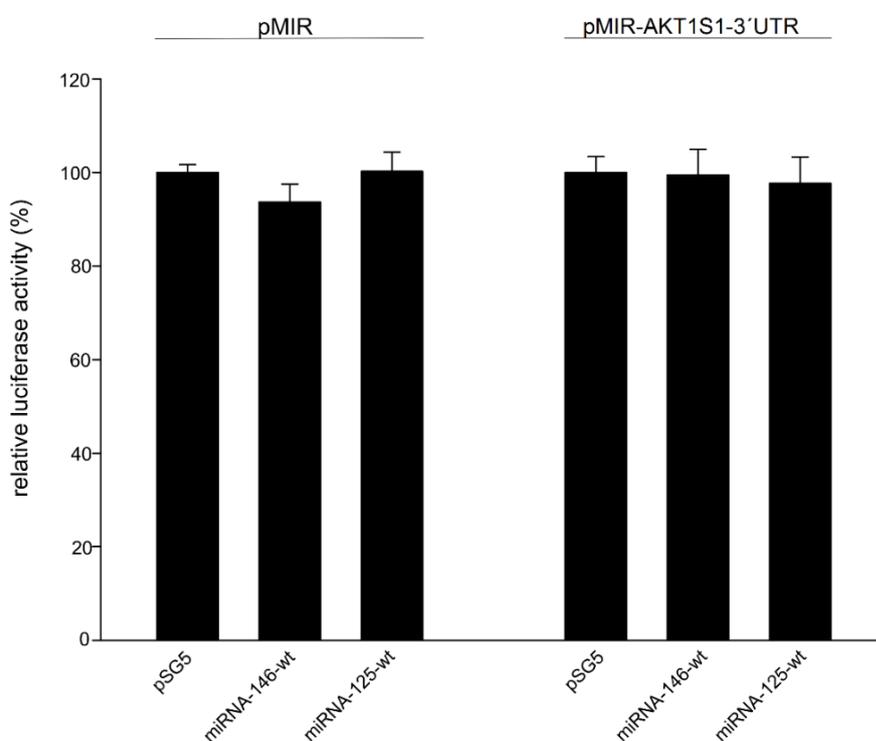


Abbildung 20: Einfluss der hsa-miR-146-wt und hsa-miR-125-wt auf den Leervektor pMIR und auf pMIR-AKT1S1-3'UTR

Laut TargetScan ist AKT1S1-3'UTR ein Ziel der miR-146-wt sowie auch der miR-125-wt (siehe Abbildung 12, Seite 52). Diese beiden miRNAs haben jedoch nach unseren Untersuchungen keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität. Auch hier wurde die Luciferaseaktivität der kontroll-transfizierten-Zellen auf 100% gesetzt. Jedoch zeigte sich keine signifikante Aktivitätsreduktion ($p=0,9$ mit der miR-146-wt; $p=0,7$ mit der miR-125-wt), sodass keine Interaktion nachweisbar war.

5.6 Die pMIR-TSPAN3-3'UTR als Target für die miR-142

Als Besonderheit stellt sich hier die 3'UTR des TSPAN3 dar. Da diese laut Vorhersage des TargetScan anders als die oben beschriebenen 3'UTR nicht mit der miR-142-3p, sondern mit der miR-142-5p interagiert. Abbildung 21 zeigt den Einfluss der miR-142-wt sowie deren Mutanten miR-142-M1 und miR-142-M3 auf pMIR-TSPAN3-3'UTR.

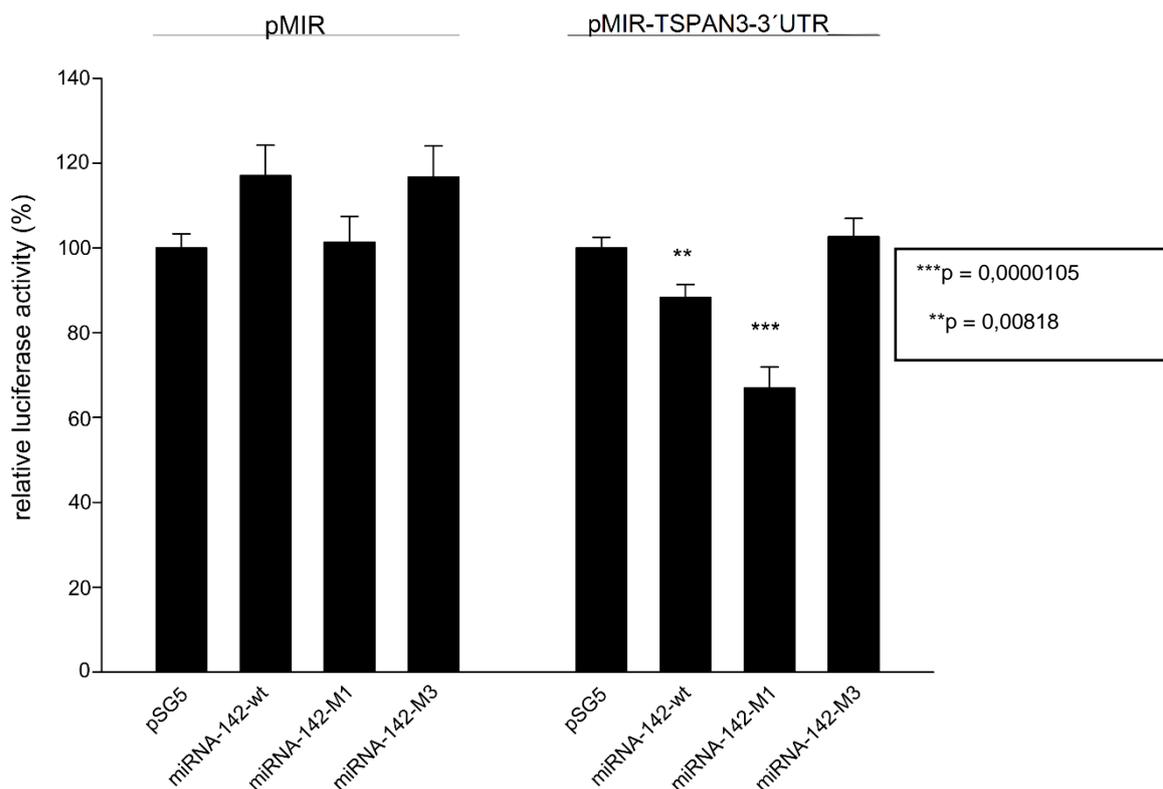


Abbildung 21: Einfluss der hsa-miR-142-wt, hsa-miR-142-M1 und hsa-miR-142-M3 auf den Leervektor pMIR und pMIR-TSPAN3-3'UTR

Es zeigte sich wie bereits in TargetScan vorhergesagt eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf 88,3% (**p= 0,00818) mit miR-142-wt. Hieraus war jedoch nicht ersichtlich, welche Bindestelle der miRNA die Interaktion ausübt. Deshalb wurden die Mutationen der miRNAs mitgetestet. Es zeigte sich eine stärkere Reduktion der Luciferaseaktivität auf 67,1% (***p = 0,0000105) mit der miR-142-M1. Es wurde von einer Wirkung der 5p Site ausgegangen, da in der miR-142-M1 die 3p-Site mutiert war. Die miR-142-M3, in der die 5p Site mutiert war, hatte keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität (p= 0,573). Nach diesen Ergebnissen wurde die Bindestelle der miR-142-5p in der TSPAN-3'UTR mutiert, das Konstrukt wurde pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR bezeichnet.

Ergebnisse

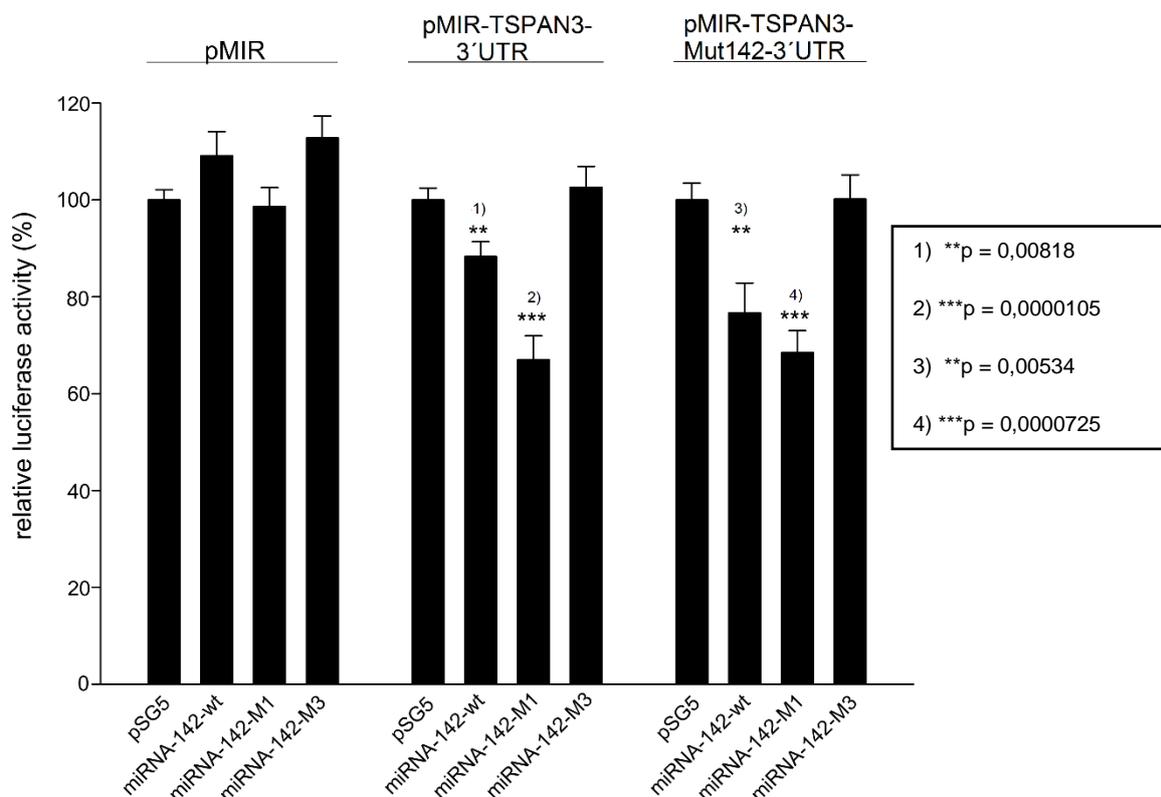


Abbildung 22: Einfluss der hsa-miR-142-wt, hsa-miR-142-M1 und hsa-miR-142-M3 auf den Leervektor pMIR, pMIR-TSPAN3-3'UTR und pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR

Abbildung 22 zeigt, dass trotz der Mutation der vorhergesagten Bindestelle keine Normalisierung der Luciferaseaktivität erreicht werden konnte. Es zeigte sich weiterhin eine Reduktion der Luciferaseaktivität der pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR mit der miR-142-wt auf 76,7% (3. **p= 0,00534) und eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf 68,5% (4. ***p= 0.0000725) mit der miR-142-M1. Auffällig blieb das weiterhin keine Interaktion der 3'UTR mit der miRNA-142-M3 bestand.

Nach diesen Erkenntnissen wurde sowohl die original 3'UTR als auch die 3'UTR mit der mutierten miRNA-Bindestelle verkleinert amplifiziert. Hierfür wurden neue Primer konstruiert. Anschließend wurde die fertige 3'UTR in den pMIR Vektor kloniert. Diese ermöglichten eine Verkleinerung der 3'UTR sodass potentielle bisher nicht identifizierte Bindestellen reduziert werden konnten.

Ergebnisse

Daraus ergaben sich folgende Reporterplasmide aus der Original 3'UTR:

➔ pMIR-T1-3'UTR

```
GAAGGTGAATTGAGCAGGTCTGCTGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCATTTAGTTAAAGCACATGTACACTGGTGTGGAC
AGAGCAGCTTGGCTTTTCATGTGCCACCTACTTACCTACTACCTGCGACTTTCTTTTCTTGTCTAGCTGACTCTTCA
TGCCCCAAGATTTTAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTCAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGGTAGAATTA
GGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGAACAGGACTGATGCCGAAATGTCACCAGGTCCCTTTCAGTCT
TCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTGCGGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAG
ATGGTGCCCCCTATTGGTGTCCCTTTAAAAAATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAATGACTAAAAT
AGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGAGCTTTGAAACTAGTGGTTTTAATC
AAAGTTGGCTTTATAGGAGGAGTATAATGTATGCACTACTGTTTTAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTGTATGAATG
AGCCCATTCATGGTAAGTC
```

CACTAC = potentielle Bindestelle der miR-142-3p

CTTTAT = Bindestelle der miR-142-5p

Abbildung 23: pMIR-T1-3'UTR wurde aus der Original 3'UTR kloniert. Hier wurde ab der 42.sten Base nach dem STOP-Codon bis zur 695.sten Base nach dem STOP-Codon kloniert (654Basen).

➔ pMIR-T2-3'UTR

```
GACTCTTCATGCCCTAAGATTTTAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTCAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGG
TAGAATTAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGATGCCGAAATGTCACCAGGTC
CTTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTGCGGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGG
TTAACACCAGATGGTGCCCTCATTGGTGTCCCTTTAAAAAATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAA
TGACTAAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGAGCTTTGAAACTAGTG
GTTTTAATCAAAGTTGGCTTTATAGGAGGAGTATAATGTATGCACTACTGTTTTAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTT
GTATGAATGAGCCCATTCATGGTAAGTC
```

CACTAC = potentielle Bindestelle der miR-142-3p

CTTTAT = Bindestelle der miR-142-5p

Abbildung 24: pMIR-T2-3'UTR wurde aus der Original 3'UTR kloniert. Hier wurde ab der 192.sten Base nach dem STOP-Codon bis zur 695.sten Base nach dem STOP-Codon kloniert (504Basen).

Ergebnisse

Diese Reporterplasmide ergaben sich aus TSPAN3-Mut142-3'UTR:

➔ pMIR-TM1-3'UTR

```
GAAGGTGAATTGAGCAGGTCTGCTGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCATTTAGTTAAAGCACATGTACACTGGTGTGGAC
AGAGCAGCTTGGCTTTTCATGTGCCACCTACTTACCTACTACCTGCGACTTTCTTTTCTTGTCTAGCTGACTCTTCA
TGCCCCAAGATTTTAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGGTAGAATTA
GGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGAACAGGACTGATGCCGAAATGTCACCAGGTCCTTTCAGTCT
TCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTGCGGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAG
ATGGTGCCCCCTATTGGTGTCTTTAAAAAATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAATGACTAAAAT
AGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGAGCTTTGAAACTAGTGGTTTTAATC
AAAGTTGGCACGTGAGGAGGAGTATAATGTATGCACTACTGTTTTAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTGTATGAATG
AGCCCATTCATGGTAAGTC
```

CACTAC = potentielle Bindestelle der miR-142-3p

CACGTG = mutierte Bindestelle der miR-142-5p

Abbildung 25: pMIR-TM1-3'UTR wurde aus der 3'UTR mit der mutierten miR-142-Sequenz kloniert. Hier wurde ab der 42.sten Base nach dem STOP-Codon bis 695.sten Base nach dem STOP-Codon kloniert (654Basen).

➔ pMIR-TM2-3'UTR

```
GACTCTTCATGCCCCAAGATTTTAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGG
TAGAATTAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGATGCCGAAATGTCACCAGGTC
CTTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTGCGGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGG
TTAACACCAGATGGTGCCCTCATTGGTGTCTTTAAAAAATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAA
TGACTAAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGAGCTTTGAAACTAGTG
GTTTTAATCAAAGTTGGCACGTGAGGAGGAGTATAATGTATGCACTACTGTTTTAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTT
TGTATGAATGAGCCATTCATGGTAAGTC
```

CACTAC = potentielle Bindestelle der miR-142-3p

CACGTG = mutierte Bindestelle der miR-142-5p

Abbildung 26: pMIR-TM2-3'UTR wurde aus der 3'UTR mit der mutierten miR-142-Sequenz kloniert. Hier wurde ab der 192.sten Base nach dem STOP-Codon bis 695.sten Base nach dem STOP-Codon kloniert (504Basen).

➔ pMIR-TM3-3'UTR

```
GACTCTTCATGCCCCAAGATTTTAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGG
TAGAATTAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGATGCCGAAATGTCACCAGGTC
CTTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTGCGGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGG
TTAACACCAGATGGTGCCCTCATTGGTGTCTTTAAAAAATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAA
TGACTAAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGAGCTTTGAAACTAGTG
GTTTTAATCAAAGTTGGCACGTGAGGAGGAGTATAATGTATGCACTACTGTTTTAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTT
TGTATGAATGAGCCATTCATGGTAAGTC
```

CACTAC = potentielle Bindestelle der miR-142-3p

CACGTG = mutierte Bindestelle der miR-142-5p

Abbildung 27 : pMIR-TM3-3'UTR wurde aus der 3'UTR mit der mutierten miRNA142-Sequenz kloniert. Hier wurde ab der 425.sten Base nach dem STOP-Codon bis 695.sten Base nach dem STOP-Codon kloniert (270Basen).

Ergebnisse

Auch hier wurde versucht eine Interaktion mit der miR-142-wt und deren Mutanten mittels Luciferase-Assays nachzuweisen. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse nach Verkleinerung der Original 3'UTR.

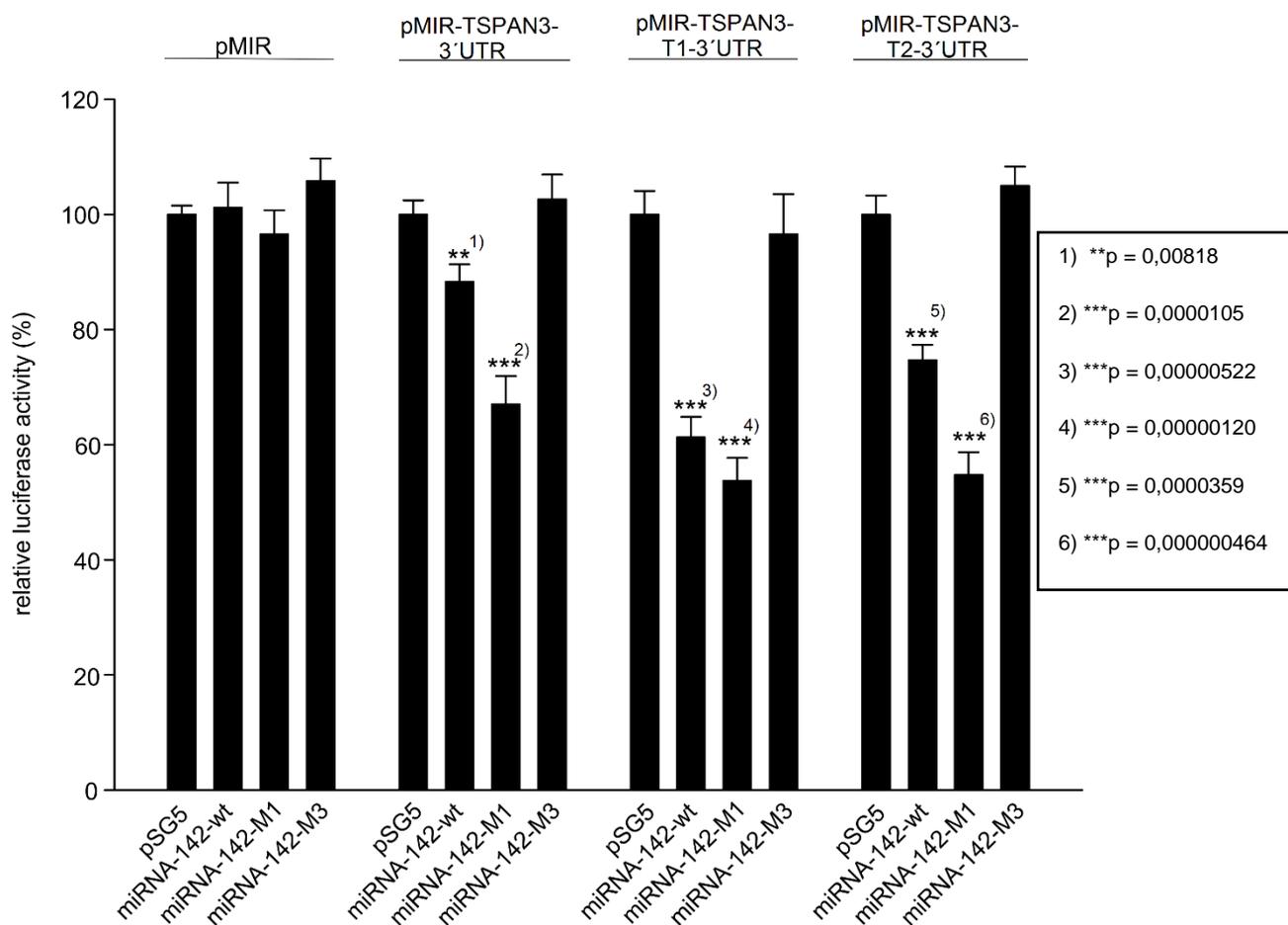


Abbildung 28: Einfluss der hsa-miR-142-wt, hsa-miR-142-M1 und hsa-miR-142-M3 auf pMIR-TSPAN3-3'UTR, pMIR-TSPAN3-T1-3'UTR und pMIR-TSPAN3-T2-3'UTR

Anhand der Abbildung 28 ist ersichtlich, dass trotz der Reduktion der 3'UTR-Länge die Luciferaseaktivität weiterhin deutlich reduziert wurde. Ebenfalls auffällig war, dass die Interaktion hauptsächlich bei Verwendung der miR-142-wt sowie der miR-142-M1 stattfand. Hierbei wurden die Reporterplasmide, welche Verkleinerungen der Original 3'UTR darstellen (Abbildung 23 und 24, Seite 64) verwendet. Es wurden daraufhin die verkürzten Reporterplasmide, welche auf Basis der mutierten 3'UTR gewonnen wurden (Abbildung 25,26 und 27, Seite 65) getestet. Abbildung 29 zeigt das Ergebnis dieser Luciferase-Assays.

Ergebnisse

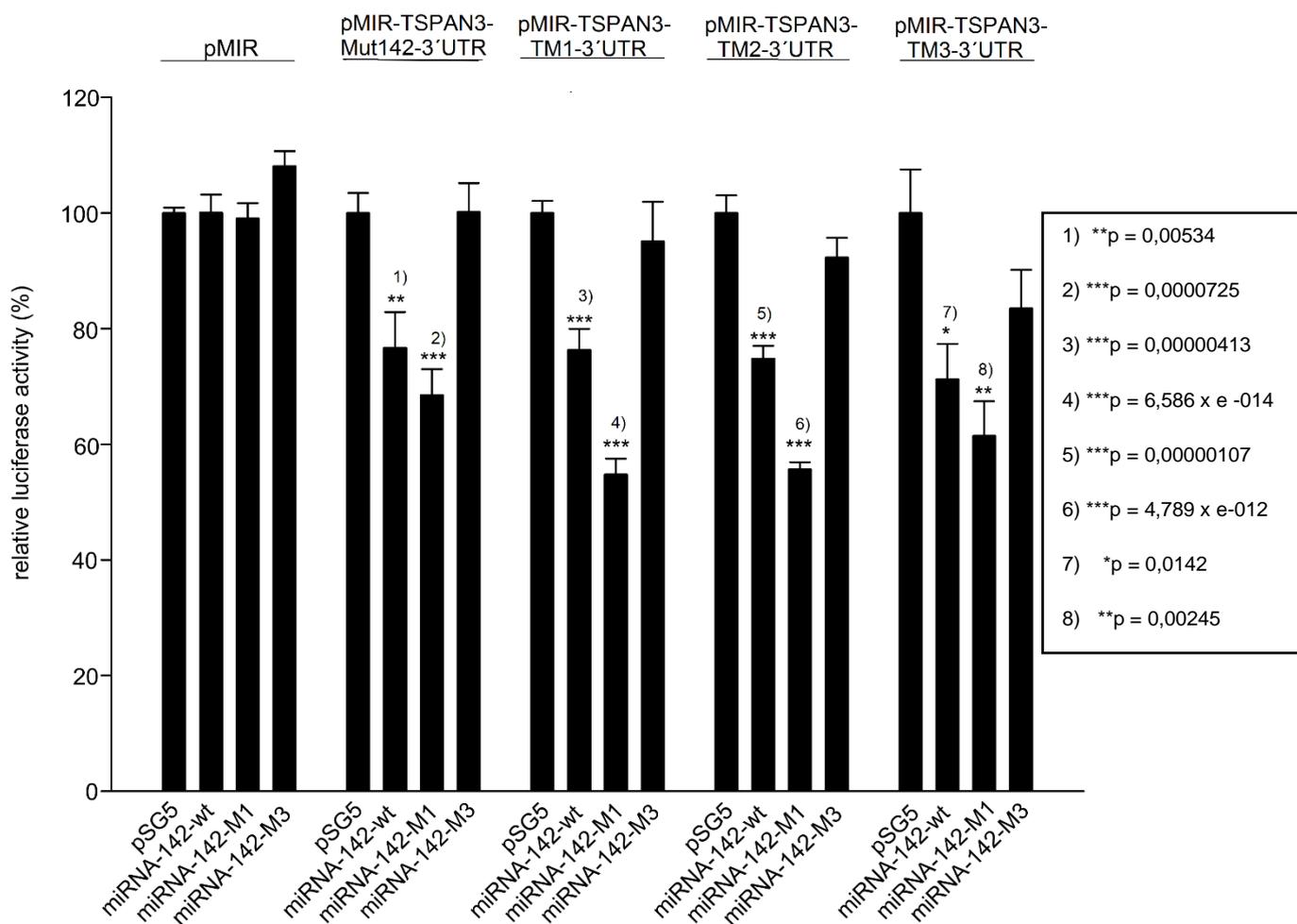


Abbildung 29: Einfluss der hsa-miR-142-wt, hsa-miR-142-M1 und hsa-miR-142-M3 auf pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR, pMIR-TSPAN3-TM1-3'UTR, pMIR-TSPAN3-TM2-3'UTR und pMIR-TSPAN3-TM3-3'UTR

Es zeigte sich auch in diesen Luciferase-Assays eine anhaltende Reduktion der Luciferaseaktivität, sodass weiterhin eine Interaktion mit der miR-142-wt als auch mit der miR-142-M1 bestand, jedoch anhaltend eine Reaktivität bei Verwendung der miR-142-M3 ausblieb. Diese Ergebnisse sind in sich inkonsistent und werden im Diskussionsteil besprochen.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es potentielle Targets der miR-142, welche durch die PAR-CLIP Methode identifiziert worden waren, experimentell zu bestätigen. Zu Beginn der experimentellen Arbeiten war für die miR-142-5p kaum ein Target bekannt, sodass diese Arbeit auch zur Identifikation neuer Targets für die miR-142-5p diente. Im Cancer Genome Atlas zeigte sich bei einer Kohorte von 200 Patienten, welche an AML (Akute myeloische Leukämie) litten, dass miR-142 als einzige miRNA mutiert war, alle Mutationen waren auf der miR-142-3p Seed-Sequenz lokalisiert [Ley et al., 2013]. Eine AML assoziierte Mutation in der miR-142-3p war primär mit einem Funktionsverlust der miR-142-3p sowie sekundär mit einer niedrigeren miR-142-5p Expression verbunden [Trissal et al., 2018]. Kwanhian et al. (2012) bestätigten ebenfalls dass in ca. 20% der untersuchten DLBCL die miR-142 mutiert war [Kwanhian et al., 2012]. Auf dieser Erkenntnis beruhte auch die vorliegende Arbeit, indem für die Experimente neben dem Wildtyp der miR-142 zwei Mutationen aus der Arbeit Kwanhian et al. (2012) verwendet wurden. Mithilfe mutierter miRNAs sollte es möglich sein, unterschiedliche Targets zu verifizieren ohne die Bindestellen in der 3'UTR selbst zu mutieren. Die miR-142-3p-Mutante M1 hat eine Punktmutation an Position 7 der Seed-Sequenz, die miR-142-5p-Mutante M3 eine an Position 6 der Seed-Sequenz (siehe Abbildung 14, Seite 53). Aufgrund dieser Punktmutationen kann es zu einem Funktionsverlust kommen [Kwanhian et al., 2012; Trissal et al., 2018], ein Funktionszugewinn ist jedoch auch möglich. Die miR-142 verhindert die Proliferation von malignen Zellen, eine Überexpression von miR-142-5p unterdrückte die Zellproliferation während eine Hemmung von miR-142-5p das Lungenkrebswachstum förderte [Wang et al., 2017]. Zudem konnte eine Überexpression von miR-142-5p das Wachstum von Leberzellkarzinomen (HCC= hepatocellular carcinoma) reduzieren [Law und Wong, 2011; Lou et al., 2017; Tsang et al., 2015]. Tabelle 1 (Seite 8-9) zeigt auf, dass in den meisten malignen Erkrankungen erniedrigte miR-142 Werte vorlagen. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der Target Analysen werden diese im Folgenden einzeln diskutiert.

6.1 Identifikation von miRNA Bindestellen in der MORF4L2-3'UTR

Die vorliegenden Ergebnisse (siehe 5.4 Die pMIR-MORF4L2-3'UTR als Target für die miR-142 und miR-29, Seite 56-58) zeigen, dass eine Interaktion der MORF4L2-3'UTR mit der miR-142-3p bewiesen worden ist (siehe Abbildung 15, Seite 56). Sowohl mit miR-142-wt als auch mit der miR-142-M3, in welcher die 5p-Site mutiert ist, konnte eine Reduktion der Luciferaseaktivität nachgewiesen werden. Eine Interaktion mit der miR-142-M1, in welcher die 3p-Seed-Sequenz mutiert ist, zeigte sich nicht. Nach Mutation der potentiellen Bindestelle im Target konnte keine Reduktion der Luciferaseaktivität mehr nachgewiesen

werden, weder mit der miRNA noch mit den miRNA-Mutanten (siehe Abbildung 16, Seite 58). Anhand der Ergebnisse konnte neben der vorhergesagten Bindestelle auch nachgewiesen werden, dass tatsächlich die 3p-Site der miR-142 diese Interaktion ausübt.

Aufgrund der Verfügbarkeit der miR-29a und miR-29b, sowie der Vorhersage von PAR-CLIP wurden diese miRNAs ebenfalls getestet. Eine Interaktion konnte aufgrund der reduzierten Luciferaseaktivität nachgewiesen werden. Hier zeigte sich jedoch trotz Mutation der vorhergesagten Bindestelle im Target weiterhin eine anhaltende Reduktion der Luciferaseaktivität (siehe Abbildung 17, Seite 58). Hier stimmte zwar die Vorhersage, dass eine Interaktion stattfindet, jedoch konnte die Bindestelle der miR-29a und miR-29b nicht identifiziert werden. Da dies nicht Aufgabe der vorliegenden Dissertation war, wurde auf weitere Experimente zur Identifikation der Bindestellen für miR-29a/b verzichtet.

6.2 Identifikation von miRNA Bindestellen in der AKT1S1-3'UTR

Im Gegensatz zu MORF4L2 wurden zwei potentielle Bindestellen für miR-142-3p in der 3'UTR des AKT1S1 Gens vorhergesagt (siehe Abbildung 12, Seite 52). Hier konnte eine Reduktion der Luciferaseaktivität sowohl mit dem Wildtyp als auch mit der miR-142-M3 gezeigt werden (siehe Abbildung 18, Seite 59), sodass im Anschluss die Mutationen der einzelnen Bindestellen erfolgte. Hierbei wurde darauf geachtet, dass immer nur eine Bindestelle mutiert wurde, sodass der Effekt der nicht-veränderten Bindestelle erhalten blieb. Es zeigte sich trotz Mutation der ersten Bindestelle am 5'Ende eine anhaltende Reduktion der Luciferaseaktivität, sowohl mit miR-142-wt als auch mit der miR-142-M3. Es erfolgte daher die Mutation der zweiten Bindestelle am 3' Ende, das Konstrukt wurde AKT1S1-Mut2-3'UTR bezeichnet. In den Luciferase-Assays war hiermit keine Reduktion der Luciferaseaktivität mehr nachweisbar (siehe Abbildung 19, Seite 60), sodass die Interaktion zwischen mRNA und miRNA aufgehoben worden war. Wir schließen daraus, dass die erste Bindestelle nicht funktionell war, da erst nach Veränderung der zweiten Bindestelle die Interaktion aufgehoben werden konnte. Eine Interaktion der AKT1S1-3'UTR mit der miR-146 sowie miR-125 konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20, Seite 61). Dies ist ein Hinweis darauf, dass potentielle Targets von miRNAs prinzipiell durch direkten Nachweis (z.B. wie durch oben geführte Experimente) bestätigt werden müssen. In anderen Zellsystemen könnte möglicherweise eine Interaktion der genannten miRNAs mit der AKT1S1-3'UTR stattfinden, daher ist zu berücksichtigen, dass die Luciferaseexperimente in 293 Zellen durchgeführt wurden.

6.3 Identifikation von miRNA Bindestellen in der TSPAN3-3'UTR

Die 3'UTR des TSPAN3 unterschied sich von den o.g. 3'UTRs insofern, dass sie ein potentiell Target der miR-142-5p darstellte. Die identifizierte potentielle 5p-Bindestelle war ein 6mer. Zusätzlich wurde durch Dr. Martin Hart (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg) eine zum damaligen Zeitpunkt durch „TargetScan“ nicht identifizierte zusätzliche potentielle 6mer Bindestelle für die miR-142-3p ermittelt (siehe Abbildung 13, Seite 53). Eine Interaktion der 3'UTR mit miR-142-wt als auch der miR-142-M1 konnte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21, Seite 62), jedoch konnte trotz Mutation der potentiellen 5p-Bindestelle im Target diese Interaktion nicht aufgehoben werden (siehe Abbildung 22, Seite 63). Das kleinste 3'UTR Fragment mit Mutation der potentiellen 5p Bindestelle war jedoch immer noch responsibel für die miR-142-wt und miR-142-M1, nicht jedoch für miR-142-M3. Daraus muss der Schluss gezogen werden, dass die auf 270bp verkürzte 3'UTR von TSPAN3 eine weitere 5p-Bindestelle aufweisen muss, die nicht identifizierbar war. Nach Beendigungen der in dieser Dissertation vorgestellten Arbeiten wurde in der Arbeitsgruppe Grässer versucht die oben beschriebene potentielle 3p-Bindestelle zu klonieren. Leider konnte trotz mehrerer Versuche weder über eine PCR das entsprechende Fragment kloniert werden, noch konnte die Firma GeneArt (Regensburg; <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis.html>) das entsprechende Fragment nach in vitro Synthese in einen Transfervektor einbringen. Schließlich war auch die Insertion eines kurzen Oligomers von ca. 36bp Länge mit der potentiellen miR-142-3p Bindestelle in den pMIR Reportervektor nicht möglich, sodass davon auszugehen ist, dass die kurze Sequenz, welche die potentielle 3p-Bindestelle enthält, für Bakterien toxisch ist. Schlussendlich ist auszuführen, dass das TSPAN3 Gen offensichtlich durch miR-142 reguliert wird, die Bindestelle(n) für die miR-142-3p bzw. -5p jedoch nicht lokalisiert werden konnten.

Diese miRNA/mRNA-Interaktionen stellen einen besonders attraktiven Angriffspunkt von medizinischen Maßnahmen v.a. zur Immuntherapie bei Krebserkrankungen dar. In dieser Arbeit konnte nachwiesen werden, dass durch den Einsatz von „Seed“-Sequenzmutanten eine leichtere Identifikation von Targetsequenzen möglich ist.

7. Anhang

7.1 Sequenzierungsergebnisse

7.1.1 Reporterplasmid pMIR-MORF4L2-3'UTR

TTCGTTGTATGCAGGGCATTGACGGCTAGCAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC
CGGAAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGCTGAGTACCACCGC
AAAGCCCTGTGAGCGTCTACAGACAGCTCACCATTTTTGTCCTGTATCTGTAAACACTTT
TTGTTCTTAGTCTTTTTCTTGAAAATTGATGTTCTTTAAAATCGTTAATGTATAACAGGGC
TTATGTTTCAGTTTGTTTTCCGTTCTGTTTTAAACAGAAAATAAAAGGAGTGTAAGCTCCT
TTTCTCATTTCAAAGTTGCTACCAGTGTATGCAGTAATTAGAACAAAGAAGAAACATTCA
GTAGAACATTTTATTGCCTAGTTGACAACATTGCTTGAATGCTGGTGGTTCCTATCCCTT
TGACACTACACAATTTTCTAATATGTGTTAATGCTATGTGACAAAACGCCCTGATTCTA
GTGCCAAAGGTTCAACTTAATGTATATACCTGAAAACCCATGCATTTGTGCTCTTTTTTTT
TTTTATGGTGCTTGAAGTAAAACAGCCCATCCTCTGCAAGTCCGAGCTCATAGGCCGGC
ATAGACGCGTGCGTGATATCATAGGTTTAAACAGTTAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTT
TCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGGCCGTCGT
TTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCAC
ATCCCCCTTTCCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCA
ACAGTTGCGCAGTCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGGATGCGGTATTTTCTCCTTACGG
CATCTGGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCCTGA
TGCCGCATAGTTAAGGCAGGCCCGACACCCGGCAACACCCGGCTGGACGGCGGCCT
GACGGGCTTGTCTGGCTCCTGGCCATCGGGCTAACAGGAACAGGCTGGTGACGTCTAC
GGGAGCTGGCAATGTGGTCAGAGGTTTTACCCGGTCATCCACGAACGGCCCGGATC
GAAGGAATTGGTGAGTTGCACCGTTTTCCCTAGGTTCCCCGA

7.1.2 Reporterplasmid pMIR-MORF4L2-Mut142-3'UTR

GGGCGGGGAAGTACTAGTTAGAGCAGAATCAGAGAGACCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCG
GAAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGCTGAGTACCACCGCAAA
GCCCTGTGAGCGTCTACAGACAGCTCACCATTTTTGTCCTGTATCTGTAAACACTTTTTG
TTCTTAGTCTTTTTCTTGAAAATTGATGTTCTTTAAAATCGTTAATGTATAACAGGGCTTA
TGTTTCAGTTTGTTTTCCGTTCTGTTTTAAACAGAAAATAAAAGGAGTGTAAGCTCCTTTT
CTCATTTCAAAGTTGCTACCAGTGTATGCAGTAATTAGAACAAAGAAGAAACATTTCAGTA
GAACATTTTATTGCCTAGTTGACAACATTGCTTGAATGCTGGTGGTTCCTATCCCTTTGC
ACGTGTGCAATTTTCTAATATGTGTTAATGCTATGTGACAAAACGCCCTGATTCTTAGTG
CCAAAGGTTCAACTTAATGTATATACCTGAAAACCCATGCATTTGTGCTCTTTTTTTTTT
TATGGTGCTTGAAGTAAAACAGCCCATCCTCTGCAAGTCCGAGCTCATAGGCCGGCATA

Anhang

GACGCGTGCGTGATATCATAGGTTTAAACAGTTAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTTCA
 TTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGGGTTCGTCGTTT
 TACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACAT
 CCCCCTTTCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAG
 TTGCGCAGCTGAATGACGAATGCGCTGATGCGGTATTTTCTCTTACGCATCTGTGGCGT
 ATTCACACCGCATATGTGCACTCTCAGTACATCTGCTCTGATGCCGCATATTAAGCAGTC
 CGAACCCGCCAACACCGTGACGCGCCTGGAGGCTTGTGTTCCGGATCTGTTACAAA
 AGTGTGGACGCCTTCGGAGTGCTGTGTTCAAAGTTTTCTCTGTTTTCGAAAGGGGGAAG
 AAAAATGGTGTGGAAGAACCCCCCTCCTCCCCAGGCGAAAATGAAAAAGTTTCTCTCTA
 AACCACCACAGGTGGGGGATGACCGTCTCTCAGGGAGATAAGAGGTTTCTATCGGA

7.1.3 Reporterplasmid pMIR-MORF4L2-Mut29-3'UTR

TGCCAACGTGGACAGGCATCACGCCTTCAGGTGAAAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGA
 AGGGCGGAAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGCTGAGTACCA
 CCGCAAAGCCCTGTGAGCGTCTACAGACAGCTCACCATTTTTGTCCTGTATCTGTAAAC
 ACTTTTTGTTCTTAGTCTTTTTCTTGTAATAATTGATGTTCTTTAAAATCGTTAATGTATAAC
 AGGGCTTATGTTTCAGTTTGTTCCTGTTTTAAACAGAAAATAAAAGGAGTGTA
 GCTCCTTTTCTCATTTCAAAGTTGCTACCAGTGATGCAGTAATTAGAACAAGAAGAAA
 CATTAGTAGAACATTTTATTGCCTAGTTGACAACATTGCTTGAATGCTGGTGGTTCCTA
 TCCCTTTGACACTACACAATTTTCTAATATGTGTTAATGCTATGTGACAAAACGCCCTGAT
 TCCTAGTGCCAAAGGTTCAACTTAATGTATATACCTGAAAACCCATGCATTTGTGCTCTT
 TTTTTTTTTTACACGTGATGAAGTAAACAGCCCATCCTCTGCAAGTCCGAGCTCATAG
 GCCGGCATAGACGCGTGCGTGATATCATAGGTTTAAACAGTTAAGCTTAATAAAGGATC
 TTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGG
 GCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGACGTTACCCAACCTAATCGCC
 TTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGCACCGATCGC
 CCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCCATATTTTCTCTT
 ACGCATCTGTGGCGGTATTTACACCGCAATAGGGGGACTCTCAGAAAATCTGGTTTGG
 TGCGCATAATTAAGCAGCCCGAAACCCGCAAACCCGGTTGACGCCCTTGGAGGGCT
 TGGTCTGTTCCGGATTCCGTTACAGAAAAGGTGTGGACCGCTCCGGAGGTGCATGTGG
 TCAAAGTTTTCCCGGTCTCTCACGAAACGCGGAAAAAAAAGATTGTGGGGAAGTTCCC
 CACGTTCTCCAGGGAAAATGTCAAACCTGCCCTCTCTATATGCACACACAACACGGTGGG
 GAAC

7.1.4 Reporterplasmid pMIR-AKT1S1-3'UTR

Anhang

CATACGGGTATGCATGTTGCGATTGGTTCGCTATCGAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAG
 AAGGGCGGAAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGATGAGGAGA
 ATGGGCCGCCCTCTTCGCCCGACCTGGACCGCATCGCGGCGAGCATGCGCGCGCTGG
 TGCTGCGAGAGGCCGAGGACACCCAGGTCTTCGGGGACCTGCCACGGCCGCGGCTTA
 ACACCAGCGACTTCCAGAAGCTGAAGCGGAAATATTGAAGTCCAGGGAGGAGCGCCCC
 GGGCCGCGTCCGCCCCGTCCCACACTACGCCCCCGCCCCACTCCCGGGGCCTGCTAA
 TCTGAGGCCGATCCGGGACCGGCCTCCTTGCGTCTCCATTCCCAAGATTGTCCCGCC
 TCTGCCAATCCCCGCCGTCTTCCAGCCCACGACCTGCCGCGCCGAGGAGCGGCATCT
 GTCCCGTTTTCCCGGTTGGGTCTGTGCTCTCTCTCCGCCTAGCGACAGATTCCTTCTATT
 AAGGGATTGGCTCGCTGAGTTCTAAGCTCTAAATGGGTCAACTCCTTTGTTTTCCGCCTA
 GCGACAAGGGATTTGCTCGCACGGCATTGGCTCCATCCCCTAGTCGCTGGACAGCTCT
 TTTTTGATTGGCTCAAATCCTGTAAAGGGCTTGACCAGTCTCTACATAGTCACCGTCCG
 CTTTTCTGAGTTCTCCCTCCCAATTGGCTCCAGCTTCCCTGGGGGCGTGGCCAAGCCCT
 CCTCTTCCCAGAATTGGCCCGGGGCCTTCAATTTACGTTCTTTACACTACGGGGACTGG
 GGTCGTCTTTGCCACGTCCCGACAATTGTTCCCTGACCCCTCAGGGATGGCCCCA
 AACTGTCCCTGCCTCTGGCACCCCTTTCATTGGTTCCATCCATCCCCACAACAGCTGC
 CAGTCGAAGCCCGTCCCTGCATCCAGGATGGTACCAGCTCCCGCCCTCGCCCCACCT
 CCACAGGTGCTTAAAGGGTCTCGTCCACCCAGGTGGGGGGCAGGGGTCTCACTCTC
 GGTCTGTGTGGGGAGAGAGAAGAGGGGGTTGGAGCTCATAGGCGGCATAAACGCGTT
 GCGTGTATCATACGCTGAAACAGTCAGCTGATAAAGGATCTTTTATTTCTTGGAACCTG
 TGGGGTGGGCTTTTTGATGGGGGCGCTAGCTGACTGGCGCTCGTTAAACAACACTGGACT
 GACCTGGGTTACCAACTATGCCTGCAGACATCTTTTTTCCACATGTGGGGGATATAGCC
 CAG

7.1.5 Reporterplasmid pMIR-AKT1S1-Mut1-3'UTR

GGGGCTTTTCAGGTAAATCTGAGAGTCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCA
 AATTCGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGATGAGGAGAATGGGCCGCCCTCTT
 CGCCCGACCTGGACCGCATCGCGGCGAGCATGCGCGCGCTGGTGCTGCGAGAGGCC
 GAGGACACCCAGGTCTTCGGGGACCTGCCACGGCCGCGGCTTAACACCAGCGACTTC
 CAGAAGCTGAAGCGGAAATATTGAAGTCCAGGGAGGGAGCGCCCCGGGCCGCGTCCG
 CCCCCTCCCTTAGCGCTCCCCCGCCCCACTCCCGGGGCCTGCTAATCTGAGGCCGATC
 CGGGACCGGCCTCCTTGCGTCTCCATTCCCAAGATTGTCCCGCCTCTGCCAATCCCC
 GCCGTCCCTTCCAGCCCACGACCTGCCGCGCCGAGGAGCGGCATCTGTCCCGTTTTCC
 GGTTGGGTCTGTGCTCTCTCTCCGCCTAGCGACAGATTCCTTCTATTAAGGGATTGGCT
 CGCTGAGTTCTAAGCTCTAAATGGGTCAACTCCTTTGTTTTCCGCCTAGCGACAAGGGA
 TTTGCTCGCACGGCATTGGCTCCATCCCCTAGTCGCTGGACAGCTCTTTTTTTGATTGG

CTCAAATCCTGTAAAGGGCTTGACCAGTCTCTACATAGTCACCGTCCGCTTTTCCTGAGT
TCTCCCTCCCAATTGGCTCCAGCTTCCTGGGGGCGTGGCCAAGCCCTCCTCTTCCCAG
AATTGGCCCGGGGCCTTCAATTTACGTTCTTTACACTACGGGGACTGGGGTCGTCTTTG
CCCACGTCCCGACAACCTTGTTCCTGACCCCTCAGGGATGGCCCCAACTGTCCCTG
CCTCTGGCACCCCTTTTCATTGGCTCCATCCATCCCCACAACAGTCTGCCAGTCGAAGC
CCGTCCCTGCATCCAGGATGGTACCAGCTCCCGCCCTCGTCTCCACCTCCACAGGTG
CCTTAAAGGGTCCTCGTCCACCCAAGGTGGGGGGCAGGGTCCTCACTCTCCGGTCCTG
TGTGAGAGAGAGTGAAGGCTGTAGCTCATAGCCGCATAGACGCGTGCGTGATATCATAG
GCTTAAACAGTAGCTAATAAATGCATCTTTATTTTCATTGGCATCTGGGGGGTGGATTTT
TGGATGCGATGGCTAGCTGGACCTGGCCGTCGTTTACAACCGTCGACTGAAGCCTGGA
CGTTACCCAGCTTAATCGCCTTGGCGCACTCAAAAC

7.1.6 Reporterplasmid pMIR-AKT1S1-Mut2-3'UTR

CGTCGGATTCAGTAAATCTGAGAGTCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAA
TTCGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGATGAGGAGAATGGGCCGCCCTCTTCG
CCCGACCTGGACCGCATCGCGGCGAGCATGCGCGCGCTGGTGCTGCGAGAGGCCGA
GGACACCCAGGTCTTCGGGGACCTGCCACGGCCGCGGCTTAACACCAGCGACTTCCA
GAAGCTGAAGCGGAAATATTGAAGTCCAGGGAGGGAGCGCCCCGGGCCGCGTCCGCC
CCGTCCCACACTACGCCCCGCCCCACTCCCGGGGCCTGCTAATCTGAGGCCGATCC
GGGACCGGCCTCCTTGCGTCTCCATTCCAAGATTGTCCCGCCTCTGCCAATCCCCG
CCGTCTTCCAGCCCACGACCTGCCGCGCCGAGGAGCGGCATCTGTCCCGTTTCCCG
GTTGGGTCTGTGCTCTCTCTCCGCCTAGCGACAGATTCCTTCTATTAAGGGATTGGCTC
GCTGAGTTCTAAGCTCTAAATGGGTCAACTCCTTTGTTTTCCGCCTAGCGACAAGGGAT
TTGCTCGCACGGCATTGGCTCCATCCCCTAGTCGCTGGACAGCTCTTTTTTTGATTGGC
TCAAATCCTGTAAAGGGCTTGACCAGTCTCTACATAGTCACCGTCCGCTTTTCCTGAGTT
CTCCCTCCCAATTGGCTCCAGCTTCCTGGGGGCGTGGCCAAGCCCTCCTCTTCCCAGA
ATTGGCCCGGGGCCTTCAATTTACGTTCTTTTTAGCGCTGGGACTGGGGGTCGTCTTTG
CCCACGTCCCGACAACCTTGTTCCTGACCCCTCAGGGATGGCCCCAACTGTCCCTG
CCTCTGGCACCCCTTTTCATTGGTTCCATCCATCCCCACAACAGCCTGCCAGTCGAAGC
CCGTCCCTGCATCCAGGATGGTACCAGCTCCCGCCCTCGCCCCACCTCCACAGGTGCT
TAAAGGGTCCTCGTCACCCAGTGGGGGGCAGGGTCCTCACTCTCCGGTCCTGTGTGGG
GGAGAGAGTGAGGGGTGAGCTCATAGTCGCATAGACGCGTGCGTGATATCATAGTTAA
CAGTAGCTATAAGATCTTTATTTTCATGATCTGGGGTTGTTTTGGATGCGCCGTAGCTGAC
TGGGTCATTACAGTCGGAAGTGAAGCTGCGTACCCACTTATGCTTGACCACTCCCTTC
GCAATGGCATAGCAAAGGGCGACGATGCCTCCACATGTGGC

7.1.7 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-3'UTR

GCATACGGTTATGCATCTTACCTATCTGCAGTCGCAGAGACCTCATAAAGGCCAAGAAG
GGCGGAAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGAGGGAGCTCCAT
CACTGGCGGAACCTATGCATAGTTGACAACCTCAAGCCTGAGCTTTTTGGTCTTGTTCTG
ATTTGGAAGGTGAATTGAGCAGGTCTGCTGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCATTTAGTTAA
AGCACATGTACACTGGTGTGGACAGAGCAGCTTGGCTTTTCATGTGCCACCTACTTA
CCTACTACCTGCGACTTTCTTTTTCCCTTGTTCTAGCTGACTCTTCATGCCCTAAGATTTT
AAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTCAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGGTAGA
ATTAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGATGCCG
AAATGTCACCAGGTCCCTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTTGC
GGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAGATGGTGCCCCTCAT
TGGTGTCCTTTTAAAAAATATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAATGACT
AAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGA
GCTTTGAAACTAGTGGTTTTTAATCAAAGTTGGCTTTATAGGAGGAGTATAATGTATGCA
CTACTGTTTTAAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTGTATGAATGAGTCCATTCATGGTAA
GTCTTAAGCTTGTGGAAATAATGTACCCATGTAGACTAGCAAATAGTATGTAGATGTG
ATCTCAGTTGTAAATAGAAAAATCTAATTTCAATAAACTCTGTATCAGTCCCCAACGCGG
CATAGACGCGTGCGTGATATCATAGCTTTAACAGTCAGCTGAATAAACGATCTTTATCT
CATCGCATCTGTGTGCTGTTTTGGATGCCGTCGCTAGCTGACTGACGTCGTTACACGTC
TGACTGGAAAGCCTGCGTACTAACTATCGCTGCAGACATCGCGTCGCCAGCTGGCGTA
TAGGCGAAAGCCGTACGAATGCCCCCTCCCAGTGGCCACCTGAATTGCAATGCCTGA
TAGGCGAAATTTCCCTA

7.1.8 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR

TTCGGTACGCTTGTCAATTCGATCACGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAA
GTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGAGGGAGCTCCATCACTGGCG
GAACCTATGCATAGTTGACAACCTCAAGCCTGAGCTTTTTGGTCTTGTTCTGATTTGGAAG
GTGAATTGAGCAGGTCTGCTGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCATTTAGTTAAAGCACATGT
ACACTGGTGTGGACAGAGCAGCTTGGCTTTTCATGTGCCACCTACTTACTACTACC
TGCGACTTTCTTTTTCCCTTGTTCTAGCTGACTCTTCATGCCCTAAGATTTTAAAGTACGAT
GGTGAACGTTCTAATTTCAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGGTAGAATTAAGGA
GGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGATGCCGAAATGTCAC
CAGGTCCTTTCAAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTTGCGGGGAGGAG
GAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAGATGGTGCCCCTCATTGGTGTCTTT
TTAAAAAATATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAATGACTAAAATAGATT

Anhang

GTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGAGCTTTGAAAC
 TAGTGGTTTTTAATCAAAGTTGGCACGTGAGGAGGAGTATAATGTATGCACTACTGTTTT
 AAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTTGTATGAATGAGACCATTCATGGTAAGTCTTAAGC
 TTGTTGGAAATAATGTACCCATGTAGACTAGCAAATAGTATGTAGATGTGATCTCAGTTG
 TAAATAGAAAAATCTAATTCAATAAACTTCTGTATCAGCCCCGACGCGCGCGGTGATGC
 GTGATCATGATCAGCCGCCGACTGACAGCGCATAGACGCGTGCGTGATATCCTAGTTTA
 CAGTAGCTAGTCACGATCTTTTTATTTCATGAATCTGGGGGTTGTTTTGGATGCGACGTAG
 CTGACCTGCCGATTTACACGCTGGGACTGACCTTGGCTACATTAAGGCCTGGACAATTC
 CCTTGCCAA

7.1.9 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-T1-3'UTR

CGGTCGTGTATGGTATAGGGAGGCGCGATGCAGAGTCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC
 GGAAAGTCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGAGGGAGCTCGAAGGT
 GAATTGAGCAGGTCTGCTGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCATTTAGTTAAAGCACATGTAC
 ACTGGTGTGGACAGAGCAGCTTGGCTTTTCATGTGCCACCTACTTACCTACTACCTG
 CGACTTTCTTTTTCTTGTCTAGCTGACTCTTCATGCCCTAAGATTTTAAGTACGATGG
 TGAACGTTCTAATTTCAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGGTAGAATTAAGGAGGA
 CACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGATGCCGAAATGTCACCAG
 GTCCTTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTTGCGGGGAGGAGGA
 GGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAGATGGTGCCCCTCATTGGTGTCTTTT
 AAAAAATATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAATGACTAAAATAGATTGT
 AGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGAGCTTTGAAACTA
 GTGGTTTATAATCAAAGTTGGCTTTATAGGAGGAGTATAATGTATGCACTACTGTTTTAA
 AGAATTAGTGTGAGTGTGTTTGTGTATGAATGAGCCTATTCATGGTAAGTCGCCGGCCC
 GGCAGCGCCGTTTCTCGCTGGCACCGGAAGACGACGGCATCGTCGCCGCCGAGTAC
 CTGCGTGGGCGCGAACGCAACCGCGCACTGGTGATCAGCAGCAATGACGATACCGGT
 GCTGTTCCGCCGCTGTCTTCGCACAGCGTTTTGCACAGCGCGGCGACCAGGTCGTGGC
 GATCTTCAACGTCAGCGATGCCGTCGGTGATGTCCGGCGCGCAGTGCGCAATGCCGTCA
 TAGACGCGTGCGTGATATCATAGGTTTAAACAGTTAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTT
 CATGGATCTGGGTGGTGGCTTTTGGATGCGGGCGCTAGCTTGGCACTGGACGTCGTTA
 CACGCCGTGACTGGAAAACCTGCGTTACCAACTAATCGCCTGGAGACATTCCCTTGCCG
 GGTGGGGTTATAAGAAAAGGCCGCACGATGGCCTCCCAAGTGGCACCGTATGGAATGA
 CCGAGGGGAATTTTCTCACACACTTTGGGGGATTCACCCAT

7.1.10 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-TM1-3'UTR

Anhang

TTTGTTGTAAGCATATAGCCCACGTCGCGGTGTGCAGAGTCCTCATAAAGGCCAAGAAG
 GGCGGAAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGAGGGAGCTCGAA
 GGTGAATTGAGCAGGTCTGCTGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCATTTAGTTAAAGCACATG
 TACTGTTGTTGGACAGAGCAGCTTGGCTTTTCATGTGCCACCTACTTACCTACTAC
 CTGCGACTTTCTTTTTCTTTGTTCTAGCTGACTCTTCATGCCCTAAGATTTTAAGTACGA
 TGGTGAACGTTCTAATTTTCAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGGTAGAATTAAGGA
 GGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGATGCCGAAATGTCAC
 CAGGTCCTTTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTTTCGCGGGGAGGAG
 GAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAGATGGTGCCCCTCATTGGTGTCTTT
 TAAAAAATATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAATGACTAAAATAGATT
 GTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGAGCTTTGAAAC
 TAGTGGTTTTTAATCAAAGTTGGCACGTGAGGAGGAGTATAATGTATGCACTACTGTTTT
 AAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTTGTATGAATGAGCCATTCATGGTAAGTCGCCGG
 CATAGCTGCAAATATAACCCGCTCACGGACGGCGGGTGCCGGTTCCGTGGCGCTGCG
 CGCCCGGGCGGGATGGGTTTATCGGTAAAGATGGTGCCCGCAATATAGGCGGGCGAC
 GGAAGGGGCCAGCAGGCCGTCGGTGGATTCACCCCGGGCAGGCGCTCGCGGATCTG
 CGAGGGCAGACCCGGCATCGGGGCAAACGGCAATTCTTCAGCTGCGCCCTGCTCGCGC
 AGCAGTCGGCATCGTCGTCATAGACGCGTGCGTGATATCATAGGTTTAAACAGTAGCTTA
 ATAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATTCTGTGTGGTGTTTTTGTATGCGACGCTAGCTGA
 CTGCGTCTGTTACACGTCTGACTGGAAGCCTGCGTACCACTATCGCTGCAGACATCCCT
 TCGCACTGCGTAAGGAAGCCGACGATCGCCCTTCCACAGTGCCCGACCCCGATAGGG
 GCATTGC

7.1.11 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-T2-3'UTR

ACGTTGTAAGCAGTTCGGTTCGCCGTTGTATAGTCCTCTAAAGGCCAAGAAGGGCGG
 AAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGAGGGAGCTCGACTCTTCA
 TGCCCCTAAGATTTTAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTTCAGAACCAATTGCGAGTCA
 TGTAGTGTGGTAGAATTAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAA
 CAGGACTGATGCCGAAATGTCACCAGGTCCTTTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGG
 CCAAAGGTTTTTTCGCGGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAG
 ATGGTGCCCCTCATTGGTGTCTTTTAAAAAATATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAG
 CTGTACAAAATGACTAAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCA
 AAATCAGAGACTGAGCTTTGAACTAGTGGTTTTTAATCAAAGTTGGCTTTATAGGAGGA
 GTATAATGTATGCACTACTGTTTTAAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTTGTATGAATGAG
 CCCATTCATGGTAAGTCGCCGGCATAGACGCGTGCGTGATATCATAGGTTTAAACAGTT

Anhang

AAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATGCGGCC
 GCTAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTA
 CCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
 GCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGA
 TCGGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCA
 GTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTAAGCAGCCCCGACACCCGTCAACACCCGCTG
 ACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCGCTACAGACAGCTGTGACGTCTCGG
 GAGCTGCATGGTGTGAGAGCTTACGTCATCACGAAACGCGCGAGACGAAAGATTGGT
 GTGAAGTCCCAGCTCCCCAGCAAGCGAGATGCAGCATGCATCTCATAGTCCATCAGGG
 TGAGTTCCAGCTCCAGAAGGCAGATGCAGATGCATCATAGCGCGACATAGTGCCGCC
 TAATTCGGCCCCATATCGGGC

7.1.12 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-TM2-3'UTR

GAGTTCTAAGGTATAGTAAGAGAGTCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAA
 TTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGAGGGAGCTCGACTCTTCATGCCCTAA
 GATTTTAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTCAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTG
 GTAGAATTAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGA
 TGCCGAAATGTCACCAGGTCCTTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGCCAAAGGTT
 TTTGCGGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAGATGGTGCCC
 CTCATTGGTGTCTTTTTAAAAATATTTACTTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAAT
 GACTAAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGA
 CTGAGCTTTGAAACTAGTGGTTTTTAATCAAAGTTGGCACGTGAGGAGGAGTATAATGTA
 TGCACACTGTTTTAAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTTGTATGAATGAGCCCATTCAT
 GGTAAGTCGCCGGCCTCGGACGTGACCGCCGCGCCCGCGCCGGTGGCCGCCGCTC
 CGGTGGCATCGCAAGCCGAAACGGCCCCGGCCGAGGCGCAAGCCCCGACCCAGCCG
 GTCGAGGCCGCGCCGGTTCAAGCCGAGCAGGCTCTCCGCTCCGGCGGCCGAGCCCGT
 GGTCGAGCCGCAGCCCGTGCAGGCCGCGCGCCCGAAGTGACCGCGGCCGGTGGCC
 GTCGAGCCCGCCAGCCAGGTCTCCGAGCCCGCCGTGCCCGCCACGGCGCCGGTGG
 AAGCCGCCACGGCCGAACCGGTCGTCGAGCCCATCGTGACGGCGGGCCCCGCCGCG
 CCGGCATAGACGCGTGCATGATATCATAGGTTTTAAACAGTTAAGCTTAATAAAGGATCTT
 TTATTTTCATTGGGTCTTGGGTTGGGTTTTTGCATGCGTCCTGTTAGATGGGACTGGGC
 GCG

7.1.13 Reporterplasmid pMIR-TSPAN3-TM3-3'UTR

CCGTGTATGGATGCGTTTCTCCATAGCGAGAGTCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA
 AAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTGAGGGAGCTCGTTAACACCA

Anhang

GATGGTGCCCTCATTGGTGTCTTTTAAAAAATATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCA
 GCTGTACAAAATGACTAAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTT
 CAAAATCAGAGACTGAGCTTTGAAACTAGTGGTTTTTAATCAAAGTTGGCACGTGAGGA
 GGAGTATAATGTATGCACTACTGTTTTAAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTTGTATGAAT
 GAGCCATTCATGGTAAGTCGCCGGCATAGACGCGTGCCTGATATCATAGGTTTAAACA
 GTTAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATGCG
 GCCGCTAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG
 TTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
 GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGC
 CTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCT
 CTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACC
 CGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTG
 ACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGA
 GACGAAAGATTGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCA
 TGCATCTCATTAGTCAGCAACCAGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAGTAT
 GCAAAGCATGCATCTCATAGTCAGCATCATAGTCCGCCCTACTCCGCCATCCGCCCTAC
 TCGACAGTCGCCATCTCCGCCCATGATGATATTTTTTATTATGCAGAGGCGAGGCGCTC
 GCTCTGACTATCAAAGATGAGGAGCTTTTGGAGCTAGCTTGCAAGTAGTGTTGCTGCAG
 TTCGCATACGTGGGCACAATCCTGACCGCCTGACCCAGGAAACCTTTTACAAAATAAA
 CCGTGTGGTCCCCCCCCGGGAGGAGAG

7.2 Target-Scan Vorhersagen, Schnittstellen der Mutagenese und Primerherstellung

7.2.1 MORF4L2

→ Vorhersage aus Target-Scan

TTGATTATGGAACATTCTAAACTTAGACAAGACGATTGTGATTGGCTGAAGGGCATACG
 CCCTCCTCCAGGGTGACGTGTCTGCCTATGGATATCAGTTGCCAGAGAAACCTGGCTTT
 ACTATGGCGGTTGGAGGAACGGCAGTGATCACACGTCGGCTGCTGGGAAGATCTGGAT
 TCTCGTTTCAGGTCACCATCAGAAAAGCTAAGTTTGTGTATAGTGAGGATCAGGAGAT
 CTGATCCTGATTGCAGAACCTTCCCTGATTACAGAATCTTGGGATTGTTGAGAGGATTAC
 ATGTAAAGTACCAGGACAGTGCATGGCACATATGATTTACAAAAGTTCATCTTCATTGC

Anhang

AGATACCTGCCTTTCTTTCTAGGTTGTATCTCCCACCTTCACCCTTCTAGACCATCCCAGA
 AGATCTATAAGATTTTCATCTGGGAAATCACTAGGAGTTCTTGGAAGGGAAAGAAGGAAG
 ATTGTTGGTTGGAATAAAAACAGGGTTGAATGAGTTCCAGAAAGCAGGGTTCTCAACCT
 CGTGGACAGCAATCTGCAGAAGAAGAGAACTTCAAAAAACCACTAGAAGCAACATGCA
 GAGAAGTAAAATGAGAGGGGCCTCCTCAGGAAAGAAGACAGCTGGTCCACAGCAGAAA
 AATCTTGAACCAGCTCTCCCAGGAAGATGGGGTGGTCGCTCTGCAGAGAACCCCCCTT
 CAGGATCCGTGAGGAAGACCAGAAAGAACAAGCAGAAGACTCCTGGAAACGGAGATGG
 TGGCAGTACCAGCGAAGCACCTCAGCCCCCTCGGAAGAAAAGGGCCCGGCAGACCC
 CACTGTTGAAAGTGAGGAGGCGTTTAAGAATAGAATGGAGGTTAAAGTGAAGATTCCTG
 AAGAATTA AACCATGGCTTGTTGAGGACTGGGACTTAGTTACCAGGCAGAAGCAGCTG
 TTTCAACTCCCTGCCAAGAAAAATGTAGATGCAATTCTGGAGGAGTATGCAAATTGCAAG
 AAATCGCAGGGAAATGTTGATAATAAGGAATATGCGGTTAATGAAGTTGTGGCAGGAAT
 AAAAGAATATTTCAATGTGATGTTGGGCACTCAGCTGCTCTACAAATTTGAGAGGCCCCA
 GTATGCTGAAATCCTCTTGGCTCACCTGATGCTCCAATGTCCCAGGTTTATGGAGCAC
 CACACCTACTGAGATTATTTGTAAGAATTGGAGCAATGTTGGCCTATACGCCCTTGATG
 AGAAAAGCCTTGCATTATTGTTGGGCTATTTGCATGATTTCTAAAATATCTGGCAAAGA
 ATTCTGCATCTCTTTACTGCCAGTGATTACAAAGTGGCTTCT **GCTGAGTACCACCGCA**
AAGCCCTG **TGA**GCGTCTACAGACAGCTCACCATTTTTGTCCTGTATCTGTAAACACTTTT
 TGTTCTTAGTCTTTTTCTTGTA AAATTGATGTTCTTTAAAATCGTTAATGTATAACAGGGCT
 TATGTTTCAGTTTGTTTTCCGTTCTGTTTTAAACAGAAAATAAAAGGAGTGTAAGCTCCTT
 TTCTCATTTC AAAGTTGCTACCAGTGTATGCAGTAATTAGAACAAGAAGAAACATTTCAG
 TAGAACATTTTATTGCCTAGTTGACAACATTGCTTGAATGCTGGTGGTTCCCTATCCCTTT
GACACTACACAATTTTCTAATATGTGTTAATGCTATGTGACAAAACGCCCTGATTCCTAG
 TGCCAAAGGTTCAACTTAATGTATATACCTGAAAACCCATGCATTTGTGCTCTTTTTTTTT
 TTTTA **TGGTGCT**TGAAGTAAA **CAGCCCATCCTCTGCAAGTCC**ATCTATGTTGTTCTTAG
 GCATTCTATCTTTGCTCAAATTGTTGAAGGATGGTGATTTGTTTCATGGTTTTTGTATTG
 AGTCTAATGCACGTTCTAACATGATAGAGGCAATGCATTATTGTGTAGCCACGGTTTTCT
 GGAAAAGTTGATATTTTAGGAATTGTATTT CAGATCTTAAATAAAATTTGTTTCTAAATTT C
 AAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

ACACTACA = Bindestelle miR-142

TGGTGCT = Bindestelle miR-29a, b

Original-Primerherstellung:

F1: **GCTGAGTACCACCGCAAAGCC**

R1: **CAGCCCATCCTCTGCAAGTCC**

Anhang

GGACTTG CAGAGGATGGGCTG

Primer mit Schnittstellen: SpeI/SacI:

F1: ggactagtGCTGAGTACCACCGCAAAGCC

R1: cgagctcGGACTTG CAGAGGATGGGCTG

Mutagenese für miR-142:

Primer For original: GTTCCTATCCCTTTGACACTACACAATTTTCTAATATG

For + PmlI-Site: GTTCCTATCCCTTTGCACGTGTGCAATTTTCTAATATG

Rev: CATATTAGAAAATTGCAACAGTCAAAGGGATAGGAAC

Mutagenese für miR-29a/b:

Primer For original: CTTTTTTTTTTTTTATGGTGCTTGAAGTAAAACAGCC

For + PmlI-Site: CTTTTTTTTTTTTTACACGTGATGAAGTAAAACAGCC

Rev: GGCTGTTTTACTTCATCACGTGTAAAAAATAAAG

0-Cutters:

#	Enzyme	Specificity
152	PmlI	CAC↓GTG

7.2.2 AKT1S1

→ Vorhersage aus Target-Scan

ATATTGTATACTGGAATTGAAGCCAAGGAGGTACCATTTTGCTCGAGGGGCATGGCCTAA
 GCCGGTCAGCTAAGGCCATGTTAATACGGGGCTGTCCCATCTCTCTGCGGGGCGCGAC
 AGCTGGAAGAGCCGAACGGATAAGAGAAGAGGAGGTGAGAGGAGCTGTACACCACAA
 GAGGCACTGAGGGACTCAGGATAACGGGATGAAGCCGTCAGTGCCCCAGAAACGAA
 GCGGCCCGGACGAATTTCTGAGTCACCGTCGCGAGAAAGCGGGCTGAGCCGCCATTT
 TGAAGCCTGGCAAACCGAAGCAAGAAATGCTGCCGTGTTGGATCTTTGCCAGCCTTCGT
 GCCGAATGGGAGCAGGGCGCGGATGGCGTCGGGGCGCCCCGAGGAGCTGTGGGAGG
 CCGTGGTGGGGGCCGCTGAGCGCTTCCGGGCCCGACTGGCACGGAGCTGGTGCTG
 CTGACCGCGGCCCGCCGCCACCACCCCGCCGGGCCCTGTGCCTATGCTGCCCAT
 GGTCGAGGAGCCCTGGCGGAGGCAGCGCGCGTTGCCTCCACGACATCGCACTGGCC
 CACAGGGCTGCCACTGCTGCTCGGCCTCCTGCGCCCCACCAGCACACAGCCACCC
 AGTCCACACCCAGCCACCCCGGCCTACCCTGGCCAGAGAGGACAACGAGGAGGAC
 GAGGATGAGCCACAGAGACAGAGACCTCCGGGGAGCAGCTGGGCATTAGTGATAATG

Anhang

GAGGGCTCTTTGTGATGGATGAGGACGCCACCCTCCAGGACCTTCCCCCTTCTGTGA
 GTCAGACCCCGAGAGTACAGATGATGGCAGCCTGAGCGAGGAGACCCCGCCGGCCC
 CCCCACCTGCTCAGTGCCCCCAGCCTCAGCCCTACCCACACAGCAGTACGCCAAGTCC
 CTGCCTGTGTCTGTGCCCGTCTGGGGCTTCAAGGAGAAGAGGACAGAGGCGCGGTGAT
 CA **GATGAGGAGAATGGGCCGCC** CTCTTCGCCCGACCTGGACCGCATCGCGGGCAGCA
 TGCGCGCGCTGGTGCTGCGAGAGGCCGAGGACACCCAGGTCTTCGGGGACCTGCCAC
 GGCCGCGGCTTAACACCAGCGACTTCCAGAAGCTGAAGCGGAAATAT **TGA** AGTCCAGG
 GAGGGAGCGCCCCGGGCCGCGTCCGCCCGTCCC **ACACTACG** CCCCCGCCCACTCC
 CGGGGCCTGCTAATCTGAGGCCGATCCGGGACCGGCCTCCTTGCGTCTCCCATTCCCA
 AGATTGTCCCGCCTCTGCCAATCCCCGCCGTCTTCCAGCCCACGACCTGCCGCGCCC
 AGGAGCGGCATCTGTCCCGTTTCCCGATTGGGTCTGTCGTCTCTCTCCGCCTAGCGAC
 AGATTCTTCTATTAAGGGATTGGCTCGCTGAGTTCTAAGCTCTAAATGGGTCAACTCCT
 TTGTTTTCCGCCTAGCGACAAGGGATTTGCTCGCACGGCATTGGCTCCATCCCCTAGTC
 GCTGGACAGCTCTTTTTTTGATTGGCTCAAATCCTGTAAAGGGCTTGACCAGTCTCTACA
 TAGTCACCGTCCGCTTTTCTGAGTTCTCCCTCCCAATTGGCTCCAGCTTCTGGGGGC
 GTGGCCAAGCCCTCCTCTTCCCAGAATTGGCCCGGGGCCTTCAATTTACGTTCTTT **ACA**
CTACG GGGACTGGGGTTCGTCTTTGCCACGTCCCGACAACCTGTTCCCTGACCCC **CTC**
AGGGA TGCCCCAAACTGTCCCTGCCTCTGGCACCCCTTTTCATTGGTTCCATCCATCC
 CCACAACAGCCTGCCAATCGAAGCCCGTCCCTGCATCCAGGATGGTACCAGCTCCCGC
 CCCTCGCCCCCACCTCCACAG **GTGCCTTA** AAGGGCCCTCGTCCACCCAAGGTGGGG
 GGCAGGGGCCCTCACTCTCCGGCCCTGGTGTG **GGGGAGAGAGTGAGGGGTG** GGGGA
 TCGGCAGTTGGGAGGGGCGCTC **TGAGATTA** AAGAGTTTTACCTCTGAGATAAATGTGAA

ACACTACG = Bindestelle von miR-142-3p

ACACTACG = bessere Bindestelle von miR-142-3p

GTGCCTTA = Bindestelle von miR-214/214ab/506

Sites with lower probability of preferential conservation

CTCAGGGA = Bindestelle von miR-125a-5p/125b-5p/351/670/4319

TGAGATTA = Bindestelle von miR-216a

Original-Primerherstellung

FOR 1: **GATGAGGAGAATGGGCCGCC**

REV 1: GGGGAGAGAGTGAGGGGTTG

→ **CAACCCCTCACTCTCTCCCC**

Primer mit Schnittstellen: SpeI/SacI:

FOR 1: cggactagt**GATGAGGAGAATGGGCCGCC**

Anhang

REV 1: cgagctc**CAACCCCTCACTCTCTCCCC**

Mutagenese für miR-142:

Primer:

For original 1: CGTCCGCCCGTCCC **ACACTACG** CCCCCGCCCACTCC

For original 2: CAATTTACGTTCTTT **ACACTACG** GGGACTGGGGTCGTC

For 1 + Afel-Site: CGTCCGCCCGTCCC TT **AGCGCT** CCCCCGCCCACTCC

For 2 + Afel-Site: CAATTTACGTTCTTT TT **AGCGCT** GGGACTGGGGTCGTC

REV1: GGAGTGGGGCGGGG **AGCGCT** AA GGGACGGGGCGGACG

REV2: GACGACCCAGTCCC **AGCGCT** AA AAAGAACGTAAATTG

0 Cutters:

#	Enzyme	Specificity
4	Afel	AGC↓GCT

7.2.3 TSPAN3

→ Vorhersage aus Target-Scan

CTGCAGCCTCCGCAGAGGCGATTGGCTGAAGCTACCGGCCGCGTGGGGCGGGACTCG
 GTTGCCAGGGAGCGGCGCGGGAGCCCTGAGGGGACTGCGGCGGCTGCGCGGAGGAG
 CGAGGCACTTGCTGGGGTCGGGGCTGCGCGACGGCGCAGGGGCTGCGGGGAGCGCC
 GCGCAGGCCGTGCAGTTCCTAGCGAGGAGGCGCCGCCATTGCCGCTCTCTCGGT
 GAGCGCAGCCCCGCTCTCCGGGCCGGCCTTCGCGGGCCACCGGCGCCATGGGCCA
 GTGCGGCATCACCTCCTCCAAGACCGTGCTGGTCTTTCTCAACTCATCTTCTGTTTTGC
 ATCATCCTGCTCTTGTTTTTGTACAGAAGTTGTTGTAGTGGTTTTGGGATATGTTTAC
 AGAGCAAAGGTGAAAATGAGGTTGATCGCAGCATTAGAAAAGTGTATAAGACCTACAA
 TGGAACCAACCCTGATGCTGCTAGCCGGGCTATTGATTATGTACAGAGACAGCTGCATT
 GTTGTGGAATTCACAATACTCAGACTGGGAAAATACAGATTGGTTCAAAGAAACCAAAA
 ACCAGAGTGTCCCTCTTAGCTGCTGCAGAGAGACTGCCAGCAATTGTAATGGCAGCCT
 GGCCACCCTTCCGACCTCTATGCTGAGGGGTGTGAGGCTCTAGTAGTGAAGAAGCTA
 CAAGAAATCATGATGCATGTGATCTGGGCCGCACTGGCATTGTCAGCTATTCAGCTGCT
 GGGCATGCTGTGTGCTTGCATCGTGTGTGTCAGAAGGAGTAGAGATCCTGCTTACGAG
 CTCCT**CATCACTGGCGGAACCTATGCA****TAG**TTGACAACCTCAAGCCTGAGCTTTTTGGTC
 TTGTTCTGATTTGGAAGGTGAATTGAGCAGGTCTGCTGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCAT
 TTAGTTA**AAGCACA**TGT**ACACTGG**TGTTGGACAGAGCAGCTTGGCTTTTCATGTGCCCA

Anhang

CCTACTTACCTACTACCTGCGACTTTCTTTTTCCCTTGTTCTAGCTGACTCTTCATGCCCCCT
AAGATTTTAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTTCAGAACCAATTGCGAGTCATGTAGTG
TGGTAGAATTAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGACTG
ATGCCGAAATGTCACCAGGTCCTTTCAGTCTTCACAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGT
TTTTGCGGGGAGGAGGAAACCAGCTTCTGGTTAAGGTTAACACCAGATGGTGCC
CCTCATTGGTGTCCTTTTAAAAAATATTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAA
ATGACTAAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGG
ACTGAGCTTTGAACTAGTGGTTTTTAATCAAAGTTGGCTTTATAGGAGGAGTATAATGT
ATGCACTACTGTTTTAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTGTATGAATGAGCCCATTCA
TGGTAAGTCTTAAGCTTGTGGAAATAATGTACCCATGTAGACTAGCAAATAGTATGTA
GATGTGATCTCAGTTGTAAATAGAAAAATCTAATTCATAAACTCTGTATCAGCCCCAA
CATATTATTTTTATTATTTGGGGGATATTTTCAGTTCAGAGCAGCAGTATCATGTTTTFG
TTGGTGCTGTCTATAGTTCATCATGGTTTACGTGTGTTTTCGTTATAGCTGTTGCCAGAT
TCTAAAGGGCTTGATATTCAAAAACACAGATGCTTTCAGTCCAGTATATCCTAGAAAT
ATAGAGCTCTACTTTGTGCAATGCACTGGGGATACAGTGGCGATACTGTCTTGTCTTC
AAGGAGTTCGGAGTCCTAGTATAGGAGACATACATAGGAGAAGATAATTTTCACACTGC
AGTGGTTGTAGTAATAGAATGGGAGTCCAAAGGGGAGTTCCGGAGAGGTCAGGGGTGA
CTTCTGGAGGAGATGCCAAGCTTGGAGGCTGGATAGGCTTTGTTGAAAGATGGTAC
ACAAGAGTGTGAAACAAAATTGTGTGTGCAGGGAGCTTAAAATACAAGGCTGGGGAAAG
AAGTTGGAGAAGCAGGAAAGCCCAGGCCCTCTAGTGTCTTACGGAACATCCTGTGGAG
GTGAGAGCTGACTTGTAGGTGGAAGCAGCTCTTGGAGGTTTGATTTGGAAGGTGAACT
GAGAAGAAGGTGGTGTGCAAGCCGGCCGTGCTGAAGCCAGGATGAATTGGTGTGACT
GGGCTTCAGTTAGGCTGGCATAGCAGTTGAGAGAGCTTAGCAGTGGGCAGCAGGGCAC
TGTTGGGGGCGGTGGTGTGAGCGGTGGATTCTGGCTGTTTGGAGGCAGGACAGTGGTGG
AATTCGATCATTGATTGGACGTGGGACAGAGAAGGGAGAAGAGAAGACTCATCTAGGAT
GAGTCCCAGGTTTCTGGCTCAGTCAACTGGGGAAACAAAGTACAGAGCTAGGGAGTA
GTTAGAGAACACATCTGGGGGTGTGACTCATGGTCAGTTTTGGGCTCGTCAGTTTTGAG
ATGCCCAAATATCATGCAGATCTGTCCCACCTGAAAATGGAGAAGACACGGGAAAGGAG
AGGAGTAAAACTAACTCCTTTTCACAAAGTGGAAAGTTACCAGAATGTGATTTTCAGAGGC
CCCGGGGATTTATCATGTGACTACTGACCCATCCCACCTCTTGCCCCTGCCTGTTGCA
CAGTGGGCAAGAATGTTTGTGACTTTTCACTACCACCACCTCCCCGAGCATGGTCCCC
CCAGTTTTCAATATGAACCATCCTGTGGGTACCCTGTACAGGCTGGCCCTGAGGTGAG
CAATATTTGGACTGTGATGTTGGTTGTTCTCCACTCTTCTACAGGACAGAACAGGGCCT
CTAGAGTGGGAAATGGCTTTGGGAAATATGCCAAGCAGTAGCCTTGTCTTCAACTTGC
CCAAGAGGATAATTCTCCACACCCTTCTGTACTCAGTCTCAGTTTGCCTGGTGAGAG
AGCAGCCTCCTCCCGTGTGCTCTGCCAGCTGGACCCAGACTGGCCATATTACCAGTGA

Anhang

GACCAAAAAGATGGAGGTGGGGAGGTAGCTCTGAGGTCTGGGAAACCATTCCAGCTCC
 TGCCAGTTTTAACTTGTGTTTAATTCCTGGCACAGTTGTCCTGGAAATGCCTTTTTCTCTT
 GCCTGGGAACCACTAGAAGGGGATGTTGTCTGTGTTGGCCAGGGCCATGCAAATTC
 CATCTTGTCTGCCCCTCCCCCGTGTAGCTGAGGCTAGGTGTTGGCATTACCCAGTGC
 TTGTTCTTCAGAGAGCAAAGCACTGCTCGTCATGTCTGAAATTTAGTGAGTGAGCTCAC
 CCACTAGGCTGGTGTTCCTGCCCCGTGGCTGCACATTGGAAGCACCGGGGCACTTTGA
 GAACTACAGATGCCTGGGTCCCAGAGCATCTAAGGTGCTCTAGGGTGTGTCCAGGACA
 CAGCCCTGGTTGAGGACCACTGCTATATTGTATGGCCTCTTTTAAAAAAGTTAATTTTAC
 TTGGAAATGATTTCAAAGCTACAGAAAAGTTGCAAGAATAAAAACTGTACAAATGAGGCT
 CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

CACTAC = potentielle Bindestelle der miR-142-3p

CTTTAT = Bindestelle von miR-142-5p

AAGCACA = Bindestelle miR-218/218a

ACTGTAG = Bindestelle miR-139-5p

AGTCTTAA = Bindestelle miR-499-5p

ACACTGG = Bindestelle miR-199ab-5p

TACTGTA & **ATACTGT** = Bindestelle miR-144

TACTGTA = Bindestelle miR-101/101ab

TGCACTA = Bindestelle miR-130ac/301ab/301b/301b-3p/454/721/4295/3666

GTCTTAA = Bindestelle miR-208ab/208ab-3p

Original-Primerherstellung

FOR 1: **CATCACTGGCGGAACCTATG**

REV 1: CTCTGTATCAGCCCCAAC

→ **GTTGGGGGCTGATACAGAG**

Primer mit Schnittstellen Sac1/NgoMIV:

FOR: cccgagctc**CATCACTGGCGGAACCTATG**

REV: gccggc**GTTGGGGGCTGATACAGAG**

Mutagenese für miR-142:

Primer:

For original: GTTTTTAATCAAAGTTGG **CTTTAT** AGGAGGAGTATAATG

For + PmlI-Site: GTTTTTAATCAAAGTTGG **CACGTG** AGGAGGAGTATAATG

Rev: CATTATACTCCTCT **CACGTG** CCAACTTTGATTA AAAAC

Anhang

0-Cutters:

#	Enzyme	Specificity
103	PmlI	CAC↓GTG

TSPAN3-3'UTR Verkleinerung bei möglichen Bindestellen

T1 bis T3 aus Original TSPAN3

CATCACTGGCGGAACCTATGCATAGTTGACAACCTCAAGCCTGAGCTTTTGGTCTTGTTCTG
 TGATTTGGAAGGTGAATTGAGCAGGCTCTGCTGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCATTTAGTT
 AAAGCACATGTACACTGGTGTGGACAGAGCAGCTTGGCTTTTCATGTGCCACCTACT
 TACCTACTACCTGCGACTTTCTTTTCTTGTCTAGCTGACTCTTCATGCCCTAAGATTT
 TAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTTCAAGACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGGTAGA
 ATTAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGATGCCG
 AAATGTCACCAGGTCTTTTCAAGTCTTCAAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTTGC
 GGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAGATGGTGCCTCAT
 TGGTGTCTTTTAAAAAATATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAATGACT
 AAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGA
 GCTTTGAACTAGTGGTTTTTAAATCAAAGTTGGCTTTATAGGAGGAGTATAATGTATGCA
 CTACTGTTTTAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTTGTATGAATGAGCCATTTCATGGTAA
 GCTTTAAGCTTGTGGAAATAATGTACCCATGTAGACTAGCAAATAGTATGTAGATGTG
 ATCTCAGTTGTAATAGAAAAATCTAATTAATAAACTCTGTATCAGCCCCAAC

TSPAN3-MUT142-3'UTR Verkleinerung bei möglichen Bindestellen

TM1 bis TM3 aus TSPAN3-MUT142-3'UTR

CATCACTGGCGGAACCTATGCATAGTTGACAACCTCAAGCCTGAGCTTTTGGTCTTGTTCTG
 TGATTTGGAAGGTGAATTGAGCAGGCTCTGCTGCTGTTGGCCTCTGGAGTTCATTTAGTT
 AAAGCACATGTACACTGGTGTGGACAGAGCAGCTTGGCTTTTCATGTGCCACCTACT
 TACCTACTACCTGCGACTTTCTTTTCTTGTCTAGCTGACTCTTCATGCCCTAAGATTT
 TAAGTACGATGGTGAACGTTCTAATTTTCAAGACCAATTGCGAGTCATGTAGTGTGGTAGA
 ATTAAGGAGGACACGAGCCTGCTTCTGTTACCTCCAAGTGGTAACAGGACTGATGCCG
 AAATGTCACCAGGTCTTTTCAAGTCTTCAAGTGGAGAACTCTTGGCCAAAGGTTTTTGC
 GGGGAGGAGGAGGAAACCAGCTTTCTGGTTAAGGTTAACACCAGATGGTGCCTCAT
 TGGTGTCTTTTAAAAAATATTTACTGTAGTCCAATAAGATAGCAGCTGTACAAAATGACT
 AAAATAGATTGTAGGATCATATGGCGTATATCTTGGTTCATCTTCAAATCAGAGACTGA
 GCTTTGAACTAGTGGTTTTTAAATCAAAGTTGGCACGTGAGGAGGAGTATAATGTATGCA
 CTACTGTTTTAAAGAATTAGTGTGAGTGTGTTTTTGTATGAATGAGCCATTTCATGGTAA

Anhang

GTCTTAAGCTTGTTGGAAATAATGTACCCATGTAGACTAGCAAATAGTATGTAGATGTG
ATCTCAGTTGTAAATAGAAAAATCTAATTCAATAAACTCTGTATCAGCCCCCAAC

FOR: Sac 1: G_↓AGCT[✓]C

REV: NgoMIV: G[✓]CCGG_↓C

Primer 1 FOR: **GAAGGTGAATTGAGCAGG**

cccgagctc**GAAGGTGAATTGAGCAGG**

Primer 2 FOR: **GACTCTTCATGCCCTAAG**

cccgagctc**GACTCTTCATGCCCTAAG**

Primer 3 FOR: **GTTAACACCAGATGGTGC**

cccgagctc**GTTAACACCAGATGGTGC**

REV for all: GCCATTTCATGGTAAGTCAG**GACTTACCATGAATGGGC**

gccggcGACTTACCATGAATGGGC

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der miRNA-Biogenese	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur des MORF4L2	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur von AKT1S1	13
Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der intrazellulären Signalkaskade von AKT1S1	14
Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Tetraspanins	17
Abbildung 6: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)	24
Abbildung 7: 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs)	25
Abbildung 8: pGEM-T Vektor der Firma Promega (Quelle: Promega)	27
Abbildung 9: pSG5 Vektor der Firma Stratagene (Quelle: Stratagene)	28
Abbildung 10: pMIR-REPORT™	29
Abbildung 11: Darstellung der Nukleotidsequenz von MORF4L2-3'UTR	51
Abbildung 12: Darstellung der Nukleotidsequenz von AKT1S1-3'UTR	52
Abbildung 13: Darstellung der Nukleotidsequenz von TSPAN3-3'UTR	53
Abbildung 14: Darstellung der Seed-Sequenz der miR-142 und Mutanten	53
Abbildung 15: Einfluss der miR-142 und Mutanten auf pMIR-MORF4L2-3'UTR	56
Abbildung 16: Einfluss der miR-142 und Mutanten auf pMIR-MORF4L2-3'UTR und pMIR-MORF4L2-Mut142-3'UTR	57
Abbildung 17: Einfluss der miR-29a und miR-29b auf pMIR-MORF4L2-3'UTR und pMIR-MORF4L2-Mut29-3'UTR	58
Abbildung 18: Einfluss der miR-142 und Mutanten auf pMIR-AKT1S1-3'UTR	59
Abbildung 19: Einfluss der miR-142 und Mutanten auf pMIR-AKT1S1-3'UTR, pMIR-AKT1S1-Mut1-3'UTR und pMIR-AKT1S1-Mut2-3'UTR	60
Abbildung 20: Einfluss der miR-146 und miR-125 auf pMIR-AKT1S1-3'UTR	61
Abbildung 21: Einfluss der miR-142 und Mutanten auf pMIR-TSPAN3-3'UTR	62
Abbildung 22: Einfluss der miR-142 und Mutanten auf pMIR-TSPAN3-3'UTR und pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR	63
Abbildung 23: Darstellung der Nukleotidsequenz von pMIR-T1-3'UTR	64
Abbildung 24: Darstellung der Nukleotidsequenz von pMIR-T2-3'UTR	64
Abbildung 25: Darstellung der Nukleotidsequenz von pMIR-TM1-3'UTR	65
Abbildung 26: Darstellung der Nukleotidsequenz von pMIR-TM2-3'UTR	65
Abbildung 27 : Darstellung der Nukleotidsequenz von pMIR-TM3-3'UTR	65
Abbildung 28: Einfluss der miR-142 und Mutanten auf pMIR-TSPAN3-3'UTR, pMIR-TSPAN3-T1-3'UTR und pMIR-TSPAN3-T2-3'UTR	66
Abbildung 29: Einfluss der miR-142 auf pMIR-TSPAN3-Mut142-3'UTR, pMIR-TSPAN3-TM1-3'UTR, pMIR-TSPAN3-TM2-3'UTR und pMIR-TSPAN3-TM3-3'UTR	67

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über einige miR-142 assoziierte Erkrankungen	9
Tabelle 2: Geräte mit jeweiligen Herstellern	21
Tabelle 3: Chemikalien mit jeweiligen Herstellern	22
Tabelle 4: Puffer und Lösungen mit Inhaltsstoffen	23
Tabelle 5: Enzyme mit jeweiligen Herstellern	24
Tabelle 6: Expressionsplasmide mit Schnittstellen	30
Tabelle 7: Reporterplasmide	31
Tabelle 8: 3'UTR mit jeweiligen Oligonukleotidprimern	32
Tabelle 9: Computersoftware	33
Tabelle 10: Pipettierschema PCR	39
Tabelle 11: Ablauf PCR mit Phusion	40
Tabelle 12: Annealingtemperatur, Elongationszeit, cDNA/Template	40
Tabelle 13: Colony PCR für insg. 12 Ansätze inkl. Positiv- und Negativkontrolle	41
Tabelle 14: PCR Ansatz 1	42
Tabelle 15: PCR Ansatz 2	42
Tabelle 16: PCR Ansatz 3	43
Tabelle 17: Agarosekonzentrationen und die dazugehörigen DNA-Trennbereiche	44
Tabelle 18: 3'UTR-Sequenzen und verwendete Restriktionsenzyme	46
Tabelle 19: Pipettierschema eines Standard-Restriktionsansatzes	46
Tabelle 20: Pipettierschema Ligationsansatz	47
Tabelle 21: pGEM-Ligationsansatz	48
Tabelle 22: Transfektionsbeispiel	49
Tabelle 23: Reporterplasmide, miRNAs und ihre Bindestellen in der 3'UTR sowie die Endonukleasen, durch welche die	55

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.....	Abbildung
Amp.....	Ampicillin
ATP.....	Adenosintriphosphat
Bp.....	Basenpaare
BSA.....	Bovines Serumalbumin
cDNA.....	complementary (komplementäre) DNA
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dNTP.....	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA.....	doppelsträngige DNA
E. coli.....	Escherichia Coli
EDTA.....	Ethylendiamin-tetraacetat
FKS.....	fötale Kälberserum
h.....	Stunde
HCC.....	hepatocellular carcinoma
H ₂ O (bi)dest.....	(bi)destilliertes Wasser
IPTG.....	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kbp.....	Kilobasenpaare
KHK.....	koronare Herzerkrankung
λ.....	Wellenlänge [nm]
m.....	Milli-
M.....	molar
MCS.....	multiple cloning site
μ.....	Mikro-
MALT.....	mucosa-associated lymphoid tissue
MACE.....	Major Adverse Cardiac Events
min.....	Minute
miRNA.....	microRNA
mut.....	Mutante
ori.....	Ursprung der Plasmidreplikation (origin of replication)
PBS.....	phosphate buffered saline
PCI.....	percutaneous coronary intervention
PCR.....	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
rpm.....	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RNA.....	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

RT.....	Raumtemperatur
SB.....	Sample Buffer
s.....	Sekunde
Tab.....	Tabelle
TAE.....	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraacetat
Taq.....	Thermophilus aquaticus
TE.....	Tris- Ethylendiamintetraacetat
TRIS.....	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U.....	Unit (Einheit)
UTR.....	untranslated region
ü.N.....	über Nacht
V.....	Volt
v/v.....	volume per volume (Volumen per Volumen)
w/v.....	weight per volume (Gewicht per Volumen)
X-Gal.....	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranosid

11. Literaturverzeichnis

1. Abidi FE, Holinski-Feder E, Rittinger O, Kooy F, Lubs HA, Stevensen RE, Schwartz CE (2002) A novel 2 bp deletion in the TM4SF2 gene is associated with MRX58. *J. Med. Genet.* 39: 430–433
2. Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martín-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, José-Eneriz ES, Abizanda G, Rodríguez-Otero P, Fortes P, Rifón J, Bandrés E, Calasanz MJ, Martín V, Heiniger A, Torres A, Siebert R, Román-Gomez J, Prósper F (2009) Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 69 (10): 4443–4453
3. Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM (2010) miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell death and differentiation* 17: 215-220
4. Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell* 5 (2): 337–350
5. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-279
6. Aspler AL, Bolshin C, Vernon SD, Broderick G (2008) Evidence of inflammatory immune signaling in chronic fatigue syndrome: A pilot study of gene expression in peripheral blood. *Behav Brain Funct.* 4: 44
7. Baricevic I, Roberts DL, Renehan AG (2014) Chronic insulin exposure does not cause insulin resistance but is associated with chemo-resistance in colon cancer cells, *Horm Metab Res.* 46: 85-93
8. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2): 281–297
9. Bartel DP, Chen CZ (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially

-
- widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat. Rev. Genet* 5 (5): 396–400
10. Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP (2004) Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101: 12130–12135
 11. Berditchevski F, Zutter MM, Hemler ME (1996) Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol. Biol. Cell.* 7: 193–207
 12. Berditchevski F, Odintsova E, Sawada S, Gilbert (2002) Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrindependent signaling. *J. Biol. Chem.* 277: 36991-37000
 13. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC (2007) Mammalian mirtron genes. *Molecular cell* 28: 328-336
 14. Bertram MJ, Berube NG, Hang-Swanson X, Ran Q, Leung JK, Bryce S, Spurgers K, Bick RJ, Baldini A, Ning Y, Clark LJ, Parkinson EK, Barrett JC, Smith JR, Pereira-Smith OM (1999) Identification of a gene that reverses the immortal phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor-like genes. *Mol Cell Biol* 19: 1479–1485
 15. Bertram MJ, Pereira-Smith OM (2001) Conservation of the MORF4 related gene family: identification of a new chromodomain subfamily and novel protein motif. *Gene* 266: 111–121
 16. Beugnet A, Wang X, Proud CG (2003) Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. *J.Biol Chem* 278: 40717–40722
 17. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006) Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 513–521

Literaturverzeichnis

-
18. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6): 1513–1523
 19. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene P, Betlach C, Heynecker, HL, Boyer HW, Crosa, JKH, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vesicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-101
 20. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat.Struct.Mol.Biol* 13 (12): 1097–1101
 21. Boucheix C, Rubinstein E (2001) Tetraspanins. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1189-1205
 22. Brown DA & London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 111–136
 23. Cai X, Schäfer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers RC, Edwards R, Raab-Traub N, Cullen BR (2006) Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS.Pathog* 2 (3): 23
 24. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc.Natl Acad Sci USA* 99: 15524–15529
 25. Carloni V, Mazzocca A, Ravichandran KS (2004) Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells. *Oncogene* 23(8): 1566-1574
 26. Carraro G, Shrestha A, Rostkovius J, Contreras A, Chao CM, El Agha E, Breanne M, Salma D, Guidolin D, Makoto MT, Günther A, Kumar ME, Seeger W, De Langhe S, Barreto G, Bellusci S (2014) miR-142-3p balances proliferation and differentiation of mesenchymal cells during lung development. *Development* 141: 1272–1281
 27. Chaconas G, van de Sande JH (1980): 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Meth.Enzymol* 65 (1): 75–85
 28. Chan EY (2009) mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy

-
- regulatory complex. *Sci. Signal* 2: 51
29. Chapnik E, Rivkin N, Mildner A, Beck G, Pasvolsky R, MetzI-Raz E, Birger Y, Amir G, Tirosh I, Porat Z, Israel LL, Lellouche E, Michaeli S, Lellouche JP, Izraeli S, Jung S, Hornstein E (2014) miR-142 orchestrates a network of actin cytoskeleton regulators during megakaryopoiesis. *Elife*: e01964
 30. Charrin S, Manie S, Oualid M, Billard M, Boucheix C, Rubinstein, E (2002) Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett.* 516: 139-144
 31. Charrin S, le Naour F, Silvie O, Milhiet PE, Boucheix C, Rubinstein E (2009) Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem.J.*420: 133-154
 32. Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E (2014) Tetraspanins at a glance, *J Cell Sci.*:127: 3641-3648
 33. Chaudhuri AD, Yelamanchili SV, Marcondes MC, Fox HS (2013) Up-regulation of microRNA-142 in simian immunodeficiency virus encephalitis leads to repression of sirtuin1. *FASEB J.* 27(9): 3720-3729
 34. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303(5654): 83-86
 35. Chen M, Tominaga K, Pereira-Smith OM, (2010) Emerging role of the MORF/MRG gene family in various biological processes, including aging. *Ann NY Acad.Sci.* 1197: 134-141
 36. Cheng JQ, Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV (2005) The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* 24: 7482-7492
 37. Chiou GY, Chien CS, Wang ML, Chen MT, Yang YP, Yu YL, Chien Y, Chang YC, Shen CC, Chio CC, Lu KH, Ma HI, Chen KH, Liu DM, Miller SA, Chen YW, Huang PI, Shih YH, Hung MC, Chiou SH (2013) Epigenetic regulation of the miR142-3p/interleukin-6 circuit in glioblastoma. *Mol Cell.* 52(5): 693-706

38. Chong ZZ (2016) Targeting PRAS40 for multiple diseases. *Drug Discov Today*(8): 1222-1231
39. Copeland BT, Bowman MJ, Ashman LK, (2013) Genetic ablation of the tetraspanin CD15 reduces spontaneous metastatic spread of prostate cancer in the TRAMP model. *Mol Cancer Res* 11: 95-105
40. Cosmopoulos K, Pegtel M, Hawkins J, Moffett H, Novina C, Middeldorp J, Thorley-Lawson, DA (2009) Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of virology* 83: 2357-2367
41. Cullen BR (2006) Viruses and microRNAs. *Nat.Genet* 38: 25-30
42. Deng B, Zhang Y, Zhang S, Wen F, Miao Y, Guo K (2015) Micro- RNA-142-3p inhibits cell proliferation and invasion of cervical, cancer cells by targeting FZD7. *Tumour Biol* 36: 8065–8073
43. Doyon Y, Selleck W, Lane WS, Tan S, Cote J (2004) Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol.Cell.Biol.*24: 1884-1896
44. Dugaiczyk A, Boyer HW, Goodman HM (1975): Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J.Mol.Biol.*96 (1): 171–184
45. Engels BM, Hutvagner G (2006) Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25(46): 6163–6169
46. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu.Rev.Biochem.*79: 351–379
47. Fan HB, Liu YJ, Wang L, Du TT, Dong M, Gao L, Meng ZZ, Jin Y, Chen Y, Deng M, Yang HT, Jing Q, Gu AH, Liu TX, Zhou Y (2014) miR-142-3p acts as an essential modulator of neutrophil development in zebrafish. *Blood.*124(8): 1320-1330
48. Ferdin J, Kunej T, Calin GA (2010) Non-coding RNAs: identification of cancer-

-
- associated microRNAs by gene profiling. *Technology in cancer research & treatment* 9: 123-138
49. Filipowicz W, Bhattacharyya SV, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat.Rev.Genet* 9(2): 102–114
50. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811
51. Florin L, Lang T (2018) Tetraspanin Assemblies in virus infection. *Frontiers in Immunology*. Volume 9: Article 1140
52. Fonseca BD, Smith EM, Lee VH, MacKintosh C, Proud CG (2007) PRAS40 is a target for mammalian target of rapamycin complex 1 and is required for signaling downstream of this complex. *J.Biol.Chem* 282: 24514–24
53. Furuya F, Hanover JA, Cheng SY (2006) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 103: 1780–1785
54. Gauwerky CE, Huebner K, Isobe M, Nowell PC, Croce CM (1989) Activation of MYC in a masked t(8;17) translocation results in an aggressive B-cell leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86(22): 8867-8871
55. Godfrey JD, Morton JP, Wilczynska A, Sansom OW, Bushell MD (2018) MiR-142-3p Is Downregulated in Aggressive p53 Mutant Mouse Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Hypermethylation of Its Locus. *CellDeathandDisease* 9: 644
56. Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M, Jungkamp AC, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T (2010) PAR-CLIP - A Method to Identify Transcriptome-wide the Binding Sites of RNA Binding Proteins. *J.Vis. Exp* (41)
57. Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in

-
- posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286(5441): 950-952
58. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18 (24): 3016–3027
 59. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110:177–189
 60. Hart M, Nolte E, Wach S, Szczyrba J, Taubert H, Rau TT, Hartmann A, Grässer FA, Wullich B (2014) Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep sequencing. *Molecular cancer research* 12: 250-263
 61. Havel JJ, Li Z, Cheng D, Peng J, Fu H (2015) Nuclear PRAS40 couples the Akt/mTORC1 signaling axis to the RPL11-HDM2-p53 nucleolar stress response pathway. *Oncogene* 34: 1487–1498
 62. Hayakawa T, Ohtani Y, Hayakawa N, Shinmyozu K, Saito M, Ishikawa F, Nakayama J (2007) RBP2 is an MRG15 complex component and down-regulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation. *Genes Cells* 12: 811-826
 63. Hemler ME (2001) Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* 155: 1103–1107
 64. Hemler ME (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19: 397-422
 65. Hemler ME (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6: 801–811
 66. Hemler ME (2014) Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat. Rev. Cancer* 14: 49-60
 67. Hezaveh K, Kloetgen A, Bernhart SH, Mahapatra KD, Lenze D, Richter J, Haake A, Bergmann AK, Brors B, Burkhardt B, Claviez A, Drexler HG, Eils R, Haas S, Hoffmann S, Karsch D, Klapper W, Kleinheinz K, Korb J, Kretzmer H, Kreuz M, Küppers R,

-
- Lawrenz C, Leich E, Loeffler M, Mantovani-Loeffler L, López C, McHardy AC, Möller P, Rohde M, Rosenstiel P, Rosenwald A, Schilhabel M, Schlesner M, Scholz I, Stadler PF, Stilgenbauer S, Sungalee S, Szczepanowski M, Trümper L, Weniger MA, Siebert R, Borkhardt A, Hummel M, Hoell JI (2016) Alterations of microRNA and microRNA-regulated messenger RNA expression in germinal center B-cell lymphomas determined by integrative sequencing analysis. *Haematologica* 101(11): 1380-1389
68. Hori H, Yano S, Koufuji K, Takeda J, Shirouzu K (2004) CD9 expression in gastric cancer and its significance. *J Surg Res.* 117: 208–215
69. Huang L, Nakai Y, Kuwahara I, Matsumoto K (2012) PRAS40 is a functionally critical target for EWS repression in Ewing sarcoma. *Cancer Res.*72: 1260–1269
70. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD, (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834-838
71. Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, Sasada R, Miyake M (1993) Suppression of cell motility and metastasis by transfection with huma motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J Exp Med.* 177: 1231–1237
72. Imig J, Motsch N, Zhu JY, Barth S, Okoniewski M, Reineke T, Tinguely M, Faggioni A, Trivedi P, Meister G, Renner C, Grässer FA (2011) microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic acids research* 39: 1880-1893
73. Isobe T, Hisamori S, Hogan DJ, Zabala M, Hendrickson DG, Dalerba P, Cai S, Scheeren F, Kuo AH, Sikandar SS, Lam JS, Qian D, Dirbas FM, Somlo G, Lao K, Brown PO, Clarke MF, Shimono Y (2014) miR-142 regulates the tumorigenicity of human breast cancer stem cells through the canonical WNT signaling pathway. *Elife*,3 2014 Nov 18
74. Iwasaki K, Yamamoto T, Inanaga Y, Hiramitsu T, Miwa Y, Murotani K, Narumi S, Watarai Y, Katayama A, Uchida K, Kobayashi T (2016) MiR-142-5p and miR-486-5p as biomarkers for early detection of chronic antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Biomarkers* 22:45-54

-
75. Jansson MD, Lund AH (2012) MicroRNA and cancer. *Molecular oncology* 6:590-610
 76. Joaquin M, Watson RJ (2003) Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor. *Cell. Mol.Life.Sci* 60(11): 2389-2401
 77. Jones EL, Demaria MC, Wright, MD (2011) Tetraspanins in cellular immunity. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 506-511
 78. Jung CH, Jun CB, Ro SH, KIM YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol.Biol Cell* 20: 1992–2003
 79. Kaduthanam S, Gade S, Meister M, Brase JC, Johannes M, Dienemann H, Warth A, Schnabel PA, Herth FJ, Sültmann H, Muley T, Kuner R (2013) Serum miR-142-3p is associated with early relapse in operable lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*80(2): 223-227
 80. Karamatic Crew V, Burton N, Kagan A, Green AC, Levene C, Flinter F, Brady RL, Daniels G, Anstee DJ (2004) CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood* 104: 2217–2223
 81. Kashef J, Diana T, Oelgeschläger M, Nazarenko I (2013) Expression of the tetraspanin family members Tspan3, Tspan4, Tspan5, Tspan7 during *Xenopus laevis* embryonic development. *Elsevier Gene Expression Patterns* 13: 1–11
 82. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development* 15:2654-2659
 83. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209-216.
 84. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110: 163–75

85. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11: 895–904
86. Kim JE, Chen J (2000) Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14340–14345
87. Kim W, Youn HS, Seong KM, Yang HJ, Yun YJ, Kwon TW, KIM YH, Lee JY, Jin YW, Ypun BH (2011) PIM1-activated PRAS40 regulates radioresistance in non-small cell lung cancer cells through interplay with FOXO3a, 14-3-3 and protein phosphatases. *Radiat. Res.* 176:539–552
88. Kitadokoro K, Bordo D, Galli G, Petracca R, Falugi F, Abrignani S, Grandi G, Bolognesi M (2001) CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J.* 20, 12–18 (2001)
89. Kohl S, Giddings I, Besch D, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Wissinger B (1998) The role of the peripherin/RDS gene in retinal dystrophies. *Acta Anat. (Basel)* 162: 75–84
90. Kohmo S, Kijima T, Otani Y, Mori M, Minami T, Takahashi R, Nagatomo I, Takeda Y, Kida H, Goya S, Yoshida M, Kumagai T, Tachibana I, Yokota S, Kawase I (2010) Cell surface tetraspanin CD9 mediates chemoresistance in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 70: 8025-8035
91. Kohno M, Hasegawa H, Myake M, Yamamoto T, Fujita S (2002) CD151 enhances cell motility and metastasis of cancer cells in the presence of focal adhesion kinase. *Int. J. Cancer* 97: 336-343
92. Kovacina KS, Park GY, Bae SS, Guzzetta AW, Schaefer E, Birnbaum MJ, Roth RA (2003) Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J. Biol. Chem* 278: 10189–10194

-
93. Kovalenko OV, Yang X, Kolesnikova TV, Hemler, ME (2004) Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for crosslinking. *Biochem. J.* 377: 407–417
 94. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research* 42: 68-73
 95. Kramer NJ, Wang WL, Reyes EY, Kumar B, Chen CC, Ramakrishna C, Cantin EM, Vonderfecht SL, Taganov KD, Chau N, Boldin MP (2015) Altered lymphopoiesis and immunodeficiency in miR-142 null mice. *Blood* 125:3720–3730
 96. Kuete V, Eichhorn T, Wiench B, Krusche B and Efferth T (2012) Cytotoxicity, anti-angiogenic, apoptotic effects and transcript profiling of a naturally occurring naphthyl butenone, guieranone A. *Cell division* 7(1):1-12
 97. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet* 39(5):673–677
 98. Kuo WY, Wu CY, Hwu L, Lee JS, Tsai CH, Lin KP, Wang HE, Chou TY, Tsai CM, Gelovani J, Liu RS (2015) Enhancement of tumor initiation and expression of KCNMA1, MORF4L2 and ASPM genes in the adenocarcinoma of lung xenograft after vorinostat treatment. *Oncotarget.* 6(11):8663-8675
 99. Kushner S (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with coli-derived plasmids. *Genetic Engineering*, ed. Boyer Nicosia, Amsterdam, Elsevier
 100. Kwanhian W, Lenze D, Alles J, Motsch N, Barth S, Döll C, Imig J, Hummel M, Tinguely M, Trivedi P, Lulitanond V, Meister G, Renner C, Grässer FA (2012) MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med.* 1(2):141-155
 101. Kwon HY, Bajaj J, Ito T, Blevins A, Konuma T, Weeks J, Lytle NK, Koechlein CS, Rizzieri D, Chuah C, Oehler VG, Sasik R, Hardiman G, Reya T (2015) Tetraspanin 3 is Required for the Development and Propagation of Acute Myelogenous Leukemia Cell Stem Cell. *17(2):* 152–164
 102. La Cour T, Gupta R, Rapacki K, Skriver K, Poulsen FM, Brunak S (2003) NESbase

-
- version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res.*31:393–396
103. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 12: 735–739
104. Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM (2003) Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol* 4 (7): R42
105. Law PTY, Wong N (2011) Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 26: 437–449
106. Lazo PA (2007) Functional implications of tetraspanin proteins in cancer biology. *Cancer Sci.* 98: 1666–1677
107. Lederberg EM, Cohen SN (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* Vol.119 No.3: 1072-1074
108. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5): 843–854
109. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23: 4051-4060
110. Levy S, Shoham T (2005) Protein–protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)* 20: 218–224
111. Levy S (2014) Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells. *Immunol. Res.* 58: 179-185
112. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120 (1): 15–20
113. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr., Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C,

-
- McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.*368: 2059–2074
114. Li Y, Kowdley KV (2012) MicroRNAs in Common Human Diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10(5): 246–253
115. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769–773
116. Lin RJ, Xiao DW, Liao LD, Chen T, Xie ZF, Huang WZ, Wang WS, Jiang TF, Wu BL, Li EM, Xu LY (2012) MiR-142-3p as a potential prognostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg. Oncol.*105(2): 175-182
117. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. In *Nat. Cell Biol* 7 (7): 719–723
118. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10:457–468
119. Lou K, Chen N, Li Z, Zhang B, Wang X, Chen Y, Xu H, Wang D, Wang H (2017) MicroRNA-142-5p Overexpression Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis by Regulating FOXO in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Oncol.Res.*25(1):65-73

-
120. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834–838
 121. Lu YZ, Deng AM, Li LH, Liu GY, Wu GY (2014) Prognostic role of phospho-PRAS40 (Thr246) expression in gastric cancer. *Arch. Med. Sci.* 10: 149–153
 122. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *In Science* 303: 95–98
 123. Ma X, Yan J, Chen W, Du P, Xie J, Yu H, Wu H (2015) Knockdown of myosin VI inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Chem.Biol.Drug Des.*86(4):723-730
 124. Ma Z, Liu T, Huang W, Liu H, Zhang HM, Li Q, Chen Z, Guo AY (2016) MicroRNA regulatory pathway analysis identifies miR-142-5p as a negative regulator of TGF-beta pathway via targeting SMAD3. *Oncotarget* 7(44):71504-71513
 125. Macias MJ, Wiesner S, Sudol M (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett.*513:30–37
 126. Madhunapantula SV, Sharma A, Robertson GP (2007) PRAS40 deregulates apoptosis in malignant melanoma. *Cancer Res* 67:3626–3636
 127. Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 11: 428-442
 128. Malla R, Ashby Jr. C., Narayanan K., Narayanan B., Faridi J., Tiwari A (2015) Proline-rich AKT substrate of 40-kDa (PRAS40) in the pathophysiology of cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 463: 161-166
 129. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF (1989) „Molecular Cloning, a laboratory manual 2nd ed“. *In Cold Spring Harbor, Laboratory Press* 1-3
 130. Maschietto M, Piccoli FS, Costa CML, Camargo LP, Neves JI, Grundy PE, Brentani H, Soares FA, de Carmargo B Carraro DM (2011) Gene expression analysis of blastemal component reveals genes associated with relapse mechanism in Wilms tumour.

European Journal of Cancer 47: 2715-2722

131. Moretti F, Thermann R, Hentze MW (2010) Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA* 16: 2493-2502
132. Moss AC, Doran PP, Macmathuna P (2007) In silico promoter analysis can predict genes of functional relevance in cell proliferation: Validation in a colon cancer model. *Transl Oncogenomics* 2: 1–16
133. Motsch N, Alles J, Imig J, Zhu J, Barth S, Reineke T, Tinguely M, Cogliatti S, Dueck A, Meister G, Renner C, Grässer FA (2012) MicroRNA profiling of Epstein-Barr virus-associated NK/T-cell lymphomas by deep sequencing. *PLoSOne*.7(8): e42193
134. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986 51 Pt 1, 263-73.
135. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. In *Plant Cell* 2 (4): 279–289
136. Nascimento EB, Fodor M, van der Zon GC, Jazet IM, Meinders AE, Voshol PJ, Vlasblom R, Baan B, Eckel J, Maassen JA, Diamant M, Ouwens DM (2006) Insulin-mediated phosphorylation of the proline-rich Akt substrate PRAS40 is impaired in insulin target tissues of high-fat diet-fed rats. *Diabetes* 55: 3221–3228
137. Nascimento EB, Snel M, Guigas B, van der Zon GC, Kriek J, Maassen JA, Jazet IM, Diamant M, Ouwens DM (2010) Phosphorylation of PRAS40 on Thr246 by PKB/AKT facilitates efficient phosphorylation of Ser183 by mTORC1. *Cell Signal* 22: 961–967
138. Newman MA, Hammond SM (2010) Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *GenesDev.*24(11): 1086–1092
139. Ng R, Song G, Roll GR, Frandsen NM, Willenbring H (2012) A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver

- regeneration. *J Clin Invest.* 122: 1097–1108
140. Nimmo R, Ciau-Uitz A, Ruiz-Herguido C, Soneji S, Bigas A, Patient R, Enver T (2013) MiR-142-3p controls the specification of definitive hemangioblasts during ontogeny. *Dev.Cell.* 26(3): 237-249
141. Olive V, Jiang I, He L (2010) mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. In *Int. J. Biochem. Cell Biol* 42 (8): 1348–1354
142. Oshiro N, Takahashi R, Yoshino K, Tanimura K, Nakashima A, Eguchi S, Miyamoto T, Hara K, Takehana K, Avruch J, Kikkawa U, Yonezawa K (2007) The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol.Chem.*282: 20329–20339
143. Pallares-Cartes C, Cakan-Akdogan G, Teleman AA (2012) Tissue-specific coupling between insulin/IGF and TORC1 signaling via PRAS40 in *Drosophila*. *Dev.Cell* 22: 172–182
144. Panasyuk G, Nemazanyy I, Zhyvoloup A, Bretner M, Litchfield DW, Filonenko V, Gout IT (2006) Nuclear export of S6K1 II is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation at Ser-17. *J.Biol.Chem* 281: 31188–311201
145. Patel S, Player MR (2008) Small-molecule inhibitors of the p53–HDM2 interaction for the treatment of cancer. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 17: 1865–1882
146. Pena AN, Pereira-Smith OM (2007) The role of the MORF/MRG family of genes in cell growth, differentiation, DNA repair, and thereby aging. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*1100: 299–305
147. Pena-Chilet M, Martinez MT, Perez-Fidalgo JA, Peiro-Chova L, Oltra SS, Tormo E, Alonso-Yuste E, Martinez-Delgado B, Eroles P, Climent J, Burgues O, Ferrer-Lozano J, Bosch A, Lluch A, Ribas G (2014) MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC cancer* 14: 529
148. Pezo RC, Gandhi SJ, Shirley LA, Pestell RG, Augenlicht LH, Singer RH (2008) Single-Cell Transcription Site Activation Predicts Chemotherapy Response in Human

-
- Colorectal Tumors, *Cancer Res.*68(13): 4977–4982
149. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T (2005) Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat.Methods* 2 (4): 269–276
150. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, Reiser M, Nickenig C, Clemens M, Peter N, Bokemeyer C, Eimermacher H, Ho A, Hoffmann M, Mertelsmann R, Trümper L, Balleisen L, Liersch R, Metzner B, Hartmann F, Glass B, Poeschel V, Schmitz N, Ruebe C, Feller AC, Loeffler M (2008) German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol.*9(2): 105-116
151. Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF (2012) A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* 481: 190–194
152. Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM (2011) Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature* 478: 404–407
153. Rhodes N, Heerding DA, Duckett DR, Eberwein DJ, Knick VB, Lansing TJ, McConnell RT, Gilmer TM, Zhang SY, Robel K, Kahana JA, Geske RS, Kleymenova EV, Choudhry AE, Lai Z, Leber JD, Minthorn EA, Strum SL, Wood ER, Huang PS, Copeland RA, Kumar R (2008) Characterization of an akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity, *Cancer Res.* 68: 2366-2374
154. Robertson GP (2005) Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24: 273-285
155. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. In *Genome Res* 14: 1902–1910

-
156. Romanska HM, Berditchevski F (2011) Tetraspanins in human epithelial malignancies. *J. Pathol.* 223: 4-14
 157. Rosner M, Hengstschlager M (2007) Cytoplasmic/nuclear localization of tuberin in different cell lines. *Amino Acids* 33:575–579
 158. Rosner M, Hengstschlager M (2008) Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Hum Mol.Genet* 17:2934–2948
 159. Ruvkun G (2001) Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294: 797-799
 160. Saito A, Narasimhan P, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan PH (2004). Neuroprotective role of a proline-rich Akt substrate in apoptotic neuronal cell death after stroke: relationships with nerve growth factor. *J Neurosci* 24: 1584–1593
 161. Saito A, Hayashi T, Okuno S, Nishi T, Chan PH (2006) Modulation of proline-rich akt substrate survival signaling pathways by oxidative stress in mouse brains after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 37: 513–17
 162. Saito Y, Jones PA (2006) Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* 5(19): 2220–2222
 163. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Imaeda H, Matsuzaki, J, Hirata K, Hosoe N, Nakamura M, Mukai M, Saito H (2012) Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma resistant to *Helicobacter pylori* eradication. *PLoSOne* 7: e47396
 164. Saji M, Vasko V, Kada F, Allbritton EH, Burman KD, Ringel MD (2005) Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*332: 167–173
 165. Sakai K, Shirakawa T, Li Y, Kitagawa Y, Hirose G (2002) Interaction of a paraneoplastic cerebellar degeneration-associated neuronal protein with the nuclear

- helix-loop-helix leucine zipper protein MRG X. *Mol.Cell.Neurosci.*19(4):477-484
166. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol.Cell* 25:903–15
167. Sassen S, Miska EA, Caldas C (2008) MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Arch.* 452 :1–10
168. Schalm SS, Blenis J (2002) Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr.Biol* 12: 632–639
169. Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J (2003) TOS motif mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr.Biol* 13: 797–806
170. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40: 310–322
171. Seipold L, Saftig P, (2016) The Emerging Role of Tetraspanins in the Proteolytic Processing of the Amyloid Precursor Protein. *Front Mol Neurosci.*9: 149
172. Sgaramella V, van de Sande, JH, Khorana HG (1970) Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67 (3): 1468–1475
173. Shadeo A, Chari R, Lonergan ML, Pusic A, Miller D, Ehlen T, Van Niekerk D, Maticic J, Richards-Kortum R, Follen M, Guillaud M, Lam WL and MacAulay C (2008) Up regulation in gene expression of chromatin remodelling factors in cervical intraepithelial neoplasia. *BMC Genomics* 9: 64
174. Shang YC, Chong ZZ, Wang S, Maiese K (2012) Wnt1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) targets PRAS40 to govern beta-amyloid apoptotic injury of microglia. *Curr. Neurovasc. Res.* 9: 239–249
175. Sharma A, Sharma AK, Madhunapantula SV, Desai D, Huh SJ, Mosca P, Amin S, Robertson GP (2009) Targeting Akt3 Signaling in Malignant Melanoma Using

-
- Isoselenocyanates, *Clin. Cancer Res.* 15 (5): 1674-1685
176. Sharma S, Liu J, Wei J, Yuan H, Zhang T, Bishopric NH (2012) Repression of miR-142 by p300 and MAPK is required for survival signalling via gp130 during adaptive hypertrophy. *EMBO.Mol.Med* 4: 617–632
177. Shein HM, Enders JF, Levinthal JD (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48: 1350-1357
178. Shimay A, Kovacina KS, Roth RA (2004) On the Mechanism for Neomycin Reversal of Wortmannin Inhibition of Insulin Stimulation of Glucose Uptake *J. Biol. Chem.* 279 (53): 55277-55282
179. Shrestha A, Carraro G, El Agha E, Mukhametshina R, Chao CM, Rizvanov A, Barreto G, Bellusci S (2015) Generation and Validation of miR-142 Knock Out Mice. *PLoSOne*.10(9): e0136913
180. Shrestha A, Mukhametshina R, Taghizade S, Vasquez-Pacheco E, Cabrera-Fuentes H, Rizvanov A, Mari B, Carraro G, Bellusci S (2017) MicroRNA-142 is a Multifaceted Regulator in Organogenesis, Homeostasis, and Disease. *Dev.Dyn* 246: 285–290
181. Sladitschek HL, Neveu PA (2015) The bimodally expressed microRNA miR-142 gates exit from pluripotency. *Mol.Syst.Biol.*11(12): 850
182. Soyuer S, Soyuer I, Unal D, Ucar K, Yildiz OG, Orhan O (2010) Prognostic significance of CD9 expression in locally advanced gastric cancer treated with surgery and adjuvant chemoradiotherapy. *Pathol Res Pract.* 206: 607–610
183. Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME (2003) Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci.* 28: 106–112
184. Strefford JC, Lane TM, Hill A, LeRoux L, Foot NJ, Shipley J, Oliver RT, Lu YJ, Young BD (2006) Molecular characterisation of the t(1;15)(p22;q22) translocation in the prostate cancer cell line LNCaP. *Cytogenet Genome Res.* 112: 45-52

-
185. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (2008) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Vol. 2. IARC; Lyon, Frankreich
 186. Sy SM, Huen MS, Chen J (2009) MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination. *J.Biol.Chem.*284(32): 21127-21131
 187. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006) NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12481–12486
 188. Tanaka K, Kondo K, Kitajima K, Muraoka M, Nozawa A, Hara T (2013) Tumor-suppressive function of protein-tyrosine phosphatase non-receptor type 23 in testicular germ cell tumors is lost upon overexpression of miR142-3p microRNA. *J.Biol.Chem.*288(33): 23990-23999
 189. Tang QJ, Lei HP, Wu H, Chen JY, Deng CY, Sheng WS, Fu YH, Li XH, Lin YB, Han YL, Zhong SL (2018) Plasma miR-142 predicts major adverse cardiovascular events as an intermediate biomarker of dual antiplatelet therapy. *Acta.Pharmacol.Sin* 40(2): 208-215
 190. Tarrant JM, Robb L, van Spruiel AB, Wright MD (2003) Tetraspanins: molecular organisers of leukocyte surface. *Trend Immunol.* 24: 610-617
 191. Tee AR, Proud CG (2002) Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of capdependent translation and reveals a novel regulatory motif. *Mol.Cell.Biol.* 22: 1674–1683
 192. Testa JE, Brooks PC, Lin JM, Wuigley JP (1999) Eukaryotic expression cloning with and antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res* 59: 3812-3820
 193. Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenou P, Arriemerlou C, Hall MN (2007) PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS ONE* 2: e1217

-
194. Ting AH, Suzuki H, Cope L, Schuebel KE, Lee BH, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Baylin SB (2008) A requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human cancer cells. In *Cancer Res* 68 (8): 2570–2575
 195. Tiwari-Woodruff SK, Buznikov AG, Vu TQ, Micevych PE, Chen K, Kornblum KI, Bronstein JM (2001) OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *J Cell Biol.* 153: 295–305
 196. Tiwari-Woodruff SK, Kaplan R, Kornblum HI, Bronstein JM (2004) Developmental expression of OAP-1/Tspan-3, a member of the tetraspanin superfamily. *J Neurosci Res.* 77: 166–173
 197. Todd SC, Doctor VS, Levy S (1998) Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1399: 101–104
 198. Tominaga K, Leung JK, Rookard P, Echigo J, Smith JR, Pereira-Smith OM (2003) MRGX is a novel transcriptional regulator that exhibits activation or repression of the B-myb promoter in a cell type-dependent manner. *J.Biol.Chem.*278(49): 49618-49624
 199. Tominaga K, Matzuk MM, Pereira-Smith OM (2005) MrgX is not essential for cell growth and development in the mouse. *Mol.Cell.Biol.*25(12): 4873-4880
 200. Trissal MC, Wong TN, Yao JC, Ramaswamy R, Kuo I, Baty J, Sun Y, Jih G, Parikh N, Berrien-Elliott MM, Fehniger TA, Ley TJ, Maillard I, Reddy PR, Link DC (2018) MIR142 Loss-of-Function Mutations Derepress ASH1L to Increase HOXA Gene Expression and Promote Leukemogenesis. *Cancer Res.*78(13): 3510-3521
 201. Trobaugh DW, Gardner CL, Sun C, Haddow AD, Wang E, Chapnik E, Mildner A, Weaver SC, Ryman KD, Klimstra WB (2014) RNA viruses can hijack vertebrate microRNAs to suppress innate immunity. *Nature* 506(7487): 245-248
 202. Tsang FH, Au SL, Wei L, Fan DN, Lee JM, Wong CC, Ng IO, Wong CM (2015) MicroRNA-142-3p and microRNA-142-5p are downregulated in hepatocellular carcinoma and exhibit synergistic effects on cell motility. *Front.Med.*9(3): 331-343

-
203. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat.Cell. Biol* 9: 316–323
 204. van Rooij, E, Olson EN (2012) MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nature reviews. Drug discovery* 11: 860-872
 205. Van Spriël AB (2011) Tetraspanins in the humoral immune response. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 512-517
 206. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931-1934
 207. Vegter EL, van der Meer P, de Windt LJ, Pinto YM, Voors AA (2016) MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy. *Eur.J.Heart Fail.*18: 457–468
 208. Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2: 489-501
 209. Wang F, Wang XS, Yang GH, Zhai PF, Xiao Z, Xia LY, Chen LR, Wang Y, Wang XZ, Bi LX, Liu N, Yu Y, Gao D, Huang BT, Wang J, Zhou DB, Gong JN, Zhao HL, Bi XH, Yu J, Zhang JW (2012) miR-29a and miR-142-3p downregulation and diagnostic implication in human acute myeloid leukemia. *Mol Biol Rep.*39(3): 2713-2722
 210. Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC Jr (2007) PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J.Biol Chem* 282: 20036–20044
 211. Wang Z, Liu Z, Fang X, Yang H (2017) MiR-142-5p Suppresses Tumorigenesis by Targeting PIK3CA in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Physiol.Biochem.* 43: 2505-2515
 212. Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. In *Cell* 75 (5): 855–862
 213. Wiza C, Chadt A, Blumensatt M, Kanzleiter T, Herzfeld De Wiza D, Horrigths

-
- A, Mueller H, Nascimento EBM, Schürmann A, Al-Hasani H, Ouwens DM (2014) Over-expression of PRAS40 enhances insulin sensitivity in skeletal muscle. *Arch. Physiol. Biochem.* 120: 64–72
214. Wright MD, Moseley GW, van Sriel, AB (2004) Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens* 64(5):533-542
215. Xu R, Bi C, Song J, Wang L, Ge C, Liu X, Zhang M (2015) Upregulation of miR-142-5p in atherosclerotic plaques and regulation of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in macrophages. *Mol.Med.Rep.*11(5):3229-3234
216. Yamada M, Sumida Y, Fujibayashi A, Fukaguchi K, Sanzen N, Nishiuchi R, Sekiguchi K (2008) The tetraspanin CD151 regulates cell morphology and intracellular signaling on laminin-511. *FEBS J.* 275: 3335-3351
217. Yanez-Mo M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdes M, Sanchez- Madrid F (2009) Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* 19: 434-446
218. Yang W, Yang LF, Song ZQ, Ali Shah SZ, Cui YY, Li CS, Zhao HF, Gao HL, Zhou XM, Zhao DM (2017) PRAS40 alleviates neurotoxic prion peptide-induced Apoptosis via mTOR-AKT signaling. *CNS Neurosci Ther.* 23: 416–427
219. Yang YG, Sari IN, Zia MF, Lee SR, Song SJ, Kwon HY (2016) Tetraspanins: Spanning from solid tumors to hematologic malignancies. *Exp Hematol.* 44(5): 322-328
220. Yang X, Claas C, Kraeft SK, Chen LB, Wang Z, Kreidberg JA, Hemler ME (2002) Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol. Biol. Cell* 13: 767-781
221. Yi R, Qin Yi, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *In Genes Dev* 17 (24): 3011–3016
222. Yochum GS, Ayer DE (2002) Role for the mortality factors MORF4, MRGX, and MRG15 in transcriptional repression via associations with Pf1, mSin3A, and

- Transducin-Like Enhancer of Split. *Mol.Cell.Biol.*22:7868–7876
223. Yoon SO, Zhang X, Freedman AS, Zahrieh D, Lossos IS, Choi YS (2010) Down-regulation of CD9 expression and its correlation to tumor progression in B lymphomas. *Am J Pathol.* 177: 377–386
224. Yu F, Narasimhan P, Saito A, Liu J, Chan PH (2008) Increased expression of a proline-rich Akt substrate (PRAS40) in human copper/zinc-superoxide dismutase transgenic rats protects motor neurons from death after spinal cord injury. *J.Cereb Blood Flow Metab* 28: 44–52
225. Yuan K, Wu H, Wang Y, Chen H, Jiao M, Fu R (2015) Phospho-PRAS40 predicts trastuzumab response in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Oncol. Lett.* 9: 785–789
226. Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Carrie A, Billuart P, McDonnell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, Fauchereau F, friocourt G, des Portes V, Kahn A, Beldjord C, Chelly J (2002) A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nature Genet.* 24: 167–170
227. Zhang F, Beharry ZM, Harris TE, Lilly MB, Smith CD, Mahajan S, Kraft AS (2009) PIM1 protein kinase regulates PRAS40 phosphorylation and mTOR activity in FDCP1 cells. *Cancer Biol Ther* 8: 846-853
228. Zhang P, Bill K, Liu J, Young E, Peng T, Bolshakov S (2012) MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1 α and enhances β -catenin signaling. *Cancer Res.* 72: 1751–1762
229. Zhang X, Yan Z, Zhang J, Gong L, Li W, Cui J, Liu Y, Gao Z, Li J, Shen L (2011) Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Ann.Oncol.*22(10):2257–2266.
230. Zhou,H, Rigoutsos I (2014) MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells. *RNA* 20: 1431-1439
231. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to

- cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 21–35
232. Zur Hausen H (1967) Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *Journal of virology* 1: 1174-1185
233. Zöller M (2009) Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9: 40-55

12. Danksagung

Frau Prof. Dr. S. Smola danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Virologie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. A. Grässer für die Überlassung des interessanten Themas und sein Vertrauen, das er in mich gesetzt hat. Herzlichen Dank für die ausgezeichnete Betreuung und die unermüdbare Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Prof. Grässer bedanke ich mich für die Vermittlung molekularbiologischer Arbeitsmethoden sowie biologischer Sichtweisen, für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Martin Hart danke ich, für seine Analysen und des Hinweises auf eine potentielle Bindestelle meines Targets.

An dieser Stelle möchte ich meinen Schwestern Maneja Yazdani, Dr. Fahema Yazdani und Dr. Fereshta Yazdani sowie meiner Mutter Shima Yazdani danken, die mir die Möglichkeit zu diesem Studium gaben, nie aufgehört haben an mich zu glauben und mir in jeder Lebenssituation Halt geben.

Bei meiner lieben Freundin Jana Miller möchte ich mich von Herzen für die stete Geduld und die guten Ratschläge bedanken, die sie mir in allen Lebenslagen entgegenbringt. Danke für das Begleiten durch das Studium und die Laborarbeiten sowie die moralische Unterstützung.

13. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.