

Aus dem Bereich Humangenetik  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Funktionelle Analyse der miR-200b-3p in Bronchialkarzinomen Kurzzeitüberlebender**

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2024

vorgelegt von: Christina Rebecca Sophie Hater  
geb. am: 14.07.2000 in Wesel

Tag der Promotion: 24.09.2024

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Eckart Meese

Prof. Dr. Dr. Robert Bals

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- & Einheitenverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	III
Einheitenverzeichnis .....	V
Abkürzungen der Nukleinbasen .....	V
Abbildungs- & Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VI
1 Zusammenfassungen.....	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Summary.....	2
2 Einleitung .....	3
2.1 Lungenkarzinom.....	3
2.2 MicroRNAs .....	7
2.3 Untersuchung des Transkriptoms Lang- und Kurzzeitüberlebender .....	10
3 Material und Methoden.....	12
3.1 Übersicht verwendeter Materialien .....	12
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	12
3.1.2 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen .....	13
3.1.3 Reaktionskits.....	14
3.1.4 Protein-Molekulargewichtsmarker .....	15
3.1.5 Vektoren.....	16
3.1.6 Enzyme und Enzypuffer .....	16
3.1.7 Antikörper.....	16
3.1.8 Eukaryontische Zelllinien.....	16
3.1.9 Kulturmedien.....	17
3.1.10 Geräte .....	17
3.1.11 Software.....	18
3.1.12 Verbrauchsmaterial .....	19
3.2 Humane Zelllinien: Kultivierung der HEK-293-T- und der A549-Zelllinie .....	20
3.3 Experimente zur Zielgenvalidierung der miR-200b-3p .....	21
3.3.1 Zielgenvorhersage .....	21
3.3.2 Plasmiddesign.....	23

## Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Konzentrationseinstellung der Expressions- und Reporterplasmide .....	26
3.3.4	Transfektion .....	26
3.3.5	HiTmiR-Dual-Luciferase-Assay .....	27
3.3.6	Mutagenese-Assay .....	29
3.4	Experimente zur Bestätigung des Einflusses der miR-200b-3p auf die Proteinexpression der Zielgene.....	30
3.4.1	Transfektion von A549-Zellen mit pSG5-miR-200b .....	30
3.4.2	RNA-Extraktion aus A549-Zellen.....	31
3.4.3	RNA-Isolation aus A549-Zellen .....	31
3.4.4	Reverse Transkriptase-Reaktion der A549-RNA .....	32
3.4.5	qRT-PCR der A549-RNA .....	32
3.4.6	Proteinextraktion aus A549-Zellen.....	34
3.4.7	Messung der Proteinkonzentration .....	35
3.4.8	Western Blot .....	35
4	Ergebnisse .....	38
4.1	HiTmiR-Dual-Luciferase-Assay .....	38
4.2	Mutagenese-Assay.....	41
4.3	Kontrolle der Überexpression der miR-200b-3p in transfizierten A549-Zellen.....	43
4.4	Western Blot.....	44
5	Diskussion.....	46
5.1.1	Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion ausgewählter positiv getesteter Zielgene.....	47
5.1.2	Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion von HIPK3 .....	48
5.1.3	Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion von CELF2 .....	49
5.1.4	Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion von LRP1 .....	51
5.1.5	Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion von PPM1F und LATS2.....	51
5.2	Fazit und Ausblick .....	56
6	Bibliographie .....	58
	Danksagung .....	70
	Lebenslauf.....	71
	Anhang.....	72

## Abkürzungs- & Einheitenverzeichnis

### Abkürzungs- & Einheitenverzeichnis

#### Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
AGO-Protein	Argonaut-Protein
AP1S2	<i>Adaptor Related Protein Complex 1 Subunit Sigma 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CDK17	<i>Cyclin Dependent Kinase 17</i>
cDNA	complementary DNA
CELF2	<i>CUGBP Elav-Like Family Member 2</i>
CEP85L	<i>Centrosomal Protein 85 Like</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cylooxygenase
CT	Computertomografie
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FCS	fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Hydrogenchlorid
HEK-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen ( <i>Human Embryonic Kidney-Cells</i> )
HIPK3	<i>Homeodomain Interacting Protein Kinase 3</i>
HiTmiR	<i>high-throughput miRNA interaction reporter assay</i>
IgG	Immunglobulin G
JCAD	<i>Junctional Cadherin 5 Associated</i>
LAR II	Luciferase Assay Reagenz ( <i>Luciferase Assay Reagent</i> )
LATS2	<i>Large Tumor Suppressor Kinase 2</i>
LHFPL6	<i>LHFPL Tetraspan Subfamily Member 6</i>
LRP1	<i>LDL Receptor Related Protein 1</i>
mind.	mindestens
miR, miRNA	microRNA
mRNA	messenger-RNA ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )

## Abkürzungs- & Einheitenverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
mut	Mutagenese
NaOH	Natriumhydroxid
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom ( <i>non-small-cell lung cancer</i> )
nt	Nukleotide
p	Wahrscheinlichkeit
P-Bodies	Prozessierungskörperchen ( <i>processing bodies</i> )
PBS	Gibco Phosphate-Buffered Saline
PLB	passiver Lysepuffer ( <i>passive lysis buffer</i> )
PPM1F	<i>Protein Phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> Dependent 1F</i>
Prä-miRNA	<i>precursor microRNA</i>
Pri-miRNA	<i>primary microRNA</i>
qRT-PCR	quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion
RISC	RNA-induzierter Stilllegungskomplex ( <i>RNA-induced silencing complex</i> )
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	RNA-Interferenz auch RNA-Silencing
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
r <sub>s</sub>	Spearman-Korrelationskoeffizient
RT	Reverse Transkription
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom ( <i>small-cell lung cancer</i> )
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ST3GAL2	<i>ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase</i>
SV 40	Simian-Virus 40
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline mit 0,1% Tween® 20
TNM	Tumor-Lymphknoten-Metastasen ( <i>Tumor-Nodes-Metastases</i> )
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs ( <i>Union internationale contre le cancer</i> )
UTR	untranslatierte Region ( <i>untranslated region</i> )
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## Abkürzungs- & Einheitenverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ZCCHC24	<i>Zinc Finger CCHC-Type Containing 24</i>

### Einheitenverzeichnis

<b>Einheiten(vorsätze)</b>	<b>Bedeutung</b>
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Da	Dalton
g	Gramm
k-	Kilo-
l	Liter
m-	Milli-
min	Minute
n-	Nano-
s	Sekunde
V	Volt
Vol.-%	Volumenprozent
W	Watt
μ-	Mikro-

### Abkürzungen der Nukleinbasen

<b>Abkürzung</b>	<b>Nukleinbasen</b>
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

## Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

### Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

#### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: microRNA-Biosynthese .....	10
Abbildung 2: Precision Plus Protein Dual Color Standards von Bio-Rad.....	15
Abbildung 3: Vektorkarte des pSG5-Expressionsplasmid .....	24
Abbildung 4: Vektorkarte des pMIR-Reporterplasmid .....	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzip des Dual-Luciferase-Assays ..	28
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzip des Mutagenese-Dual- Luciferase-Assays .....	30
Abbildung 7: Kontrollen des HiTmIR-Dual-Luciferase-Assays .....	39
Abbildung 8: Ergebnisse des HiTmIR-Dual-Luciferase-Assays.....	40
Abbildung 9: Kontrollen des Mutagenese-Dual-Luciferase-Assays .....	42
Abbildung 10: Ergebnisse des Mutagenese-Assays .....	43
Abbildung 11: Überexpressionskontrolle.....	44
Abbildung 12: Einfluss veränderter miR-200b-3p-Expression auf die endogenen Proteinlevel von LRP1, PPM1F Isoform 1 und PPM1F Isoform 2 in A549-Zellen.....	45
Abbildung 13: Der Einfluss der miR-200b-3p auf den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg.....	50
Abbildung 14: Der Einfluss der miR-200b-3p auf den Hippo-Signalweg .....	54
Abbildung 15: Einfluss der miR-200b-3p auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg .....	56

#### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation des Primärtumors nach TNM 8 der IASLC (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebshilfe, & AWMF, 2024) .....	4
Tabelle 2: Klassifikation des Lymphknotenbefalls nach TNM 8 der IASLC (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebshilfe, & AWMF, 2024) .....	5
Tabelle 3: Klassifikation der Fernmetastasen nach TNM 8 der IASLC (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebshilfe, & AWMF, 2024) .....	5
Tabelle 4: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC 8 (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebshilfe, & AWMF, 2024) .....	6
Tabelle 5: Inverse Korrelation nach Spearman ( $r_s$ ) zwischen der miR-200b-3p und den ausgewählten Zielgenen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Hart, Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes).....	23
Tabelle 6: Die 40 analysierten Reporterplasmide (alphabetisch) .....	26
Tabelle 7: Die für den Mutagenese-Assay ausgewählten Reporterkonstrukte .....	30
Tabelle 8: Ansatz des Reaktionsmix der qRT-PCR .....	33

## Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

Tabelle 9: Temperaturprofil der qRT-PCR im Real-Time-PCR-Thermocycler .....	33
Tabelle 10: Übersicht der für das Design der Reporterplasmide verwendeten Zielgensequenzen .....	72

### 1 Zusammenfassungen

#### 1.1 Zusammenfassung

Das Lungenkarzinom stellt eine der deutschland- und weltweit häufigsten Krebserkrankungen dar und weist trotz zahlreicher therapeutischer Ansätze eine ungünstige Prognose auf. Für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika ist ein besseres Verständnis der Karzinogenese des Lungenkarzinoms auf molekularbiologischer Ebene unabdingbar. Einen vielversprechenden Forschungsansatz stellen microRNAs dar, deren Expression in Tumorgewebe verändert ist und die sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Wirkungen ausüben können. In dieser Arbeit erfolgt die funktionelle Analyse der miR-200b-3p in Bronchialkarzinomen Kurzzeitüberlebender. Die miR-200b-3p ist in Bezug auf Lungenkarzinome von besonderem Interesse, da ihre Expression exklusiv im Tumorgewebe von Kurzzeitüberlebenden mit einem initial günstigen Tumorstaging im Vergleich zum Normalgewebe hochreguliert ist. Um den Einfluss der miR-200b-3p auf die Transformation der physiologischen Zelle zur Lungenkrebszelle und die Krebsprogression zu verstehen und den möglichen Zusammenhang zwischen der Überexpression der miR-200b-3p und der höheren Aggressivität der Lungenkarzinome der Kurzzeitüberlebenden zu erforschen, wurden in dieser Arbeit 31 bioinformatisch vorhergesagte Zielgene untersucht. Mittels HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay konnten 30 dieser Zielgene als Zielgene der miR-200b-3p validiert werden. Für den anschließenden Mutageneseassay wurden die miR-200b-3p-Bindestellen in den zehn im HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay am stärksten reprimierten Zielgene mutiert, wobei alle zehn als direkte Zielgene der miR-200b-3p validiert werden konnten. Zwei dieser zehn validierten Zielgene, LRP1 und PPM1F, wurden detaillierter untersucht. Durch die Quantifizierung der LRP1- und PPM1F-Expression in mit miR-200b-3p transfizierten A549-Zellen mittels qRT-PCR und Western Blot konnten gezeigt werden, dass die Expression der beiden Zielgene auch in einer Lungenkrebszelllinie durch Überexpression der miR-200b-3p gehemmt wird. Von besonderem Interesse sind LRP1, PPM1F, HIPK3, CELF2 und LATS2, die eine tumorsuppressive Wirkung aufweisen und deren Expression durch die miR-200b-3p inhibiert wird.

### 1.2 Summary

#### **Functional analysis of miR-200b-3p in bronchial carcinomas of short-term survivors**

Lung carcinoma is one of the most common cancers in Germany and worldwide and has an unfavorable prognosis despite numerous therapeutic approaches. A better understanding of the carcinogenesis of lung cancer at the molecular level is essential for the development of new chemotherapeutic agents. A promising research approach is focused on microRNAs which expression is altered in tumor tissues and which can exert both tumor suppressive and oncogenic effects. In this work, functional analysis of miR-200b-3p in bronchial carcinomas of short-term survivors is conducted. The miR-200b-3p is of particular interest in regards to lung carcinomas because its expression is exclusively upregulated in tumor tissues of short-term survivors with an initial favorable tumor staging compared to normal tissues. To understand the impact of miR-200b-3p on carcinogenesis and to explore the possible relationship between miR-200b-3p overexpression and the higher aggressiveness of lung carcinomas of short-term survivors, 31 bioinformatically predicted target genes were investigated in this work. Using HiTmIR dual luciferase assay, 30 of these target genes were validated as target genes of miR-200b-3p. In the subsequent mutagenesis assay, the miR-200b-3p binding sites of the ten most strongly repressed target genes in the initial HiTmIR dual luciferase assay were mutated. In the mutagenesis HiTmIR assay all ten were validated as direct target genes of miR-200b-3p. Two of the ten validated target genes, LRP1 and PPM1F, were examined in more detail. Quantification of LRP1 and PPM1F expression in miR-200b-3p transfected A549 cells by qRT-PCR and Western blot demonstrated that the expression of the two target genes was also inhibited in a lung cancer cell line by overexpression of miR-200b-3p. Of particular interest are LRP1, PPM1F, HIPK3, CELF2, and LATS2 which have tumor suppressive effects and are repressed by miR-200b-3p overexpression.

## 2 Einleitung

### 2.1 Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Bei Frauen war es 2018 mit 9,4 % der Krebsneuerkrankungen die dritthäufigste Krebsneuerkrankung; es erkrankten 21.900 Frauen an Lungenkrebs [97]. Bei Männern machte das Lungenkarzinom 2018 13,3 % der Krebsneuerkrankungen aus, damit war es die zweithäufigste Krebsneuerkrankung [97]. 35.300 Männer erkrankten 2018 an Lungenkrebs [97]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 bis 70 Jahren [97]. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 22 % bei Frauen und 17 % bei Männern ist das Lungenkarzinom eine prognostisch ungünstige Erkrankung [97]. 2019 starben 44.881 Menschen in Deutschland an Lungenkrebs [97]. Die altersstandardisierten Neuerkrankungs- und Sterberaten unterscheiden sich zwischen Frauen und Männern [97]. Während beide Raten bei Männern seit 1999 abfallen, steigen die Raten, die die Frauen betreffen, an [97]. Die Raten nähern sich einander an [97]. Dennoch liegen die Neuerkrankungs- und Sterberaten der Frauen kontinuierlich unter denen der Männer [97]. Zurückzuführen ist diese zeitliche Entwicklung auf eine Veränderung des Tabakkonsums im Laufe der Jahre [97]. Während die Jemalsraucherquote der Männer der Geburtsjahrgänge 1915 bis 1979 wenigen Schwankungen unterlag und kontinuierlich bei 50 bis 65 % lag, steigt die der Frauen erst in der Nachkriegszeit deutlich an [20]. In den Geburtsjahrgängen 1915 bis 1919 beispielsweise liegt die Quote von Raucherinnen und ehemaligen Raucherinnen zu Nichtraucherinnen bei ungefähr 10 %, während sie in den Geburtsjahrgängen 1960 bis 1964 bei 50 % liegt [20]. Aktives Rauchen ist der bedeutendste Risikofaktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms: Bei Männern sind neun von zehn und bei Frauen sechs von zehn Lungenkrebsfällen auf aktives Rauchen zurückzuführen [97]. Weitere exogene Risikofaktoren für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms stellen die beruflich bedingten Karzinogenexpositionen beispielsweise durch Asbest, Arsen, polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Quarzstäube dar [97]. Auch umweltbedingte Karzinogenexpositionen wie zum Beispiel durch Passivrauchen, ionisierende Strahlung, Feinstaub, Dieselabgase und Radon spielen eine untergeordnete Rolle [97]. Endogene Risikofaktoren, die die Entwicklung eines Lungenkarzinoms begünstigen, sind Krankheiten wie die Tuberkulose, die mit einer Narbenbildung in der Lunge einhergehen, und zudem auch erbliche Faktoren [69, 97]. Histologisch erfolgt eine Unterteilung in zwei Haupttypen: Das kleinzellige Lungenkarzinom (*small-cell lung cancer*, SCLC), das zu den neuroendokrinen Tumoren zählt, und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (*non-small-cell lung cancer*, NSCLC) [69]. Das SCLC macht bei Frauen 20 % und bei Männern 17 % der Lungenkrebsfälle aus [23]. 60 % der 2013 erfassten SCLC-Fälle betrafen Frauen [23]. Im Vergleich zum NSCLC weist das SCLC eine höhere Zellteilungsrate und eine raschere Wachstumsprogredienz auf und es kommt zu

## Einleitung

einer früheren Metastasierung [23, 125]. Das SCLC hat eine schlechtere Prognose als das NSCLC [23]. Die Gruppe der NSCLCs umfasst alle Tumoren der Lunge, die nicht unter das SCLC fallen [63]. Die häufigsten NSCLCs sind das Adenokarzinom, das 46 % der Lungenkrebsneuerkrankungen bei Frauen und 37 % bei Männern ausmacht, und das Plattenepithelkarzinom, das 15 % der Lungenkrebsneuerkrankungen bei Frauen und 29 % bei Männern darstellt [63].

Zur Basisdiagnostik des Lungenkarzinoms gehören eine ausführliche Anamnese, die klinische Untersuchung, Laboruntersuchungen, eine Röntgenthorax-Übersicht in zwei Ebenen, eine Computertomographieuntersuchung (CT) des Thorax inklusive der Oberbauchregion und eine Bronchoskopie [69]. Eine routinemäßige Bestimmung von Tumormarkern erfolgt beim Lungenkarzinom nicht, da bislang kein Biomarker mit zufriedenstellender Spezifität und Sensitivität identifiziert werden konnte [69]. Biopsien für eine histologische Untersuchungen können bei einer Bronchoskopie, durch eine transthorakale, CT-gesteuerte Biopsie oder durch eine Thorakoskopie gewonnen werden [69]. Der Ausbreitungsdiagnostik zur Beurteilung einer möglichen Fernmetastasierung dienen eine CT-Untersuchung des Abdomens, eine Magnetresonanztomographieuntersuchung des Schädels und eine Knochenszintigrafie oder ein Positronenemissionstomografie-CT des ganzen Körpers [69].

Das Staging zur Stadieneinteilung eines Lungenkarzinoms erfolgt anhand der Tumorausbreitung in Bezug auf den primären Tumor, den Lymphknotenstatus und Fernmetastasen mittels der Tumor-Nodes-Metastases-Klassifikation (TNM) und unterscheidet sich zwischen SCLC und NSCLC nicht (Tabelle 1, Tabelle 2, Tabelle 3) [69].

**Tabelle 1: Klassifikation des Primärtumors nach TNM 8 der IASLC (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebshilfe, & AWMF, 2024)**

Tx	keine Beurteilung des Primärtumors möglich oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor radiologisch oder bronchoskopisch nicht sichtbar
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Durchmesser des Primärtumor $\leq 3$ cm in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein Hauptbronchusbefall
T1mi	minimal invasives Adenokarzinom: Solitäres Adenokarzinom $\leq 3$ cm in der größten Ausdehnung mit einem überwiegend lepidischen Wachstumsmuster und einem invasiven Anteil $\leq 5$ mm Durchmesser
T1a	größter Durchmesser $\leq 1$ cm
T1b	größter Durchmesser $> 1$ cm und $\leq 2$ cm
T1c	größter Durchmesser $> 2$ cm und $\leq 3$ cm

## Einleitung

T2	Durchmesser des Primärtumors > 3 cm und ≤ 5 cm in größter Ausdehnung oder Primärtumor mit mind. einem der folgenden Merkmale:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Befall des Hauptbronchus ≥ 2 cm distal der Carina oder</li> <li>• Infiltration der viszeralen Pleura oder</li> <li>• tumorbedingte Atelektase oder obstruktive Entzündung der Lunge</li> </ul>	
	T2a	größter Durchmesser > 3 cm und ≤ 4 cm
T2b	größter Durchmesser > 4 cm und ≤ 5 cm	
T3	Durchmesser des Primärtumors > 5 cm und ≤ 7 cm in größter Ausdehnung oder Primärtumor mit mind. einem der folgenden Merkmale:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• direkte Infiltration der Pleura parietalis, der Brustwand, des Nervus phrenicus oder des parietalen Perikards oder</li> <li>• weiterer Tumorknoten im selben Lungenlappen wie der Primärtumor</li> </ul>	
T4	Durchmesser des Primärtumors > 7 cm in größter Ausdehnung oder Primärtumor mit mind. einem der folgenden Merkmale:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiltration des Zwerchfells, des Mediastinum, des Herzens, der großen Gefäße, der Trachea, des Nervus laryngeus recurrens, des Ösophagus, der Wirbelkörper, der Carina oder</li> <li>• weiterer, vom Primärtumor getrennter Tumorknoten in einem anderen Lungenlappen derselben Seite</li> </ul>		

**Tabelle 2: Klassifikation des Lymphknotenbefalls nach TNM 8 der IASLC (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebshilfe, & AWMF, 2024)**

Nx	keine Beurteilung regionaler Lymphknoten möglich
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	mind. eine Metastase in ipsilateralen peribronchialen, hilären oder intrapulmonalen Lymphknoten
N2	mind. eine Metastase in ipsilateralen mediastinalen oder subkarinalen Lymphknoten
N3	mind. eine Metastase in kontralateralen mediastinalen oder hilären Lymphknoten oder Skalenus- oder supraclaviculären Lymphknoten

**Tabelle 3: Klassifikation der Fernmetastasen nach TNM 8 der IASLC (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebshilfe, & AWMF, 2024)**

M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
	M1a

## Einleitung

	M1b	eine extrathorakale Metastase
	M1c	mehrere extrathorakale Metastasen

Mittels der TNM-Klassifikation lassen sich die Tumorerkrankungen gemäß der Union internationale contre le cancer (UICC) in Stadien einteilen (Tabelle 4) [69]. Bei SCLC erfolgt im Gegensatz zu NSCLC keine Differenzierung des Stadiums IV [69].

**Tabelle 4: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC 8 (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebshilfe, & AWMF, 2024)**

Stadium	T-Status	N-Status	M-Status
0	Tis	N0	M0
IA1	T1mi, a	N0	M0
IA2	T1b		
IA3	T1c		
IB	T2a		
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a – c, T2a, b T3	N1 N0	
IIIA	T1a – c, T2a, b T3 T4	N2 N1 N0 – N1	M0
IIIB	T1a – c, T2a, b T3 – T4	N3 N2	
IIIC	T3 – T4	N3	
IVA	Tis - T4	N0 – N3	M1a, b
IVB			M1c

Über 50% der Lungenkrebserkrankungen befinden sich bei Diagnosestellung bereits in Stadium IV [97]. Diese späte Diagnosestellung lässt sich einerseits damit erklären, dass es kein flächendeckendes Lungenkrebscreening gibt, andererseits kommt es bei Lungenkrebs meist erst in fortgeschrittenen Stadien zu meistens unspezifischen Symptomen [38, 97].

Während eine Früherkennung mittels Röntgenthorax-Übersicht bei Risikopersonen aufgrund der Strahlenbelastung nicht sinnvoll ist, werden asymptomatischen Risikopersonen jährliche Low-Dose-CT-Untersuchungen empfohlen [69, 81]. Als Risikopersonen gelten Personen im Alter zwischen 50 und 75 Jahren mit Raucheranamnese von mind. 15 Zigaretten pro Tag über mind. 25 Jahre oder mind. zehn Zigaretten pro Tag über mind. 30 Jahre und einer Nikotinkarenz kürzer als zehn Jahre [69].

## Einleitung

Die Symptome einer Erkrankung mit einem Lungenkarzinom lassen sich auf den Primärtumor, seine intra- und extrathorakale Ausbreitung oder paraneoplastische Syndrome zurückführen [69]. Die häufigsten Initialsymptome sind Husten bzw. ein veränderter Hustencharakter, Gewichtsverlust, Luftnot, Brustschmerzen und Hämoptysen [69]. Paraneoplastische Syndrome treten bei SCLCs häufiger auf als bei NSCLCs, insbesondere endokrine Störungen wie beispielsweise das Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion oder das Cushing-Syndrom [125].

Die Therapie des Lungenkarzinoms ist patientenindividuell und unter anderem vom Tumorstadium, der Tumorart, dem Therapieansprechen und dem Wunsch des Patienten abhängig [69]. Die Therapieoptionen umfassen eine operative Therapie zur Tumorresektion und Lymphadenektomie, Strahlentherapie, medikamentöse Therapien mittels adjuvanter und neoadjuvanter Chemotherapie und supportive Behandlungen [69]. In einem palliativen Setting werden auch „Targeted Therapies“ wie z.B. PD-1-Inhibitoren eingesetzt, die sich nach dem Nachweis bestimmter Treibermutationen richten [69].

## 2.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine Ribonukleinsäure-Moleküle (RNA-Moleküle) mit einer Länge von ungefähr 21 bis 23 Nukleotiden, die nicht-codierend sind [65]. Das bedeutet, dass sie keine Proteine codieren; stattdessen regulieren sie die Proteinbiosynthese auf posttranskriptioneller Ebene [65]. Die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch miRNAs funktioniert über verschiedene Mechanismen, die in einer direkten Spaltung der Ziel-messenger-RNA (Ziel-mRNA) oder in einer Hemmung der Proteintranslation mit anschließendem Abbau der Ziel-mRNA resultieren [82]. Dieser Prozess wird RNA-Interferenz (RNAi) genannt [26]. Allerdings sind auch miRNAs bekannt, die positiv auf die Genexpression einwirken und die Translation aktivieren [8]. Im menschlichen Genom sind bislang etwa 2600 reife miRNAs bekannt, die unter anderem in Intronbereichen oder auch in intergenischen Bereichen codiert werden [4, 99]. Mindestens ein Drittel der etwa 20.000 proteincodierenden Gene des menschlichen Genoms wird durch RNAi in seiner Genexpression beeinflusst [70, 91]. Eine einzelne miRNA reguliert nicht exklusiv eine einzige mRNA, sondern kann auf viele verschiedene mRNAs einwirken, solange diese in ihrer 3'-untranslatierten Region (3'-*untranslated region*, 3'-UTR) eine Bindestelle der jeweiligen miRNA tragen [66]. Ebenso sind kombinatorische Effekte möglich, in deren Rahmen mehrere miRNAs gemeinsam auf eine Ziel-mRNA einwirken [47].

Die Synthese der miRNAs beginnt im Zellkern (Abbildung 1) [67]. Die RNA-Polymerase II erzeugt im Rahmen der Transkription des miRNA-Gens die primary microRNA (Pri-miRNA) und es werden eine Cap-Struktur an das 5'- und ein Poly(A)-Schwanz an das 3'-Ende angehängt [68]. Die Pri-miRNA lagert sich anschließend zu einer doppelsträngigen

## Einleitung

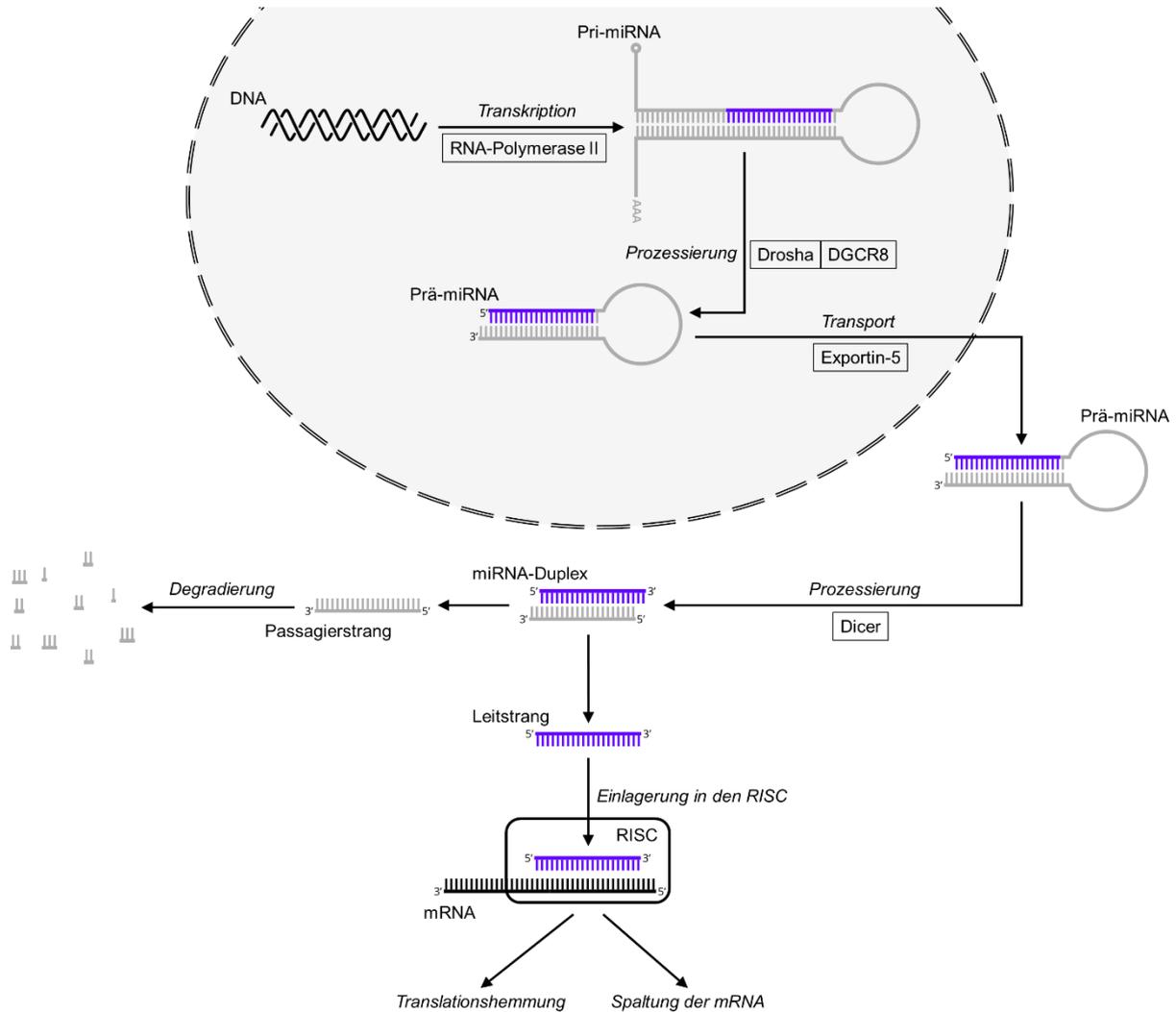
Haarnadelstruktur zusammen [82]. Die weitere Prozessierung der Pri-miRNA geschieht durch den Mikroprozessorkomplex, der die Pri-miRNA mit dem RNA-Bindeprotein DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) bindet und die Haarnadelstruktur durch die Ribonuklease-III Drosha (RNase-III Drosha), eine Endonuklease, prozessiert [36]. Es entsteht die *precursor-miRNA* (Prä-miRNA), die etwa 70 Nukleotide lang ist [65]. Anschließend wird die Prä-miRNA mittels Exportin-5 Ran-GTP-abhängig aus dem Zellkern durch die Kernporen hinaus ins Zytoplasma transportiert [133]. Dort findet der erste Schritt der RNAi statt; der Stem-Loop der Haarnadelstruktur wird durch Dicer, einen Enzymkomplex mit RNase-Aktivität, abgetrennt [62, 95]. Es entsteht der miRNA-Duplex, ein doppelsträngiges RNA-Molekül, das an jedem 3'-Ende einen zwei Nukleotide langen Überhang aufweist [94, 134]. Eine Helikase trennt im zweiten Schritt der RNAi das doppelsträngige miRNA-Molekül in seine Einzelstränge auf, einen Leitstrang (*guide strand*) und einen Passagierstrang (*passenger strand*), der abgebaut wird [37, 53]. Obwohl prinzipiell beide miRNA-Einzelstränge in den RNA-induzierten Stilllegungskomplex (*RNA-induced silencing complex*, RISC) eingelagert werden könnten, wird bei den meisten miRNAs einer der beiden Einzelstränge präferiert [102]. Bevorzugt ausgewählt wird der Strang, der thermodynamisch instabiler ist und ein purinreiches 5'-Ende aufweist sowie dessen erster Nukleotid am 5'-Ende als Base Uracil oder Adenin aufweist und phosphoryliert ist [29, 40, 48, 58]. Der Leitstrang lagert sich mit anderen Proteinen zum RISC zusammen [51]. Das funktionelle Kernstück des RISC stellt das Argonaute-Protein (AGO-Protein) dar [51]. Dieses fixiert die miRNA, sodass die Positionierung für die Bindung der Ziel-mRNA optimal ist [74]. Die Ziel-mRNA wird mittels komplementärer Basenpaarung an die *seed*-Region der miRNA gebunden, die sich an den Positionen nt 2-7 des 5'-Endes der miRNA befindet [70]. Damit die Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA erfolgen kann, muss die *seed*-Region der miRNA komplett komplementär zur entsprechenden Bindestelle in der Ziel-mRNA sein [70]. Es werden verschiedene kanonische Bindungstypen unterschieden [70]. Bei einer 6mer-Bindung besteht lediglich die Komplementarität in der *seed*-Region und das Nukleotid der Ziel-mRNA, das nt 1 der miRNA gegenübersteht, enthält kein Adenin als Nukleinbase [70]. Die 7mer A1-Bindung hingegen weist ebenfalls die Komplementarität in der *seed*-Region auf, aber das Nukleotid der Ziel-mRNA, das nt 1 der miRNA gegenübersteht, enthält Adenin als Nukleinbase [70]. Bei der 7mer M8-Bindung weist die Ziel-mRNA über die *seed*-Region hinaus eine Komplementarität mit nt 8 der miRNA auf und das Nukleotid der Ziel-mRNA, das nt 1 der miRNA gegenübersteht, enthält kein Adenin als Nukleinbase [70]. Bei der 8mer-Bindung weist die Ziel-mRNA über die *seed*-Region hinaus ebenfalls eine Komplementarität mit nt 8 der miRNA auf und das Nukleotid der Ziel-mRNA, das nt 1 der miRNA gegenübersteht, enthält Adenin als Nukleinbase [70]. Die Stärke der Bindung ist vom Bindungstyp abhängig und wie folgt: 8mer > 7mer M8 > 7mer A1 > 6mer [39]. Meist bindet die miRNA die Ziel-mRNA in deren 3'-UTR [70]. Es wurden aber z.B. auch Bindestellen in der 5'-UTR und in der kodierenden

## Einleitung

Sequenz gefunden [28, 115]. Die Bindung der Ziel-mRNA an den RISC stellt den dritten Schritt der RNAi dar [51]. Bei einer komplett komplementären Basenpaarung, die beim Menschen selten ist, wird die Ziel-mRNA direkt durch das AGO-Protein gespalten [51, 109]. Meistens ist die Basenpaarung jedoch nicht komplett komplementär und die Ziel-mRNA wird gebunden ohne direkt vom AGO-Protein gespalten zu werden [135]. Von den vier menschlichen AGO-Proteinen, AGO1, AGO2, AGO3 und AGO4, besitzt nur AGO2 ein katalytisches Zentrum [75]. Die Translation der Ziel-mRNA wird nun durch den RISC gehemmt und der gesamte Komplex wird zu den Prozessierungskörperchen (*processing bodies*, P-Bodies) transportiert [135]. P-Bodies bestehen aus Aggregaten von Proteinen und Nukleinsäuren und stehen im Zusammenhang mit mRNA-Degradation [9]. Sie enthalten Proteine, die dem mRNA-Decapping und der mRNA-Degradation dienen, wie z.B. DCP1, LSM4 und XRN1 [9, 24]. In den P-Bodies findet das Decapping, die Kürzung des Poly(A)-Schwanzes und schließlich der Abbau der Ziel-mRNA statt [106].

Physiologisch nehmen miRNAs u.a. Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose [12, 65]. Bei vielen Krankheiten, wie z.B. auch bei zahlreichen Krebsarten, sind miRNAs dysreguliert [85]. Die Rolle, die miRNAs in der Krebsentwicklung spielen, ist vielfältig. So können miRNAs, wie die miR-200b-3p, sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene fungieren [44, 77].

## Einleitung



### Abbildung 1: microRNA-Biosynthese

Die miRNA-Biosynthese beginnt im Zellkern mit der Transkription des miRNA-Gens durch die RNA-Polymerase II. Die erzeugte Pri-miRNA lagert sich zu einer Haarnadelstruktur zusammen und wird durch den Mikroprozessorkomplex, der aus Drosha und DGCR8 besteht, zur Prä-miRNA prozessiert. Die Prä-miRNA wird durch Exportin-5 aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert. Der Stem-Loop der Prä-miRNA wird durch Dicer abgetrennt, es entsteht der doppelsträngige miRNA-Duplex. Der miRNA-Duplex wird in seine Einzelstränge aufgetrennt. Einer der Einzelstränge, der Passagierstrang, wird abgebaut. Der andere Einzelstrang, der Leitstrang, wird in den RISC eingelagert und kann die Ziel-mRNA binden, was zur Translationshemmung oder zur direkten Spaltung der Ziel-mRNA führt.

### 2.3 Untersuchung des Transkriptom Lang- und Kurzzeitüberlebender

Die Grundlage dieses Projektes bildet die von Sandra Schwarz durchgeführte Untersuchung des Transkriptom in Bronchialkarzinomgewebeproben Lang- und Kurzzeitüberlebender [101]. Durch Resektionen bei Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten/-innen wurden Gewebeproben des Tumor und des korrespondierenden Normalgewebes gewonnen. Die Länge des Überlebens der Patienten/-innen nach der Operation wurde verfolgt; anhand dessen erfolgte eine Einteilung in eine der folgenden Gruppen: „Langzeitüberlebende“ und „Kurzzeitüberlebende“. Als Langzeitüberlebende sind

## Einleitung

Patienten/-innen definiert, die 24 Monate nach ihrer Operation noch am Leben waren, während die Gruppe der Kurzzeitüberlebenden die Patienten/-innen umfasst, die innerhalb von 24 Monaten nach ihrer Operation verstarben. In der Gruppe der Langzeitüberlebenden erfolgte eine Untersuchung der Gewebeproben der Patienten/-innen, die bei der Operation ein ungünstiges Staging von T3N0M0 oder höher in der TNM-Klassifikation (8. Auflage) aufwiesen. Aus der Gruppe der Kurzzeitüberlebenden wurden diejenigen Patienten/-innen ausgewählt, die bei der Resektion ein günstiges Staging von T2bN2 oder niedriger in der TNM-Klassifikation (8. Auflage) aufwiesen. Das Ziel war es auf diese Art und Weise deregulierte miRNAs zu identifizieren, die als negative oder positive Prädiktoren in Bezug auf die Überlebenszeit fungieren und einen besseren Aufschluss auf das zu erwartende Überleben erlauben, als es durch ein Staging bislang möglich ist.

Bei der Transkriptomanalyse der miRNAs der Gewebeproben mittels Next Generation Sequencing wurden im Vergleich zwischen den Tumor- und Normalgewebeproben Kurzzeitüberlebender 88 hochregulierte miRNAs gefunden. 16 dieser miRNAs waren exklusiv zwischen dem Tumor- und Normalgewebe Kurzzeitüberlebender hochreguliert, das heißt sie waren in keinem der anderen drei Entitätenvergleiche, dem Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe Langzeitüberlebender, dem Vergleich zwischen den Tumorgeweben Lang- und Kurzzeitüberlebender oder dem Vergleich der Normalgewebe Lang- und Kurzzeitüberlebender, hochreguliert. Eine dieser 16 miRNAs ist die miR-200b-3p, deren funktionelle Analyse im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Das mRNA-Transkriptom wurde im Rahmen dieses Projekts ebenfalls mittels Next Generation Sequencing von Sandra Schwarz analysiert und das Verhältnis zwischen miRNA- und mRNA-Expression wurde ermittelt.

## Material und Methoden

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Übersicht verwendeter Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
3-Mercapto-1,2-propanediol	Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
Ambion™ Nuclease-Free Water (Kleinstmengen ddH <sub>2</sub> O)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Bio Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH; Radolfzell, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
Doppelt deionisiertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Hauseigene Anlage (s. unter 3.1.10)
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH; Cölbe, Deutschland
Gibco Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA
Glycerin	Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, AnalaR NORMAPUR	VWR International, Radnor; Pennsylvania, USA
Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (in Plätzchen)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## Material und Methoden

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Penicillin/Streptavidin	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA
PolyFect™ Transfection Reagent	Qiagen; Hilden, Deutschland
Ponceau S	Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen; Hilden, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trischlormethan/Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.2 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
Blockingpuffer	BSA	5 % (w/v)
(5 % BSA/TBST)	1x TBST	
Blockingpuffer	Magermilchpulver	5 % (w/v)
(5 % Milch/TBST)	1x TBST	
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml ddH <sub>2</sub> O
Sample Buffer (2x)	TRIS-HCl (pH 6,8)	130 mM
	SDS	6 % (w/v)
	3-Mercapto-1,2-propanediol	10 % (v/v)
	Glycerin	10 % (w/v)

## Material und Methoden

Puffer/Lösung	Produkt	Konzentration/Menge
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
SDS-Laufpuffer (1x)	TRIS-HCl pH 6,8	25 mM
	Glycin	190 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
TBS (Tris-Buffered Saline) (10x)	TRIS	24,2 g
	NaCl	87,66 g
TBST (TBS mit 0,1% Tween® 20) (10x)	10x TBS	
	Tween20	0,1 % (w/v)
Transferpuffer (1x)	TRIS-HCl	25 mM
	Glycin	190 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)

### 3.1.3 Reaktionskits

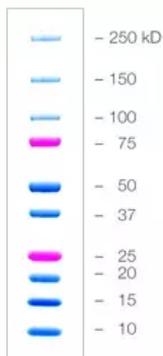
Produkt	Hersteller
Dual-Luciferase Reporter® Assay System	Promega Corporation; Fitchburg, Wisconsin, USA
miRNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Control Primer Set, SNORD48 (hsa)	Qiagen; Hilden, Deutschland
miRCURY LNA miRNA PCR Assay (für hsa-miR-200b-3p)	Qiagen; Hilden, Deutschland

## Material und Methoden

Produkt	Hersteller
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
SignalFire™ ECL Reagenz	Cell Signaling Technology; Cambridge, UK
SignalFire™ Elite ECL Reagenz	Cell Signaling Technology; Cambridge, UK

### 3.1.4 Protein-Molekulargewichtsmarker

Im Rahmen des Western Blots wurde eine Natrium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die untersuchten Proteine wurden bei der Gelelektrophorese ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Der Einsatz des Precision Plus Protein Dual Color Standards der Firma Bio-Rad erlaubt den Vergleich der Laufstrecke der Banden des Markers und der Banden der zu untersuchenden Proteine, sodass Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Proteine gezogen werden können. Der Precision Plus Protein Dual Color Standards-Marker ist eine Mischung aus zehn rekombinanten Proteinen, deren Molekulargewicht zwischen 10 und 250 kDa liegt. Acht der durch die Proteine gebildeten Banden sind blau gefärbt und die zwei pink gefärbten Referenzbanden liegen bei 25 und 75 kDa (Abbildung 2).



#### Abbildung 2: Precision Plus Protein Dual Color Standards von Bio-Rad

Der dargestellte Protein-Größenstandard wurde im Rahmen des Western Blots bei der SDS-PAGE als Referenz für die Probengröße eingesetzt (s. 3.4.8) (Abbildung: Bio-Rad).

## Material und Methoden

### 3.1.5 Vektoren

Vektor	Hersteller
pMIR-RNL-TK	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA
pSG5	Agilent Technologies; Santa Clara, Kalifornien, USA
pSG5-miR-200b	Dr. Martin Hart (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum des Saarlandes)

### 3.1.6 Enzyme und Enzympuffer

Produkt	Hersteller
Restriktionsendonukleasen ( <i>SpeI</i> -HF, <i>SacI</i> -HF, <i>EcoRI</i> -HF, <i>BamHI</i> -HF)	New England BioLabs GmbH; Frankfurt am Main, Deutschland
Trypsin/EDTA (Gibco™)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA

### 3.1.7 Antikörper

Produkt	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG-(Gesamtmolekül)-Peroxidase in Ziege hergestellte Antikörper	Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
Anti-Maus-IgG (Gesamtmolekül)-Peroxidase in Kaninchen hergestellte Antikörper	Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
Monoklonaler Anti-LRP1-Antikörper in Kaninchen hergestellt	Cell Signaling Technology; Cambridge, UK
Monoklonaler Anti-PPM1F-Antikörper in Maus hergestellt	Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
Monoklonaler GAPDH-Antikörper in Kaninchen hergestellt	Cell Signaling Technology; Cambridge, UK

### 3.1.8 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
A549	Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
HEK-293T	Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

## Material und Methoden

### 3.1.9 Kulturmedien

Produkt	Hersteller
Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA

### 3.1.10 Geräte

Gerät	Produkt	Hersteller
Aufreinigungssystem für Nukleinsäuren	QIAcube	Qiagen; Hilden, Deutschland
Bildgebendes Instrument	ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, Kalifornien, USA
Blotting-Apparat	TE42 und TE62 Tank Blotting-Einheit	Hoefer Inc.; Holliston, Massachusetts, USA
Elektrophorese-Netzgeräte	Electrophoresis power supply EV231	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
	Standard Power Pack P25T	Biometra GmbH; Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, Kalifornien, USA
Inverses Durchlicht-Mikroskop	Axiovert25	Carl Zeiss Jena GmbH; Jena, Deutschland
	GloMax® Navigator Microplate Luminometer	Promega Corporation; Fitchburg, Wisconsin, USA
Pipettierhilfe	Accu-jet® pro	BRAND GMBH + CO KG; Wertheim, Deutschland
Pipettierroboter	epMotion 5075 liquid handling system	Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
RT-qPCR System	StepOnePlus™ RealTime PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA
Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA
Thermocycler	peqSTAR 2X Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland
	ProFlex PCR Thermocycler	Applied Biosystems; Waltham, Massachusetts, USA
Thermoschüttler	Mischblock/Heizblock Bioer MB-102 Thermocell	Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd; Hangzhou, Zhejiang, China

## Material und Methoden

Gerät	Produkt	Hersteller
Ultraschall-Zelldisruptor/-Homogenisator	Sonifier 250	Branson Ultrasonics; Brookfield, Connecticut, USA
UV-VIS-Photometer	BioPhotometer	Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
Vakuumpzentrifuge	UniEquip UNIVAPO 100H	Uniequip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH; Planegg, Deutschland
Vortexer	RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH; Garbsen, Deutschland
Wasser- und Eisanlagen	Flockeneisbereiter Flake-Line	WESSAMAT Eismaschinenfabrik GmbH; Kaiserslautern, Deutschland
Wasserbad	Reinstwasseranlage ELGA PURELAB Chorus, PURELAB flex Dispenser Typ 1003	ELGA LabWater; Celle, Deutschland Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel, Deutschland
Zellkultur	Heraeus Laminair HB 2448 K Sterilbank/Sicherheitswerkbank New Brunswick Incubator CO2 Galaxy 170S (Eukaryotische Zellkultur)	Heraeus; Hanau, Deutschland Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
Zellzählgerät	LUNA-FLTM Dual Fluorescence Cell Counter	Logos Biosystems, Inc.; Dongan-gu Anyang-si, Gyeonggi-do, Südkorea
Zentrifugen	Centrifuge 5810R	Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5425	Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
	Costar Mini Centrifuge Model 10 MVSS	Corning, Inc.; Corning, New York, USA
	MIKRO 185	Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen, Deutschland
	SIGMA 2-1K mit Kühlung	SIGMA Laborzentrifugen GmbH; Osterode am Harz, Deutschland

### 3.1.11 Software

Programm/Webanwendung	Link/Hersteller
Figma	Figma Inc., San Francisco, Kalifornien, USA
GATC-Viewer	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

## Material und Methoden

Programm/Webanwendung	Link/Hersteller
Image Lab 6.0.1	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, Kalifornien, USA
Microsoft® Office Excel, Powerpoint, Word	Microsoft Office Professional Plus 2019, Microsoft Corporation
mirDIP 5.0.2.3	<a href="https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/">https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/</a>
miRTarBase	<a href="https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php">https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php</a>
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA
Operating Software, Version 1.5	
NCBI Blast (Basic Local Alignment Search Tool)	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
NCBI Gene (National Center for Biotechnology Information)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/</a>
Powerpoint Toolkit	Motifolio Inc.; Ellicott City, USA
Sigma Plot 10	Inpixon GmbH; Frankfurt am Main, Deutschland
SnapGene 6.2.1	GSL Biotech LLC; Chicago, Illinois, USA
Targetscan Human 7.2	<a href="http://www.targetscan.org/vert_72/">http://www.targetscan.org/vert_72/</a>
WebCutter 2.0	<a href="http://heimanlab.com/cut2.html">http://heimanlab.com/cut2.html</a>

### 3.1.12 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 30 µl	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, Kalifornien, USA
96-Well-Assay-Platten	Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
Greiner Bio-One Polypropylen-Teströhrchen mit konischem Boden	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA

## Material und Methoden

Material	Hersteller
Haftfolie für PCR-Platten	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA
LUNA-FLTM Dual Fluorescence Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Inc.; Dongan-gu Anyang-si, Gyeonggi-do, Südkorea
MicroAMP Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA
Nitrocellulose Transfermembran	GE Healthcare; Chicago, Illinois, USA
Parafilm M	Bemis Company; Neenah, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sorenson BioScience; Murray, Utah, USA
Pipettenspitzen für das epMotion 5075 liquid handling system	Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (safe-lock; 2 ml)	Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
RNase-freie Reaktionsgefäße (0,2 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
UV/VIS-Küvette	Eppendorf SE; Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6-well, 96-well)	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Zellulosefilter WhatmanTM	Herolab GmbH, Maidstone, Vermont, Vereinigte Staaten

### 3.2 Humane Zelllinien: Kultivierung der HEK-293-T- und der A549-Zelllinie

Für die Durchführung der *high-throughput miRNA interaction reporter assay*-Dual-Luciferase-Assays (HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay) und der anschließenden Mutagenese-Assays wurde die *Human Embryonic Kidney-293-T-Zelllinie* (HEK-293-T-Zelllinie) kultiviert. Die HEK-293-Zelllinie wurde in den 1970er Jahren aus humanen embryonalen Nierenzellen generiert, die mit gescherter Adenovirus 5-DNA transfiziert wurden [32]. Die HEK-293-T-Zelllinie ist eine Weiterentwicklung der HEK-293-Zelllinie, die 1987 unter dem Namen „293/tsA1609neo“

## Material und Methoden

generiert wurde [21]. Diese Zelllinie exprimiert das Große T-Antigen aus dem Simian-Virus 40 (SV 40), das nach der Transfektion die Replikation von Plasmiden, die den SV 40-Replikationsursprung enthalten, ermöglicht [21]. Die HEK-293-T-Zellen wurden von der „Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ bezogen.

Um die Beeinflussung der Proteinexpression ausgewählter Zielgene durch die miR-200b-3p zu untersuchen, wurde darüber hinaus auch die Adenokarzinomzelllinie A549 kultiviert [31]. Die A549-Zelllinie wurde ebenfalls von der DSMZ bezogen.

Die beiden adhärent wachsenden Zelllinien wurden unter Verwendung derselben Methode bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Die Aussaat erfolgte in Zellkulturflaschen mit „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM), das mit 10 Vol.-% fötalem Kälberserum (FCS), in dem für die Kultivierung der Zellen wichtige Wachstumsfaktoren enthalten sind, und 1 Vol.-% Penicillin/Streptavidin, das bakterielle Kontamination der Zellkulturen verhindert, versetzt wurde. Zur Passage wurde das Zellkulturnährmedium abgenommen und die Zellen zunächst langsam mit 1 ml Trypsin/EDTA gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Danach wurden die Zellen in frischem Zellkulturnährmedium (DMEM) resuspendiert.

### 3.3 Experimente zur Zielgenvalidierung der miR-200b-3p

Zur experimentellen Validierung der Zielgene der miR-200b-3p wurden zur Zielgenauswahl die aus unveröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe Dr. Hart bekannte inverse Korrelation zwischen der miR-200b-3p- und der mRNA-Expression in Tumor- und Normalgewebe Kurzzeitüberlebender mit einer bioinformatischen Zielgenvorhersage kombiniert. Die Analyse dieser potentiellen Zielgene erfolgte mit Hilfe des sogenannten HiTmiR-Dual-Luciferase-Assays, der am Institut für Humangenetik entwickelt wurde [59]. Im Anschluss wurde ein Mutagenese-HiTmiR-Assay zur Bestätigung ausgewählter Zielgene des initialen HiTmiR-Dual-Luciferase-Assays durchgeführt.

#### 3.3.1 Zielgenvorhersage

Da es durch kanonische und nicht-kanonische Bindungen zu einer Vielzahl an möglichen Interaktionen zwischen miRNA und mRNA kommen kann, wird eine Zielgenvorhersage benötigt. Die bioinformatische Zielgenvorhersage für die miR-200b-3p erfolgte mittels miRDIP 4.1, einem Tool, das die Ergebnisse 30 verschiedener Algorithmen zur Zielgenvorhersage zusammenfasst: BCmicrO, BiTargeting, CoMeTa, Cupid, DIANA, EIMMo3, GenMir++, MAMI, MBStar, microrna.org, MirAncesTar, mirbase, miRcode, mirCoX, miRDB, MirMAP, MirSNP, MirTar, miRTar2GO, Mirza-G, MultiMiTar, PACCMIT, PicTar, PITA, RepTar,

## Material und Methoden

RNA22, RNAhybrid, TargetRank, TargetScan und TargetSpy [119]. Durch miRDIP wurden 708 Zielgene für die miR-200b-3p vorhergesagt. Diese vorhergesagten Zielgene wurden mit der Korrelation zwischen mRNA- und miR-200b-3p-Expression im Vergleich der Tumor- und Normalgewebeprobe der Kurzzeitüberlebenden abgeglichen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Hart). Es wurden diejenigen Zielgene ausgewählt, die eine gleich oder stärker negative Korrelation als -0,3 im Spearman-Korrelationskoeffizienten aufwiesen. Die Auswahl anhand der inversen Korrelation erfolgt aufgrund des Wirkmechanismus der miRNAs, bei dem durch Bindung der miRNA an ihre Ziel-mRNA ein Abbau der Ziel-mRNA erfolgt. Durch die inverse Korrelation wurden 3219 invers korrelierte mRNAs identifiziert. Der Abgleich der durch miRDIP vorhergesagten miR-200b-3p-Zielgene und der durch die inverse Korrelation identifizierten invers korrelierten mRNAs ergab eine Überschneidung von 203 vorhergesagten und invers korrelierten miR-200b-3p-Zielgenen. Daraufhin wurden von den 203 vorhergesagten Zielgenen diejenigen ausgewählt, die durch miRDIP mit der Score Class „very high“, die die besten ein Prozent der Ergebnisse umfasst, oder „high“, die die besten fünf Prozent der Ergebnisse umfasst, bewertet wurden. Die verbliebenden 195 potentiellen Zielgene wurden mittels miRTarBase gefiltert, sodass diejenigen Zielgenvorhersagen ausgeschlossen wurden, die bereits durch andere Arbeitsgruppen mittels Dual-Luciferase-Assay bestätigt wurden. Somit wurden 181 bioinformatisch vorhergesagte Zielgene ermittelt, die anschließend nach der Stärke der inversen Korrelation zwischen ihrer mRNA und der miR-200b-3p geordnet wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die 31 am stärksten negativ korrelierten Zielgene ausgewählt und untersucht. Dafür wurden 40 Reporterkonstrukte synthetisiert. (Tabelle 5), da einige der Zielgensequenzen mehrere potentielle Bindestellen für die miR-200b-3p aufweisen. Liegen diese Bindestellen mehr als 500 bp weit auseinander, können sie nicht gemeinsam in ein Plasmid kloniert werden, sodass für manche Zielgene mehr als ein Reporterkonstrukt pro Zielgen designt werden musste.

## Material und Methoden

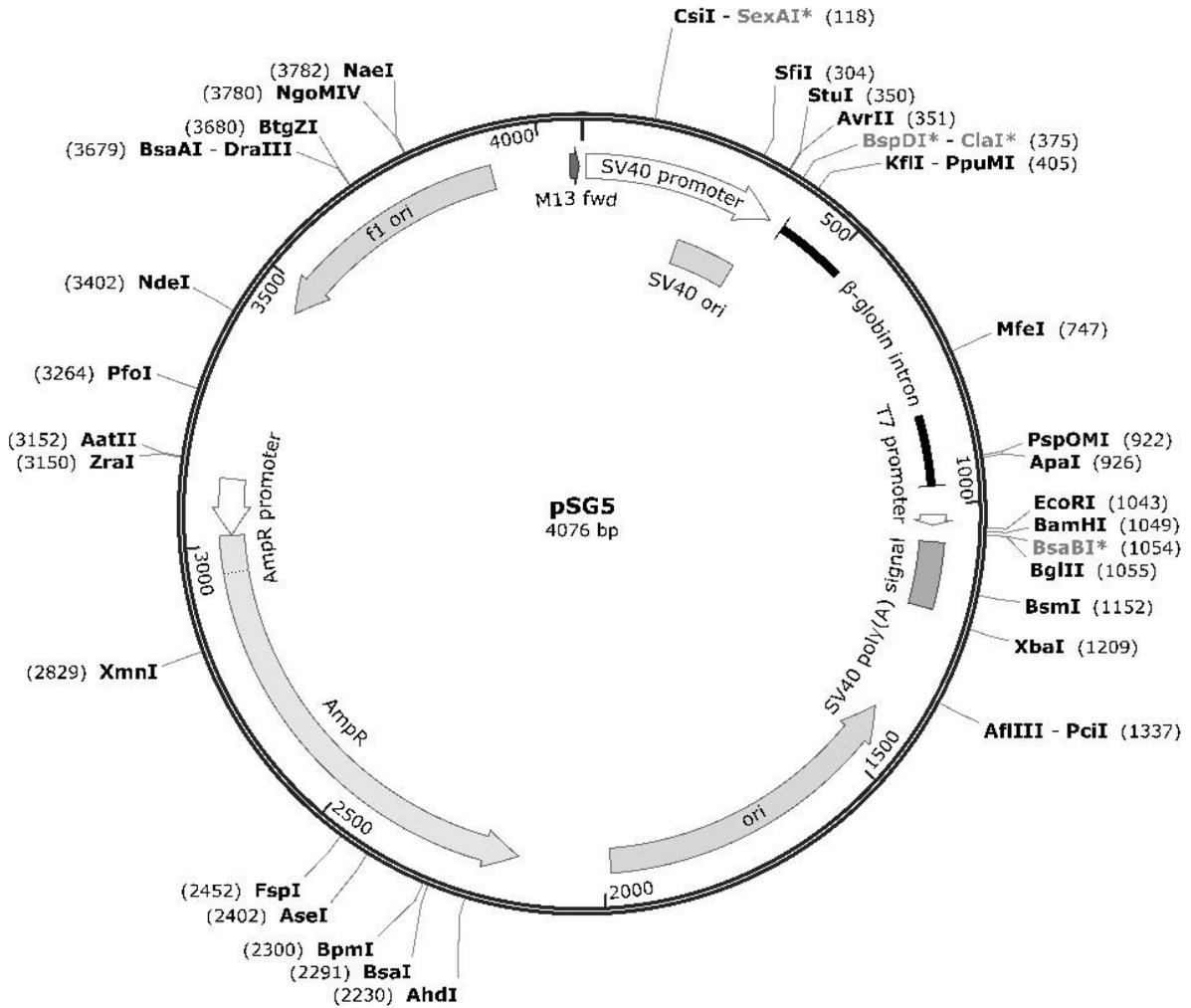
**Tabelle 5: Inverse Korrelation nach Spearman ( $r_s$ ) zwischen der miR-200b-3p und den ausgewählten Zielgenen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Hart, Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes)**

Zielgene	$r_s$	Zielgene	$r_s$	Zielgene	$r_s$
AP1S2	-0,724	JCAD	-0,621	SERINC1	-0,596
TAOK3	-0,713	MXD4	-0,618	ZCCHC24	-0,582
MBNL1	-0,698	LATS2	-0,618	GIT2	-0,572
RGL1	-0,691	SNX30	-0,613	CDK17	-0,571
PBX3	-0,685	VASH1	-0,610	CITED2	-0,568
FRMD4B	-0,664	PPM1F	-0,606	PALM2AKAP2	-0,562
ST3GAL2	-0,660	ARHGEF3	-0,602	SCHIP1	-0,555
SYNJ1	-0,657	CEP85L	-0,599	HIPK3	-0,553
LHFPL6	-0,642	GARRE1	-0,598	RAPGEF2	-0,550
LRP1	-0,627	RAB8B	-0,598		
CELF2	-0,621	NAP1L5	-0,597		

### 3.3.2 Plasmiddesign

Für die folgenden Assays wurde „pSG5-miR-200b“ als Expressionsplasmid verwendet, das freundlicherweise von Dr. rer. nat. Martin Hart zur Verfügung gestellt wurden. Das Expressionsplasmid dient der Expression der miR-200b-3p in eukaryotischen Zellen. Die DNA-Sequenz der precursor-miR-200b wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* in das pSG5-Plasmid kloniert. Die Expression der miR-200b-3p durch das pSG5-miR-200b-Expressionsplasmid wurde nach der Klonierung durch Dr. rer. nat. Martin Hart verifiziert (Hart, 2013).

Der pSG5-Leervektor wurde von Agilent Technologies (Stratagene) bezogen (Abbildung 3).



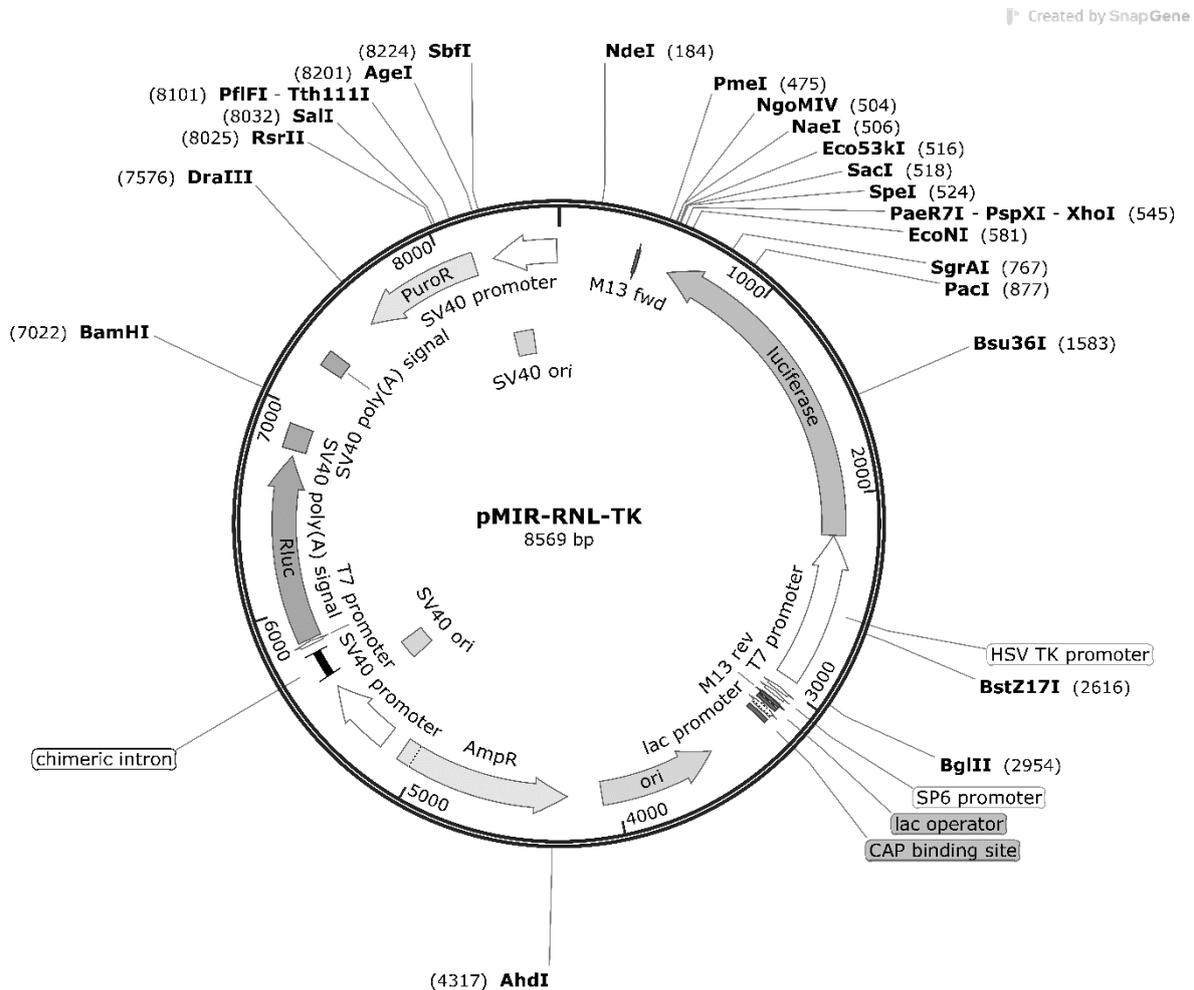
**Abbildung 3: Vektorkarte des pSG5-Expressionsplasmid**

Für das Einbringen der miR-200b-3p in die Zellen wurde ein pSG5-Expressionsplasmid verwendet. Die DNA-Sequenz der precursor-miR-200b-3p wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* in den Expressionsvektor kloniert. (Eigene Abbildung; die Abbildung wurde mittels der von Agilent Technologies bereitgestellten Nukleotidsequenz des Vektors durch SnapGene 6.2.1 (GSL Biotech LLC) erstellt.)

Die Reporterplasmide wurden von Thermo Fisher Scientific (GeneArt) bezogen. Die Basis für die Reporterplasmide stellt das pMIR-RNL-TK-Plasmid dar, das von Beitzinger et al. modifiziert wurde (Abbildung 4) [11]. Dieses Plasmid codiert für zwei Luciferasen, die Firefly- und die Renilla-Luciferase [11]. Upstream der Luciferasegene befinden sich konstitutiv aktive Promotoren, sodass die Luciferasegene kontinuierlich abgelesen werden. Für jedes der vorhergesagten Zielgene wurden abhängig von der Anzahl der Bindestellen ein bis drei Reporterplasmide designiert (Tabelle 6). Dafür wurden die Sequenzen der vorhergesagten 6mer- bis 8mer-Bindestellen der miR-200b-3p in der 3'-UTR des Zielgens gesucht und die entsprechenden maximal 500 bp langen DNA-Abschnitte mittels der Restriktionsenzyme *SpeI* und *SacI* in die Multiple Cloning Site des Reportervektors kloniert. Bei der Transkription des Firefly-Luciferasegens entsteht nun eine Firefly-Luciferase-mRNA, die als 3'UTR, die zu

## Material und Methoden

untersuchende, fremd-eingebrachte Sequenz trägt, in der sich die vorhergesagte bzw. die vorhergesagten Bindestellen der miR-200b-3p befinden. Das Renilla-Luciferasegen ist zwischen den verschiedenen Reportervektoren identisch und die Expression ist von der miR-200b-3p unabhängig.



### Abbildung 4: Vektorkarte des pMIR-Reporterplasmid

Für den Dual-Luciferase-Assay wurde pMIR-RNL-TK als Reporterplasmid verwendet. Das pMIR-RNL-TK-Plasmid codiert für zwei Luciferasen: Die Firefly-Luciferase und die Renilla-Luciferase. Upstream der Luciferasen befinden sich konstitutiv aktive Promotoren, sodass die Luciferasegene kontinuierlich abgelesen werden. Die maximal 500 bp lange Sequenzen der 3'UTR der vorhergesagten Zielgene, die die potentiellen Bindestellen der miR-200b-3p enthalten, wurden mithilfe der Restriktionsenzyme *SpeI* und *SacI* in die Multiple Cloning Site des Reportervektor kloniert. Somit ist die Expression der Firefly-Luciferase durch die miR-200b-3p reguliert. Die Expression der Renilla-Luciferase ist von der miR-200b-3p unabhängig. (Eigene Abbildung; die Abbildung wurde mittels der Nukleotidsequenz des Vektors durch SnapGene 6.2.1 (GSL Biotech LLC) erstellt.)

## Material und Methoden

**Tabelle 6: Die 40 analysierten Reporterplasmide (alphabetisch)**

Reporterplasmide			
pMIR-AP1S2_1	pMIR-GARRE1	pMIR-MXD4	pMIR-SCHIP1
pMIR-AP1S2_2	pMIR-GIT2	pMIR-NAP1L5_1	pMIR-SERINC1
pMIR-ARHGEF3	pMIR-HIPK3_1	pMIR-NAP1L5_2	pMIR-SNX30
pMIR-CDK17	pMIR-HIPK3_2	pMIR-PALM2AKAP2	pMIR-ST3GAL2
pMIR-CELF2	pMIR-HIPK3_3	pMIR-PBX3	pMIR-SYNJ1_1
pMIR-CEP85L_1	pMIR-JCAD	pMIR-PPM1F	pMIR-SYNJ1_2
pMIR-CEP85L_2	pMIR-LATS2	pMIR-RAB8B_1	pMIR-TAOK3_1
pMIR-CITED2	pMIR-LHFPL6	pMIR-RAB8B_2	pMIR-TAOK3_2
pMIR-FRMD4B_1	pMIR-LRP1	pMIR-RAPGEF2	pMIR-VASH1
pMIR-FRMD4B_2	pMIR-MBNL1	pMIR-RGL1	pMIR-ZCCHC24

### 3.3.3 Konzentrationseinstellung der Expressions- und Reporterplasmide

Die Reporterplasmide wurden lyophilisiert geliefert. 5 µg Reporterplasmid wurden in 100 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Damit sich die Plasmide in dem RNase-freien Wasser lösen, wurden die Proben für 60 min bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Bei der Konzentrationseinstellung der Reporterplasmid-Lösungen auf 45-55 ng/µl erfolgte die Konzentrationsmessung durch das NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer. Lag die Reporterplasmid-Konzentration über 55 ng/µl, erfolgte eine Verdünnung mit RNase-freiem Wasser. Bei Konzentrationen unter 45 ng/µl wurden die Proben mit einer Vakuumzentrifuge vaporisiert. Die Konzentrationseinstellung der Expressionsplasmid-Lösung erfolgte ebenfalls auf 45-55 ng/µl.

### 3.3.4 Transfektion

Die Transfektion der HEK-293-T-Zellen mit den pSG5-Expressions- und pMIR-Reporterplasmiden erfolgte nach Herstellerangaben mittels des Transfektionsreagenz PolyFect von Qiagen. Das Transfektionsreagenz besteht aus kationischen Polyamidoamin-Dendrimeren, deren dreidimensionale Struktur und positive Ladung eine Komplexbildung mit Nukleinsäuren erlauben [3, 60]. Nachdem die PolyFect-Nukleinsäuren-Komplexe über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, fungiert PolyFect als Puffer, um die Aktivität der lysosomalen Nukleasen zu inhibieren, sodass die Nukleinsäuren nicht degradiert werden und zum Zellkern transportiert werden können.

Um die HEK-293-T-Zellen im Folgenden transfizieren zu können, erfolgte zunächst ihre Aussaat auf 96-Well-Platten. Dafür wurden die Zellen nach der fünften Passage, was einem zweiwöchigen Kultivierungszeitraum entspricht, erst mit 1 ml Trypsin/EDTA gewaschen, mit

## Material und Methoden

1 ml Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend in 9 ml Zellkulturnährmedium (DMEM) gelöst. Die Zelllösung wurde in ein Falcon überführt. Die Konzentration der Zelllösung wurde mittels des LUNA-FLTM Dual Fluorescence Cell Counter bestimmt und die Zelllösung wurde 1:4 mit Zellkulturnährmedium (DMEM) verdünnt. Danach wurden mittels des Pipettierroboters epMotion 5075 von Eppendorf je  $3,4 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert und am folgenden Tag nach Schema entweder mit pSG5 oder mit pSG5-miR-200b und pMIR-RNL-TK oder einem für die Validierung eines Zielgens designten Reporterplasmid, das die jeweilige zu testende Sequenz beinhaltet, transfiziert.

Es wurden durch den Pipettierroboter 30 µl Zellkulturnährmedium (DMEM) pro Well in eine leere 96-Well-Platte vorgelegt und im Anschluss wurden 4 µl bzw. 200 ng pSG5 oder pSG5-miR-200b pro Well nach Schema in der Mischplatte verteilt. Als nächstes wurden je 1 µl bzw. 50 ng Reporterplasmid pro Well nach Schema verteilt. Ein Transfektionsmix wurde aus 990 µl Zellkulturnährmedium (DMEM) und 110 µl Transfektionsreagenz (PolyFect) angesetzt und gevortext. Der Pipettierroboter pipettierte je 10 µl des Transfektionsmix in jedes Well der Mischplatte. Nach einer zehninütigen Inkubation bei Raumtemperatur, während der sich Transfektionskomplexe bilden, wurde der Inhalt der Wells der Mischplatte auf die am Vortag ausgesäte Zellkulturplatte aufgetropft. Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5% CO<sub>2</sub> für 48 Stunden inkubiert.

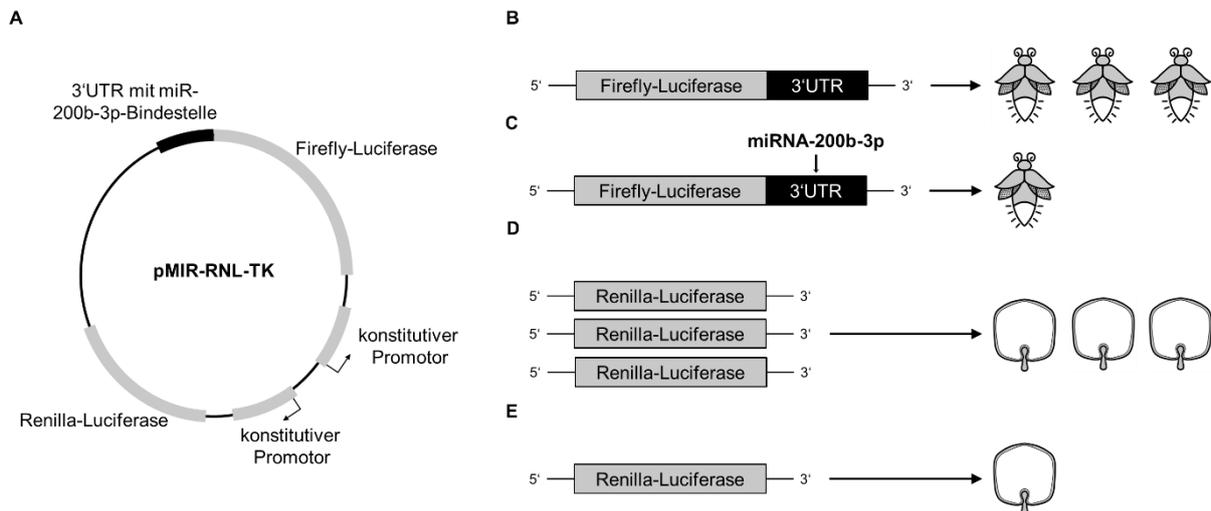
### 3.3.5 HiTmiR-Dual-Luciferase-Assay

Zur Validierung der Zielgene wurde ein Dual-Luciferase-Assay mit vier Experimenten in Duplikaten durchgeführt. Die namensgebende „Luciferase“ ist ein Enzym, das bei Oxidation seiner Substrate, den Luciferinen, Biolumineszenz emittiert [33]. Die in diesem Dual-Luciferase-Assay verwendeten Luciferasegene stammen ursprünglich aus dem *Photinus pyralis*, einem Glühwürmchen, und der *Renilla reniformis*, einer Seefeder.

Ausgangsmaterial des Dual-Luciferase-Assay ist das Zelllysat von mit Expressions- und Reporterplasmiden transfizierten HEK-293-T-Zellen. Die Expressionsplasmide codieren für die miR-200b-3p, sodass eine Überexpression dieser miRNA in den betreffenden Zellen vorliegt. Die Reporterplasmide codieren für zwei verschiedene Luciferasen: Die Firefly- und die Renilla-Luciferase. Abhängig von der Stärke der Regulation des untersuchten Zielgens durch die miR-200b-3p ist die Expression der Firefly-Luciferase durch die miR-200b-3p reguliert. Bindet die miR-200b-3p an die aus dem Zielgen stammende Bindestelle in der 3'UTR der Firefly-Luciferase-mRNA, kommt es zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese und es wird in diesen Zellen weniger Firefly-Luciferase synthetisiert als in den mit pSG5 transfizierten Zellen ohne miR-200b-3p-Überexpression. Die Expression der Renilla-Luciferase ist von der miR-200b-3p-Expression unabhängig und fungiert als interne Kontrolle, mit der die

## Material und Methoden

Transfektionseffizienz kontrolliert wird. Bei hoher Transfektionseffizienz liegen viele Reporterplasmide in den Zellen vor, sodass auch im Verhältnis viel Firefly- und Renilla-Luciferase synthetisiert wird. Bei einer niedrigen Transfektionseffizienz hingegen werden sowohl weniger Firefly-Luciferase als auch weniger Renilla-Luciferase synthetisiert. Die Messung der Renilla-Luciferase-Aktivität ermöglicht die Normierung der Firefly-Luciferase-Aktivitäts-Quantifizierungen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Dual-Luciferase-Assays**

**A:** Für den Dual-Luciferase-Assay wurden die Zellen mit dem pMIR-RNL-TK-Reporterplasmid transfiziert. Das pMIR-RNL-TK-Plasmid codiert für zwei Luciferasen: Die Firefly-Luciferase und die Renilla-Luciferase. Upstream der Luciferasen befinden sich konstitutive Promotoren, sodass die Luciferasegene kontinuierlich abgelesen werden. In die 3'UTR des Firefly-Luciferasegens wurden potentielle Bindestellen der miR-200b-3p kloniert, deren Sequenzen aus der 3'UTR der vorhergesagten Zielgene stammen. **B:** Durch Transkription des Firefly-Luciferasegens entsteht die abgebildete Firefly-Luciferase-mRNA. Kommt es nicht zu einer Regulation der Translation durch die miR-200b-3p, wird im Rahmen der Translation Firefly-Luciferase synthetisiert. Die Hinzugabe von Luciferinen im Rahmen des Luciferase-Assays führt zu Entstehung von Biolumineszenz, die gemessen wird (hier durch die Glühwürmchen-Skizze symbolisiert). **C:** Durch Transkription des Firefly-Luciferasegens entsteht die abgebildete Firefly-Luciferase-mRNA. Kommt es zu einer Regulation der Translation durch die miR-200b-3p, indem diese an die 3'UTR der mRNA bindet, wird durch die Translationshemmung weniger Firefly-Luciferase synthetisiert. Bei Hinzugabe von Luciferinen im Rahmen des Luciferase-Assays wird weniger Biolumineszenz gemessen. Es besteht ein inverser Zusammenhang zwischen der Kompatibilität der miR-200b-3p und der 3'UTR der Firefly-Luciferase und der emittierten Biolumineszenz. **D:** Bei großer Transfektionseffizienz liegen viele Reporterplasmide in den Zellen vor. Somit wird im Rahmen der Transkription viel Renilla-Luciferase-mRNA synthetisiert und translatiert. Dadurch liegt in den Zellen viel Renilla-Luciferase vor, sodass im Dual-Luciferase-Assay viel Biolumineszenz gemessen wird (hier durch die Renilla-Skizze symbolisiert). Die Proteinbiosynthese des Renilla-Luciferasegens wird nicht von der miR-200b-3p reguliert. **E:** Bei geringer Transfektionseffizienz liegen wenige Reporterplasmide in den Zellen vor. Es wird weniger Renilla-Luciferase erzeugt und somit im Rahmen des Dual-Luciferase-Assays weniger Biolumineszenz gemessen. (Eigene Abbildung)

Vor Durchführung des Dual-Luciferase-Assays wurden die transfizierten Zellen zunächst lysiert. Dafür wurde das Zellkulturnährmedium manuell abgenommen. Anschließend wurden durch den Pipettierroboter je 100 µl passiver Lysepuffer 1× (*passive lysis buffer*, PLB) in alle

## Material und Methoden

Wells der transfizierten Zellkulturplatte pipettiert. Die Zellkulturplatte wurde 15 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zelllysate vom Pipettierroboter durchgemischt und je 10 µl Lysat in jedes Well der Assayplatte pipettiert.

Nun erfolgte die Messung des Dual-Luciferase-Assay mittels des Luminometers, dem GloMax® Navigator Microplate Luminometer von Promega, und des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems von Promega nach Herstellerangaben. Im Rahmen des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems wurden zwei Reagenzien verwendet: „Luciferase Assay Reagent II“ (LAR II) und „Stop & Glo® Reagent“. Das LARII wird lyophilisiert geliefert und wurde zur Anwendung in 10 ml „Luciferase Assay Buffer II“ resuspendiert. Das Stop & Glo® Reagent wird als 50x Substrat geliefert und in Vorbereitung auf den Dual-Luciferase-Assay in 10 ml „Stop & Glo® Buffer“ gelöst. Das Luminometer wurde für den Dual-Luciferase-Assay vorbereitet: Der Injektor 1 wurde mit LAR II und der Injektor 2 mit Stop & Glo® Reagent geprimt. Anschließend wurde der Dual-Luciferase-Assay durchgeführt und die durch die Firefly- und Renilla-Luciferase emittierte Biolumineszenz gemessen. Dabei wurde durch das Luminometer mittels Autoinjektoren zunächst die Firefly-Luciferase-Aktivität gemessen, indem LAR II zu den Zelllysaten gegeben wurde. Mittels des im Anschluss hinzugegebenen Stop & Glo® Reagent wurde die Firefly-Luciferase-Reaktion gestoppt und die Renilla-Luciferase-Aktivität initiiert und gemessen.

### 3.3.6 Mutagenese-Assay

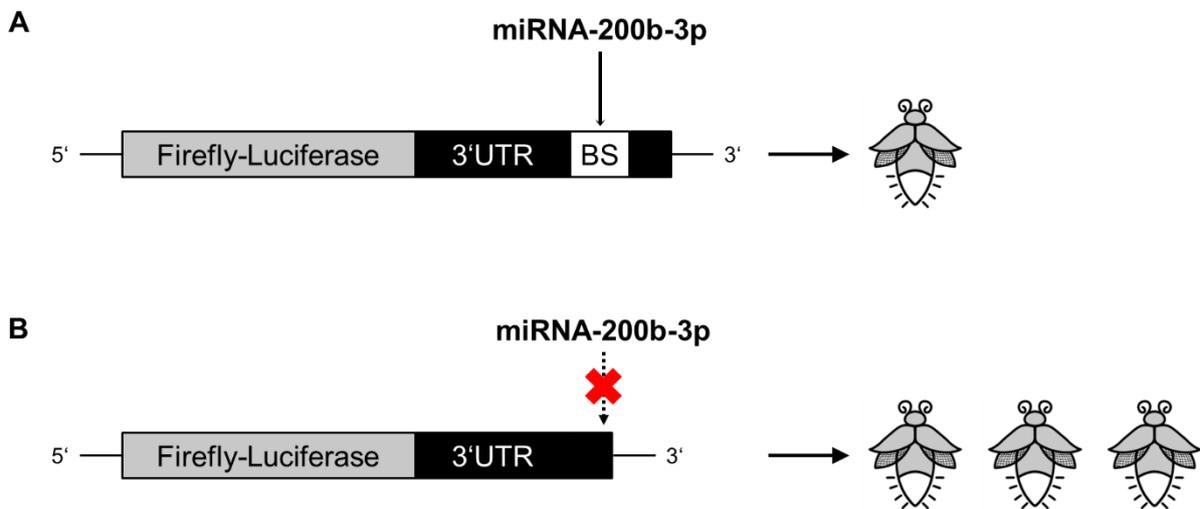
Der Mutagenese-Assay ist ebenfalls ein Dual-Luciferase-Assay und dient der Verifizierung der spezifischen Bindestellen einzelner Zielgene. Die zehn im Dual-Luciferase-Assay am stärksten reprimierten Reporterkonstrukte wurden für den Mutagenese-Assay ausgewählt (Tabelle 7). Sie werden als Wildtyp-Reporterkonstrukte (wt) bezeichnet. Es wurden für diese Zielgene Mutagenese-Reporterplasmide (mut) designt: Die potentielle Bindestelle der miR-200b-3p wurde aus der Sequenz der Reporterplasmide deletiert. Erfolgt der regulierende Einfluss der miR-200b-3p über diese Bindestelle, ist die Regulation durch die Deletion aufgehoben und die Firefly-Luciferase-Synthese wird nicht gehemmt. Die Firefly-Luciferase-Aktivität ist bei dem mut-Reporterkonstrukt dann im Vergleich zum wt-Reporterkonstrukt höher (Abbildung 6).

Der Mutagenese-Assay erfolgte in vier Experimenten im doppelten Ansatz auf die unter 3.3.5 beschriebene Weise als Dual-Luciferase-Assay. Die Transfektion der HEK-293-T-Zellen erfolgt im Gegensatz zu dem unter 3.3.5 beschriebenen Dual-Luciferase-Assay mit pSG5 oder pSG5-miR-200b und den wt-Reporterkonstrukten, die bereits in den vorherigen Dual-Luciferase-Assays verwendet wurden, oder den mut-Reporterkonstrukten. Der folgende Arbeitsablauf ist identisch.

## Material und Methoden

Tabelle 7: Die für den Mutagenese-Assay ausgewählten Reporterkonstrukte

Ausgewählte Reporterplasmide	
pMIR-PPM1F	pMIR-ST3GAL2
pMIR-JCAD	pMIR-CEP85L_2
pMIR-ZCCHC24	pMIR-LHFPL6
pMIR-CEP85L_1	pMIR-LRP1
pMIR-CDK17	pMIR-AP1S2_1



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Mutagenese-Dual-Luciferase-Assays**

**A:** Die Firefly-Luciferase-mRNA des wt-Reporterplasmid weist in ihrer 3'UTR eine Bindestelle für die miR-200b-3p auf. Die miR-200b-3p bindet an die 3'UTR und hemmt die Translation der Firefly-Luciferase-mRNA. Somit wird weniger Firefly-Luciferase synthetisiert, sodass im Dual-Luciferase-Assay eine geringe Firefly-Luciferase-Aktivität gemessen wird. **B:** Die Bindestelle für die miR-200b-3p in der 3'UTR der Firefly-Luciferase-mRNA des mut-Reporterplasmid wurde deletiert. Die miR-200b-3p bindet nicht an die 3'UTR und reguliert so die Translation der Firefly-Luciferase-mRNA nicht. Somit wird viel Firefly-Luciferase synthetisiert, sodass im Dual-Luciferase-Assay eine hohe Firefly-Luciferase-Aktivität gemessen wird. (*Eigene Abbildung*)

### 3.4 Experimente zur Bestätigung des Einflusses der miR-200b-3p auf die Proteinexpression der Zielgene

#### 3.4.1 Transfektion von A549-Zellen mit pSG5-miR-200b

Um die A549-Zellen im Folgenden transfizieren zu können, erfolgte zunächst ihre Aussaat auf zwei 6-Well-Platten. Dafür wurden die Zellen nach der siebten Passage, was einem dreiwöchigen Kultivierungszeitraum entspricht, erst mit 1 ml Trypsin/EDTA gewaschen, mit 1 ml Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend in 9 ml Zellkulturnährmedium (DMEM) gelöst. Die Zelllösung wurde in ein Falcon überführt. Die Konzentration der Zelllösung wurde mittels des LUNA-FLTM Dual Fluorescence Cell Counter

## Material und Methoden

Zellzählgerätes bestimmt und danach wurden je  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert und am folgenden Tag nach Schema entweder mit pSG5 oder mit pSG5-miR-200b transfiziert. Dafür wurden je 2 µg pSG5 bzw. pSG5-miR-200b mit 100 µl Zellkulturnährmedium (DMEM) und 20 µl Transfektionsreagenz (PolyFect) versetzt, gevortext und zentrifugiert. Nach einer siebenminütigen Inkubation bei Raumtemperatur, während der sich Transfektionskomplexe bilden, wurden die Ansätze auf die Zellen aufgetropft. Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5% CO<sub>2</sub> für 48 Stunden inkubiert.

### 3.4.2 RNA-Extraktion aus A549-Zellen

Um die Transfektionseffizienz des pSG5-miR-200b und die damit einhergehende miR-200b-3p-Überexpression in den betreffenden Zellen zu kontrollieren, wird eine qRT-PCR durchgeführt. Ausgangsmaterial für die qRT-PCR ist das Transkriptom der Zellen. Zur RNA-Extraktion aus den A549-Zellen wurde zunächst das Zellkulturnährmedium abgenommen und anschließend wurden 700 µl QIAzol Lysis Reagent in jedes Well gegeben. Das Reagenz dient der Lyse der Zellen und inhibiert RNasen, sodass das Transkriptom erhalten bleibt. Nach Überführung in Reaktionsgefäße erfolgte die Lagerung bei -70 °C.

### 3.4.3 RNA-Isolation aus A549-Zellen

Da in dem mittels QIAzol Lysis Reagent lysierten Material neben RNA auch DNA und Proteine enthalten waren, wurde eine RNA-Isolation durchgeführt. Die RNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben im QIAcube mittels des „miRNeasy Mini Kit“ von Qiagen, das die Isolation des Transkriptoms der Zellen einschließlich miRNAs erlaubt.

Zunächst wurden nach fünfminütiger Inkubation des Ausgangsmaterials bei Raumtemperatur 140 µl Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden zehn Sekunden lang gevortext und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden die Proben bei 12.000g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Es entstehen drei Phasen: Die obere, wässrige Phase enthält die RNA, während sich die DNA und Proteine in der mittleren Interphase und der Zelldebris sich in der unteren, organischen Phase befinden. Die obere Phase wurde abgenommen und 2 ml wurden in ein Reaktionsgefäß mit Safe-Lock-Deckel überführt. In die Positionen 3 – 6 des QIAcubes wurden 100 % Ethanol, RWT-Puffer, RPE-Puffer und RNase-freies Wasser platziert. Eine „RNeasy® Mini spin column“ und ein 1,5 ml-Sammelgefäß wurden in den Positionen 1 und 3 des Rotor-Adapters positioniert.

Der QIAcube führte den Rest der RNA-Isolation automatisch aus. Das 100 % Ethanol wurde als erstes hinzugegeben und dient dazu, die Bindungsbedingungen der RNA an die Membran der RNeasy® Mini spin column zu optimieren. Anschließend wurde die Probe in die RNeasy®

## Material und Methoden

Mini spin column überführt, wo die RNA an die Membran band und so aus der flüssigen Probe isoliert wurde. Die beiden Puffer, der RWT-Puffer und der RPE-Puffer, dienen dem Waschen der RNA. Mit RNase-freiem Wasser wurde die RNA von der Membran eluiert und die RNA-Lösung wurde in dem 1,5 ml-Sammelgefäß gesammelt.

### 3.4.4 Reverse Transkriptase-Reaktion der A549-RNA

Die Reverse Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) dient dem Umschreiben von RNA in DNA. Das im Rahmen der RT-Reaktion verwendete Enzym, die Reverse Transkriptase, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase [117]. Die RT-Reaktion dient der Synthese von complementary DNA (cDNA) aus der isolierten mRNA. Das „Quantitect Reverse Transcription Kit“ von Qiagen wurde gemäß der Herstellerangaben verwendet. Vor Durchführung der RT-Reaktion erfolgte die Messung der RNA-Konzentration in den Proben mittels eines Spektralphotometers. Um die RNA vor Degradierung zu schützen, erfolgte die Lagerung der RNA-Proben auf Eis. Die RT-Reaktion beginnt mit der Elimination genomischer DNA, da die RT-Reaktion von kleinsten Mengen DNA, die sich trotz der RNA-Isolation in den Proben befinden könnten, beeinträchtigt werden könnte. Dafür wurden 2 µl gDNA Wipeout Buffer, 7× und 100 ng RNA eingesetzt, anschließend wurde der Ansatz mit RNase-freiem Wasser auf 14 µl aufgefüllt. Die Proben wurden bei 42 °C für zwei Minuten im RT-Reaktions-Gerät inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die eigentliche RT-Reaktion. Zu jeder Probe wurden 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µl Quantiscript RT Buffer, 5 × und 1 µl RT-Primer Mix hinzugegeben. In dem RT-Gerät wurden die Proben für 15 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für drei Minuten bei 95 °C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

### 3.4.5 qRT-PCR der A549-RNA

Die qRT-PCR ist ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Genexpression. Um die Transfektionseffizienz des pSG5-miR-200b und die damit einhergehende miR-200b-3p-Überexpression in den A549-Zellen zu kontrollieren, wurde eine qRT-PCR mittels des für die hsa-miR-200b-3p spezifischen miRCURY LNA miRNA PCR Assays und des QuantiTect SYBR Green PCR-Kits von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Der miRCURY LNA miRNA PCR Assay enthält miRNA-spezifische forward- und reverse-Primer. Mittels dieser wird während der PCR gezielt das cDNA-Template der miR-200b-3p vervielfältigt und es wird doppelsträngige DNA synthetisiert. Quantifiziert wird diese Amplifikation nach jedem PCR-Zyklus mittels SYBR Green, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngiger DNA interkaliert [100]. Bei der Bindung des SYBR Greens an die doppelsträngige DNA wird ein

## Material und Methoden

Fluoreszenzsignal emittiert, das gemessen wird. Als endogene Kontrolle wurde das Kontrollprimerset *SNORD48* (hsa) verwendet; *SNORD48* ist eine nicht-kodierende RNA. Entsprechend der Herstellerangaben wurden zunächst 10 µl der cDNA mit 590 µl RNase freiem Wasser 1:60 verdünnt. Anschließend wurde der Reaktionsmix angesetzt (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Ansatz des Reaktionsmix der qRT-PCR**

Reagenzien	Volumen (pro Ansatz)
2x miRCURY SYBR® Green Master Mix	5 µl
miRCURY LNA miRNA Primer Assay	1 µl
cDNA-Template	3 µl
RNase freies Wasser	1 µl
<b>Gesamtes Reaktionsvolumen</b>	<b>10 µl</b>

Bei den im zweifachen Ansatz gemessenen Negativkontrollen wurde die cDNA im Reaktionsmix durch dieselbe Menge RNase-freies Wasser substituiert. Zur Messung der endogenen Kontrolle wurde ein zwölffacher Reaktionsmix mit dem *SNORD48*-Primermix angesetzt. Für die Quantifizierung der miR-200b-3p-Expression wurde ein zwölffacher Reaktionsmix mit dem miR-200b-3p-spezifischen miRCURY LNA miRNA Primer Assay angesetzt. Die Ansätze wurden in die Wells einer 96-Well-Reaktionsmikrotiterplatte pipettiert, die 96-Well-Reaktionsmikrotiterplatte wurde mittels einer Haftfolie verschlossen, gevortext und anschließend bei 2000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Die Ansätze wurden in einem Thermocycler, dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System von Thermo Fisher, nach einem speziellen Temperaturprofil inkubiert (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Temperaturprofil der qRT-PCR im Real-Time-PCR-Thermocycler**

Ablauf	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Hitzeaktivierung	120 s	95 °C	1
PCR-Zyklus			40
Denaturierung	10 s	95 °C	
Annealing und Verlängerung	60 s	56 °C	
Schmelzkurvenanalyse	variabel	60-95 °C	

Während der qRT-PCR erfolgte die Amplifikation der in den Proben enthaltenen cDNA. Nach jedem PCR-Zyklus wurde das Fluoreszenzsignal, das durch das Interkalieren des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green in doppelsträngiger DNA emittiert wird, gemessen. Die Fluoreszenzsignale ermöglichen die Quantifizierung der PCR-Produkte und wurden nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode analysiert, die eine Quantifizierung der relativen Veränderung der

## Material und Methoden

Genexpression erlaubt [79]. Die Effizienz (E) der qRT-PCR von 100 % (=1), was eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem PCR-Zyklus bedeutet, wird für die Verwendung dieser Methode vorausgesetzt [79]. Um die x-fache Veränderung der miR-200b-3p-Expression im Vergleich zwischen pSG5-miR-200b- und pSG5-transfizierten A549-Zellen zu errechnen, wurde die Differenz ( $\Delta\Delta CT$ ) zwischen der Differenz des CT-Wertes der miR-200b-3p ( $CT_{xq}$ ) und des CT-Wertes des Referenzgens, des SNORD48, ( $CT_{rq}$ ) in pSG5-miR-200b-3p-transfizierten Zellen und der Differenz des CT-Wertes der miR-200b-3p ( $CT_{xcb}$ ) und des CT-Wertes des SNORD48 ( $CT_{rcb}$ ) in pSG5-transfizierten Zellen errechnet [79]. Die Expressionsveränderung der miR-200b-3p in pSG5-miR-200b-3p-transfizierten A549-Zellen wird somit relativ zur Expression der miR-200b-3p in pSG5-transfizierten A549-Zellen angegeben und es erfolgt eine Normalisierung der Ergebnisse durch das endogene Referenzgen *SNORD48*.

### $\Delta\Delta CT$ -Methode (modifiziert nach Livak & Schmittgen, 2001):

$$x\text{-fache Veränderung} = (1 + E)^{-((CT_{xq} - CT_{rq}) - (CT_{xcb} - CT_{rcb}))} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Im Rahmen der Schmelzkurvenanalyse, die im Anschluss an die 40 PCR-Zyklen erfolgte, wurden die Proben von einer Ausgangstemperatur von 60 °C kontinuierlich um 0,3 °C pro 15 s auf 95 °C erhitzt. Nach jeder Temperaturerhöhung wurde das Fluoreszenzsignal erfasst und die Schmelztemperatur der in der Probe enthaltenen DNA bestimmt. Die Auswertung der Schmelztemperatur ermöglichte die Detektion möglicherweise in der Probe enthaltener unspezifischer Nebenprodukte. Dies diente dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, da SYBR Green nicht sequenzspezifisch in doppelsträngiger DNA interkaliert.

### 3.4.6 Proteinextraktion aus A549-Zellen

Um die Proteine aus den Zellen zu gewinnen, wurden die Zellen zunächst geerntet. Das Zellkulturnährmedium wurde abgenommen, 1 ml Puffer (PBS) hinzugegeben und die adhärennten Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflasche mittels Zellschabern abgelöst. Die folgenden Schritte erfolgten unter kontinuierlicher Kühlung der Probe mittels Eis, um die Denaturierung der Proteine zu verhindern. Die Zelllösung wurde in Reaktionsgefäße umpipettiert, für zehn Minuten bei 1.100 rpm zentrifugiert, die Überstände wurden abgenommen und verworfen und es wurde erneut mit 1 ml PBS gewaschen. Es wurden 50 µl 2x Sample Buffer hinzugegeben. Das im Sample Buffer enthaltene SDS bildet als anionisches Detergenz mit Proteinen negative Komplexe, sodass die Eigenladung der Proteine in der folgenden Gelelektrophorese vernachlässigt werden kann [110]. Das ebenfalls im Sample Buffer enthaltene 3-Mercapto-1,2-propanediol löst die Disulfidbrücken der Proteine auf und destabilisiert auf diese Weise die Tertiärstruktur der Proteine [121]. Anschließend wurden die Zellen mittels dreimaligem für drei Sekunden andauernden Ultraschall zerstört und die Ansätze

## Material und Methoden

wurden für zehn Minuten bei 99 °C im Wasserbad inkubiert und für weitere zehn Minuten bei 4 °C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Die negativen Ladungen des SDS, die sich gegenseitig abstoßen, sowie das Erhitzen der Proteine führen zu deren Denaturierung. Die Zelltrümmer, die sich am Boden abgesetzt hatten, wurden verworfen. Der flüssige Überstand, der das Proteom der Zellen enthält, wurde abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 3.4.7 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach Herstellerangaben durch das BioPhotometer von Eppendorf. Zunächst maß das Gerät die Absorption von 400 µl einmolarer Natriumhydroxid-Lösung als Leerwert. Anschließend wurden 4 µl der Proteinlösung mit 396 µl einmolarer Natriumhydroxid-Lösung verdünnt, gevortext und in eine Küvette überführt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 280 nm. Die Messwerte (A<sub>280</sub>) lassen sich mit der folgenden Formel in die Proteinkonzentration umrechnen:

$$\frac{3,2}{A_{280}} = x \mu\text{l [pro 15 } \mu\text{g Protein]}$$

Anhand der Messung der Proteinkonzentration ist es beim anschließenden Western Blot möglich die gleiche Menge Protein einzusetzen.

### 3.4.8 Western Blot

Um den tatsächlichen Einfluss der miR-200b-3p auf die Proteinexpression ihrer Zielgene nachzuweisen, wurden zwei Zielgene ausgewählt: PPM1F und LRP1. Beim Western Blot wird das aus den A549-Zellen extrahierte Proteingemisch durch eine Natrium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Proteingröße in Proteinbanden aufgetrennt [64, 96]. Beim Blotting werden die Proteinbanden von der Trägermatrix der Gelelektrophorese auf eine Trägermembran übertragen [96]. Mittels spezifischer Antikörper werden die gesuchten Proteine detektiert und quantifiziert [96].

Die SDS-PAGE wurde nach Herstellerangaben mit dem Mini-PROTEAN® Tetra Cell-System von Bio-Rad durchgeführt. Zunächst wurden die Gele vorbereitet und in dem Rahmen des „casting stand“ angebracht. Sowohl der *casting stand* als auch der Behälter wurden mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Das anionische SDS führt zu einer Denaturierung der Proteine und lagert sich an die Proteine an, sodass sie gleichmäßiger negativ geladen sind [110]. Bei der folgenden Gelelektrophorese erfolgt die Trennung der Proteine deshalb hauptsächlich nach Molekulargewicht und nicht nach der Ladung der Proteine [64, 104].

Der *casting stand* wurde in den Behälter eingesetzt und die Proteinlösungen der mit pSG5- und der mit pSG5-miR-200b transfizierten Zellen und der als Größenstandard dienende

## Material und Methoden

Precision Plus Protein Dual Color Standards Marker der Firma Bio-Rad wurden nach einem Schema in die Taschen des Gradienten-Polyacrylamidgels 4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels der Firma Bio-Rad pipettiert. Es wurden je 15 µg Protein und 4 µl Marker eingesetzt. Zunächst wurden die Proteine zehn Minuten mit 24 mA bei maximaler Volt- und Wattzahl in das Gel einlaufen gelassen, sodass die Proben nicht mehr nur auf den Taschen auflagen. Anschließend wurde die Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese für 40 min bei 50 mA bei maximaler Volt- und Wattzahl durchgeführt.

Nun erfolgte das Blotting der Proteine vom Elektrophoresegel auf die Trägermembran, die Nitrocellulose-Transferrmembran. Verwendet wurde das „Hoefer TE24 Electrophoresis Transphor Unit +2 Cassettes“-System. Das System wurde mit Transferpuffer befüllt und das Gel und die Trägermembran wurden aufeinandergelegt und geschützt von zwei Lagen Blottingpapier und einer Lage Schwammtuch auf jeder Seite in die Kassette eingesetzt und entsprechend der Transferrichtung, die von der Kathode ausgehend in Richtung der Anode erfolgt, in dem System angebracht. Bei 400 mA, 38 V und 15 W erfolgte für 150 min das Blotting. Dann wurden die Proteine mit Ponceau S eingefärbt, um zu überprüfen, ob in jeder Reihe Proteinbanden vorhanden waren. Das Ponceau S wurde mit Wasser abgespült und die Membran wurde auf der Höhe zwischen der 50 kDa- und der 75 kDa-Bande in zwei Teile geschnitten. Auf diese Art und Weise konnten die beiden untersuchten Proteine parallel mittels Antikörpern detektiert werden. Das LRP1 hat ein Gewicht von etwa 85 kD und war somit oberhalb der 75 kDa-Bande zu erwarten, während das PPM1F ein Gewicht von etwa 50 kDa aufweist und genauso wie das etwa 37 kDa schwere Haushaltsgen GAPDH unterhalb der 75 kDa-Bande erwartet wurde. Anschließend wurden die unspezifischen Bindestellen abhängig vom später eingesetzten primären Antikörper entweder mit einer 5 % BSA-TBST-Lösung oder mit einer 5 % Milchpulver-TBST-Lösung geblockt. Der LRP1-Membranabschnitt wurde mit BSA-TBST-Lösung und der PPM1F-GAPDH-Membranabschnitt wurde mit Milchpulver-TBST-Lösung für 30 min auf dem Schüttler geblockt. Anschließend wurden die Membranen in Falcons überführt, die 10 ml BSA-TBST-Lösung und 10 µl Anti-LRP1 bzw. 8 ml Milch-TBST-Lösung und 12 µl Anti-PPM1F enthielten, und über Nacht bei 4 °C auf dem Kipp-Roll-Mischer inkubiert. Die primären Antikörper banden währenddessen an die spezifischen Epitope der nachzuweisenden Proteine.

Danach erfolgte drei Mal eine zehnminütige Waschung der Membranen mit TBST, um die ungebundenen primären Antikörper zu entfernen. Nun wurden die Membranabschnitte in ein Falcon überführt, das 10 ml Milch-TBST-Lösung und 2,5 µl des tierspezifischen sekundären Antikörper enthielt, der an die primären Antikörper bindet. Der LRP1-Antikörper stammt aus Hasen, weswegen für die LRP1-Membran Anti-rabbit-IgG eingesetzt wurden, während für die aus Mäusen stammenden PPM1F-Antikörper Anti-mouse-IgG verwendet wurden. Die Membranen wurden für eine Stunde bei 4 °C auf dem Kipp-Roll-Mischer inkubiert und

## Material und Methoden

anschließend drei Mal für zehn Minuten mit TBS gewaschen, um die ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen.

Die Analyse erfolgt mittels des „ChemiDoc Touch Imaging System“ von Bio-Rad nach Herstellerangaben. Die Entwicklung erfolgte mit Signalfire™ Elite ECL Reagent. Es entstand an den Stellen der Membran eine Chemilumineszenz, an denen sekundäre Antikörper gebunden waren. Die sekundären Antikörper weisen eine Peroxidaseaktivität auf, die das in dem Reagenz enthaltene Substrat unter der Entstehung von Chemilumineszenz umsetzt [15]. Um die verschiedenen Proben später mit einander vergleichen zu können, erfolgte die Messung der Proteinexpression des GAPDH, als sogenanntes Haushaltsgen. Die Membran, auf der bereits das PPM1F gemessen wurde, wurde für zehn Minuten mit TBST gewaschen und in ein Falcon, das 10 ml Milchpulver-TBST-Lösung und 12,5 µl Anti-GAPDH enthielt, überführt. Über Nacht erfolgte die Inkubation auf dem Kipp-Roll-Mischer bei 4 °C. Währenddessen banden die primären GAPDH-Antikörper an die spezifischen Epitope des GAPDH. Danach wurde die Membran drei Mal für zehn Minuten mit TBST gewaschen, um die ungebundenen primären Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran in ein Falcon überführt, das 10 ml Milch und 2,5 µl sekundären Antikörper, Anti-rabbit-IgG, enthielt. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C auf dem Kipp-Roll-Mischer wurde die Membran drei Mal für zehn Minuten mit TBS gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit Signalfire™ ECL Reagent. Die Auswertung erfolgte mittels „Image Lab 6.0.1“ von Bio-Rad.

### 4 Ergebnisse

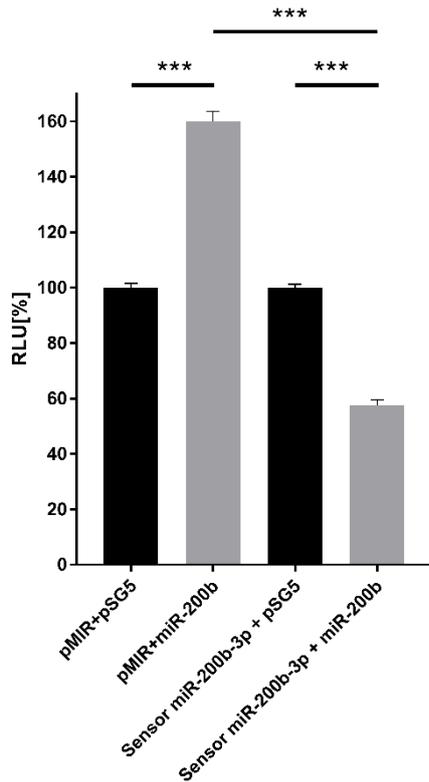
#### 4.1 HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay

Im HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay wurde in vier Experimenten in Duplikaten die Firefly- und die Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen. Die Renilla-Luciferase-Aktivität ist von der miR-200b-3p unabhängig und diente zur Überprüfung der Transfektionseffizienz. Die gemessene Renilla-Luciferase-Aktivität ermöglicht die Normierung der gemessenen Firefly-Luciferase-Aktivität. Die Regulation der Firefly-Luciferase-Expression ist von der Kompatibilität der miR-200b-3p und dem untersuchten Zielgen abhängig.

Zur weiteren Normierung der Ergebnisse wurde der Einfluss der miR-200b-3p auf den pMIR-Leervektor untersucht, dieser lässt sich hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) als Induktion auf 159,9 % quantifizieren (Abbildung 7). Da dieser induktive Effekt der miR-200b-3p auf den pMIR-Leervektor, der durch sekundäre Effekte bedingt sein kann, die Ergebnisse verfälscht, wurden alle mit den wildtypischen Reporterplasmiden gemessenen Werte auf die Werte der Kotransfektion der miR-200b-3p mit dem leeren pMIR-Reporterplasmid normiert.

Als Positivkontrolle diente der Vergleich zwischen dem Einfluss des pSG5-Leervektors oder des pSG5-miR-200b auf das miR-200b-3p-Sensor-Reporterplasmid (Sensor miR-200b-3p); es erfolgt eine Reduktion der *Relative Light Unit* (RLU) auf 57,4 % (Abbildung 7). Als miR-200b-3p-Sensor-Reporterplasmid diente ein SEC23A-pMIR-Vektor, dessen Sequenz in einer vorangegangenen Studie bereits als direkte Zielsequenz der miR-200b-3p identifiziert und verifiziert wurde [43].

## Ergebnisse



### Abbildung 7: Kontrollen des HiTmIR-Dual-Luciferase-Assays

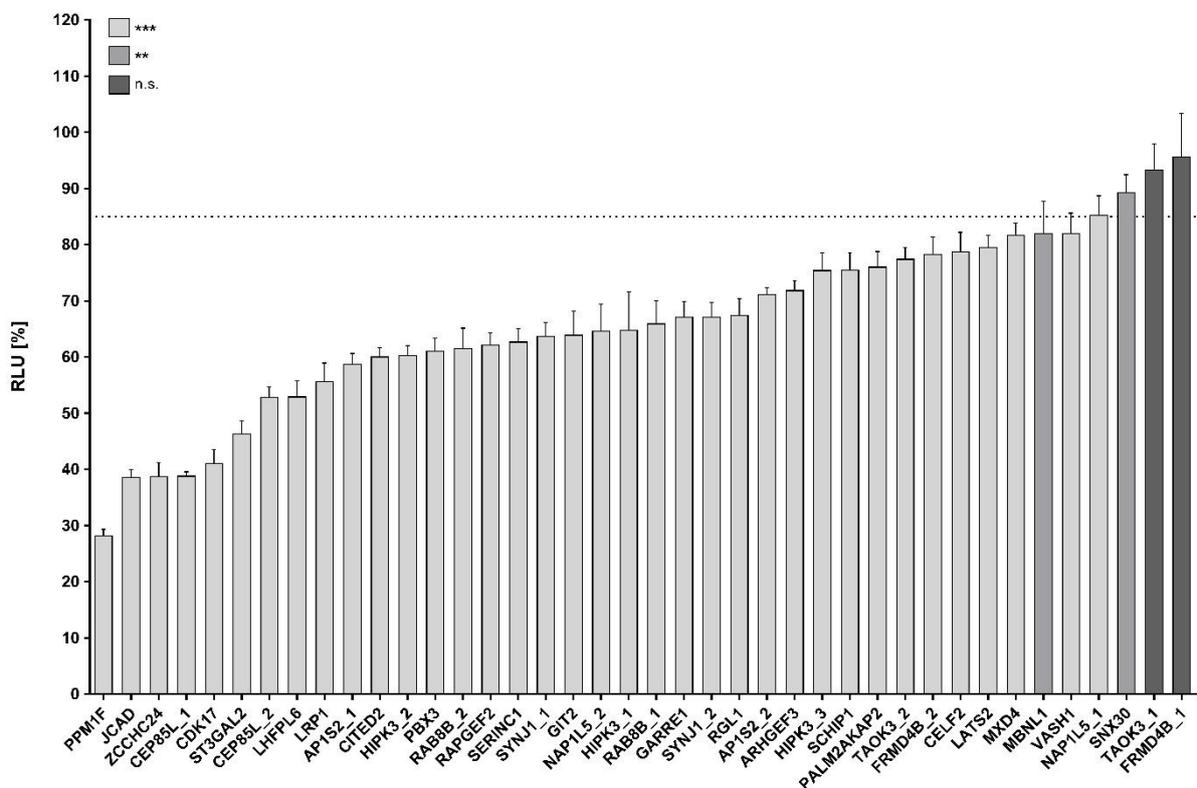
Auf der y-Achse ist die *Relative Light Unit* (RLU) als Maßeinheit der gemessenen Biolumineszenzen in Prozent aufgetragen. Von links nach rechts sind auf der x-Achse aufgetragen: der pMIR-Leervektor und der pSG5-Leervektor, der pMIR-Leervektor und das pSG5-miR-200b, das miR-200b-3p-Sensor-pMIR und der pSG5-Leervektor, das miR-200b-3p-Sensor-pMIR und das pSG5-miR-200b. Der Einfluss der miR-200b-3p auf den pMIR-Leervektor lässt sich hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) als Induktion auf 159,9 % quantifizieren. Als Positivkontrolle dient der Vergleich zwischen dem Einfluss des pSG5-Leervektors oder des pSG5-miR-200b auf das miR-200b-3p-Sensor-pMIR; es erfolgt eine hochsignifikante ( $p \leq 0,001$ ) Reduktion der RLU auf 57,4 %. Drei Sterne (\*\*\*) entsprechen einer hohen Signifikanz ( $p \leq 0,001$ ). Der HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay wurde in vier Experimenten in Duplikaten durchgeführt.

Die Auswertung der RLU gibt Aufschluss auf den regulatorischen Einfluss der miR-200b-3p auf die entsprechenden Zielgene. Eine Repression der RLU bestätigt die Bindung der miR-200b-3p. Je mehr die Reporterstrukture durch die miR-200b-3p reprimiert werden, desto größer ist die Hemmung der Genexpression des Zielgens durch die miR-200b-3p.

Somit können die vorhergesagten Zielgene durch den HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay validiert werden. Als validiert, also als „positive Targets“, werden Zielgene betrachtet, deren Reporterstrukture mit einem p-Wert von maximal 0,05 reprimiert wurden und deren RLU maximal 85 % betrug. In der Testung der 40 Reporterkonstrukten mittels des HiTmIR-Dual-Luciferase-Assays wurden zwei Reporterstrukture nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) reprimiert (TAOK3\_1 und FRMD4B\_1), zwei Reporterstrukture wurden signifikant ( $0,001 < p \leq 0,01$ ) reprimiert (MBNL1 und SNX30) und 36 Reporterstrukture wurden hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) reprimiert (Abbildung 8). In Bezug auf die einzelnen

## Ergebnisse

Reporterkonstrukte waren 36 von 40 Reporterkonstrukten mindestens mit einem p-Wert von 0,05 reprimiert und wiesen eine RLU von maximal 85 % auf und konnten somit als positive Targets identifiziert werden. Dies ergibt eine Validierungseffizienz des HiTmiR-Dual-Luciferase-Assays in Bezug auf die einzelnen Reporterkonstrukte von 90 % (Abbildung 8). In Bezug auf die Validierung der gesamten Zielgene lässt sich ein Zielgen als validiert betrachten, solange mindestens eins seiner Reporterkonstrukte ein positives Target der miR-200b-3p darstellt. Außer einem der vorhergesagten Zielgene (SNX30) weisen alle anderen 30 Zielgene mindestens ein Reporterkonstrukt auf, das ein positives Target ist (Abbildung 8). Dies führt zu einer Validierungseffizienz des HiTmiR-Dual-Luciferase-Assays in Bezug auf die Zielgene von 97 %.



**Abbildung 8: Ergebnisse des HiTmiR-Dual-Luciferase-Assays**

Auf der y-Achse ist die *Relative Light Unit* (RLU) als Maßeinheit der gemessenen Biolumineszenzen in Prozent aufgetragen. Auf der x-Achse sind die 40 Reporterkonstrukte nach Stärke ihrer Repression durch die miR-200b-3p aufgetragen. Entsprechend der Signifikanz der Ergebnisse sind die Balken helligkeitskodiert. Drei Sterne (\*\*\*) entsprechen einer hohen Signifikanz ( $p \leq 0,001$ ). Zwei Sterne (\*\*) entsprechen einem signifikanten Ergebnis ( $0,001 < p \leq 0,01$ ). N.s. steht für nicht-signifikant ( $p > 0,05$ ). Die gestrichelte Linie liegt bei 85 % RLU. Dabei ist ein positiv getestetes Zielgen durch eine signifikante Reduktion der RLU unter 85 % definiert. Abgebildet sind die Mittelwerte der RLU-Werte sowie der Standardfehler. Der HiTmiR-Dual-Luciferase-Assay wurde in vier Experimenten in Duplikaten durchgeführt.

## Ergebnisse

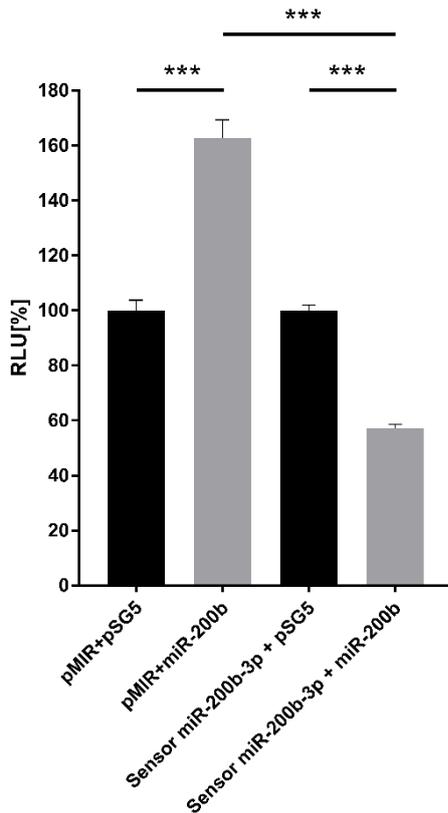
### 4.2 Mutagenese-Assay

Im Mutagenese-Dual-Luciferase-Assay wurde in vier Experimenten in Duplikaten die Firefly- und die Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen. Die Renilla-Luciferase-Aktivität ist von der miR-200b-3p unabhängig und diente zur Überprüfung der Transfektionseffizienz. Die gemessene Renilla-Luciferase-Aktivität ermöglicht die Normierung der gemessenen Firefly-Luciferase-Aktivität. Die Regulation der Firefly-Luciferase-Expression ist von der Kompatibilität der miR-200b-3p und dem untersuchten Zielgen abhängig.

Zur weiteren Normierung der Ergebnisse wurde der Einfluss der miR-200b-3p auf den pMIR-Leervektor untersucht, dieser lässt sich hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) als Induktion auf 162,6 % quantifizieren (Abbildung 9). Da dieser induktive Effekt der miR-200b-3p auf den pMIR-Leervektor, der durch sekundäre Effekte bedingt sein kann, die Ergebnisse verfälscht, wurden alle mit den wildtypischen und mutierten Reporterplasmiden gemessenen Werte auf die Werte der Kotransfektion der miR-200b-3p mit dem leeren pMIR-Reporterplasmid normiert.

Als Positivkontrolle diente der Vergleich zwischen dem Einfluss des pSG5-Leervektors oder des pSG5-miR-200b auf das miR-200b-3p-Sensor-pMIR; es erfolgt eine Reduktion der RLU auf 57,1 % (Abbildung 9).

## Ergebnisse



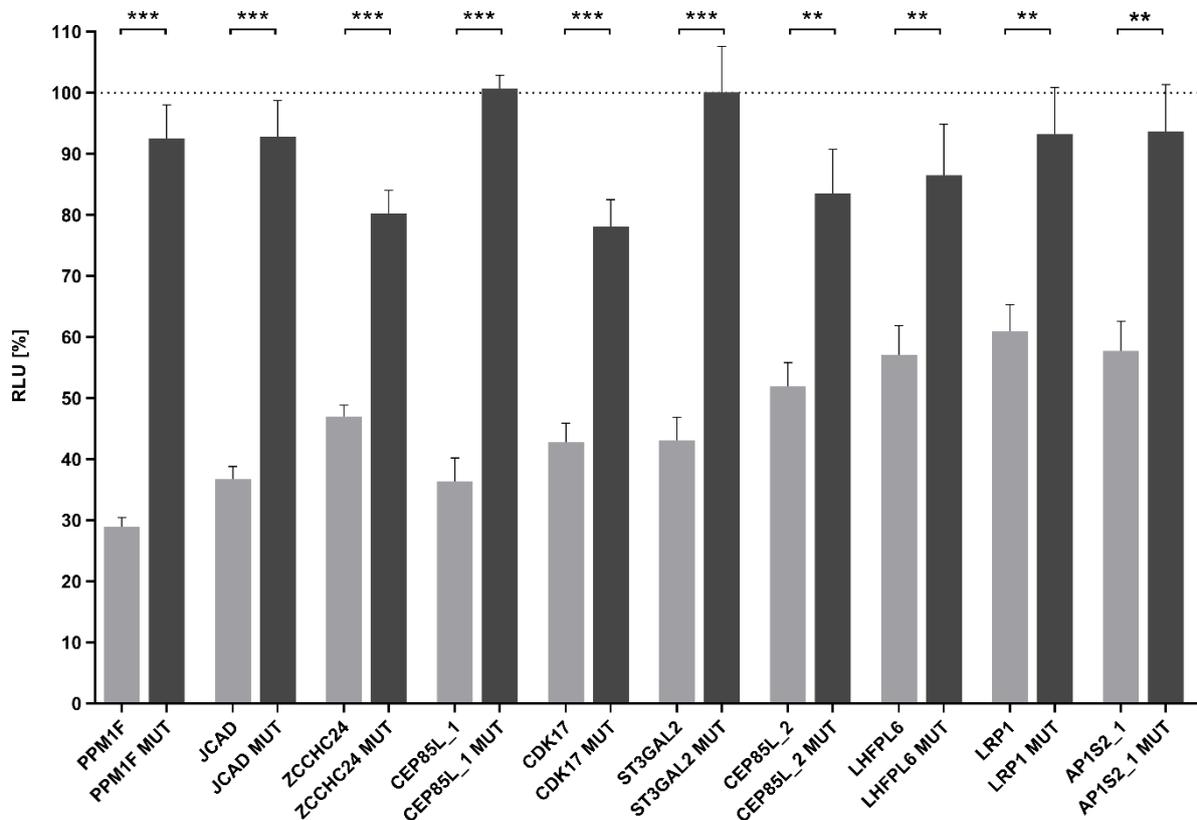
### Abbildung 9: Kontrollen des Mutagenese-Dual-Luciferase-Assays

Auf der y-Achse ist die *Relative Light Unit* (RLU) als Maßeinheit der gemessenen Biolumineszenzen) in Prozent aufgetragen. Von links nach rechts sind auf der x-Achse aufgetragen: der pMIR-Leervektor und der pSG5-Leervektor, der pMIR-Leervektor und das pSG5-miR-200b, das miR-200b-3p-Sensor-pMIR und der pSG5-Leervektor, das miR-200b-3p-Sensor-pMIR und das pSG5-miR-200b. Der Einfluss der miR-200b-3p auf den pMIR-Leervektor lässt sich im Vergleich der ersten zwei Messungen hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) als Induktion auf 162,6 % quantifizieren. Als Positivkontrolle dient der Vergleich zwischen dem Einfluss des pSG5-Leervektors oder des pSG5-miR-200b auf das miR-200b-3p-pMIR; es erfolgt eine hochsignifikante ( $p \leq 0,001$ ) Reduktion der RLU auf 57,1 %. Drei Sterne (\*\*\*) entsprechen einer hohen Signifikanz ( $p \leq 0,001$ ). Der Mutagenese-Assay wurde in vier Experimenten in Duplikaten durchgeführt.

Für den Mutagenese-Dual-Luciferase-Assay wurden die zehn im HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay am stärksten reprimierten Reporterkonstrukte ausgewählt. Die Firefly-Luciferase-Aktivität zwischen dem wt-Reporterkonstrukt, dem im HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay verwendeten Reporterkonstrukt, und dem mut-Reporterkonstrukt, dem durch eine Deletion der miR-200b-3p-Bindestellen mutierten Reporterkonstrukt, wurde verglichen. Dies ermöglicht eine Validierung der einzelnen Bindestellen und schließt aus, dass der hemmende Effekt der miR-200b-3p auf die Genexpression der Firefly-Luciferase auf sekundären Effekten beruht. Die RLUs von vier der zehn untersuchten mut-Reporterkonstrukte sind im Vergleich zu ihrer wt-Kontrolle signifikant ( $0,001 < p \leq 0,01$ ) angestiegen (Abbildung 10). Die RLUs von sechs der zehn untersuchten mut-Reporterkonstrukte sind im Vergleich zu ihrer wt-Kontrolle hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ) angestiegen: PPM1F, JCAD, ZCCHC24, CEP85L\_1, CDK17 und

## Ergebnisse

ST3GAL2 (Abbildung 10). Die RLU aller untersuchten mut-Reporterkonstrukte ist im Vergleich zur wt-Kontrolle mindestens signifikant angestiegen, dies ergibt eine Validierungseffizienz im Mutagenese-Dual-Luciferase-Assay von 100 %.



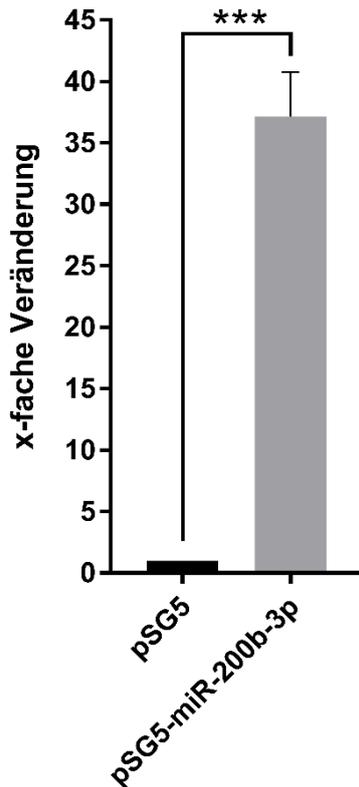
### Abbildung 10: Ergebnisse des Mutagenese-Assays

Auf der y-Achse ist die *Relative Light Unit* (RLU) als Maßeinheit der gemessenen Biolumineszenzen in Prozent aufgetragen. Auf der x-Achse sind die zehn Reporterkonstrukte im Vergleich zwischen wt- und mut-Reporterplasmid nach Stärke ihrer Reprimierung durch die miR-200b-3p im HiTmlR-Dual-Luciferase-Assay aufgetragen. Drei Sterne (\*\*\*) entsprechen einer hohen Signifikanz ( $p \leq 0,001$ ). Zwei Sterne (\*\*) entsprechen einem signifikanten Ergebnis ( $0,001 < p \leq 0,01$ ). Der Mutagenese-Assay wurde in vier Experimenten in Duplikaten durchgeführt.

### 4.3 Kontrolle der Überexpression der miR-200b-3p in transfizierten A549-Zellen

Um den Einfluss veränderter miR-200b-3p-Expression auf die endogenen Proteinlevel von LRP1 und PPM1F in A549-Zellen im Verlauf mithilfe eines Western Blots quantifizieren zu können, wurden A549-Zellen entweder mit einem pSG5-miR-200b-Expressionsplasmid oder einem leeren pSG5-Expressionsplasmid transfiziert. Nach zweitägiger Inkubation wurde das Transkriptom der A549-Zellen isoliert. Die Überexpression der miR-200b-3p in den mit pSG5-miR-200b transfizierten Zellen wurde mittels einer qRT-PCR nachgewiesen (Abbildung 11).

## Ergebnisse



### Abbildung 11: Überexpressionskontrolle

Auf der y-Achse ist die x-fache Veränderung der miR-200b-3p-Expression aufgetragen. Die Abbildung zeigt, dass die miR-200b-3p-Expression in den mit pSG5-miR-200b-3p transfizierten A549-Zellen im Vergleich zu den mit pSG5 transfizierten A549-Zellen hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) 37,1fach erhöht war. Drei Sterne (\*\*\*) entsprechen einer hohen Signifikanz ( $p \leq 0,001$ ). Die Überexpressionskontrolle wurde im dreifachen Ansatz durchgeführt.

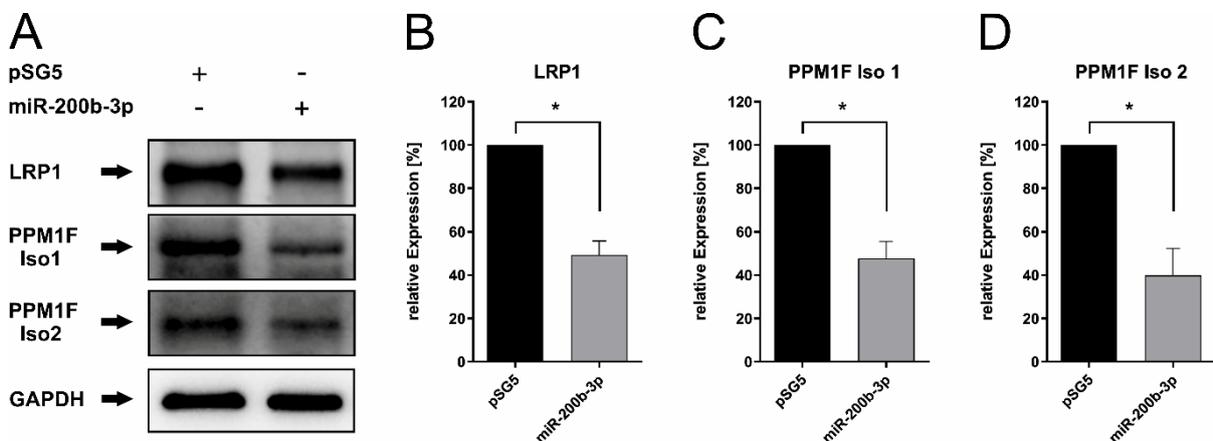
### 4.4 Western Blot

Der Einfluss veränderter miR-200b-3p-Expression auf die endogenen Proteinlevel von LRP1 und PPM1F in A549-Zellen wurde mittels eines Western Blots quantifiziert. Als interne Kontrolle des Western Blots diente das Haushaltsgen GAPDH [108]. Als Haushaltsgen erfolgt die GAPDH-Expression konstitutiv, sodass durch die Quantifizierung des GAPDH-Levels ein Vergleich der eingesetzten Proteinmenge möglich ist. Dies erlaubt eine Normierung der Expressionslevel der untersuchten Proteine.

Mittels spezifischer Antikörper wurde die endogene LRP1- und PPM1F-Proteinexpression im Rahmen des Western Blots quantifiziert und es wurden verminderte LRP1- und PPM1F-Expressionslevel in mit pSG5-miR-200b transfizierten Zellen festgestellt (Abbildung 12 A). Die Quantifizierung der LRP1-Expressionslevel zeigte in drei voneinander unabhängigen Experimenten eine Reduktion der LRP1-Expression in mit pSG5-miR-200b transfizierten Zellen im Vergleich mit pSG5 transfizierten Zellen auf durchschnittlich 50,9 % ( $p = 0,0358$  im Welch's T-Test) des Ausgangswertes (Abbildung 12 B). Bei der Auswertung des PPM1F-

## Ergebnisse

Expressionslevels waren zwei Banden vorhanden, die auf zwei verschiedene Isoformen des PPM1Fs zurückzuführen sind, die durch alternatives Spleißen entstehen [2]. Die Expressionslevel der beiden Isoformen wurden separat voneinander quantifiziert. Die Quantifizierung der PPM1F Isoform 1-Expressionslevel zeigte in drei voneinander unabhängigen Experimenten eine Reduktion der PPM1F Isoform 1-Expression in mit pSG5-miR-200b transfizierten Zellen im Vergleich mit pSG5 transfizierten Zellen auf durchschnittlich 50,5 % ( $p = 0,0379$  im Welch's T-Test) des Ausgangswertes (Abbildung 12 C). Die Quantifizierung der PPM1F Isoform 2-Expressionslevel zeigte in drei voneinander unabhängigen Ansätzen eine Reduktion der PPM1F Isoform 2-Expression in mit pSG5-miR-200b transfizierten Zellen im Vergleich mit pSG5 transfizierten Zellen auf durchschnittlich 44,1 % ( $p = 0,038$  im Welch's T-Test) des Ausgangswertes (Abbildung 12 D).



**Abbildung 12: Einfluss veränderter miR-200b-3p-Expression auf die endogenen Proteinlevel von LRP1, PPM1F Isoform 1 und PPM1F Isoform 2 in A549-Zellen.**

**A:** Western Blot-Analyse der LRP1-, PPM1F Isoform 1- und PPM1F Isoform 2-Expressionslevel in mit miR-200b-3p transfizierten A549-Zellen mit GAPDH als Ladekontrolle. **B:** Quantifizierung der LRP1-Level in mit miR-200b-3p transfizierten A549-Zellen. **C:** Quantifizierung der PPM1F Isoform 1-Level in mit miR-200b-3p transfizierten A549-Zellen. **D:** Quantifizierung der PPM1F Isoform 2-Level in mit miR-200b-3p transfizierten A549-Zellen. Ein Stern (\*) entspricht einem Ergebnis mit einem p-Wert von maximal 0,05. Der Western Blot wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

### 5 Diskussion

Lungenkrebs ist weltweit eine bedeutende Erkrankung und entsteht durch die Transformation physiologischer menschlicher Zellen in Krebszellen. Das Konzept der „Hallmarks of Cancer“ ermöglicht eine Strukturierung dieser Transformation [41]. Diese Hallmarks stellen Eigenschaften dar, die durch Veränderungen des Genoms der Krebszelle in einem mehrschrittigen Prozess erworben werden und das maligne Wachstum des Krebses fördern [41]. Im Jahr 2000 wurden von Hanahan und Weinberg sechs Hallmarks of Cancer definiert: Die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Aktivierung der Zellinvasion mit Überschreiten von Gewebegrenzen und Metastasierung, ein unbegrenztes Teilungsvermögen, die Induktion und Aufrechterhaltung der Angiogenese und eine Apoptoseresistenz [41]. 2011 ergänzten sie die Hallmarks um zwei weitere Fähigkeiten, die Zellen im Laufe der Krebsentwicklung entwickeln: Eine Umprogrammierung des Energiestoffwechsels und das Vermeiden der Zerstörung durch das Immunsystem [42].

Im Tumorgewebe sind viele Signalwege im Vergleich zum Normalgewebe verändert. Eine Regulation der Signalwege erfolgt u.a. durch miRNAs. Im Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe von Kurzzeitüberlebenden war die miR-200b-3p exklusiv für diesen Entitätenvergleich im korrespondierenden Tumorgewebe hochreguliert. Dies weist auf eine Rolle der miR-200b-3p in NSCLC hin, die die Krebserkrankung zu fördern scheint. Konträr dazu ist die miR-200b-3p in vielen Krebsarten über die Hemmung von ZEB1 und ZEB2 als Inhibitor der epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bekannt [35]. Die EMT beschreibt einen Prozess, bei dem epitheliale Zellen durch den Verlust ihrer Zell-Zell-Kontakte und der Zellpolarität zu mesenchymalen Zellen werden [34]. Die EMT spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und trägt durch das Initiieren der Metastasierung zur Krebsprogression bei [34, 118]. Eine Erklärung dafür, warum die Expression der miR-200b-3p in den durch die Arbeitsgruppe Hart untersuchten Lungentumorgewebeproben dennoch hochreguliert war, könnte im komplexen Aufbau von Tumoren begründet sein. In Bezug auf kolorektale Karzinome beispielsweise konnte bereits herausgefunden werden, dass die Expression der miR-200-Familie, zu der auch die miR-200b-3p gehört, in der invasiven Front der Karzinome herunterreguliert war, was die EMT fördern könnte [90]. In Metastasen hingegen konnten hohe Expressionslevel der miR-200-Familie festgestellt werden, die die mesenchymal-epitheliale Transition, die Umkehr der EMT, und damit eventuell ein Festwachsen der Metastasen ermöglichen könnten [35, 90]. Auch in Adenokarzinomen des Pankreas konnte gezeigt werden, dass die miR-200b-3p-Expression in der invasiven Front des Tumors herunterreguliert war, während die Expression im Haupttumorgewebe hochreguliert war [56]. Im NSCLC könnten analoge Prozesse dazu führen, dass die Expressionslevel der miR-200b-3p in den durch die Arbeitsgruppe Hart untersuchten Gewebeproben erhöht waren.

## Diskussion

Der Einfluss der miR-200-Familie auf einige der Hallmarks of Cancer ist bereits bekannt [128]. Durch die Bestätigung der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene könnten weitere Signalwege identifiziert werden, über die die miR-200b-3p im Tumorgewebe Einfluss auf die Hallmarks of Cancer nehmen und damit die Lungenkrebserkrankung fördern könnte.

### 5.1.1 Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion ausgewählter positiv getesteter Zielgene

Die Rolle einiger der im Rahmen dieser Arbeit als Zielgen der miR-200b-3p bestätigten Gene in Bezug auf das NSCLC und andere Krebsarten war bislang noch nicht Gegenstand von Publikationen, sodass die entsprechenden Zielgene im Folgenden nicht diskutiert werden. Nachfolgend werden diejenigen Zielgene diskutiert, deren Funktion in den für das NSCLC wichtigen Signalwegen oder der Karzinogenese anderer Krebsarten als dem NSCLC bekannt ist.

Der Fokus der Forschung über das *Junctional Cadherin 5 Associated* (JCAD) liegt bislang auf kardiovaskulären Erkrankungen, so scheint es beispielsweise die Entwicklung von arterieller Thrombose zu fördern [72]. Jones et al. konnten zeigen, dass JCAD den Hippo-Signalweg (s. 5.1.5) in Endothelzellen hemmt und mit LATS2 interagiert [54]. Über die Hemmung des Hippo-Signalweges im Tumor könnte JCAD wie PPM1F, ein weiteres Zielgen der miR-200b-3p, Einfluss auf die Krebsprogression nehmen.

Das *Zinc Finger CCHC-Type Containing 24* (ZCCHC24) wurde im Zusammenhang mit Leberkrebs untersucht. Bei Leberkrebs stellt es ein low-risk Gen in Bezug auf die Prognose dar [5]. Möglicherweise könnte bei Lungenkarzinomen der Kurzzeitüberlebenden die schlechtere Prognose im Zusammenhang mit der Inhibition des ZCCHC24 durch die miR-200b-3p stehen.

Die *Cyclin Dependent Kinase 17* (CDK17) wird v.a. im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen erforscht, so ist eine CDK17-Überexpression bei der Alzheimererkrankung bekannt [16]. In Brustkrebs ist eine CDK17-Überexpression mit späteren Stadien der Erkrankung assoziiert; CDK17 könnte in Brustkrebs eine onkogene Wirkung vermitteln [50]. Die Rolle von CDK17 in NSCLC ist hingegen noch unbekannt; als Zielgen der miR-200b-3p könnte CDK17 in Lungenkrebs eine tumorsuppressive Funktion vermitteln.

Die Funktion der *ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase* (ST3GAL2) in NSCLC ist noch unbekannt. Ihre Rolle in verschiedenen anderen Krebsarten ist Gegenstand der Forschung. In Brustkrebsstammzellen im Vergleich zu Bruststammzellen ist die ST3GAL2-mRNA überexprimiert [71]. In oralen Plattenepithelkarzinomen ist eine Überexpression der ST3GAL2-mRNA mit späteren Stadien der Erkrankungen und Invasivität assoziiert [83]. Ein ST3GAL2-Knockdown in kolorektalen Karzinomen konnte sowohl in einer Zelllinie als auch in Nacktmäusen die Tumorprogression und in vitro auch die -invasivität verringern [19].

## Diskussion

ST3GAL2 scheint in diesen Krebsarten als Onkogen zu fungieren. Die Rolle von ST3GAL2-in NSCLC ist noch unbekannt; als Zielgen der miR-200b-3p könnte ST3GAL2 in Lungenkrebs eine tumorsuppressive Funktion vermitteln.

Das *LHFPL Tetraspan Subfamily Member 6* (LHFPL6) wird im Zusammenhang mit Magenkrebs untersucht und stellt einen ungünstiger Prognosefaktor dar. Eine LHFPL6-Überexpression steht im Zusammenhang mit einer ungünstigeren Prognose und könnte die EMT aktivieren [78, 139]. Die Rolle von LHFPL6 in NSCLC ist hingegen noch unbekannt; als Zielgen der miR-200b-3p könnte LHFPL6 in Lungenkrebs eine tumorsuppressive Funktion vermitteln.

Das *Adaptor Related Protein Complex 1 Subunit Sigma 2* (AP1S2) spielt eine wichtige Rolle im vesikulären Transport und könnte im Zusammenhang mit der EMT stehen [7]. In Lungenadenokarzinomen führt eine Depletion von AP1S2 zu verminderter Krebszellmotilität [7]. Somit könnte AP1S2 in NSCLC die Metastasierung fördern und die Expressionslevel des AP1S2 könnten sich zwischen der invasiven Front und dem Haupttumorgewebe, das eine Hochregulation der miR-200b-3p-Expression aufweist, unterscheiden.

Insgesamt besteht bei den oben beschriebenen Zielgenen der miR-200b-3p Forschungsbedarf, was ihre Funktionen im NSCLC betrifft. Die Herunterregulation ihrer Expression im Tumorgewebe Kurzzeitüberlebender weist auf eine tumorsuppressive Wirkung hin, die experimentell mithilfe funktioneller Assays verifiziert werden müsste.

### 5.1.2 Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion von HIPK3

Die *Homeodomain Interacting Protein Kinase 3* (HIPK3) konnte im Rahmen dieser Arbeit als Zielgen der miR-200b-3p bestätigt werden. HIPK3 ist ein Kofaktor, der mit der Homöodomäne von Transkriptionsfaktoren interagiert und diese supprimiert [61]. HIPK3 nimmt Einfluss auf verschiedene Prozesse, wie z.B. die Transkriptionsregulation und die Apoptose. So interagiert HIPK3 mit dem Fas-Rezeptor, der sich auf der Zelloberfläche befindet und über den die Apoptose induziert werden kann [98].

Das Expressionslevel von HIPK3 wurde in Gewebeproben von 206 NSCLC-Patienten durch Liu et al. ermittelt (Liu, et al., 2018). Bei der Auswertung des Zusammenhangs zwischen dem HIPK3-Expressionsleveln und der Überlebenszeit der Patienten zeigt sich ein schlechteres Gesamtüberleben bei niedrigeren HIPK3-Expressionsleveln [76]. Diese Ergebnisse konnten in der Untersuchung des Transkriptom der Kurzzeitüberlebenden in Lungenkrebs- und Lungennormalgewebeproben durch die Arbeitsgruppe Hart in bislang unveröffentlichten Daten bestätigt werden. In HCC827-, einer Adenokarzinomzelllinie, und A549-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass ein HIPK3-Knockdown die Migration und die Invasion von Lungenkrebs begünstigt [76]. In mit A549-Zellen xenotransplantierten Nacktmäusen konnte dargestellt

## Diskussion

werden, dass eine HIPK3-Überexpression das Tumorwachstum inhibiert [76]. Somit scheint HIPK3 in NSCLC als Tumorsuppressor zu fungieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte HIPK3 als ein direktes Zielgen der miR-200b-3p identifiziert werden. Im Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe der Kurzzeitüberlebenden war die miR-200b-3p-Expression im Tumorgewebe hochreguliert. Dabei könnte die Überexpression der miR-200b-3p über die Reduktion der HIPK3-Menge in den Tumorzellen zur Progression des Bronchialkarzinoms beitragen und die schlechtere Prognose der Kurzzeitüberlebenden mitbedingen.

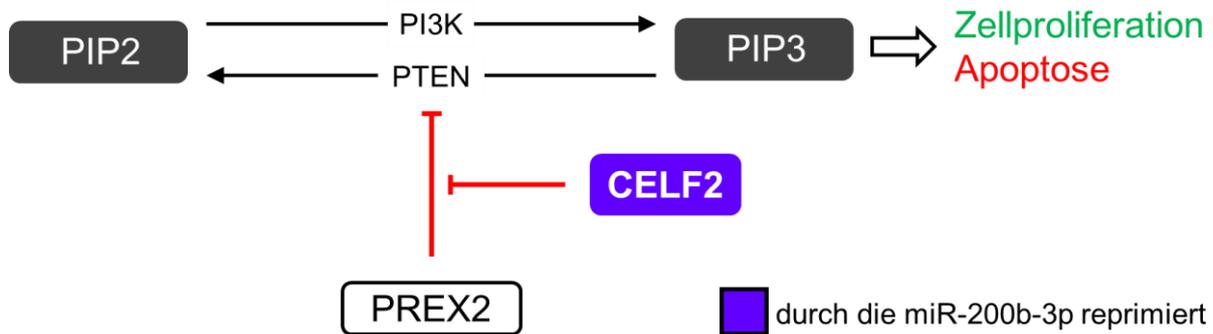
### 5.1.3 Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion von CELF2

Das *CUGBP Elav-Like Family Member 2* (CELF2) konnte im Rahmen dieser Arbeit als Zielgen der miR-200b-3p bestätigt werden. CELF2 ist ein RNA-bindendes Protein, das über eine Bindung an einzel- oder doppelsträngige RNA deren Expression reguliert [13].

Über die Inhibierung der Translation der COX-2-mRNA kann CELF2 Einfluss auf die Angiogenese und die Apoptoseregulation nehmen [80, 87, 105]. Die Expressionslevel von COX-2 sind in verschiedenen Tumoren wie z.B. im Lungenkarzinom erhöht [126]. Die Mechanismen, über die die Karzinogenese durch COX-2 gefördert wird, sind vielfältig. So induziert COX-2 beispielsweise über VEGF die Angiogenese in NSCLC und inhibiert die Apoptose über eine Stimulation der Bcl-2-Expression [80, 105]. Über die Suppression der COX-2-Expression könnte CELF2 eine tumorsuppressive Wirkung aufweisen. Durch die miR-200b-3p-bedingte Herunterregulation der CELF2-Expression könnte der über die Hemmung der COX-2-Expression vermittelte tumorsuppressive Effekt wegfallen.

Auch der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, der u.a. Apoptose und Zellproliferation und -wachstum reguliert und in vielen verschiedenen Krebsarten wie auch dem Lungenkarzinom konstitutiv aktiviert ist, wird durch CELF2 beeinflusst (Abbildung 13) [27, 30]. Ein wichtiger Schritt im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg stellt die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 durch PI3K dar [6]. PTEN hemmt diesen Schritt, indem es PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert [112]. Die Aktivität von PTEN kann durch PREX2 inhibiert werden [25]. Diese Interaktion zwischen PREX2 und PTEN wird durch nicht-kanonische Bindung von CELF2 an PREX2 reduziert, sodass CELF2 zu einer gesteigerten PTEN-Aktivität und damit zu einer Hemmung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges führt [132]. Die Inhibition des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges hemmt die Zellproliferation- und das -wachstum und fördert Apoptose. Damit könnte CELF2 über die Stimulierung des PTEN eine tumorsuppressive Wirkung aufweisen. Als Zielgen der miR-200b-3p könnte die Herunterregulierung der CELF2-Expression über eine wegfallende Hemmung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges die Zellproliferation und Apoptoseresistenz in NSCLC fördern.

## Diskussion



### Abbildung 13: Der Einfluss der miR-200b-3p auf den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Durch Phosphorylierung des PIP2 durch PI3K entsteht PIP3. PIP3 fördert im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg die Zellproliferation und hemmt die Apoptose. PIP3 kann durch PTEN wieder zu PIP2 dephosphoryliert werden. Die Aktivität von PTEN wird durch PREX2 gehemmt. CELF2 unterstützt die inhibitorische Funktion des PTEN über die Hemmung von PREX2. Somit hemmt CELF2 über die Hemmung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs die Zellproliferation und fördert Apoptose. Die Regulation des CELF2 durch die miR-200b-3p ist in blauer Farbe gekennzeichnet: CELF2 stellt ein direktes Zielgen der miR-200b-3p dar und wird in seiner Expression durch die miR-200b-3p gehemmt.

Über seinen Einfluss auf den Hedgehog-Signalweg könnte CELF2 antiproliferativ und antiinvasiv wirken. Der Hedgehog-Signalweg, der in der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle spielt, ist in vielen Krebsarten wie auch dem NSCLC verändert [73, 88]. In NSCLC-Zellkulturen scheint der Hedgehog-Signalweg bei Zellstress aktiviert zu werden [73]. Die Aktivierung induziert Zellwachstum und -überleben und erhöht die Invasivität in NSCLC-Zellkulturen [73]. CELF2 stimuliert in Anwesenheit von HHIP-AS1 die HHIP-Expression und stabilisiert HHIP [130]. HHIP, ein Oberflächenprotein, ist ein wichtiger Inhibitor der Hedgehog-Signalweges [17]. Eine Überexpression von HHIP in NSCLC-Zellkulturen inhibiert den Hedgehog-Signalweg und macht die Zellen empfindlicher für Zellstress [73]. Die HHIP-Expression ist auch in vivo in NSCLC herunterreguliert und niedrige HHIP-Expressionslevel sind mit einem schlechten Überleben assoziiert [130]. Somit könnte die durch die miR-200b-3p reprimierte CELF2-Expression in NSCLC über eine fehlende Inhibition des Hedgehog-Signalweges Proliferation, Migration und Invasivität begünstigen [130].

Das Expressionslevel von CELF2 wurde in Gewebeproben von 87 NSCLC-Patienten durch Yeung et al. ermittelt [132]. Im Vergleich zwischen Lungennormalgewebe und Lungenkarzinomgewebe war die CELF2-Expression im Tumorgewebe signifikant herunterreguliert [132]. Eine erniedrigte CELF2-Expression im Tumorgewebe war mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert [132]. Die Repression der CELF2-Expression in Tumoren von Kurzzeitüberlebenden konnte in den bislang unveröffentlichten Transkriptomanalysen der Arbeitsgruppe Hart verifiziert werden.

In dieser Arbeit konnte CELF2 als ein direktes Zielgen der miR-200b-3p identifiziert werden. Im Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe der Kurzzeitüberlebenden war die miR-200b-3p-Expression im Tumorgewebe hochreguliert. Die miR-200b-3p-vermittelte

## Diskussion

Repression der CELF2-Expression könnte über die Aktivierung der COX-2-Translation, des PI3K/Akt/mTor-Signalweges und des Hedgehog-Signalweges und der damit verbundenen Reduktion der antiproliferativen und antiinvasiven Effekte zur Progression des Bronchialkarzinoms beitragen.

### 5.1.4 Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion von LRP1

Das *LDL Receptor Related Protein 1* (LRP1) konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Western-Blot-Analysen in der Adenokarzinomzelllinie A549 als direktes Zielgen der miR-200b-3p bestätigt werden. LRP1 ist ein Membranrezeptor, der in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird und über 30 verschiedene Liganden bindet [45]. Zu den Liganden von LRP1 gehören unter anderem Apolipoprotein E,  $\alpha$ -2-Makroglobulin, Tissue Plasminogen Activator und Proteinase-Inhibitoren [45]. LRP1 ist an Endozytoseprozessen sowie der Regulation von Signalwegen und Zellwachstum und -differenzierung beteiligt [111].

In Kokulturen von LRP1-knockout Fibroblasten bzw. Mausembryonen-Fibroblasten mit drei verschiedenen Lungenkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte LRP1-Expression in den Nicht-Tumor-Zellen die Proliferation der drei Tumorzelllinien inhibiert [84]. Als Zielgen der miR-200b-3p könnte LRP1 somit als stromaler Tumorstromawachstumsinhibitor fungieren [84]. In verschiedenen Multicenter-Studien wurden die mRNA-Expressionslevel des LRP1 in Lungentumoren bestimmt: Die LRP1-mRNA-Level waren im Vergleich zwischen Tumor- und normalen Lungengewebe signifikant verringert [84]. Niedrigere LRP1-Expression war in diesen Studien mit einem schlechteren Überleben assoziiert [84]. Diese Ergebnisse konnten in der Untersuchung des Transkriptom der Kurzzeitüberlebenden in Lungenkrebs- und Lungennormalgewebeproben durch die Arbeitsgruppe Hart in bislang unveröffentlichten Daten bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte LRP1 als direktes Zielgen der miR-200b-3p identifiziert werden. Die Repression der LRP1-Expression durch die miR-200b-3p in Lungenkrebs Kurzzeitüberlebender könnte durch die Reduktion der tumorinhibierenden Wirkung des LRP1 die Krebsprogression fördern und damit zur schlechteren Prognose der Kurzzeitüberlebenden beitragen.

### 5.1.5 Einfluss der miR-200b-3p auf die Funktion von PPM1F und LATS2

Die *Protein Phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> Dependent 1F* (PPM1F) konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Western-Blot-Analysen in der Adenokarzinomzelllinie A549 als direktes Zielgen der miR-200b-3p bestätigt werden. Die PPM1F ist eine Serin/Threonin-Phosphatase, die im Zytoplasma lokalisiert ist, und gehört zur Familie der Metall-abhängigen Proteinphosphatasen [1, 114]. PPM1F nimmt einen Einfluss auf viele verschiedene

## Diskussion

Signalwege und auf physiologische sowie pathologische Prozesse, wie z.B. auf die Angiogenese, invasive Prozesse und die Apoptoseregulation.

Auf die Angiogenese könnte PPM1F über die Dephosphorylierung und damit Deaktivierung von MAPK1/3, das aktiviert die Angiogenese fördert, Einfluss nehmen [18, 86, 136]. Es konnte von Zhang et al. gezeigt werden, dass ein PPM1F-Knockdown in vitro und in vivo zu vermehrter Sekretion von Angiogenesefaktoren und vermehrter Angiogenese führt [137]. Die Herunterregulierung der PPM1F-Expression durch miR-200b-3p könnte im Lungenkrebs der Kurzzeitüberlebenden ebenfalls die Angiogenese fördern.

Auch auf die Invasivität und Metastasierung von Krebs könnte PPM1F Einfluss nehmen. In PPM1F-knockout-Zellen konnte gezeigt werden, dass das Silencing von PPM1F die Sekretion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Exosomen stimuliert [137]. Außerdem führte die Injektion von PPM1F-knockout-Zellen in Mäusen im Rahmen der Untersuchung von Langzeitmetastasierung zu größeren und einer größeren Anzahl an Metastasen und einer höheren Sterblichkeit [137]. Die Metastasierung und Invasivität des NSCLC der Kurzzeitüberlebenden könnte über die Herunterregulierung des PPM1F durch die miR-200b-3p verstärkt werden.

Eine weitere wichtige Eigenschaft, die Krebszellen im Laufe ihrer Transformation entwickeln, ist die Apoptoseresistenz. Die Reduktion der PPM1F-Expression durch die miR-200b-3p könnte proapoptotische Effekte negativ beeinflussen. So konnten Tan et al. zeigen, dass PPM1F proapoptotisch wirken kann [116]. Ein Signalweg, über den PPM1F seine proapoptotische Wirkung vermitteln kann, beinhaltet die Inaktivierung der Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CAMKII) [52]. CAMKII weist eine antiapoptotische Wirkung auf und wird für die G1/S-Progression im Zellzyklus benötigt [93, 120]. Somit könnte eine Reduktion der PPM1F-Expression bedingt durch eine miR-200b-3p-Überexpression CAMKII aktivieren, was eine verminderte Apoptose der Tumorzellen bedingen könnte.

Die *Large Tumor Suppressor Kinase 2* (LATS2) konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als Zielgen der miR-200b-3p bestätigt werden. Die LATS2 ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die u.a. eine zentrale Rolle im Hippo-Signalweg ausübt [129].

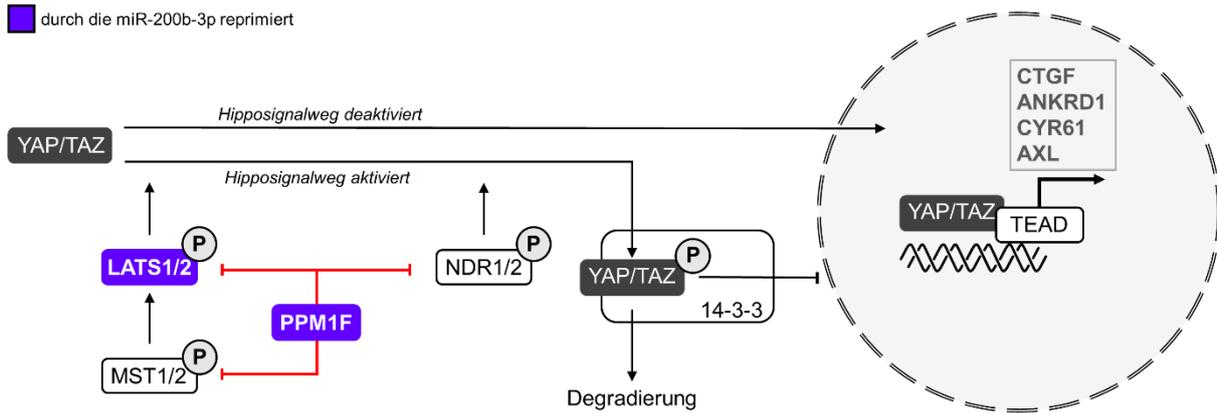
Das Expressionslevel von LATS2 wurde in Gewebeproben von 65 NSCLC-Patienten durch Strazisar et al. analysiert [113]. Im Vergleich zwischen Lungennormalgewebe und Lungenkarzinomgewebe war die LATS2-Expression im Tumorgewebe signifikant herunterreguliert [113]. Auch die Untersuchung des LATS2-Expressionslevels in den Gewebeproben von 56 NSCLC-Patienten durch Yao et al. zeigte eine Herunterregulation des LATS2-Expressionslevels im Tumorgewebe [131]. Die bislang unveröffentlichten Transkriptom-Daten von Lungenkrebs- und Lungennormalgewebeproben Kurzzeitüberlebender der Arbeitsgruppe Hart bestätigen die Ergebnisse von Yao et al.

## Diskussion

Sowohl PPM1F als auch LATS2 können den Hippo-Signalweg beeinflussen. Der Hippo-Signalweg (Abbildung 14), der die Zellproliferation und Apoptose steuert, wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* untersucht und leistet in Tieren die Regulation der Organgröße; im Menschen steht er im Zusammenhang mit Krebs [127]. Im Menschen phosphorylieren die phosphorylierten Kinasen MST1 und MST2 die Kinasen LATS1 und LATS2 [127]. Die phosphorylierten Kinasen LATS1 und LATS2 und phosphoryliertes NDR1 und NDR2 phosphorylieren im Menschen anschließend YAP/TAZ [49]. Das phosphorylierte YAP/TAZ bindet beispielsweise an das 14-3-3-Protein und verbleibt so im Zytoplasma, wo es anschließend abgebaut wird [55]. Bei einer Inhibition des Hippo-Signalweges, wie z.B. durch eine miR-200b-3p-bedingte Repression von LATS2, kann das unphosphorylierte YAP/TAZ in den Zellkern transportiert werden [138]. Dort aktiviert YAP/TAZ den Transkriptionsfaktor TEAD, ein DNA-bindendes Protein, und induziert somit die Expression verschiedener Gene, die an Zellproliferations- und Apoptoseprozessen beteiligt sind [92, 138]. PPM1F hemmt MST1, LATS1 und NDR1, sodass weniger Phosphorylierung des YAP/TAZ stattfindet [92]. Somit üben PPM1F und LATS2 im Hippo-Signalweg gegensätzliche Rollen aus: Während LATS2 die YAP/TAZ-induzierte TEAD-vermittelte Genexpression hemmt, stimuliert PPM1F diese. Zielgene der durch YAP/TAZ induzierten TEAD-vermittelten Genexpression sind beispielsweise CTGF, ANKRD1, CYR61 und AXL [22, 138].

## Diskussion

 durch die miR-200b-3p reprimiert



**Abbildung 14: Der Einfluss der miR-200b-3p auf den Hippo-Signalweg**

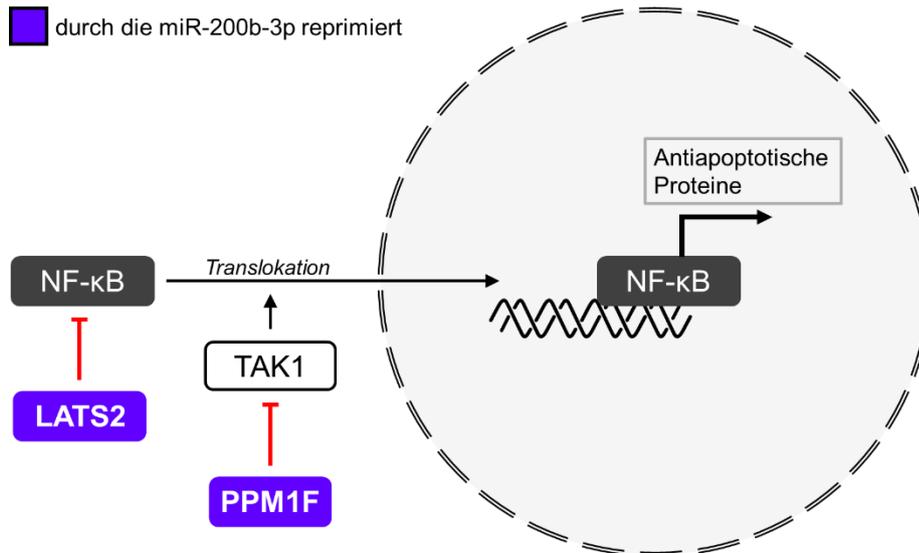
Eine Kernkomponente des Hippo-Signalwegs stellen die Transkription-Koaktivatoren YAP/TAZ dar. Bei deaktiviertem Hippo-Signalweg kann YAP/TAZ in den Zellkern transportiert werden. Dort interagiert YAP/TAZ mit dem Transkriptionsfaktor TEAD und stimuliert die Transkription einiger Gene, wie z.B. CTGF, ANKRD1, CYR61 und AXL. Ist der Hippo-Signalweg hingegen aktiviert, wird YAP/TAZ durch phosphoryliertes LATS1/2, das durch MST1/2 phosphoryliert und damit aktiviert wird, und durch phosphoryliertes NDR1/2 selbst phosphoryliert. Das phosphorylierte YAP/TAZ wird von Proteinen, wie z.B. dem 14-3-3, gebunden und so im Zytoplasma zurückgehalten; es kann nicht in den Zellkern transportiert werden. Das phosphorylierte YAP/TAZ wird abgebaut. Somit inhibiert die Aktivierung des Hippo-Signalweges die TEAD-abhängige Transkription. PPM1F interagiert mit den Kinasen MST1 und LATS1, die Teil des Hippo-Signalwegs sind, und mit der Kinase NDR1 und inhibiert deren Aktivität. Dies führt zu einer Deaktivierung des Hippo-Signalweges mit konsekutiver Stimulation der TEAD-abhängigen Transkription. Die Regulation der Komponenten des Hippo-Signalwegs durch die miR-200b-3p ist in Blau gekennzeichnet: LATS2 und PPM1F stellen direkte Zielgene der miR-200b-3p dar und werden in ihrer Expression durch die miR-200b-3p gehemmt. LATS2 hemmt über die Phosphorylierung des YAP/TAZ die TEAD-vermittelte Genexpression. PPM1F hingegen hemmt die Phosphorylierung des YAP/TAZ durch seinen Einfluss auf den Hippo-Signalweg, sodass YAP/TAZ in den Zellkern transportiert werden kann und dort die TEAD-vermittelte Genexpression stimuliert. (Eigene Abbildung)

In der Sequenzierung des Transkriptoms der Kurzzeitüberlebenden konnte von der Arbeitsgruppe Hart gezeigt werden, dass die ANKRD1- und die AXL-mRNA-Expressionslevel in den Tumorgewebeproben im Vergleich zu den Normalgewebeproben verringert waren. Die CTGF- und CYR61-Expressionslevel konnten nicht ermittelt werden, was möglicherweise auf eine zu geringe Expression unterhalb der Detektionsgrenze zurückzuführen ist. Die Herunterregulation dieser Downstream-Targets des Hippo-Signalweges in den Tumorgewebeproben der Kurzzeitüberlebenden deutet auf eine Aktivierung des Hippo-Signalweges hin. PPM1F und LATS2 beeinflussen den Hippo-Signalweg auf eine diametral entgegengesetzte Art und Weise und könnten so gegensätzliche Funktionen ausüben. Dennoch konnten sowohl PPM1F als auch LATS2 in dieser Arbeit als direkte Zielgene der miR-200b-3p bestätigt werden. Allerdings könnten PPM1F und LATS2 grundsätzlich verschieden stark auf den Hippo-Signalweg einwirken und in vivo unterschiedlich stark durch die miR-200b-3p reguliert werden.

## Diskussion

Ein weiterer Signalweg, der eine antiapoptotische Wirkung aufweist und auf den sowohl LATS2 als auch PPM1F hemmend einwirken können, wird über NF- $\kappa$ B vermittelt (Abbildung 15) [124, 131]. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der über die Bindung an DNA im Zellkern eine zentrale Rolle bei Entzündungen und der Inhibition der Apoptose spielt [10, 103, 107]. Die Überexpression von LATS2 inhibiert die Aktivität von NF- $\kappa$ B [131]. Somit könnte NF- $\kappa$ B bei einer verminderten LATS2-Expression, die z.B. durch die Hochregulation der miR-200b-3p vermittelt werden könnte, mit seiner antiapoptotischen Wirkung die Apoptose der Tumorzellen verhindern. Auch PPM1F kann über die Dephosphorylierung und damit einhergehende Deaktivierung der Kinase TAK1 Einfluss auf die Aktivität von NF- $\kappa$ B nehmen [124]. Phosphorylierte aktive TAK1 stimuliert die Translokation von NF- $\kappa$ B vom Zytoplasma in den Zellkern und induziert damit die über NF- $\kappa$ B-vermittelte Transkription von antiapoptotischen Proteinen, wie z.B. Bcl-2, BCL2L11 und TRAF2 [14, 46, 57, 89, 122–124]. Eine reduzierte PPM1F-Expression könnte die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern begünstigen und somit zu einer erhöhten Expression antiapoptotischer Proteine in den Tumorzellen beitragen. In der Sequenzierung des Transkriptoms der Kurzzeitüberlebenden konnte von der Arbeitsgruppe Hart gezeigt werden, dass die Bcl-2-, BCL2L11- und TRAF2-mRNA-Expressionslevel in den Tumorgewebeproben im Vergleich zu den Normalgewebeproben erhöht waren. Dies deutet auf eine, durch die miR-200b-3p vermittelte Reduktion der LATS2- und PPM1F-Expressionslevel bedingte, verstärkte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges hin.

## Diskussion



### Abbildung 15: Einfluss der miR-200b-3p auf den NF-κB-Signalweg

NF-κB stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der nach seiner durch TAK1 stimulierten Translokation in den Zellkern die Expression antiapoptotischer Proteine stimuliert. LATS2, ein Zielgen der miR-200b-3p, kann NF-κB inhibieren. PPM1F, das ebenfalls ein Zielgen der miR-200b-3p darstellt, kann TAK1 inhibieren. Somit könnten sowohl LATS2 als auch PPM1F die NF-κB-vermittelte Expression antiapoptotischer Proteine hemmen. Die Herunterregulation der LATS2- und PPM1F-Expressionslevel durch die Hochregulation der miR-200b-3p im Tumorgewebe der Kurzzeitüberlebenden könnte zu einer NF-κB-vermittelten Expression antiapoptotischer Proteine führen. Die Zielgene der miR-200b-3p sind in Blau gekennzeichnet. (Eigene Abbildung)

Insgesamt könnte die Herunterregulation der PPM1F-Expression durch die Überexpression der miR-200b-3p in Tumoren von Kurzzeitüberlebenden die Krebsprogression induzieren, indem sowohl die proapoptotischen Effekte von PPM1F als auch die über den Hippo-Signalweg vermittelte tumorsuppressive Wirkung entfallen und die Angiogenese stimuliert wird. Die verminderte Expression von LATS2, die durch die Inhibition durch miR-200b-3p bedingt ist, könnte wie auch die verminderte Expression der PPM1F über die fehlende Hemmung des NF-κB zu einer Apoptoseresistenz des Tumors führen, was zu der schlechteren Prognose der Kurzzeitüberlebenden beitragen könnte.

## 5.2 Fazit und Ausblick

Um ihren Einfluss auf die Transformation der physiologischen Zelle zur Lungenkrebszelle und die Krebsprogression zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Rolle der miR-200b-3p im Rahmen der Karzinogenese funktionell analysiert. Von 31 vorhergesagten Zielgenen konnten initial 30 mittels des HiTmIR-Dual-Luciferase-Assays als direkte Zielgene identifiziert werden. Im anschließenden Mutageneseassay wurden die miR-200b-3p-Bindestellen in den zehn im HiTmIR-Dual-Luciferase-Assay am stärksten reprimierten Zielgenen mutiert. Alle zehn ausgewählten Zielgene konnten als direkte Zielgene der miR-200b-3p validiert werden. Durch die Quantifizierung der LRP1- und PPM1F-Expression in A549-Zellen mittels Western Blot

## Diskussion

konnte gezeigt werden, dass die Expression der beiden Zielgene auch in dieser Lungenkrebszelllinie durch Überexpression der miR-200b-3p gehemmt wird. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Hochregulation der miR-200b-3p an der Reduktion der Expressionslevel von allen im Dual-Luciferase-Assay positiv getesteten Zielgenen im Tumorgewebe der Kurzzeitüberlebenden beteiligt ist, sodass die miR-200b-3p potentiell Einfluss auf die Karzinogenese in NSCLC nimmt.

Von besonderem Interesse sind LRP1, PPM1F, HIPK3, CELF2 und LATS2, die eine tumorsuppressive Wirkung vermitteln und potentiell über die Inhibition ihrer Expression durch miR-200b-3p in ihrer Funktion gestört werden. Vor allem am Beispiel von PPM1F und LATS2 zeigt sich, wie vielschichtig die Regulierung der Signalwege bei Krebserkrankungen sind, da die beiden Proteine den Hippo-Signalweg, der die Zellproliferation und Apoptose steuert, gegensätzlich beeinflussen.

Um ein umfassenderes Verständnis der Rolle der miR-200b-3p in Bezug auf Lungenkarzinome zu erlangen, wäre es notwendig das Targetom der miR-200b-3p vollständig identifizieren, da eine einzelne miRNA multiple Zielgene beeinflussen kann. Die Karzinogenese ist ein komplexer, multifaktorieller Prozess und die miR-200b-3p ist nicht die einzige deregulierte miRNA, sodass selbst nach Identifizierung ihres gesamten Targetoms nur eingeschränkte Aussagen über den tatsächlichen Einfluss der miR-200b-3p auf die Entstehung und die Progression von Lungenkarzinomen möglich wären.

Insgesamt zeigt sich in dieser Arbeit, dass der Krebsentstehung und -erkrankung sehr komplexe Regulationsnetzwerke zugrunde liegen. So kann nicht ein einziges Zielgen für die neoplastischen Prozesse, wie z.B. Apoptoseresistenz oder Zellproliferation, verantwortlich sein. Vielmehr zeigt sich ein kompliziertes Netzwerk, das viele Regulationsebenen aufweist und deren einzelne Komponenten sich gegenseitig beeinflussen. Auch sollte die ganzheitliche Betrachtung der Krebserkrankung auf molekularbiologischer Ebene nicht vernachlässigt werden. Es kann in Bezug auf die Erforschung der Rolle der miRNAs in Krebs nicht als kausal angesehen werden, nur den Einfluss eines Zielgens auf Tumoren zu untersuchen; vielmehr wird es in der Zukunft wichtig sein, sowohl das Zusammenspiel der verschiedenen Zielgene einer miRNA oder mehrerer miRNAs als auch die Interaktionen und Verhältnisse zwischen verschiedenen miRNAs und auch mRNAs zu untersuchen. So gibt es unterschiedliche miRNAs, die dasselbe Zielgen beeinflussen, kooperative Effekte zwischen miRNAs, Zielgene, die sich gegenseitig beeinflussen, und viele weitere Interaktionen auch auf posttranskriptioneller Ebene. Somit kann der kausale Zusammenhang zwischen der Deregulation einer einzelnen miRNA und der Karzinogenese von Lungenkarzinomen nicht klar definiert werden, sondern stellt lediglich einen Baustein zur Erforschung der komplexen Regulationsnetzwerke von Krebserkrankungen dar.

## Bibliographie

### 6 Bibliographie

1. (2024) Metal-dependent protein phosphatase (PPM) family | Enzymes | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY.  
<https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=1041>.  
Zugegriffen: 05. April 2023
2. (2024) PPM1F - Protein phosphatase 1F - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt.  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P49593/entry#sequences>. Zugegriffen: 22. Februar 2023
3. Akhtar S, Al-Zaid B, El-Hashim AZ, Chandrasekhar B, Attur S, Yousif MHM, Benter IF (2015) Cationic Polyamidoamine Dendrimers as Modulators of EGFR Signaling In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 10(7):e0132215. doi:10.1371/journal.pone.0132215
4. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, Hart M, Abu-Halima M, Grässer FA, Lenhof H-P, Keller A, Meese E (2019) An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res* 47(7):3353–3364. doi:10.1093/nar/gkz097
5. Apizi A, Wang L, Wusiman L, Song E, Han Y, Jia T, Zhang W (2022) Establishment and verification of a prognostic model of liver cancer by RNA-binding proteins based on the TCGA database. *Transl Cancer Res* 11(7):1925–1937. doi:10.21037/tcr-21-2820
6. Auger KR, Serunian LA, Soltoff SP, Libby P, Cantley LC (1989) PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 57(1):167–175. doi:10.1016/0092-8674(89)90182-7
7. Banerjee P, Xiao G-Y, Tan X, Zheng VJ, Shi L, Rabassedas MNB, Guo H-F, Liu X, Yu J, Diao L, Wang J, Russell WK, Roszik J, Creighton CJ, Kurie JM (2021) The EMT activator ZEB1 accelerates endosomal trafficking to establish a polarity axis in lung adenocarcinoma cells. *Nat Commun* 12(1):6354. doi:10.1038/s41467-021-26677-y
8. Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* 69(21):3613–3634. doi:10.1007/s00018-012-0990-9
9. Bashkurov VI, Scherthan H, Solinger JA, Buerstedde JM, Heyer WD (1997) A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol* 136(4):761–773. doi:10.1083/jcb.136.4.761
10. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376(6536):167–170. doi:10.1038/376167a0
11. Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G (2007) Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* 4(2):76–84. doi:10.4161/rna.4.2.4640

## Bibliographie

12. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113(1):25–36. doi:10.1016/s0092-8674(03)00231-9
13. Burd CG, Dreyfuss G (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265(5172):615–621. doi:10.1126/science.8036511
14. Catz SD, Johnson JL (2001) Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20(50):7342–7351. doi:10.1038/sj.onc.1204926
15. Cell Signaling Technology (2024) SignalFire™ Elite ECL Reagent. <https://www.cellsignal.com/products/wb-ip-reagents/signalfire-elite-ecl-reagent/12757>. Zugegriffen: 25. April 2024
16. Chaput D, Kirouac L, Stevens SM, Padmanabhan J (2016) Potential role of PCTAIRE-2, PCTAIRE-3 and P-Histone H4 in amyloid precursor protein-dependent Alzheimer pathology. *Oncotarget* 7(8):8481–8497. doi:10.18632/oncotarget.7380
17. Chuang PT, McMahon AP (1999) Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397(6720):617–621. doi:10.1038/17611
18. Dai J, Peng L, Fan K, Wang H, Wei R, Ji G, Cai J, Lu B, Li B, Zhang D, Kang Y, Tan M, Qian W, Guo Y (2009) Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene* 28(38):3412–3422. doi:10.1038/onc.2009.189
19. Deschuyter M, Leger DY, Verboom A, Chaunavel A, Maftah A, Petit J-M (2022) ST3GAL2 knock-down decreases tumoral character of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Am J Cancer Res* 12(1):280–302
20. Deutsches Krebsforschungszentrum (2008) Frauen und Rauchen in Deutschland. [https://www.dkfz.de/de/tabakkontrolle/download/Publikationen/FzR/FzR\\_Frauen\\_und\\_Rauchen.pdf](https://www.dkfz.de/de/tabakkontrolle/download/Publikationen/FzR/FzR_Frauen_und_Rauchen.pdf)
21. DuBridges RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7(1):379–387
22. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S (2011) Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474(7350):179–183. doi:10.1038/nature10137
23. Emrich K, Kraywinkel K (2021) Epidemiologie des kleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Onkologe* 27(9):858–861. doi:10.1007/s00761-021-01001-x

## Bibliographie

24. Eystathioy T, Jakymiw A, Chan EKL, Séraphin B, Cougot N, Fritzler MJ (2003) The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* 9(10):1171–1173. doi:10.1261/rna.5810203
25. Fine B, Hodakoski C, Koujak S, Su T, Saal LH, Maurer M, Hopkins B, Keniry M, Sulis ML, Mense S, Hibshoosh H, Parsons R (2009) Activation of the PI3K pathway in cancer through inhibition of PTEN by exchange factor P-REX2a. *Science* 325(5945):1261–1265. doi:10.1126/science.1173569
26. 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(6669):806–811. doi:10.1038/35888
27. Forgacs E, Biesterveld EJ, Sekido Y, Fong K, Muneer S, Wistuba II, Milchgrub S, Brezinschek R, Virmani A, Gazdar AF, Minna JD (1998) Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene* 17(12):1557–1565. doi:10.1038/sj.onc.1202070
28. Forman JJ, Legesse-Miller A, Collier HA (2008) A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39):14879–14884. doi:10.1073/pnas.0803230105
29. Frank F, Sonenberg N, Nagar B (2010) Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465(7299):818–822. doi:10.1038/nature09039
30. Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81(5):727–736. doi:10.1016/0092-8674(95)90534-0
31. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51(5):1417–1423. doi:10.1093/jnci/51.5.1417
32. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1):59–74. doi:10.1099/0022-1317-36-1-59
33. GREEN AA, MCELROY WD (1956) Crystalline firefly luciferase. *Biochim Biophys Acta* 20(1):170–176. doi:10.1016/0006-3002(56)90275-X
34. Greenburg G, Hay ED (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95(1):333–339. doi:10.1083/jcb.95.1.333
35. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to

## Bibliographie

- mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10(5):593–601.  
doi:10.1038/ncb1722
36. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432(7014):235–240. doi:10.1038/nature03120
37. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123(4):631–640.  
doi:10.1016/j.cell.2005.10.022
38. Griesinger F, Absenger G, Bleckmann A, Eberhardt W, Eichhorn M, Früh M, Gautschi O, Hilbe W, Hoffmann H, Huber RM, Kraywinkel K, Loges S, Pöttgen C, Reck M, Reinmuth N, Sebastian M, Siehl JM, Waller C, Wolf J, Wörmann B (2023) Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC).  
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@@guideline/html/index.html>
39. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27(1):91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017
40. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang B-T, Kim VN (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125(5):887–901. doi:10.1016/j.cell.2006.03.043
41. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57–70.  
doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
42. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
43. Hart M (2013) Das komparative MicroRNA-Profil zunehmend maligner Prostatakarzinome und Identifizierung von microRNA-Zielgenen. Universität des Saarlandes
44. He M, Liu Y, Deng X, Qi S, Sun X, Liu G, Liu Y, Liu Y, Zhao M (2013) Down-regulation of miR-200b-3p by low p73 contributes to the androgen-independence of prostate cancer cells. *Prostate* 73(10):1048–1056. doi:10.1002/pros.22652
45. Herz J, Strickland DK (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 108(6):779–784. doi:10.1172/JCI13992
46. Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348(6299):334–336. doi:10.1038/348334a0

## Bibliographie

47. Hon LS, Zhang Z (2007) The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression. *Genome Biol* 8(8):R166. doi:10.1186/gb-2007-8-8-r166
48. Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, Chen W, Khaitovich P (2009) Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 10:413. doi:10.1186/1471-2164-10-413
49. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D (2005) The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122(3):421–434. doi:10.1016/j.cell.2005.06.007
50. Hussain Qureshi MF, Shah M, Lakhani M, Abubaker ZJ, Mohammad D, Farhan H, Zia I, Tafveez R, Khan ST, Rubina G, Shamim M, Ghulam H (2021) Gene signatures of cyclin-dependent kinases: a comparative study in naïve early and advanced stages of lung metastasis breast cancer among pre- and post-menopausal women. *Genes Cancer* 12:1–11. doi:10.18632/genesandcancer.209
51. Hutvagner G, Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297(5589):2056–2060. doi:10.1126/science.1073827
52. Ishida A, Kameshita I, Fujisawa H (1998) A novel protein phosphatase that dephosphorylates and regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 273(4):1904–1910. doi:10.1074/jbc.273.4.1904
53. Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H (2002) A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* 16(19):2497–2508. doi:10.1101/gad.1022002
54. Jones PD, Kaiser MA, Ghaderi Najafabadi M, Koplev S, Zhao Y, Douglas G, Kyriakou T, Andrews S, Rajmohan R, Watkins H, Channon KM, Ye S, Yang X, Björkegren JLM, Samani NJ, Webb TR (2018) JCAD, a Gene at the 10p11 Coronary Artery Disease Locus, Regulates Hippo Signaling in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(8):1711–1722. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310976
55. Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, Hisaminato A, Fujiwara T, Ito Y, Cantley LC, Yaffe MB (2000) TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J* 19(24):6778–6791. doi:10.1093/emboj/19.24.6778
56. Karamitopoulou E, Haemmig S, Baumgartner U, Schlup C, Wartenberg M, Vassella E (2017) MicroRNA dysregulation in the tumor microenvironment influences the phenotype of pancreatic cancer. *Mod Pathol* 30(8):1116–1125. doi:10.1038/modpathol.2017.35
57. Karl I, Jossberger-Werner M, Schmidt N, Horn S, Goebeler M, Leverkus M, Wajant H, Giner T (2014) TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis. *Cell Death Dis* 5(10):e1444. doi:10.1038/cddis.2014.404

## Bibliographie

58. Kawamata T, Yoda M, Tomari Y (2011) Multilayer checkpoints for microRNA authenticity during RISC assembly. *EMBO Rep* 12(9):944–949. doi:10.1038/embor.2011.128
59. Kern F, Krammes L, Danz K, Diener C, Kehl T, KÜchler O, Fehlmann T, Kahraman M, Rheinheimer S, Aparicio-Puerta E, Wagner S, Ludwig N, Backes C, Lenhof H-P, Briesen H von, Hart M, Keller A, Meese E (2021) Validation of human microRNA target pathways enables evaluation of target prediction tools. *Nucleic Acids Res* 49(1):127–144. doi:10.1093/nar/gkaa1161
60. Kesharwani P, Iyer AK (2015) Recent advances in dendrimer-based nanovectors for tumor-targeted drug and gene delivery. *Drug Discov Today* 20(5):536–547. doi:10.1016/j.drudis.2014.12.012
61. Kim YH, Choi CY, Lee SJ, Conti MA, Kim Y (1998) Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J Biol Chem* 273(40):25875–25879. doi:10.1074/jbc.273.40.25875
62. Knight SW, Bass BL (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293(5538):2269–2271. doi:10.1126/science.1062039
63. Kraywinkel K, Schönfeld I (2018) Epidemiologie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Onkologie* 24(12):946–951. doi:10.1007/s00761-018-0480-2
64. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685. doi:10.1038/227680a0
65. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294(5543):853–858. doi:10.1126/science.1064921
66. Lai EC (2002) Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30(4):363–364. doi:10.1038/ng865
67. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21(17):4663–4670. doi:10.1093/emboj/cdf476
68. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23(20):4051–4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
69. Leitlinienprogramm Onkologie (2024) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Version 3.0 – März 2024 AWMF-Registernummer: 020-007OL. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. [https://register.awmf.org/assets/guidelines/020-007OLI\\_S3\\_Praevention-Diagnostik-Therapie-Nachsorge-Lungenkarzinom\\_2024-03.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/020-007OLI_S3_Praevention-Diagnostik-Therapie-Nachsorge-Lungenkarzinom_2024-03.pdf)

## Bibliographie

70. 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. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
71. Liang Y-J, Ding Y, Lavery SB, Lobaton M, Handa K, Hakomori S (2013) Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(13):4968–4973. doi:10.1073/pnas.1302825110
72. Liberale L, Puspitasari YM, Ministrini S, Akhmedov A, Kraler S, Bonetti NR, Beer G, Vukolic A, Bongiovanni D, Han J, Kirmes K, Bernlochner I, Pelisek J, Beer JH, Jin Z-G, Pedicino D, Liuzzo G, Stellos K, Montecucco F, Crea F, Lüscher TF, Camici GG (2023) JCAD promotes arterial thrombosis through PI3K/Akt modulation: a translational study. *Eur Heart J* 44(20):1818–1833. doi:10.1093/eurheartj/ehac641
73. Lin E-H, Kao Y-R, Lin C-A, Kuo T-Y, Yang S-P, Hsu C-F, Chou T-Y, Ho C-C, Wu C-W (2016) Hedgehog pathway maintains cell survival under stress conditions, and drives drug resistance in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 7(17):24179–24193. doi:10.18632/oncotarget.8253
74. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M (2003) Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426(6965):465–469. doi:10.1038/nature02123
75. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305(5689):1437–1441. doi:10.1126/science.1102513
76. Liu Y, Qian L, Yang J, Huang H, Feng J, Li X, Bian T, Ke H, Liu J, Zhang J (2018) The expression level and prognostic value of HIPK3 among non-small-cell lung cancer patients in China. *Onco Targets Ther* 11:7459–7469. doi:10.2147/OTT.S166878
77. Liu K, Zhang W, Tan J, Ma J, Zhao J (2019) MiR-200b-3p Functions as an Oncogene by Targeting ABCA1 in Lung Adenocarcinoma. *Technol Cancer Res Treat* 18:1533033819892590. doi:10.1177/1533033819892590
78. Liu Y-J, Yin S-Y, Zeng S-H, Hu Y-D, Wang M-Q, Huang P, Li J-P (2021) Prognostic Value of LHFPL Tetraspan Subfamily Member 6 (LHFPL6) in Gastric Cancer: A Study Based on Bioinformatics Analysis and Experimental Validation. *Pharmgenomics Pers Med* 14:1483–1504. doi:10.2147/PGPM.S332345
79. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
80. Luo H, Chen Z, Jin H, Zhuang M, Wang T, Su C, Lei Y, Zou J, Zhong B (2011) Cyclooxygenase-2 up-regulates vascular endothelial growth factor via a protein kinase C

## Bibliographie

- pathway in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 30(1):6. doi:10.1186/1756-9966-30-6
81. Manser RL, Irving LB, Stone C, Byrnes G, Abramson M, Campbell D (2004) Screening for lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD001991. doi:10.1002/14651858.CD001991.pub2
  82. McManus MT, Petersen CP, Haines BB, Chen J, Sharp PA (2002) Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* 8(6):842–850. doi:10.1017/s1355838202024032
  83. Mehta KA, Patel KA, Pandya SJ, Patel PS (2020) "Aberrant sialylation plays a significant role in oral squamous cell carcinoma progression". *J Oral Pathol Med* 49(3):253–259. doi:10.1111/jop.12976
  84. Meng H, Chen G, Zhang X, Wang Z, Thomas DG, Giordano TJ, Beer DG, Wang MM (2011) Stromal LRP1 in lung adenocarcinoma predicts clinical outcome. *Clin Cancer Res* 17(8):2426–2433. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2385
  85. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 1(12):882–891
  86. Miyake M, Goodison S, Lawton A, Gomes-Giacoa E, Rosser CJ (2015) Angiogenin promotes tumoral growth and angiogenesis by regulating matrix metallopeptidase-2 expression via the ERK1/2 pathway. *Oncogene* 34(7):890–901. doi:10.1038/onc.2014.2
  87. Mukhopadhyay D, Houchen CW, Kennedy S, Dieckgraefe BK, Anant S (2003) Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. *Mol Cell* 11(1):113–126. doi:10.1016/s1097-2765(03)00012-1
  88. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287(5785):795–801. doi:10.1038/287795a0
  89. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 17(2):384–395. doi:10.1093/emboj/17.2.384
  90. Paterson EL, Kazenwadel J, Bert AG, Khew-Goodall Y, Ruzkiewicz A, Goodall GJ (2013) Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia* 15(2):180–191. doi:10.1593/neo.121828
  91. Piovesan A, Antonaros F, Vitale L, Strippoli P, Pelleri MC, Caracausi M (2019) Human protein-coding genes and gene feature statistics in 2019. *BMC Res Notes* 12(1):315. doi:10.1186/s13104-019-4343-8
  92. Rahmat MB, Zhang S, Koh C-G (2019) POPX2 is a novel LATS phosphatase that regulates the Hippo pathway. *Oncotarget* 10(15):1525–1538. doi:10.18632/oncotarget.26689

## Bibliographie

93. Rasmussen G, Rasmussen C (1995) Calmodulin-dependent protein kinase II is required for G1/S progression in HeLa cells. *Biochem Cell Biol* 73(3-4):201–207. doi:10.1139/o95-024
94. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403(6772):901–906. doi:10.1038/35002607
95. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16(13):1616–1626. doi:10.1101/gad.1004402
96. Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7):3116–3120. doi:10.1073/pnas.76.7.3116
97. Robert Koch-Institut (2021) Krebs in Deutschland für 2017/2018. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/krebs\\_in\\_deutschland\\_2021.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf?__blob=publicationFile)
98. Rochat-Steiner V, Becker K, Micheau O, Schneider P, Burns K, Tschopp J (2000) FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Exp Med* 192(8):1165–1174. doi:10.1084/jem.192.8.1165
99. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14(10A):1902–1910. doi:10.1101/gr.2722704
100. Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R (1995) Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl* 4(4):234–238. doi:10.1101/gr.4.4.234
101. Schwarz S (2022) Analyse des miRNoms und Transkriptoms von Bronchialkarzinomen Lang- und Kurzzeitüberlebender, Saarbrücken
102. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2):199–208. doi:10.1016/s0092-8674(03)00759-1
103. Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47(6):921–928. doi:10.1016/0092-8674(86)90807-x
104. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28(5):815–820. doi:10.1016/0006-291x(67)90391-9

## Bibliographie

105. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, Dubois RN (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58(2):362–366
106. Sheth U, Parker R (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300(5620):805–808.  
doi:10.1126/science.1082320
107. Shimizu H, Mitomo K, Watanabe T, Okamoto S, Yamamoto K (1990) Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol Cell Biol* 10(2):561–568. doi:10.1128/mcb.10.2.561-568.1990
108. Sikand K, Singh J, Ebron JS, Shukla GC (2012) Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -actin are targets of miR-644a. *PLoS One* 7(10):e47510. doi:10.1371/journal.pone.0047510
109. Siomi MC, Tsukumo H, Ishizuka A, Nagami T, Siomi H (2005) A potential link between transgene silencing and poly(A) tails. *RNA* 11(7):1004–1011.  
doi:10.1261/rna.2280105
110. Smith BJ (1984) SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol* 1:41–55. doi:10.1385/0-89603-062-8:41
111. Spuch C, Ortolano S, Navarro C (2012) LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in Alzheimer's disease. *Front Physiol* 3:269. doi:10.3389/fphys.2012.00269
112. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV (1997) Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15(4):356–362.  
doi:10.1038/ng0497-356
113. Strazisar M, Mlakar V, Glavac D (2009) The expression of COX-2, hTERT, MDM2, LATS2 and S100A2 in different types of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cell Mol Biol Lett* 14(3):442–456. doi:10.2478/s11658-009-0011-7
114. Takeuchi M, Taniguchi T, Fujisawa H (2004) Identification and characterization of nuclear localization signals of CaMKP-N. *J Biochem* 136(2):183–188.  
doi:10.1093/jb/mvh109
115. Tan S, Guo J, Huang Q, Chen X, Li-Ling J, Li Q, Ma F (2007) Retained introns increase putative microRNA targets within 3' UTRs of human mRNA. *FEBS Lett* 581(6):1081–1086. doi:10.1016/j.febslet.2007.02.009
116. Tan KM, Chan SL, Tan KO, Yu VC (2001) The *Caenorhabditis elegans* sex-determining protein FEM-2 and its human homologue, hFEM-2, are Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-

## Bibliographie

- dependent protein kinase phosphatases that promote apoptosis. *J Biol Chem* 276(47):44193–44202. doi:10.1074/jbc.M105880200
117. Temin HM, Mizutani S (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226(5252):1211–1213. doi:10.1038/2261211a0
118. Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6):442–454. doi:10.1038/nrc822
119. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild A-C, Tsay M, Lu R, Jurisica I (2018) mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res* 46(D1):D360-D370. doi:10.1093/nar/gkx1144
120. Tombes RM, Grant S, Westin EH, Krystal G (1995) G1 cell cycle arrest and apoptosis are induced in NIH 3T3 cells by KN-93, an inhibitor of CaMK-II (the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/CaM kinase). *Cell Growth Differ* 6(9):1063–1070
121. Visentini J, Gauthier J, Bertrand MJ (1989) Effect of trifluoroacetic acid on the reduction of disulfide bridges in peptides analyzed by fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 3(11):390–395. doi:10.1002/rcm.1290031105
122. Wang Z, Zhang B, Yang L, Ding J, Ding H-F (2008) Constitutive production of NF- $\kappa$ B2 p52 is not tumorigenic but predisposes mice to inflammatory autoimmune disease by repressing Bim expression. *J Biol Chem* 283(16):10698–10706. doi:10.1074/jbc.M800806200
123. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS (1998) NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281(5383):1680–1683. doi:10.1126/science.281.5383.1680
124. Weng T, Koh C-G (2017) POPX2 phosphatase regulates apoptosis through the TAK1-IKK-NF- $\kappa$ B pathway. *Cell Death Dis* 8(9):e3051. doi:10.1038/cddis.2017.443
125. Wolf M, Bleckmann A, Eberhardt W, Eichhorn M, Früh M, Gautschi O, Griesinger F, Hilbe W, Hoffmann H, Kraywinkel K, Loges S, Pirker R, Pöttgen C, Reck M, Reinmuth N, Sebastian M, Waller C, Wolf J (2023) Lungenkarzinom, kleinzellig (SCLC). <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-kleinzellig-sclc/@@guideline/html/index.html>
126. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A (1998) Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58(22):4997–5001
127. Wu S, Huang J, Dong J, Pan D (2003) hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 114(4):445–456. doi:10.1016/s0092-8674(03)00549-x

## Bibliographie

128. Wu K-L, Tsai Y-M, Lien C-T, Kuo P-L, Hung AJ-Y (2019) The Roles of MicroRNA in Lung Cancer. *Int J Mol Sci* 20(7). doi:10.3390/ijms20071611
129. Yabuta N, Fujii T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Nishiguchi H, Endo Y, Toji S, Tanaka H, Nishimune Y, Nojima H (2000) Structure, expression, and chromosome mapping of LATS2, a mammalian homologue of the *Drosophila* tumor suppressor gene *lats/warts*. *Genomics* 63(2):263–270. doi:10.1006/geno.1999.6065
130. Yang Y, Cheng Y, Mou Y, Tang X, Mu X (2022) Natural Antisense Long Noncoding RNA HHIP-AS1 Suppresses Non-Small-Cell Lung Cancer Progression by Increasing HHIP Stability via Interaction with CELF2. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 33(1):67–77. doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2022043174
131. Yao F, Liu H, Li Z, Zhong C, Fang W (2015) Down-regulation of LATS2 in non-small cell lung cancer promoted the growth and motility of cancer cells. *Tumour Biol* 36(3):2049–2057. doi:10.1007/s13277-014-2812-1
132. Yeung YT, Fan S, Lu B, Yin S, Yang S, Nie W, Wang M, Zhou L, Li T, Li X, Bode AM, Dong Z (2020) CELF2 suppresses non-small cell lung carcinoma growth by inhibiting the PREX2-PTEN interaction. *Carcinogenesis* 41(3):377–389. doi:10.1093/carcin/bgz113
133. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17(24):3011–3016. doi:10.1101/gad.1158803
134. Zeng Y, Cullen BR (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32(16):4776–4785. doi:10.1093/nar/gkh824
135. Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(17):9779–9784. doi:10.1073/pnas.1630797100
136. Zhang S, Guo T, Chan H, Sze SK, Koh C-G (2013) Integrative transcriptome and proteome study to identify the signaling network regulated by POPX2 phosphatase. *J Proteome Res* 12(6):2525–2536. doi:10.1021/pr301113c
137. Zhang S, Weng T, Cheruba E, Guo T, Chan H, Sze SK, Koh C-G (2017) Phosphatase POPX2 Exhibits Dual Regulatory Functions in Cancer Metastasis. *J Proteome Res* 16(2):698–711. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00748
138. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang C-Y, Chinnaiyan AM, Lai Z-C, Guan K-L (2008) TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 22(14):1962–1971. doi:10.1101/gad.1664408
139. Zhao Q, Zhao R, Song C, Wang H, Rong J, Wang F, Yan L, Song Y, Xie Y (2021) Increased IGFBP7 Expression Correlates with Poor Prognosis and Immune Infiltration in Gastric Cancer. *J Cancer* 12(5):1343–1355. doi:10.7150/jca.50370

## Danksagung

### Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um allen, die mich auf dem Weg meiner Promotion begleitet und unterstützt haben, meine aufrichtige Dankbarkeit und Wertschätzung auszusprechen.

Zuallererst möchte ich dem Leiter des Instituts für Humangenetik, Herrn Prof. Dr. Eckart Meese, meinen Dank aussprechen. Vielen Dank dafür, dass ich meine Doktorarbeit zu diesem interessanten Thema an Ihrem Institut durchführen durfte. Darüber hinaus danke ich für die Erstellung des Erstgutachtens.

Für die Akquise und Bereitstellung der Gewebeproben, die die Grundlage für die Fragestellung dieser Arbeit darstellen, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hanno Huwer und Herrn Prof. Dr. Eckart Meese bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer, Dr. Martin Hart, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich durch schwierige Phasen geleitet hat. Seine Expertise, sein Engagement, seine konstruktive Kritik und seine Hilfsbereitschaft haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Darüber hinaus danke ich für die freundliche Bereitstellung der pSG5-miR-200b-Expressionsplasmide.

Ebenso möchte ich Stefanie Rheinheimer danken, die mir mit ihrem Fachwissen und ihrer Unterstützung geholfen hat, meine Experimente erfolgreich abzuschließen. Vor allem möchte ich mich auch für die schöne gemeinsame Zeit im Labor bedanken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere bei Dr. Nicole Ludwig möchte ich mich für ihre Expertise und ihre Unterstützung bedanken.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung bedanken. Vor allem Björn Karthein möchte ich für seine ständige Unterstützung, seine Geduld und dafür, dass er mich immer wieder erneut motiviert hat, danken.

## **Lebenslauf**

### **Lebenslauf**

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

## Anhang

### Anhang

**Tabelle 10: Übersicht der für das Design der Reporterplasmide verwendeten Zielgenesequenzen**

Gene	r <sub>s</sub>	NCBI Referenzsequenz	Plasmid-bezeichnung	Sequenz	Länge der Sequenz (bp)
AP1S2	-0,724	NM_001272071.2	pMIR-AP1S2_1	ACTAGTCTCTCCTCCCTTGTGATGACTTCTTGTGGCATTTCACACACTGTAGATGGTCACTCCCTTCATGTCCATGTTAGCTCATGGTGAAGATGATGCTTGTGCAGTATTACTGTTTTGCTAAGCCGCTTCATTCATGCCTACACAATTTTTTTTTAAAAGGGAACCTTGTAAATTAAGTGATAAGGGACTTAAATATGAATTAGAATGGTGCAGAAAAGAGATACCTTTCTGGATTTTTAAAGTTAAAGGTCAGTTTCTCTTAATCTGATTATGTGCACATATGAAAAAATGGCACATCATATACATGAAAAATCAGGCAGTATACATTTATAAATACTGTATTTGACAAAAGGAACTCTTAAATTATAATGTGAAACCTGGTTTTATGAAACAAAAGACTGAGCTC	413
			pMIR-AP1S2_2	ACTAGTGCAAATTTACTCCAAGACTTGTATTGGAATTTACATACCTTTTTTTTTTTTTTTAAAGGACTACAGATTATTTTTAATGACTAAATTGGAGTGATACTTTACACTAAAAATTTTCTTAGGCATTCTGAATCTGGGATGAGAACAGGATTGTTTCCACAATAGTAAGCACATAATTTTTAAGGCCAAGGCACATTTGACTCCTGAGATGAATTTTTGTGGTCATAATCAAATACCTTAGTTGTTTTGATGCCCAAAATAAAGTGAGAATGGTAATTTGCCAGGAAATCTTCATAACAGTATCTTACAAAAACGTGTTGCTCTCTTCACAGTATTATGTGTAAGTCATTGTTTAAAGCACGAATGTTCCCTCTGGGGTACTGTTAAAGCTAAATTTATTTTGTCTCCCTCCACTTAGAAGTCTGCACACTTTACAGCAGCTTCTTTCTTCCATGGCACTGCCTAGTTAACGAGCTC	494
TAOK3	-0,713	NM_001346487.2	pMIR-TAOK3_1	ACTAGTGATTAATTTTTTGGCATTTCACAAAAAAGAAAAAAGAAAAACAGAAAAAATTCAGACCCTGCAAAACACATTCCTCCATTTAACGGGCGTTGCTCCTCACTCTCTCTCTCTTACTCTTACTGACATCGTGTCCGCAAGTGCCTGTTTTATTCTTACTCCATCAGGGGCCCTTCTCCCTCCCTGTGCACTTTCACTGCTGGCCAAAACTGGCCGCTCTCTTCTATTACAGTACAGTACAGTATTGATGTGATTCAAATGTTTCAGTGAAAACTTGGAGACAGTTTTTAAACAAAACCAATAAACCAACAACAAAAAAGTGGATGTATATTGCTTTAAGCAATCACTCATTACCACCAATCTGTGAAAGTAAAGCAAAAAATAATAATAAATGCCAAGGGGGAGAGACACAATATCCGAGCCTTACACCTTAACTAGCTGCTGCGAGCTC	474
			pMIR-TAOK3_2	ACTAGTCTCACAGAATCCCAGTAGCACAAATTTGGGCTTTGGCAATCGTGTATTTTGTATAGAAGGAATTTAAGGAGAGGTATTACTTATTTTCATATTGATTTAACTGTTTCTCTGATCAAATTTTTTACTTCTCCTCCTGTCTCTCCCACTCCCTCCTTTTCCAGTTTCAGTATTTGGAGTTCAACACTGTCTCTCAATCAGATCATCTTGATCTTTTTCTTATCTCCCTTCCCTTCTCTAAGTCCATTTCTTGGTCATAAATATTGCATTATTCACACTTTCAAACGTGTATTTTCTTACAATAAAAAATGATGAAAAAAGGCTTTACTTCTTTTGCATGCACTTTAAAAACAAAACAAAACATTTTTCAGTTTCCAAGGAAGAGCATGATAACTGTGAGAGCTTTTAAATTATATTGTAATAAAAGTTTCATCACGAGCTC	462
MBNL1	-0,698	NM_001376826.1	pMIR-MBNL1	ACTAGTGAATAGATTGTAAGACGTGGTGAGGGAGGGATCTGACAGAGATGAATGTGCCAAGCAAAACCAACTGTGTATTTTTAAAGCACATCATGGCTTTAAGTACCATGTTGTTAAGGATTCTCATGAAGTGCCATAGACTGTACATCAAATTAGAGTATTATTTCTCAGTGTTATTGTTTTTCAGAGCCAATTTTGTGCATATTTGCTAGTACTAATCAGTCAAAGGGCACCATTCTTTTTTTTTTTTTTGAACCAAGCTGTCTCAGAAATGGCCAATTTAACTTTACAGTAACAATAGACAGCACAACTCTCTCAATACAGATAAACTCACACATACTGGAGATATATATAATAGATATATAAAAAATTTTTAATGCATTGTAGTGAATTTTATGCATACTATACTGTATAACATGTTATCAAAGGGATTGCCATTTCTGAGACACAGTAACAAAAAATGGAGCTC	493

## Anhang

RGL1	-0,691	NM_0151 49.6	pMIR-RGL1	ACTAGTGGGATAGTATGGACTATGGAAAAACAAATTTGCACAATGGCC TGGGAAGTTGAGGTCACATTTTTACAGGGAATAAGAAACTGAGAAC CTAGTCTCGTATATTCTGAGTAAATGGAATCAGTCTGGGAATAGAGA GTGTCCTTTTGCCAGTATTACAAGAAGCCCAACTTTATTTTTATAAA GGGAGAGGATGACTTTCTCAATCAAGTGCCACCAGATAAAAACAACCTG CAGAGGCTGGAAGTCCACAGGCTGTATGAAAGGCCACTTTGAAAG GGTTTGGATGAGCTGGTGGCCTTCAACCTCTGCCTGCATCTGCCACTT TCTGTACCCCTAGGGAGGCCAGGAGGAGCTTCGGAGGACCATCGCCC CACTGGTCTAGCCATCATGACACCTCTGGAGGTGTCAAGCTCCTGAAA CAAGCTCATTTCAGTTTCTGGCAACCCCGTGTATTCCGTTTTCCCCCT AAAGAACGAGCTC	493
PBX3	-0,685	NM_0061 95.6	pMIR-PBX3	ACTAGTCATCTTGTAATTAACCTCTTTGTTTCCCTTCATAAAATGTAATGT ACATTGTAATCTTTTTAAAGAAAAATCAGGGTGCACCTGCAACTTTTTAA AAAACCGAGTGTGGAAACATTGGGTCTTAATCAACACAGGATCGGTA AAACTGTTGTAATACTGAGAAACATTTTGAATGTTCTTCATCTTATTAC TAATCCATGCAAAAAAGCAAGCAGCGACTAATTTGTATGATGCATT CAGATTTCACTATTCAGTACTGTATATTTACCCTGTGTAATGGGGCCC CCTCTCCTTCTCTCTTTTTGTATTGTATGCGATTCTGAAACTGATTGAG TCATGAAAAATAATTTGTGGCGGTGATTCTAATGATTTAAAAACGTTTCG TGTTCCCTTTCTAACTGGATTACCCCTGGATTGAAAAAGTCTTCCCTGT GGTAGTTATATGTAGTTTCAAACATGAATAAACTTTTTGCTTTCATGGAG CTC	497
FRMD4B	-0,664	NM_0151 23.3	pMIR- FRMD4B_1	ACTAGTGTGAAGCCTTCATCAATAGCAAGCACTTTTTAAGGGAGTAAAA GTTGTTAAAGGCAAACCTCAAAAACATGAAAGGGCATTGAGGATGTCC CATGGCAATAAGAACAGGGGAAATCTCAGAGCACAATTCAGCAGGATG AGAGAAGGGGAACAGAAAGCTCCGGAGTCAATGCTCACTTCAGAGTTT GAATTCGTGAGCTGACAAAGAGTAACTGCTCTTTCTACACAGACATG GACAAATTTAGACAGTATTGAAAAATTACTTGAAGCTGGATTTTCATGAA GTTCTGAATGAGTGAATGTTTTTTAGGATACTATAAAGAGTATGTTT TTCATAAGCACCATAAAATGGGTTCTGGAAAACTGATTACCTTAGCAT CCTGTAATATACTTATGGTAGCAGATTGGGGAAAATGAAGCAGCCCA CTGAATAATTGACAAAAGTCTGCTTGGAGAACATTCTAAGGTACAATATC ATGGAGGAGCTC	498
			pMIR- FRMD4B_2	ACTAGTCAAGACCTATTATTTTTTACATAGGTCAATAAACAAGGTGT GCTACTGAAAATGTTACGTTTTCTCCATTTATGTCAGGGGTTTCATGT GAAGCAGGTCGAGTCTACTTCAAGTAATCATATTGGGCAAGGCT TCGGATTTTTATTTATAGTATTACCGTATTTTAAATCCGGGATGTAC ATTTTTAAATATTTACATTAATAACATGGTTCATCTTTTTATTGATGGCAT ATTCTACTTGAATGGCAGTTTTTTCTTAATAGTACATTAATAAATGTC TGTTCTTACAATAAAGTTCCTTGAATGATGAAATGCGGTAGTTTG TCTCACTGAGGATGACTGGTGAAGACTTTTAGGTTTTTAATCTTGGGA ATGTTGTTTATTTGAGCAAGTAATTTATACTAATTCACAGACTGGCAA ACAGGTCTTCTAAATCAAGAAATTAGTTCTCTGACATCCGAGCTC	492
ST3GAL2	-0,660	NM_0069 27.4	pMIR- ST3GAL2	ACTAGTCTGGCTGAGGGAACAGGGACCGGCAGGGGACTTTGTTAGGG GAGGGTTGGGATGGGAGTGGGCCCTGAAAGTAAATATATTGGAAC CTAGTCGAGTGTGTTCTTTCCAATTCGAAAGTAGAAAGAGTAAAAA TAGGGGTGATTGGGGTGGGGTGTAGTAGAATGCCTCTCAGGGCGCT CCCCCTCCCCACCGTTTTAGAGAGCTAGGCCCTCAGCCAGTCTTGC CACTCCCATCTCAGTCTTCTGAAAGAGGCTGTTTTGAGTGTGATGA AAAGCAATGCAATTTATGCCAAACAGTATTGAGCAGAATAATTTATTTCTT TTTTTCTTTTTGCTTTAAATCATGAATCCCGCCAGGTACGGTGGCTCAC ACCTGTATCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCGGGCGGATTACTTA ATACTTAAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCTGGCCAATATGGTGAAC CTCGTCTTACCGAGCTC	497
SYNJ1	-0,657	NM_0038 95.3	pMIR- SYNJ1_1	ACTAGTCTTTAAAGATGTACATTGAGGGAATATCAAAAAATAGCGTTCA TGGCTACGAATATGTAGAATGTTAAAGCACAGCAAACCTGCACTGCAC TTATAAAGCAAATCTATTAGAAAAAAGCATTTTTCTAAATGCTCAATG TTATCAAAATACTATATTTATAGAAGTAATCTTCTCTGTAAACAGCCAAG ATTTGCTGTTAGAAATAACTCTGTGAGTTTTATATTGTCTTTTTGGAG GTTCTAATCATTTCAGCAGTAGCGTCTTAAACAGCAGTATTACTATAAG CAGTTGCTTCAAAATGTGAATTAACCTGTTGAAACTGTGGCTTTAACAT CCATGTGACAAGTGTATATGGTATTTGCTCTCCATTAGCAAATAATTC ATTGTTAGGTAACTTCACAAGTGCAAAATGCAGATCTGTGAGCAATGT TTCTATTGAATATAAACTACTGTCTAAAAATATACATATCAGCAGCCGA GCTC	496

## Anhang

			pMIR-SYNJ1_2	ACTAGTGCCTTTATCAGGAAAATTATACTTGCCAAGTTGCTGAAAATGC ACAAAATTATGAAAGTTAAAGGTATGCTGCAAAATACTAGCCATTATTC TATGTATTATTAATAATTTACAAGTTCTGTTAAAAGCAGAGCAGAAGTTA GACACTAAGGATCTCTTTGTGAAGCTGTGTTCTCTATATTAGATTGCT GTTTATATGTAAGAATTTTATTGCTTATGTGGCATAACAATTTTATAACT ATAAACTTTATAGAAGTACAGTATTAAGTCAGTGGTACACAGACATTC TGACATATCCTGTGAAACGTGCTGTCATATGAAATAAATATATCTGTC TTTACCATGAGCTC	359
LHFPL6	-0,642	NM_0057 80.3	pMIR-LHFPL6	ACTAGTAGGTTTAGTGGTGCAATTTCTCCTCTGTTTTCTTTTAAATATAC ATTTAAAATACAGTATTATCACTTTATAAAACATACATTAAGCCTAATAA ATGGACCAATAAGCCAAACTATCAGTATTTGTATATCCTGCATAAACT CTAATTTAGTTCCTCAACATATTTTCAGTGTTTATGCAGACCTTTAGAGT TAAGCCTTTGTATTTCATGTTATTCACAATATGCAATATTTCTCTGAG TAGCTTCTGCTATGATATTTCTTATGAAGAAAAGGGCAACTTTCTGTCC ACTATAGGAGAGAATTCAGCCGAAGATAGAGAGTAATGAGAGACATT TTCCAGTCATTGGATCGTGTTCCTTTGTCCATTATTGACTGTGCTGT ACCACTTTATTTCTATATTCAATTTGTAAAAAATTTAAAGTGCTATTTT GTTTGTATTGAAAATCTCTGTGAATAAATTTCTCTTTGATCGAGCTC	496
LRP1	-0,627	NM_0023 32.3	pMIR-LRP1	ACTAGTGCCTGCCCGTCCGACTGCCCCAGAAAAGCCTCCTGCCCC TGCCAGTGAAGTCCTTCAGTGAGCCCTCCCAGCCAGCCCTTCCC TGGCCCGCCGGATGTATAAATGTAATAATGAAGGAATTACATTTTATA TGTGAGCGAGCAAGCCGGCAAGCGAGCACAGTATTATTTCTCCATCCC CTCCCTGCCTGCTCCTTGGCACCCCATGCTGCCTTCAGGGAGACAG GCAGGGAGGGCTTGGGGCTGCACCTCCTACCCTCCCACCAGAACGCA CCCCACTGGGAGAGCTGGTGGTGCAGCCTTCCCTCCCTGTATAAGA CACTTTGCCAAGGCTCTCCCTCTCGCCCATCCCTGCTTGCCCGCTC CCACAGCTTCTGAGGGCTAATTCTGGGAAGGGAGAGTTCTTTGCTGC CCCTGTCTGGAAGACGTGGCTCTGGGTGAGTAGGCGGAAAGGATG GAGTGTATTAGTTCGAGCTC	495
CELF2	-0,621	NM_0010 25077.3	pMIR-CELF2	ACTAGTGATATGTATAGAAAAGTCATTTAAATTTATTTTCTACAAGCT AATTGAATCCAGGAGCAGCTTTAATTATAACACTAACGGAAGAGAAAA GAAGTATTTCAAGGGCTCAAATGGAAGCTGTACTCAGTCCGGTGAG GCAGGGGAGGTAAAGTTTCTCACACTCAAGTCGTCTTCATAGTTTAC TGTCCTTTTCCAAACAAAAGCTAATAACGCCATACGCATCCACACACT CCTCCTGGATGAACCTAAGTCTCGTCCCACTGTACCCCAAGGCCAG TTATCAAAAAGTGTCTTCTCTGCCCTCAAAGACTGAAGCCGACGGC CCTGTCTGCCCTGCTCAGGAATCTGATTGCTCTTAAAGTCTCTTAC AAGATTCCGTGATGTTTGTCCCTCTGTCTTATCTCTCTCCAGTAT TTTCAGACGCACAAGCTCTGACTCAGGCCACCCAGCACCTGGCAGCC TTCTCGAGCTC	497
JCAD	-0,621	NM_0208 48.4	pMIR-JCAD	ACTAGTGGAGTTTGGGACACTGGCTGTTGCCGGTGTTCAGCACATTT CAGTTTAGGGGAAATGTGAATCAATAGGTATGATCCATTTCTAATCAAT TTGGCCTTCTGCTGCTGGAAGTAACTTTACTTATAAGTAACTTGCCATC AGAGAATAAAAGCAATATCTTTAAGTTCCTGAAAAATTTAACTTGATC TGTAATACTAAGAGTATTATTTATCTGGCAGTGAATATTTTGATCAT TTGCCAACACGCCATTGTCTGCTTTGCACTCAGTATTATCTATTTTATT TTCTGTATGGGTATTAGAAATCTTTATATGAAAAATAATTGCTGGTTT AAAATAGACCATTTTAAACAAAGTACTATATTTCTTTTACGAAAATGCT ATTTTCTATGATGTAAACAATTGTTAGCGGCAGATTTTAAAGAAAGT ATTATTTTATTTAAGAGTCTGTATCCCTTTGTGTGAGAGGAACCCGAGC TC	496
MXD4	-0,618	NM_0064 54.3	pMIR-MXD4	ACTAGTCCCGTGCCTCTGCTCCTTGGCCTGCCTGCCCGCCAGCCA CGCGTGTGAGCCCTCCAGTTCTCCTTCAAGTTGACGCCAGCCTCTCCAC AGGCCACTGCTGTGCCATTCTGGAAGCTCCAGCTGCTGCTGGGCTG CCTGGCACTGCCCGCTTGGCGGTGAGGGCTGCCGAGCTGCCTGCC CCTTCCAGCTGGGCAGAGTCCCTGCAAGGAGGCAGGGCCAGCTTC CACATCCGAGCCCTGGTCCAGCATAGCCGCCACGGTCTGTCTCAG ATTCTAATCATTCCAGAAGTATTAACGTCATTGCTGCAAACTCCGGC AGGTGCCGTGTGAGGGGCTTAAAGACCACCACAGGGAaCTCAGACCC CAACCTGGATCCCAGGAGAAAGAGTGGACCCGAGGAAGGAAGGAA GGCAAGGCTGTCTGTCCATCCGTCCGTCTGTCCACCTACCTGTCACT CACATAGGCTCCTGGCGGAGCTC	495

## Anhang

LATS2	-0,618		pMIR-LATS2	ACTAGTCAGAGATAAACACAATATTCCTTATTTCAAATAGTATGATTCC TATTTAAAGTGATTTATATTTGAGTAAAAAGTTCAATTCCTTTTTGCTTTT TAAAAATCTGATGCTTCATAATTTTCATTATATTATCCACATATTTTTTC CTTGAAGTTCTTAGCATAATGTATCCATTACTTAGTATATATCTAGGCAA CAACACTTAGAAGTTTATCAGTGTAACTAAAAATAAAGATTCCTG TGACTGGTTACATTTGTGTGAGTGGCATACTCAAGTCTGCTGTGCCT GTCGTGACTGTCAGTATTCGCTATTTATAGTCGTGCCATGTTG TACTCACAGCGCTCTGACATACTTTCATGTGGTAGGTTCTTTCTCAGG AACTCAGTTAACTATTATTTATTGATATATCATTACCTTTGAAAAGCTT CTACTGGCACAATTTATTATTTAAATTTGAATCCGAGCTC	490
SNX30	-0,613	NM_0010 12994.2	pMIR-SNX30	ACTAGTCAAGAAAGTGAAGGCCATCACTAGGGTTGGCTTTGGGGAG GGGAAACTAAGACTGCTTTTGCCAAATGATATTTTATAATGTAAG GAAACACAGGGACCACAAAACCTTTTTTTTTTTTAAAGTGAAAGATT AGTGCCTTTTGGCATACTTTGATTTAGAGGATATAGTATCGGCATTG ACAAATCACGTAGAAAACAAAGAATGCTATAGATGACAAACAGTATTAAT GTTACTCCTGATTCTGCAGAACAGCTTTTGAAGATACTGGGGGTATC TTCAAGCCTCAGAGCAGCTTGTTCAGATAGAAATCTCTATGGGTTGA AATGCCAAAACAGAAAACATGATGTTGACTCATGTAATTTAGTCCATT TTAGCAGAGCCTTTAGTGTAAACACCAGTGGCGAGGAGCATTGATAT TCTCTGTCAGCAGCAGCACTCCACACCAGGTGTTCTGGGCTCTCTG TAGGCGAGCTC	497
VASH1	-0,610	NM_0149 09.5	pMIR-VASH1	ACTAGTGTGTCCTGGGCTCGCTCCAAGTGCAGGAACATACATGCAG GGCCCAACATGATGATGGTGTGAAGGGCAGGAAACAGTCTCTGAAG GAGTGGGGAGTGGGAGTCTGCCCCGCCAGTACCATCGCTCC TGCCAGCTTCTTAGACCAGGCAGGGCTGCCATGGTGTAGCTGCAA GTCCATCAGTATTGACCGTCTCGCTCCATCTTGGCTCCGGAGTCCC AAGTTTCCTTTTCATCAAATCTGACAAAGAGAGAAACATGGGTGTGC TTGGCCACAGGGCCTGGTGGTGTGATGGACCTCCCGCTCCCTCAAGC TCTGGATGGCTGCAGTGTGTACTAGACTTTGTTCCAGGCTGTTCTCATC TCAGTATTGCCCTTCTTTCACTTTCACACTTCATCTCATTCTGTGT CACTTTCCCGAAACGAATAAAGTCTCCCGAGCTCCTGCTGTGTAGGC TGGGCAGAAACCACGAGCTC	498
PPM1F	-0,606	NM_0146 34.4	pMIR-PPM1F	ACTAGTGTCTGTAGCAGCCACCCCTGCCCACTCCAGGGCAGC CATGATGTGCTTGGGCCACCAGGGCTTCCGGGCTGCTCTTTCCC TGAGCCCGAAACCGGCGACGCACATGTCTTTTGTGGTGTGTTGT TTTTTCCAGGGAGTCTAATCCGAAGCAGTATTCCAGGTTTTCTCTT TGTTTTATCAGTGCCAAAGATGACCTGTTGTGCATATAATTAAGCAGA GCTTAGCATTTATTTATCTTTAGAAACTTAAGTATTACTTTTTAAA GCTATTTTCAAGGAACCTTTTTTGCAGTATTATTGAATTTATTTCTAA ATCAGGATTGAAACAGGAACCTTTCCAGGTGGTGAATAAGCCATTCA AGTGCCCTACACAGCTTTGAAGAACTAGGACTGCAGTGGGCTCGGAT AGGCCATTGAGGTTTTAGAAAAGCAGGATTTGTTTTGTTAGGGAGG CATGGAGCTC	497
ARHGEF3	-0,602	NM_0011 28615.2	pMIR- ARHGEF3	ACTAGTCAGAAGCATGTGCACCTCGGGAAGCAGGCTGCATCTTACCT GTACAGTATTTGCATTCCACAGATGGAACGGTTTGGAGAAGCACTTTT CATACTTTTGTGAAAGTATACATGTTGGCCAGTCTCTCGTATCTGTAC CTTTGTCCCTAGTACTGTAAGTCCCAATCTGTCTGTGAAGCTGGAATC TGTGGCAACTATTACCCTGTGTTGATTTCCCAAGTGTCTGGATGGATG GAGAGGTAACAACAAGTACTTTTCAGTTGCTGCTGCTGGATTTAAAA AAATAGAAAAGAAATCTCAAACTACTGTTTACATAGATTGTTGAAGA GTCCCTCCTCTGTGCTTCTGTACCACTTTCCAGCTCTTAGATGTGGT AGCTAAAGGCACGGAATTTAGACGGCTTGTAAATAGGGCATGAGGAA CTCATCTGTGATTGGGATGGTATTAGAGAGAGAATCAGGAAAGACCA ACGAGCTC	496
CEP85L	-0,599	NM_0010 42475.3	pMIR- CEP85L_1	ACTAGTGGGATTTTGTGGGGAATTGAAACTAATAGTATTCTATAGT TTGTCAGTATTTACTTTTTGATTTTTATTTTCAGAAAATTTCCCTTTCCC AGGACACCCTCTTGATTAGAATATCCTCTCTGTATCACATTAACAAAC AGATTTACTGTAGACCAAATAAGATGGGCAAAATAGCAACTAGAGC ATCTACCCAGTTTGAAGTGGATGTTCTGTTGGAAGTTATGACACCAATA TATTCCTGAAATGAAAATTAACCTAAATTTAAAGTGAATCTATTTGAAA ATTTACTTAGATAATGAAACCTCGTTTTAATTGTGCTTTTTGTGAATCCA ACACTGTTTGTCTAGAAAAGTATCTTATCCAGTATTAATATTTTGTCTT TTGGGTTTTAAAGTTGAGCTTATTAGCCCTCAATCACATTACAGCAAGC ATAAAGTAACAGTTGACTCAATGAAAGACCCAAATGCTGGAGCTC	493

## Anhang

			pMIR-CEP85L_2	ACTAGTAGAAAAGTAAATGGCTTAATTTGAACTATTAATTTTCAGTGG CCTCTAATTAACAAAAACAAAAACCACAAACTGGCTAGGTAAGAT ATTCTGAGGTCATTTAAAAGAAGTGTGGCAGCTAGGATTCAATATTT AATGCTAACAGTATTATTTTAGTGAATTTATTTGGTGGTGACAGTT TATTAACCTAATTAGACTTCTTTCAATAGCTTGTGTAGAGACAATCTC AAGGGCTGAAAGTGTGCTAAAATGAATGTCATACATTTCTGATATAC TAAGGAGCTTATAAAGTAATTTTCATAGTGAAGAATTTAATTTCT TAGAGGATGTTTTAAAGGAGCTACTTAATGGGAAAAATGTTCTTAAA TATCAGTAATAGTTCATTAAGTAACATAGTAGCTAAGAACATGGACTAT ATTTTCGAGCTC	456
GARRE1	-0,598	NM_0146 86.5	pMIR-GARRE1	ACTAGTGAATTGAATGGTGGCTTAAATGAGAAATAATAAATATATCT ATATAGAATAGACATATCCCACTGTATTTAATTTGAGGTTACAGAAAGT TCTTTATATAAACTTATTTAAATTTTTCATATTTTCATCTTTGAAAAAGTC TGAGAAAAATCCATAATTTTTCTGGTATGAAAGTTTGACAGTATTAATA TTTTTTTTATATTTCTTAAATCATTAAACCATTTAATATATGTTAACTAC TAATAAATGGTTTTATTCTTTCTAACTCCATATAAGCTTTTCCAGCAAAGA TTGTAATAACACATTTATGTTCTCGTTTTCTACAGATAAAGTAAATTTA TATATAAAAAACAAAAAGAGGCTGGGCGTGGTGGCTCACGCCTGTA ATCCAGCACATTTGGGAGGCCGAGGCAGGTGGATCACCTAAGGTCAG GAGTTTCGAGACCAGCTGGCCAATATGGTGAACCCCATCTCTACGAG CTC	499
RAB8B	-0,598	NM_0165 30.3	pMIR-RAB8B_1	ACTAGTCATTTAGCTTTGCTAGATTGTATATACATTGAGCTAAGACCTTA GGAAATTCATTTCTGCATGATAAAATGACCCAATAAATATTCCACTTT GCTTAATAATGTACATACAGTGCATTTATTTTTCTATTTGTAGATGAATT TAATGACAGATAATTGTCTGTTCCCGCTGAAACTGAAGAAATCTAGTT TTTTGTGAACATTTTGTGGTCTTATGGATAAGGTACATGAAGATTTTT GCAGCAGTATTAGTGGTTCAGTGGCTGCACATTTAATCAGTGTGTTA ATTTTTGACAGTGATTGGACTAGACCTTTTCAATAGAGTCTGAGGGTA TCAGACAGTGAAGATGTGCTGTAAGTAAAGTAGCATGTAATCAGTTGAT TGAAAAACGTTTCGCTGGGAACCTTATTTTAGCTATATTTTACTTCAGACA GATTATGATACAATAATCTACCTGTGCATCAGTTAGGAGCTC	487
			pMIR-RAB8B_2	ACTAGTGTGCTGCAGGGTTTCTTACTATTTACAGAACATTTTGTGCAG TCTTTGTTATAAATTTTTCAGAAGACTATACTCTTTACTTTGAAGGTCTAT TTTTAATTATACCTCATTAGCTATCTAGTATTCTAATACCTGGTAGAA AAACAGTGAGCCAGCCTTTAAGCATCTAACAAAAATTTAGACTCTTTGTT TTGTTTTGAAGTGAAGACATCATTGGGAAAGGTAGGAAATATTAGTTTA GGATAGGCATACATGTCATATCCAGTAGCATAAAAAAGTATTATCTC CCTGTCTCCATTAATAAATTTAGCTGTGCAATATAGGTGCGTTTTTGA GAAGTTTCTAGTAAGAGATTATAACTCCATTTTACAGGTTCTGAATGCT CAGAGTCTATTAAGGCTTATAAAGTTTTTCTGTGATCAGTAAGTGA CACATTTAAGCAGACATTTTCAAGTTCATGACTTAGATTTCGAGCTC	492
NAP1L5	-0,597	NM_1537 57.4	pMIR-NAP1L5_1	ACTAGTGAAAAAGTGCATCTTTGAGACTTTGCTTTTGTAAACGCAGACAT CAGCTTTACACTTCACAGGAGATTGATGGCATTGAGGAAGATTGCAAT GGAGATCATGACACTACTGTTAATAAGGCCAGGAAACTGCCATTTCA AGTTCTGAAAAATGTTTTGAGTATTTGAATTTAGAGAAACAACATGGTT CCAAGAAGGAGGGTGTAAAACCTGTAAAATCTGTCAACATATGTATTC ATTAGTTACAATCTCATGTTTGTGTTTTCTTAGTACTGTCTATTTACAAA CACGTAAAAAATACCCCAAATATGTTTTAAGTATTAAATCATTACCTAG CGTTTTAGAAAATTAATTTACTTGAAGAGATGTAGAATGTAGCAAATTA TGTAAGCATGTGTATCCAGCGTTATGTACTTTGCGCCTTGTGACGCTCT TTCTGTCATGTAGCTTTAGGGTGTAGCTGTGAAAATCATCGAGCTC	489
			pMIR-NAP1L5_2	ACTAGTCTTCTCACTGAAGCTAATGTTTGGAAAAATATACTTGAAG AACCAATCCAAGTGTGTGCCCTACCCAGCTCAGAAGTAGAAAGG GTTAAGTTTGGCTTGTATTAGCTGTGCCCTCATTATTTGCTATGTAAT GTGACATATTAATTATAAATGGTGCATAATCAAAATTTACTGCTTGAGG ACAGATGCATACAGTAAGGATTTTAGGAAGAATATATTTAATGTAAG ACTCTTAGCTTCTGTGGTTTTGAATTTAGTGTGAGCCAGTGATCTA TAAAGAAACATAAGCTTAAAGTGTATTACTGTGGTGTAAATAAAACA GTATTTTCGAGCTC	358

## Anhang

SERINC1	-0,596	NM_0207 55.4	pMIR- SERINC1	ACTAGTGTGAGACTTCTAGCATGAAAGTCCCACCTTTGATTATTGCTTAT TTGAAAACAGTATTCCCAACTTTTGTAAAGTTGTGTATGTTTTGCTTCC CATGTAACCTCTCCAGTGTCTGGCATGAATTAGATTTTACTGCTTGTG ATTTTGTATTTTCTTACCAAGTGCATTGATATGTGAAGTAGAATGAAT GCAGAGGAAAAGTTTTATGAATATGGTATGAGTTAGTAAAGTGCCCA TTATTGGGCTTATTCTCTGCTCTATAGTTGTGAAATGAAGAGTAAAAAC AAATTTGTTTGACTATTTTAAATATATTAGACCTTAAAGCTGTTTTAGC AAGCATTAAAGCAAATGTATGGCTGCCTTTTGAATATTTGATGTGTG CCTGGCAGGATACTGCAAAGAACATGGTTTTTAAATTTATAAAACA AGTCACTTAAATGCCAGTTGTCTGAAAAATCTTATAAGGTTTTACCTT GGAGCTC	499
ZCCHC24	-0,582	NM_1533 67.4	pMIR- ZCCHC24	ACTAGTCAGGAGGCAAGAGAATATCAAAACAAGATTCTGGAAGTAT TTTGCCAACCTTCTGGTTGAGCTGCAAGAAAAATTTATGGTGAGAACT TTTCTGTTTCCCGTTATTGGGTTTTGGTTGGTTTTGTTGTTTTTAC TATGCTTTGGTCTGTAATAATATGCAACTGAACTACATTGAGAAGGAAA TATTGCTACATAGAATATTATATGAAGTTGGTACATAATTCTGATGAGG AAAAAAATCTTTGCAATCTTTAAGCCATATTGTTGTTTTCTGTGTG TTTTCCCTGGATGAAAAATCAGTATTAAGTAGACAGCATATTATCAA GTGTTTAGACTTATTAATATGTTCTTGTCTGTATTTATACATATGTGTA TTTTGAAAAGTATTGCCTTTTTAAAGGGAAGCTATAATTCGATACATAGT GAAAAAGGAATGGTGACCCCTTTGTGCTCTCCACTGAGGATAACG AGCTC	498
GIT2	-0,572	NM_0571 69.5	pMIR-GIT2	ACTAGTCAAGGGCAGGGCACCCTCTCTGTTTTCTAGGCTTTATAA AGTCCAATTTCAAATTCAGACGCAGAACTTTCAGATTTCTACAAAAAG AAACATTTAATGACGGTTTTAAAACCTTTTAAAAGAAAACCTCAGTATTAT TTTGCATGTTTTCTAACCAATTTTCAACTATTTAACCCACTTGCCTTATT TTGTGCCTATTGTGGTTAGTTTCTGATGTTCCGGTTGTGTTGTCAAC AACTGTTGAGTTGATCACATACATCCAAAAGTATAGTTTCATTGTCTAAA GTTTTGAAAACCTTTTCCATCCCTTAAAACCTCCCTGCTATGGCTGAAA CTATAAATGAAATTTTTCATAAAACATTTTCTTGAGAGAGTTCAAGTAAA AAAGAAAAATCAGCGTCATTTGTTCCCTGCCAAGCATCGTGAATAA GTGAATTTCTGGCTACTTCATAATCTCAAGTTTGGGGTATCTCCGA GCTC	496
CDK17	-0,571	NM_0025 95.5	pMIR-CDK17	ACTAGTGAATATGTCTTTGAAATGAGCCATGATAAATACAAACAAGA GAAATGAGAACTTACAGATTGCTTAAAATATTGTGGGTATTATCTGT TTACCAGAGATACTAAATATTAGTTTTAATTATGCATCTCTTTGAACATC ATAAACACACTTTGGTGTGGTAAACAGTATTTTAAAGCATTTTTGTTCACT TTTAAAGACTATTTGTTAGTGCATCTTACAACTATAAATCTTAATTGG TATATTTGAAATGGTCGTGATAATTTTGGCTTATATATCATGAAAAATA GTCATAACTTAATTTCTTTTCTGAAATTCAGTGAACATTGAGGGGT CCTACCATTTCTGTTGAGGAAATCTTGTAGTTTATTGTTGTTATTTAACA GTATTAAGTGGATTTTGTATATTTCAATTTAACTTTATTGTAATAGTG ATTGTGCATGTTTGGGGTGTATTTTAAATTTTACGATACGAGCTC	497
CITED2	-0,568	NM_0060 79.5	pMIR-CITED2	ACTAGTCCCATATGTACAGATGATAATAGGGTGTGGAATGTCGTCACT GGCAAACATTTACAGATTTTTATTTGTTTCTGTCTTCAACATTTTTGA CACTGTGCTAATAGTTATATTAGTACATGAAAAGATACTACTGTGTTG AAAGCTTTTTAGGAAAATTTGACAGTATTTTGTACAAAACATTTTTTTG AAAAATACTTTGTTAATTTATTCTATTTTAAATTTGCCAATGTCAATAAAAA GTTAAGAAATAACTTGTTTTCTAGAAGTCAATTTGGGGGTGTTGTTCC TTTGGTGGCTTTTTCCCGCTCTTGTGTTGAACTATTGATGAGA GTAAGCATTCCAAAGGATAAATTACAGGACACTAAAAACAGGTATGAT GAGCTTAAGCGGAGAGCAGGATTTAACATAATTGGCATAATGCTTCATT GTTATCATTGAAACATGCCTCTTGGTGTGCTTTAATCAAAAGCTGGAGC TC	494
PALM2AKAP2	-0,562	NM_0072 03.5	pMIR- PALM2AKAP2	ACTAGTGTACAAATCCTAAAGATGGGGTGTGTGGATGTGTGTGTG TGTGTGTGTACACCATTGTGTGTTTGTAAATGTGTATGTTTCATGAGTA AGGGTGTGTGTGTGTGTATTAAAAATCCAGAGTGACCGTGGCACTT GGGTGTACAGGTAATCCTCCAGAGCTGTTTGTGCTGCTTCCAGGAGTGG AGTGAGAAATTTCTTTTTATGAAAAGGATATAAAGGCACCAGCTGAT GCAGTATTTGTAATATTAAGTTGACCTAACAGGATTTGATGATGAGTCA CAATTACAAAGTTTTGAGCGTTTTGTAATTTGACATTTAGGAGAGTCT CCTATTTATCTCATACTTACATTCATGCTTATGATATACTATAGAGGATG CCAGCTTAAATCTTCTGTCAATTAAGCAATATGATAAGGGTATTCAAT AATTGGGTGCCCTAAATTTCTGGATGAGAAAAATTTCAATTTGTCAT GAGGAGCTC	498

## Anhang

SCHIP1	-0,555	NM_0145 75.4	pMIR-SCHIP1	ACTAGTCAGAGAACAAGCTAGAATTTATTTTGCCTTCTGTGGTTGTAAAA ATGCTGTTGCTAAAGGTGGCCGAGAAACAAATATCAGTGTAGTCATT GATAATGTCTGAAGCTTAATGTCAGTGATTGGCCTTTGCTCTTAATT TATTTTAATTTTTACTTGTGCCACTTAATATCAGGCATTTTAATAAAATA TTGTTACAAAAATGTACAGTACTGACACCACCACAAATCATGGTTAAT AAAAGAGAGTAGTTTTAACTTTATTTTATTTGTTTAGAGATTTAAGTT GGAACAGTATTTCCCATGACTACTTTTCATTCTCAGTGTAGTTTTAA AGAAGAACTGTAATGACGGTGCTATACAAGTCAAAAAATACATGCCT GCCTCGTAGTGAAGTTGTAGCTCTCCGTAATATGTATATTTTACTCAGT TTTCAACATTTTGTGAATGTTGACTACCTGAAGTTCCTTTTTAGATGGA GCTC	496
HIPK3	-0,553	NM_0057 34.5	pMIR- HIPK3_1	ACTAGTGTGAAACTGCAATACAATCTAAGTTTATTTGAGAGTGTTC TGATAATTGGACTTAATAAAATGTTTAGAGGTACAGTAGGCATTGACTT TGGGTAGATAATAAAATGCAAAATGCTCATTGATTCATGATGGTTTT ATCTTAGCTTGGGCAAACCATGCAGTATTTAATAAATAGTAGCAGAACT TTTACTATTGAAGCTTGAAAAGATGTGAGTCTTTGTGTGCAATTTTGA TTTATGCATGTGAGAGGGTTTTTTTTTTTTTAAAGTATTTTACATTGCA GTACTTGTTCCTGTTGGTGATGTTGCTTATTTAATACATTCCTGCA GGGACAGAAATACATGCTTTTTTCTTTCTAGGAAGTGTGTTGAGTT CCCCCTTCCCGACATTTTTTCTTTTTGGGTGGTGTGATGGTAGT GGTTATGCTGTTTAAATGAAGTTGCTTTTACAGCACCAAAGCAGACT C	494
			pMIR- HIPK3_2	ACTAGTGAAAAAATGCATTTGTTACTTTGGGGTGTGTTATTTGCATC AGTATTTTATCTCTATTAATGTTTGTGCTCATCACTGCATATTAAAAA CTTGGATGTATCAGTGTAACTTAATTTTTATTTTCACTGGCATTGTA GACACTTGAGAAAGCTGTATCTTGCAGGCTGACTTAACTTTTTTCCTT AAAACTCGGAATATAATCTTACAGCATTTACTGGAATAAACAGTACAA AGCATTGGAGTGAAAACTCTAGATGTTTTGGATTTACAGCGTTTCTTT GATAAATGAATTGTATACCCTTGTACAGCTCTAGTACAGCGTTACAAA TAAGCTAATAATGGATAAGTTTTCTTCACTCCATTAACACAAGCAGTGT TTTATTTAATAATCATCAATGAAATAAATGTCCTGAAATTGATTTTAAA AATTACAGTATTAGATCATAAAGTAAAAACCAGCAGTACATTTTAGGA GCTC	497
			pMIR- HIPK3_3	ACTAGTCCTAAGATTAATTTAAAAGATTATTTACAGATGACACATTTATG GGGTCATATTTAAGTAAATTTGCTGCCCTCCACAGCCTTCTAATTTTA TTTATATGTTCCAGCAGATTATTAGGATCTGCTTACTTCTTAGGAAAGA ATCAATGCTGGCAACACATTGTTTCAGAAACCCAAGTCAAAGGATT GATTGTATCACAAACAGGTACAAAACACTGACAGATTTTCTTTTGTAG GGCCATGTTACTACCCTGAAATGTTGATTTTTGTCTTTAATTTCCAA GACTTAAAGCAGTCTTGTTAAATTGACATAAATGGTAAACTTCAACATTT TCATAATACAGTATTAATGTTTGATAAAGGTATATCCCAGTTAACTACAC TGCTTTAATGCAATCATGGGCATTTAATGTATTTTAAAATAAATTT CAAAATTCGCTAAATCTTAATTTAGCATATTGACAAAGTAATCTGGGA GCTC	499
RAPGEF2	-0,550	NM_0013 51724.5	pMIR- RAPGEF2	ACTAGTCAATGAAATCCTTTGAGTACAGTCTTGTCCACTTGTTCACAA TGCTCCTCTTTAAAAAATAAATGAGTTTAAAGATTTTGTTCAGAGAG TAAATATATCCATTTAATGATTACAGTATTATTTAAACCTTAAGTAG GGTTGCCAGCCTGGTTTCTGAAAACCAAATATGCCGGACAGGGTGTG GCCACACCAAGAAGACGGGAAGACCTGGCTTGTGACCCTGGCTTCCC ATGTCCTTCTGGTCTCACCCGCGAAGTCCCCTATCCTGGAAGTATGAA ATGTTAGCCAAATTAACCAAGACACCTCATCTGCTCCTTCCCAGTGG ATGGGGTTCTTCTGTAACACTGTTTGCACATGGCCAGGGGAGGGA AGGACCCTTGTGCTCTGTGAGCCTTATGGAGGCAGGACGGTGTCA TTGGCGGATGTGCTCCTGCTCCATTGAGATGGATGGCAAACCCATTTT TAAGGAGCTC	494