

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

**Herstellung von Vektoren zur Ko-Expression
fluoreszierender Proteine und miRNAs in
eukaryotischen Zellen**

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

vorgelegt von:
Tobias Schreiber
Geb. am 02.06.1992
In Speyer

Tag der Promotion:

04.11.2020

Dekan:

Univ-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter:

Prof. Dr. Friedrich Grässer

Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

Danksagung

Die Experimente dieser Arbeit wurden im Universitätsklinikum des Saarlandes, Standort Homburg durchgeführt.

Meinen besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Friedrich Grässer richten, für seine ständige Diskussionsbereitschaft, sein Engagement für dieses Projekt und sein Durchhaltevermögen. Durch dessen Humor und das angenehme Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe waren selbst gescheiterte Experimente bald vergessen.

Für die Betreuung im Labor gilt Frau Dr. rer. nat. Jennifer Menegatti mein besonderer Dank. Nur durch Ihre große Hilfsbereitschaft und unermüdliche Geduld konnte dies ermöglicht werden. Mit Zeit und Ratschlägen hast du nie gespart. Ohne deine vielen Ideen wäre dieses Projekt nie möglich gewesen.

Frau Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim danke ich für die offizielle Übernahme der Betreuung.

Auch bei Herrn Dr. rer. nat. Hiresch Ayoubian möchte ich mich dafür bedanken, dass er immer ein offenes Ohr hatte, seine Erfahrung mit mir teilte und Hilfe bei Problemen jeder Art wusste. Danke für deine zahlreichen Tipps.

Frau Ruth Nord widme ich meinen Dank für Ihre unbezahlbaren Hilfestellungen, der guten Laune und der guten Atmosphäre im Labor, zu der sie einen ganz wesentlichen Beitrag lieferte.

Auch Frau Manuela Mader möchte ich meinen Dank für die Erstellung des Vektors pSG5-GFP aussprechen, der im Rahmen dieser Doktorarbeit für weitere Klonierungsexperimente genutzt wurde.

Ich möchte mich auch bei allen weiteren Mitarbeitern der Virologie und Humangenetik für die gute Zeit bedanken. Es war toll mit euch zusammenzuarbeiten.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinem Bruder, Dominik Schreiber, für dessen Unterstützung und seinen hilfreichen Ratschlägen herzlich danken. Du hast mir in den Momenten geholfen, als ich dich wirklich brauchte.

Meiner Mutter und meiner restlichen Familie danke ich für alle aufmunternden Worte, der Kraft und der Motivation, die ihr mir unermüdlich gegeben habt. Ich könnte mir keine bessere Familie wünschen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
1 Abkürzungsverzeichnis	VI
2 Zusammenfassung	1
3 Summary	2
4 Einleitung	3
4.1 Eigenschaften von microRNAs und deren Funktion in der posttranskriptionellen Genregulation	5
4.2 Das diffus großzellige B-Zell Lymphom	7
4.3 Die Funktion der miR-142	9
4.4 Die Funktion der miR-34a	10
4.5 Die Funktion der miR-200c	12
5 Zielsetzung der Arbeit	13
6 Material und Methoden	15
6.1 Materialien	15
6.1.1 Geräte	15
6.1.2 Chemikalien	16
6.2 Puffer und Lösungen	17
6.3 Membranen, Filter und Säulen	23
6.4 Enzyme	23
6.5 Zelllinien	23
6.5.1 293T-Zelllinie	23
6.6 Medium für Zellkulturen	24
6.6.1 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	24
6.7 Bakterien	24
6.7.1 <i>E. coli</i> DH5α Bakterien	24
6.7.2 Medium für Bakterien	24
6.8 Vektoren	25
6.8.1 Der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)	25
6.8.2 Der Vektor pSG5	26

6.9	Marker	27
6.9.1	“DNA Ladder“	27
6.9.2	“Protein Standard Ladder“	28
6.10	Antikörper und Primer	29
6.10.1	Primäre Antikörper	29
6.10.2	Sekundäre Antikörper	29
6.10.3	Primer für die Klonierung	30
6.10.4	Primer für die Sequenzierung	30
6.11	Bakterielle Zellkultur	31
6.11.1	Aufzucht und Lagerung von Bakterien	31
6.11.2	Herstellung kompetenter Bakterien	31
6.11.3	Transformation kompetenter Bakterien	32
6.11.4	Colony-PCR	32
6.12	Eukaryotische Zellkultur	33
6.12.1	Kultivierung von adhärennten Monolayer Zellkulturen	33
6.12.2	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Calciumphosphatmethode	33
6.12.3	Transfektion eukaryotischer Zellen mit PolyFect (Qiagen)	34
6.13	DNA-Techniken	35
6.13.1	Präparative Plasmid-Isolation mittels NucleoBond-Kit	35
6.13.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung	36
6.13.3	Polymerase-Kettenreaktion	36
6.13.4	Agarosegelelektrophorese	38
6.13.5	NucleoSpin-Gelextraktion von DNA	39
6.13.6	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	40
6.13.7	Dephosphorylierung von Vektor DNA	41
6.13.8	Ligation von DNA Fragmenten	41
6.14	RNA-Techniken	42
6.14.1	RNA-Isolation	42
6.14.2	Northern Blot	43
6.14.3	Herstellung des Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese	43
6.14.4	RNA Transfer	44
6.14.5	Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde	44
6.14.6	Spezifischer Nachweis von RNA	45

6.15	Protein Techniken	45
6.15.1	Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen unter reduzierenden Bedingungen	45
6.15.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	46
6.15.3	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	47
6.15.4	Western Blot	47
6.15.5	Fluoreszenzmikroskopie	49
7	Ergebnisse	50
7.1	Erstellung des Ko-Expressionsvektors pSG5-GFP-miR-34a	51
7.1.1	PCR der pre-miR-34a des pSG5-miR-34a	51
7.1.2	Erstellung der Ko-Expressionsvektoren pSG5-GFP-miR-34a durch Klonierung	52
7.1.3	Sequenzierung des relevanten Bereichs innerhalb des Vektors pSG5-GFP-miR-34a	53
7.1.4	Nachweis der eGFP Expression im Vektor pSG5-GFP-miR-34a durch Western Blot	54
7.1.5	Nachweis der miR-34a Expression durch den Vektor pSG5-GFP-miR-34a durch Northern Blot	56
7.2	Erstellung des Ko-Expressionsvektors pSG5-GFP-miR-200c	58
7.2.1.	PCR der pre-miR-200c des pSG5-miR-200c	58
7.2.2	Erstellung der Ko-Expressionsvektoren pSG5-GFP-miR-200c durch Klonierung	59
7.2.3	Sequenzierung des relevanten Bereichs innerhalb des Vektors pSG5-GFP-miR-200c	60
7.2.4	Nachweis der eGFP Expression im Vektor pSG5-GFP-miR-200c durch Western Blot	60
7.3	Erstellung der Ko-Expressionsvektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3	62
7.3.1	PCR der pre-miR-142 des pSG5-miR-142, pSG5-miR-142-mut2 und pSG5-miR-142-mut3	62
7.3.2	Erstellung der Ko-Expressionsvektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 durch Klonierung	64

7.3.3	Sequenzierung der relevanten Bereiche innerhalb der Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3	66
7.3.4	Nachweis der eGFP-Expression durch die Vektoren pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 mittels Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie	66
7.3.5	Nachweis der miR-142 Expression durch die Vektoren pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 mittels Northern Blot	71
8	Diskussion	76
8.1	MicroRNAs und Karzinogenese	76
8.2	Einfluss der miR-34a auf den Tumorsuppressor P53 und die Krebsentstehung	79
8.3	Weitere “targets“ der miR-34a	81
8.4	Einfluss der miR-142 auf die Krebsentstehung	82
8.5	Weitere “targets“ der miR-142	84
8.6	Funktion der miR-142 im Immunsystem	86
8.7	Ergebnisdiskussion	88
8.8	Ausblick	90
9	Tabellenverzeichnis	91
10	Abbildungsverzeichnis	92
11	Anhang	93
12	Curriculum vitae	106
13	Literaturverzeichnis	107

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.....	Abbildung
A.....	Adenin
a.e.....	am ehesten
BF.....	engl. bright field
bp.....	Basenpaare
BZRAP1.....	engl. Benzodiazepin Rezeptor Associated Protein 1
bzw.....	beziehungsweise
C.....	Cytosin
ca.....	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CLL.....	chronisch lymphatische Leukämie
CR.....	komplette Remission
dest.....	destilliert
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DGCR.....	engl. Di-George-critical-region
DLBCL.....	diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DMEM.....	engl. Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP.....	engl. enhanced green fluorescent protein
engl.....	englisch
FKS.....	fetales Kälberserum
Fa.....	Firma
FOXP1.....	forkhead box transcription factor 1
ggf.....	gegebenenfalls
GTP.....	Guanintriphosphat
G.....	Guanin
HEK.....	engl. Human Embryonic Kidney
IL.....	Interleukin
kDa.....	Kilodalton
kb.....	Kilobasen
LB.....	engl. lysogeny broth
LDL.....	engl. low-density-lipoprotein
M.....	molare
MCMV.....	murines Cytomegalievirus

Abkürzungsverzeichnis

MCS.....	<i>engl. multiple cloning site</i>
MgCl ₂	<i>Magnesiumchlorid</i>
miR.....	<i>micro-RNA</i>
miRNA.....	<i>micro-RNA</i>
MM.....	<i>Multiples Myelom</i>
MPS.....	<i>mononukleäre Phagozytensystem</i>
NB.....	<i>Northern Blot</i>
neb.....	<i>new England biolabs®</i>
NHL.....	<i>Non-Hodgkin-Lymphom</i>
NK-Zellen.....	<i>natürliche Killerzellen</i>
OD.....	<i>optische Dichte</i>
PAGE.....	<i>engl. Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
PCR.....	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
Pde3b.....	<i>Phosphodiesterase-3b</i>
pre-miR.....	<i>engl. precursor micro-RNA</i>
pri-miRNA.....	<i>engl. primary micro-RNA</i>
RbCl.....	<i>Rubidiumchlorid</i>
RBM3.....	<i>engl. RNA-binding-motif 3</i>
RISC.....	<i>engl. RNA-induced-silencing-complex</i>
RNA.....	<i>Ribonukleinsäure</i>
Rpm.....	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
RT.....	<i>Raumtemperatur</i>
s.....	<i>siehe</i>
SB.....	<i>Sample-Buffer</i>
SDS.....	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SOB.....	<i>Super Optimal Broth</i>
sog.....	<i>sogenannte</i>
T.....	<i>Thymin</i>
Tab.....	<i>Tabelle</i>
Tregs.....	<i>regulatorische T-Zellen</i>
U.....	<i>Uracil</i>
u.a.....	<i>unter anderem</i>
WB.....	<i>Western Blot</i>
wt.....	<i>Wildtyp</i>
z.B.....	<i>zum Beispiel</i>

2 Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nicht kodierende RNAs, welche die Proteintranslation posttranskriptionell regulieren. Ausgangspunkt der Arbeit war der Befund, dass die miR-142 in ca. 20% aller diffus großzelligen B-Zell Lymphome (DLBCL) durch Mutationen verändert vorliegt (Kwanhian et al., 2012). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden fluoreszierende Proteine und miRNAs in eukaryotischen Zellen ko-exprimiert. Bei den miRNAs handelte es sich um die miR-142-wt, eine miR-142-3p und eine miR-142-5p Mutante sowie die miR-34a. Der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-) wurde zur Klonierung der miR-142 und deren Mutanten verwendet. In einem ersten Schritt wurde eGFP in die MCS zwischen die Schnittstellen für XbaI und HindIII kloniert, sodass das Produkt pcDNA3.1/Hygro(-)GFP entstand. Dieser Klonierungsschritt wurde auch für mCherry durchgeführt, sodass auch der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)mCherry durch Klonierung gebildet wurde. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließ sich in transfizierten Zellen eine deutliche Überexpression der Fluoreszenzproteine nachweisen. Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung. Die folgenden Experimente wurden nur für den Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP durchgeführt. In weiteren Schritten wurde die precursor-Sequenz der miR-142-wt, der miR-142-mut2 (3p-Mutante) und miR-142-mut3 (5p-Mutante) durch PCR amplifiziert und zwischen die Schnittstellen für BamHI und XhoI an das 3' Ende der eGFP-Sequenz in den Vektor inseriert. Kontrollen mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigten, dass eGFP weiterhin überexprimiert wurde, was ebenfalls durch Western Blot bestätigt wurde. Im Northern Blot war sowohl die reife miR-142 als auch die pre-miR-142 sichtbar, sowohl der Mutante 2, 3 als auch der miR-142-wt.

Zusätzlich wurde die miR-34a und miR-200c in den Vektor pSG5-GFP kloniert. Hierbei wurden die gleichen Methoden angewendet wie oben beschrieben. Zuletzt wurde eine deutliche Überexpression der miR-34a im Northern Blot bestätigt. Bei den Experimenten wurde mittels Western Blot die Expression von eGFP, mittels Northern Blot die Anwesenheit der miRNA und durch Sequenzierung die korrekte DNA-Sequenz ermittelt.

3 Summary

MicroRNAs (miRNAs) are short, non-coding RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression. The basis for this work was the finding that miR-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) (Kwanhian et al., 2012). In this thesis, vectors were generated to achieve the co-expression of fluorescent proteins and miRNAs in eukaryotic cells. The miRNAs of interest were miR-142-wt, one miR-142-3p mutant and one miR-142-5p mutant as well as miR-34a. For the miR-142 experiments, the vector pcDNA3.1/Hygro(-) was used. First, the eGFP gene was cloned into the MCS of pcDNA3.1/Hygro(-) between the restriction sites XbaI and HindIII. The cloning resulted in the product pcDNA3.1/Hygro(-)GFP. Analogously mCherry was cloned building the vector pcDNA3.1/Hygro(-)mCherry. Using fluorescence microscopy, the expression of eGFP and mCherry in eukaryotic cells was shown. The following experiments were only done with the vector pcDNA3.1/Hygro(-)GFP. The precursor for miR-142-wt, miR-142-mut2 (3p-mutant) and miR-142-mut3 (5p-mutant) were amplified by PCR and inserted directly behind the 3' end of the coding sequence of the gene eGFP between the BamHI and XhoI restriction sites. The expression of eGFP was verified by fluorescence microscopy and by Western blot. Expression of the miR-142-wt, miR-142-mut2, miR-142-mut3 as well as the corresponding precursor RNAs was shown by Northern blotting.

Another series of experiments were done cloning the miR-34a and the miR-200c into the vector pSG5-GFP. The same methods were applied as described above. The expression of miR-34a was demonstrated by Northern blot. In addition, western blots were carried out to show the expression of the eGFP-Protein. The correct sequence of the inserted miRNA was determined by sequencing.

4 Einleitung

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Klonierung von microRNAs in einen Expressionsvektor und deren Ko-Expression mit Fluoreszenzproteinen. MicroRNAs sind kleine 18-25 Nucleotid-lange, nicht-codierende Ribonukleinsäuren, die durch komplementäre Bindung an die 3'UTR diverser mRNAs einen entscheidenden Einfluss auf die posttranskriptionelle Genregulation besitzen (Liao et al., 2014). Viele Entwicklungs-, Differenzierungs- und Proliferationsprozesse werden von diesen kleinen RNAs gesteuert (Hwang und Mendell, 2006). Im Jahr 1993 entdeckten Lee et al. (1993) die erste microRNA, lin-4 und deren Bedeutung für die ontogenetische Entwicklung von *C. elegans* (Lee et al., 1993). Fehlregulierte microRNAs konnten mit diversen Tumoren, u. a. dem Colon- und dem Mamakarzinom, aber auch Lymphomen assoziiert werden.

Die Basis dieser Dissertation stellt das Paper „MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma“ von (Kwanhian et al., 2012) dar. Es konnte in dieser Publikation erstmals gezeigt werden, dass ca. 20 % aller DLBCL Proben Mutationen in der miR-142 aufweisen. Die Aufarbeitung zeigte in 11 von 56 DLBCL Proben Mutationen. Hiervon war sowohl die reife miR-142-3p als auch die reife miR-142-5p betroffen. Des Weiteren wurden Mutationen in der „precursor“ Sequenz gefunden. Diese Erkenntnisse wurden von (Hezaveh et al., 2016) bekräftigt. Sie konnte in 5 von 40 DLBCL Proben Mutationen der miR-142 finden. Auch in fast 10 Prozent der untersuchten Proben von folliculären Lymphomen wurden Mutationen in der Sequenz der miR-142 gefunden. Dies führte zur Schlussfolgerung, dass die miR-142 eine wesentliche Bedeutung für die Lymphomentstehung besitzt (Hezaveh et al., 2016). Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines Klonierungsvektors zur Transfektion eukaryotischer Zellen mit den miR-142 Mutanten und dem miR-142 Wildtyp. Im Speziellen wurden der Wildtyp, eine 3p- Mutante, im Folgenden als miR-142-mut2 und eine 5p-Mutante, im Folgenden als miR-142-mut3 bezeichnet, in den Vektor pcDNA3.1/Hygro(-) kloniert. Dieser Vektor eignet sich hervorragend zur Selektion eukaryotischer Zellen mit Hilfe des Antibiotikaresistenzgens gegen Hygromycin. Des Weiteren besitzt er die notwendigen Sequenzen zur Expression in eukaryotischen Zellen. Zur optischen Selektion positiver Klone mittels Fluoreszenz wurden zuerst GFP und mCherry eingefügt und die Expression mikroskopisch in der 293T-Zelllinie bestätigt und durch Sequenzierung verifiziert. Darüber hinaus wurde die Modifikation mit eGFP noch im Western Blot nachgewiesen. Nach Klonierung des Fluoreszenzproteins folgte die miR-142-wt, die miR-142-3p und miR-142-5p Mutanten. Anschließend wurde der Vektor sequenziert und die RNA Expression durch Northern Blot bestätigt.

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich zudem mit der miR-200c und der miR-34a. Die miR-34a ist von besonderer wissenschaftlicher Bedeutung, da sie direkt P53 vermittelt reguliert wird. Die 3 Vertreter der miR-34 Familie zeigen sogar die höchste P53 vermittelte Induzierbarkeit aller miRNAs (Hermeking, 2007). *p53* ist eines der am häufigsten mutierten Gene in humanen Krebszellen (Rokavec et al., 2014). Über die *p53*-Kaskade ist die miR-34a an der Apoptose bei Zellstress, genetischen Schäden oder Chromosomenaberrationen beteiligt (Chen und Hu, 2012). In vielen Tumoren führt eine Deletion oder die Methylierung der CpG-Region zur funktionellen Inaktivität oder zur Transkriptionsrepression des Gens *p53* (Adams et al., 2016). Die miR-34a und miR-200c wurden in den Vektor pSG5-GFP kloniert. Die Klonierung erfolgte analog zur Klonierung der miR-142. Hierbei wurden die microRNAs an das 3' Ende der Sequenz des Fluoreszenzproteins direkt nach dem stop codon des Gens GFP in den Vektor eingefügt.

4.1 Eigenschaften von microRNAs und deren Funktion in der posttranskriptionellen Genregulation

MicroRNAs sind kleine, nicht-kodierende, einzelsträngige 18-25 Nukleotid lange Ribonukleinsäuren (He und Hannon, 2004), die sequenzspezifisch durch komplementäre Basenpaarung an die 3'UTR einer mRNA, in seltenen Fällen an die codierende Region der mRNA binden. miRNAs durchlaufen eine Reihe von Reifungsprozessen, die als Prozessierung bezeichnet werden. Das Primärtranskript, die sogenannte pri-miRNA, kann eine Länge von 500 bis zu mehreren tausend Nukleotiden aufweisen (Kim, 2005). Diese besitzen, vergleichbar mit mRNAs, einen Poly-A Schwanz am 3' Ende, eine Cap Struktur am 5' Ende, aber im Unterschied zu vielen anderen kleinen RNA Molekülen eine charakteristische Haarnadelstruktur. Das im Nukleus lokalisierte Enzym Drosha schneidet die beiden Überhänge der pri-miRNA ab und bildet die pre-miRNA mit einer Länge von 60-70 bp. Entscheidend hierbei sind die RNase III Domänen und die RNA-Bindungsdomäne, was in seiner Gesamtheit den Mikroprozessorkomplex ausmacht und mit Hilfe des Cofaktors DGCR8 die pri-miRNA schneidet. Die entstandene pre-miRNA mit ihrer charakteristischen "stem-loop" Konformation wird nun durch Exportin 5, einem RAN-GTP abhängigen Exporter, aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert, wo der letzte Reifungsschritt erfolgt (Leisegang et al., 2012). Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch das Enzym Dicer, einer weiteren RNase III, auf die Länge der reifen miRNA (18-25 Nukleotide) geschnitten. Die reife miRNA übt ihre Funktion in einem als RISC (RNA-induced-silencing-complex) bezeichneten Effektorcomplex aus. Eine herausragende Rolle im RISC bildet das Ago2 Protein, das den enzymatischen Abbau der mRNA bewerkstelligt. Neueste Untersuchungen ergaben, dass nicht die Menge an miRNAs in einer Zelle deren funktionelle Aktivität bestimmt, sondern die Assoziation der miRNAs zum Ago-Komplex. miRNAs sind stabile Ribonukleinsäuren, deren „Ago-Assoziation“ ein wesentlicher Schritt zur Inhibition einer mRNA darstellt (Ayoubian et al., 2019). Der RISC wird durch mindestens ein Ago-Protein gebildet und somit bestimmt auch die Beladung des RISCs mit der speziellen miRNA deren inhibitorisches Potenzial (Flores et al., 2014). Dies wird unter anderem durch die Komplementarität einer miRNA und deren "target" beeinflusst. Je mehr mRNAs sich in der Zelle befinden und desto höher deren Komplementarität ist, desto stärker ist die Ago-Assoziation der entsprechenden miRNAs. Der Großteil der in einer Zelle vorkommenden miRNAs ist nicht an Ago gebunden und somit inaktiv. Bei kompletter Komplementarität der "seed"-Region und der 3'UTR erfolgt eine Degradierung durch Ago2 oder bei inkompletter Komplementarität eine Inhibition der Translation. Man geht heutzutage davon aus, dass der Mechanismus der Inhibition im Tierreich überwiegt. Durch diese

repressiven Einflüsse kann die Zelle auch auf posttranskriptioneller Ebene die Proteinbiosynthese regulieren (Lee et al., 1993).

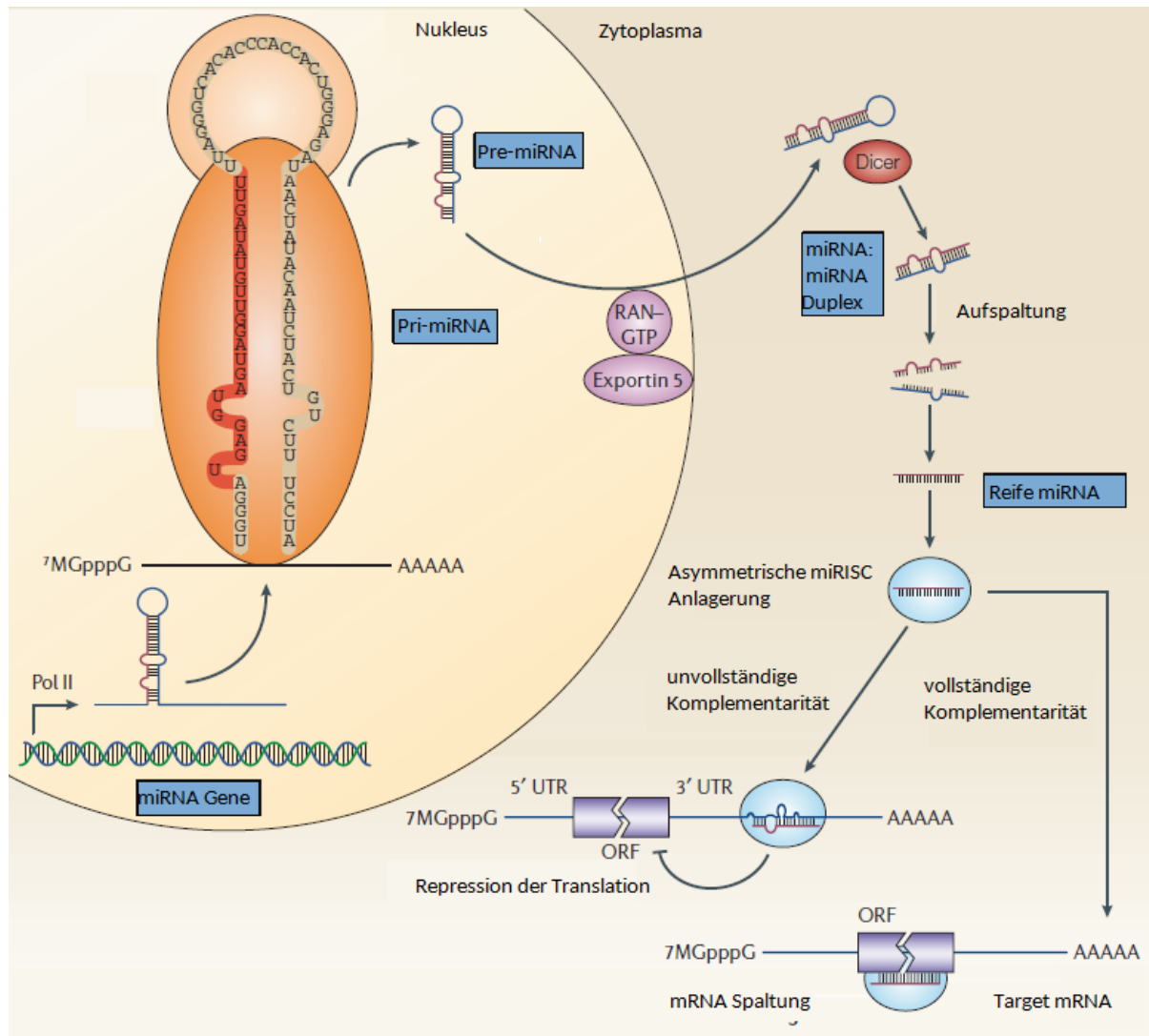


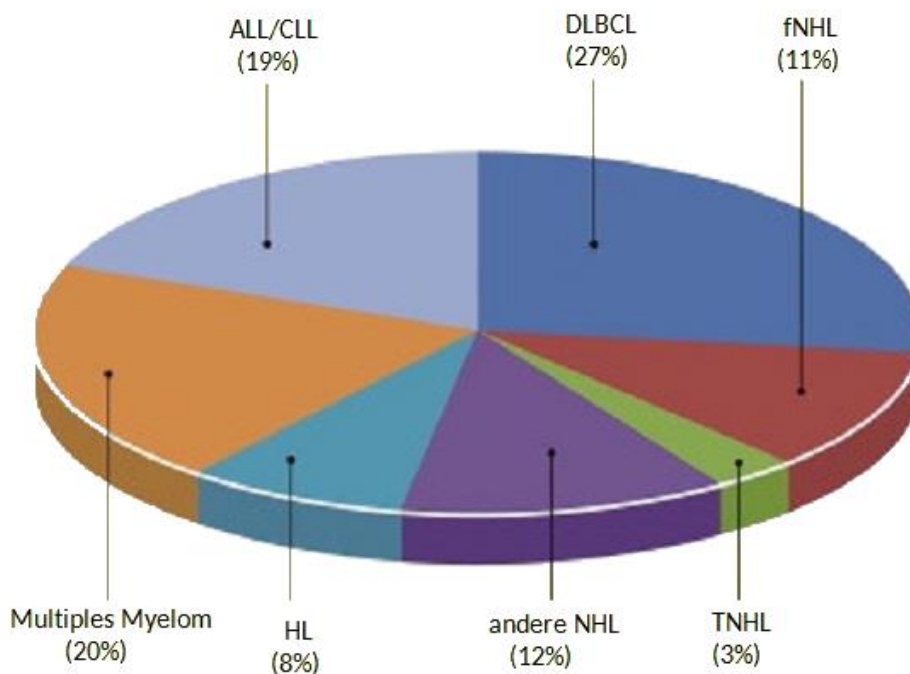
Abbildung (Abb.) 1: miRNA Prozessierung und die miRNA-vermittelte Genregulation; verändert nach (Esquela-Kerscher und Slack, 2006): Die RNA-Polymerase II bildet die primary-miRNA, die noch im Zellkern durch die Endonuklease Drosha zur pre-miRNA gespalten wird. Exportin 5 transportiert unter Zuhilfenahme des Coenzym RAN-GTP die pre-miRNA ins Zytoplasma. Dort wird die pre-miRNA durch das Enzym Dicer zu einer miRNA-Duplex umgesetzt und nach Aufspaltung in zwei Einzelstränge die reife einzelsträngige miRNA auf den RISC beladen. Je nach Komplementarität der entsprechenden mRNA und miRNA führt der miRNA-RISC Komplex, bei inkompletter Komplementarität zur Unterdrückung der Translation und bei vollständiger komplementärer Paarung zur Zerschneidung der mRNA. Die Blockierung der Translation scheint hierbei der überwiegende der beiden Mechanismen zu sein.

4.2 Das diffus großzellige B-Zell Lymphom

Das diffus großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) wird der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) zugeordnet. Die NHL und die Hodgkin-Lymphome bilden zusammen die Klasse der Lymphome, der soliden Krebsformen des Immunsystems (Shankland et al., 2012). Mit 90% aller Lymphome repräsentieren die NHL die weitaus größere, allerdings auch sehr inhomogene Gruppe. Die Hodgkin-Lymphome machen die verbleibenden 10% aus (Shankland et al., 2012). Mit ca. 30% aller NHL im europäischen Raum stellt das DLBCL die häufigste Entität dar und hat somit eine hohe epidemiologische Relevanz (Martelli et al., 2013). Als Vertreter der hochmalignen, schnell wachsenden Lymphome zeigt es ohne Behandlung einen aggressiven und tödlichen Verlauf mit rascher Tumorprogression. Durch eine äußerst hohe Proliferationsrate und somit einer kurzen Tumorverdopplungszeit ist die schnelle Diagnose von entscheidender Bedeutung für therapeutische und somit auch prognostische Zwecke. Biomarker die zur frühen Diagnosestellung beitragen, könnten somit auch die Prognose ganz entscheidend verbessern (Qadir und Faheem, 2017).

Ein bereits etablierter Biomarker ist eine hohe LDH, ein Maß für den Zelluntergang, der mit der Tumormasse korreliert und somit als negativer Prognosefaktor gewertet werden kann (Yadav et al., 2016). Die einfache Devise "je mehr Zeit ohne gezielte Chemotherapie bis zur Diagnosestellung verstreicht, umso schlechter die individuelle Prognose" behält hier ihre Gültigkeit. Da die hochmalignen Lymphome durch schnelles Wachstum gekennzeichnet sind, sprechen sie in einem kurativen Behandlungsschema auch gut auf eine Chemotherapie an.

Häufigkeit von Lymphomen im Jahr 2010 in England nach den Aufzeichnungen des nationalen Krebsregisters



Daten stammen von Release edition reference tables, Office for National Statistics

Abb. 2: Häufigkeit der Lymphom-Subtypen in England im Jahr 2010; verändert nach (Lowry und Lynch, 2013): Die Häufigkeitsverteilung darf in westlichen Nationen als vergleichbar angesehen werden. Somit stellen das DLBCL und das folliculäre NHL mehr als ein Drittel aller Lymphome dar. In beiden Subtypen wurden Mutationen der miR-142 nachgewiesen (Hezaveh et al., 2016).

4.3 Die Funktion der miR-142

Die miR-142 wird vom Chromosom 17 des menschlichen Genoms codiert, unmittelbar flankiert vom "Benzodiazepin Rezeptor Associated Protein 1" (BZRAP1). Aus der 87 Basenpaare langen "hairpin" Struktur der pre-miR-142 entstehen zwei reife miRNAs, die miR-142-3p und miR-142-5p.

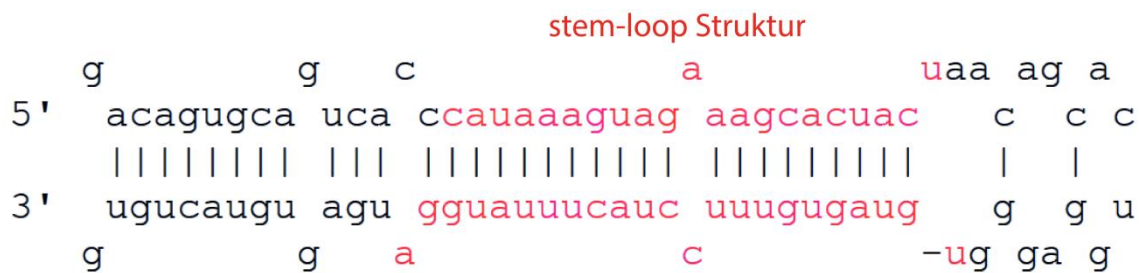


Abb. 3: Die pre-miR-142 mit ihrer "stem-loop" Struktur und die reifen miR-142-3p und -5p; verändert nach (www.miRBase.org): Abgebildet ist die pre-miR-142 vor der enzymatischen Aufspaltung durch das Enzym Dicer mit der charakteristischen Haarnadelstruktur, die die beiden daraus entstehenden reifen miR-142-5p und miR-142-3p voneinander trennt. Hervorgehoben ist die Sequenz der reifen miRNAs (rosa gefärbt).

Die miR-142 scheint eine zentrale Stellung in der Kontrolle der Hämatopoese des Menschen einzunehmen (Sun et al., 2010). Sie kommt vorwiegend in hämatopoetischen Zellen vor und stellt dort einen großen Anteil aller miRNA-Moleküle dar (Teruel-Montoya et al., 2014). Untersuchungen von miR-142 (-/-) knock-out Mäusen konnten zeigen, dass ein Verlust der miRNA zu einer Immundefizienz in Folge einer Hypogammaglobulinämie sowie einer unzureichenden Immunantwort auf Viren und lösliche Antigene führt (Kramer et al., 2015). Die miR-142 spielt zudem eine Rolle in der Entstehung von Fieber und weiteren immunmodulatorischen Prozessen. Bei ansteigender Körpertemperatur führt ein negativer feedback-Mechanismus möglicherweise vermittelt durch eine verminderte Expression von RNA-binding-motif 3 (RBM3) zu einer Expressionssteigerung der miR-142-5p, die wiederum diverse Pyrogene als "target" besitzt. Dies könnte ein möglicher Schutzmechanismus vor kritischer Hyperthermie sein (Wong et al., 2016). Darüber hinaus trägt sie eine wesentliche Bedeutung in diversen anderen biologischen Prozessen, wie der Lymphomentstehung, der Lungenentwicklung, Inflammation und Kardiomyopathie (Shrestha et al., 2017). Auch bei der Atherosklerose, einem chronisch entzündlichen Prozess, scheint die miR-142-5p eine Rolle zu spielen. Die miR-142-5p ist in Makrophagen, welche an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, hochreguliert. Bei durch LDL stimulierten Makrophagen wurden besonders hohe Spiegel an miR-142-5p entdeckt (Xu et al., 2015). Dieser Prozess geschieht auch bei der Bildung von

atherösen Plaques. Hierbei phagozytieren Makrophagen LDL-Moleküle und werden zu Schaumzellen. Dies ist ein wesentlicher Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose.

4.4 Die Funktion der miR-34a

Die miR-34a gehört zur miR-34 Familie, zu der insgesamt zwei weitere miRNAs zählen, die miR-34b und miR-34c. Die miR-34a ist im menschlichen Genom auf dem Chromosom 1 codiert, während die miR-34b und miR-34c auf dem Chromosom 11 codiert sind. Die Familie der miR-34 ist evolutionsbiologisch hoch konserviert.

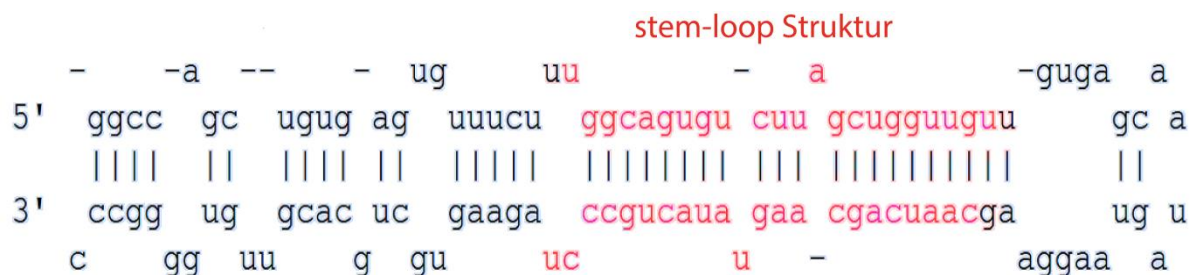


Abb. 4: Die pre-miR-34a mit ihrer “stem-loop“ Struktur und die reife miR-34a; verändert nach (www.miRBase.org): Abgebildet ist die pre-miR-34a vor der enzymatischen Aufspaltung mit der Haarnadelstruktur. Farblich markiert ist die Sequenz der reifen miR-34a.

Die miR-34a ist eine Tumorsuppressor-miRNA und besitzt viele Onkogene als “target“, die unter anderem an Proliferation, Apoptose und Differenzierung beteiligt sind. Widerfährt einer Zelle immenser Zellstress, so kommt es zur gesteigerten Expression und Stabilisierung von P53, was eine direkte Erhöhung der Transkriptionsrate der miR-34a bewirkt. Diese wirkt über die Inhibition der Expression diverser Proteine auf mRNA-Ebene als Tumorsuppressor. Sie wirkt im Zusammenspiel mit P53 der Tumorentstehung entgegen. Der Promotor der miR-34a besitzt eine Bindungsstelle für verschiedene Transkriptionsfaktoren zum Beispiel: P53 (Slabakova et al., 2017). Verschiedene Regulationsmechanismen werden weiter unten in der Abbildung dargestellt. In vielen Tumoren ist die miR-34a deutlich herunterreguliert oder sogar komplett deletiert (Yan et al., 2019). Misso et al. (2014) untersuchte die Häufigkeit von Methylierungen der CpG Sequenz in Proben von Kolorektalen Karzinomen und fand heraus, dass über 45 % aller Proben diese epigenetische Veränderung aufwiesen und dass sie stark mit dem Vorkommen von Metastasen assoziiert ist. Eine inverse Korrelation zwischen der Methylierung und der Konzentration der miR-34a wurde ebenfalls festgestellt. Im Umkehrschluss stellt dies einen vielversprechenden Mechanismus der Tumorkontrolle dar,

weil der Einsatz von Demethylierungsagentien zu einer Inhibition des Tumorwachstums und einer geringeren Metastasenbildung führen könnte (Misso et al., 2014). "Mimics" der miR-34a waren tatsächlich die ersten miRNAs, die in einer klinischen Studie Anwendung fanden und dementsprechend nicht nur im theoretischen Setting vielversprechend waren (Adams et al., 2016). Durch einen G1 oder G2/M Zellzyklusarrest, infolgedessen Apoptose eintritt, kann die miR-34a aufgrund von DNA-Schäden hochreguliert werden und somit vermittelt durch P53 eine maligne Entartung verhindern. Die miR-34a wurde in diversen Karzinomen herunterreguliert vorgefunden. Zu diesen zählen die HPV-assoziierten Karzinome, das kolorektale Karzinom und das hepatozelluläre Karzinom (Jiang und Hermeking, 2017).

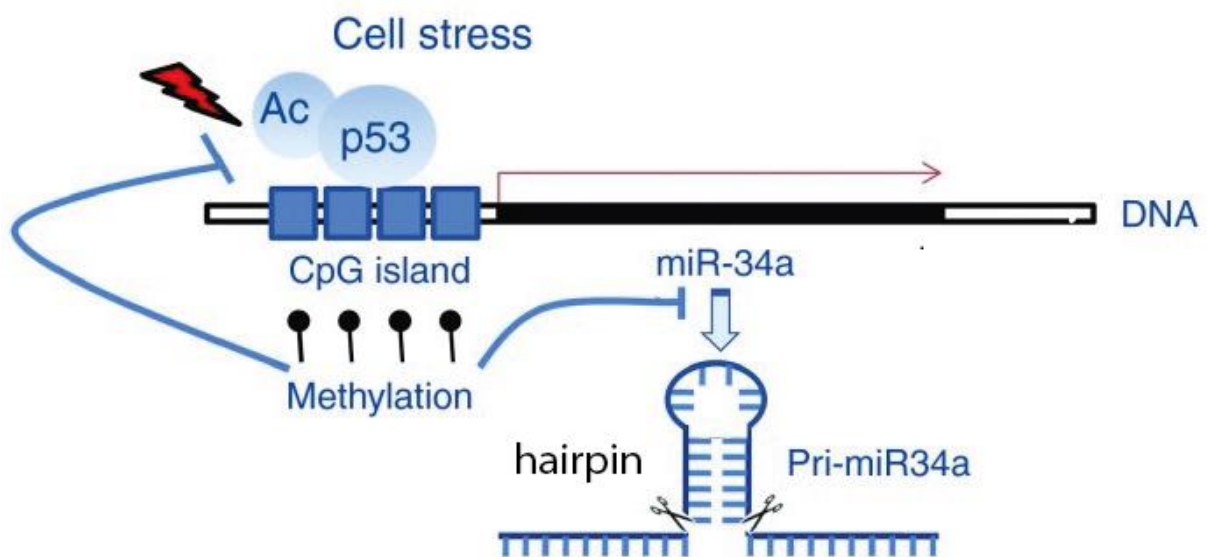


Abb. 5: Regulationsmechanismen der Transkription der miR-34a; verändert nach (Misso et al., 2014): Die miR-34a ist von großer Bedeutung bei genetischen Schäden und wirkt als Tumorsuppressor-miRNA. Ein entscheidendes Steuerelement, das als Transkriptionsfaktor dient, ist das Protein P53, das seinerseits auch als Tumorsuppressor wirkt. Der miR-34a Promotor besitzt sowohl eine direkte P53 Bindungsstelle als auch eine CpG Region. Über die CpG-Region kann eine Methylierung als epigenetische Veränderung zu einer verminderten Transkription führen, was in einigen Tumoren beobachtet werden konnte (Lodygin et al., 2008). Auch Mutationen im Gen *p53* können eine verminderte Transkription der miR-34a herbeiführen und somit der malignen Zellentartung zuträglich sein.

4.5 Die Funktion der miR-200c

Die miR-200c gehört ebenso wie 4 weitere miRNAs, (die miR-200a, miR-200b, miR-141 und miR-429) zur miR-200 Familie. Die miRNAs lassen sich in Hinblick auf deren Lokalisation im menschlichen Genom 2 Clustern zuordnen. Die miR-200c bildet zusammen mit der miR-141 ein Cluster auf Chromosom 12. Die verbleibenden 3 miRNAs der Familie werden von einer Sequenz auf Chromosom 1 codiert (Mongroo und Rustgi, 2010).

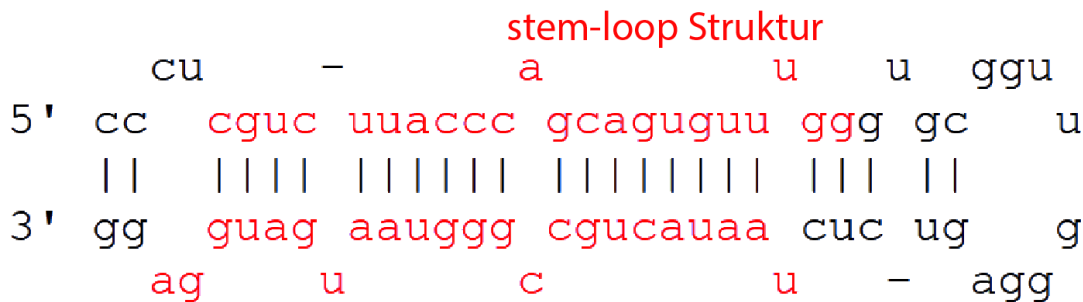


Abb. 6: Die pre-miR-200c mit ihrer "stem-loop" Struktur und die reife miR-200c; verändert nach (www.miRBase.org): Abgebildet ist die pre-miR-200c vor der enzymatischen Aufspaltung mit der Haarnadelstruktur. Farblich hervorgehoben ist die Sequenz der reifen miR-200c, wobei der aus 23 Nukleotiden bestehende Einzelstrang den Leitstrang mit der "seed"-Sequenz darstellt.

Die miR-200c kommt, ebenso wie die anderen Vertreter der miR-200 Familie, vorrangig in epithelialen Zellen vor, wobei in mesenchymalem Gewebe Methylierungsreaktionen des miR-141/miR-200c-Promotors zu einer Unterdrückung der Expression der miR-200c führen (Neves et al., 2010). Aberrante Regulierungs- und Methylierungsmuster des Promotors wurden in vielen Krebsarten entdeckt u.a. dem Prostatakarzinom (Lynch et al., 2016).

Dies ist mitunter dem Zusammenhang geschuldet, dass die miR-200c Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) haben könnte, was bekanntlich einer der entscheidenden Schritte der Karzinogenese ist (Korpal und Kang, 2008). Dieser oft initiale Schritt führt dazu, dass die Zellen ihre feste Adhäsion verlieren und Eigenschaften erlangen, die sie zur Migration befähigen (Yilmaz und Christofori, 2009).

Aufgrund dieser Eigenschaften wurde anfangs geplant das Klonierungsprodukt pSG5-GFP-miR-200c zu erstellen. Im Verlauf entschied sich die Arbeitsgruppe gegen dieses Forschungsprojekt, sodass zwar der Vektor bereits erstellt worden war, ein Northern Blot zur Verifizierung der miRNA nicht mehr durchgeführt wurde. Analog zum Vektor pSG5-GFP-miR-34a wurden beim Vektor pSG5-GFP-miR-200c Expressionsversuche des Fluoreszenzproteins durchgeführt. Folglich, da dieses Projekt nicht vollständig abgeschlossen wurde, wird in der Diskussion nicht näher auf die miR-200c eingegangen.

5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von Vektoren zur Ko-Expression fluoreszierender Proteine und miRNAs in eukaryotischen Zellen. In diesem Rahmen wurden Klonierungsexperimente durchgeführt. Zwei miRNAs waren hierbei von zentralem Interesse, die miR-34a und die miR-142. Zudem erfolgte die Klonierung der miR-200c in den Vektor pSG5-GFP. Das Vorgehen war analog zur miR-34a, einschließlich Western Blot und Sequenzierung. Lediglich auf den NB wurde verzichtet, da man sich dagegen entschied mit dem Klonierungsprodukt pSG5-GFP-miR-200c weiterzuarbeiten.

Für die genauere wissenschaftliche Betrachtung der miR-142 wurde sich entschieden, weil ein hoher Prozentsatz der DLBCL Mutationen in der miR-142 aufweist, sowohl in der reifen miR-142-3p als auch in der reifen miR-142-5p (Kwanhian et al., 2012). Wenig später wurde dieses Erkenntnis, nämlich ein hoher Anteil an Mutationen der miR-142 in DLBCL, von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt (Hezaveh et al., 2016). Sie fanden zusätzlich Mutationen der miR-142 in folliculären Lymphomen. In Ihrer Masterarbeit „Functional analysis of microRNA-142 by CRISPR-Cas9 mediated knock-out“ hat M.Sc. Jaqueline Fröhlich mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems an miR-142 knock-out BJAB und JURKAT Zelllinien geforscht. Basierend auf diesen Zelllinien kam die Idee der Transfektion der erstellten BJAB und Jurkat miR-142 knock-out Zelllinien mit Klonierungsvektoren, welche die miR-142-3p und miR-142-5p Mutanten beinhalten. Es wurde zunächst nach einem geeigneten Vektor zur Transfektion der Zelllinien gesucht. Die Entscheidung fiel auf den Vektor pcDNA3.1/Hygro(-). Dieser kann durch seinen Promotor auch in eukaryotischen Zelllinien eingesetzt werden. Er bietet durch die Antibiotikaresistenzgene für Hygromycin und Ampicillin Selektionsfaktoren sowohl für eukaryotische als auch prokaryotische Zellen. Die Klonierung der Fluoreszenzproteine eGFP und mCherry in die MCS war der erste Schritt. Nachdem der Vektor pcDNA3.1/Hygro (-) mCherry erstellt worden war, wurde dieser Vektor nicht mehr für weitere Klonierungsexperimente genutzt. Es wurde nur noch mit dem Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP gearbeitet. Anschließend wurden die miR-142-Mutanten und die miR-142-wt in die MCS des Vektors eingebaut und zwar an das 3' Ende der für das Fluoreszenzprotein codierenden Region. Zur Kontrolle der Expression des GFP wurde die Fluoreszenzmikroskopie herangezogen. Bei positivem Signal, wurde daraufhin eine Protein- und RNA-Extraktion durchgeführt und zunächst das Vorhandensein von GFP mittels Western Blot bestätigt. Die Anwesenheit und Überexpression der miRNA wurde mittels Northern Blots nachgewiesen. Zur Klonierung der miR-34a wurde entschieden, auf einen bereits vorhandenen GFP Expressionsvektor zurückzugreifen, den Vektor pSG5-GFP. Die miR-34a spielt als Tumorsuppressor-miRNA eine entscheidende Rolle in diversen Krebsarten.

Zielsetzung der Arbeit

Als Folgeexperiment steht nun die Transfektion der miR-142 "knock-out" Zelllinien BJAB und JURKAT an. Anhand dieser Folgeexperimente könnte die Bedeutung der Mutationen für die Tumorentstehung des DLBCL weiter erforscht werden. Die Vektoren wurden u. a. zur Transfektion der JURKAT und BJAB miR-142-knock-out Zelllinien mit anschließender Selektionierung der transfizierten Zellen mittels FACS erstellt. Einzelne Zellen könnten somit auf unterschiedliche Parameter wie Genexpression und Wachstumsmuster analysiert werden. Anhand der heranwachsenden Zellkultur kann das Zellwachstum betrachtet und sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit als auch auf morphologische und molekularbiologische Unterschiede untersucht werden.

6 Material und Methoden

Bei den Methoden handelt es sich um in diesem Labor etablierte Techniken, deren Funktionalität bereits bestätigt wurde. Daher wurde sich in Absprache mit Prof. Dr. F. Grässer und dem Dekanat der Universität des Saarlandes darauf geeinigt, überwiegende Teile der Abschnitte Material und Methoden aus zuvor in dieser Arbeitsgruppe verfassten Arbeiten zu übernehmen. Der Material- und Methodenteil stammt größtenteils aus der Doktorarbeit von Dr. Martin Hart (Hart, 2014) und der Masterarbeit von Jacqueline Fröhlich (Fröhlich, 2016).

6.1 Materialien

6.1.1 Geräte

Zentrifugen	Megafuge 1.0 R (Heraeus) 202 MK (Sigma)
CO ₂ Inkubator	Heracell TM 150i (Thermo Scientific)
Electrophoresis power supply	Consort EV-231 (Consort bvba) Phero Stab 300 (Biotec Fisher)
Hybridisierungsöfen	UM 400B Hyp (Bachhofer)
Mikroskop	Leica DMI 6000B
PCR Cycler	Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research)
Phosphoimager	Phosphoimager TM -Typhoon with plates and cassettes for exponation (Molecular Dynamics, Amersham)
Photometer	NanoDrop TM 2000 (ThermoFisher)
“Semi-dry” Blotter	2117 Multiphor (LKB Bromma)
Shaker	Thermomixer Compact (Eppendorf) POLYMAX 1040 (Heidolph) REAX 2000 (Heidolph) REAX 2 (Heidolph)
Sonication device	Sonifier 250 (Branson) Proteinextrakte

Tank-Blotting chamber	2005 Transphor Electro Blotting Unit (LKB Bromma)
UV-Dokumentation	ChemiDoc™ XRS+ (Biorad)

6.1.2 Chemikalien

Acrylamid	Roth
Agarose NCEO UltraQuality	Roth
Ammonium persulfate (APS)	Serva
Ampicillin	Bayer
Bactoagar	DIFCO
Bisacrylamid	Roth
Blocking reagent	Boehringer
Bromophenol "blue"	Serva
cComplete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Denhardt's solution 50x	Sigma
Diethylpyrocarbonate	Sigma
EDTA	Serva
Ethidiumbromid	Roth
Fetal calf serum (FCS)	Sigma
Fixation concentrate ADEFO	Chemi GmbH
Gamma UT ³² P	Hartmann Analytics
Luria Broth Agar (GIBCO)	Becton Dickinson
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Serva
Nukleotide (dNTPs)	Peqlab
Nukleotide (NTPs)	Invitrogen
Methylimidazole	Sigma
PeqGOLD TriFast™	Peqlab

Penicillin, Streptomycin	GE Healthcare 25
PolyFect	Qiagen
Propidium iodide	Roth
RNase A	Machery-Nagel
SequaGel UreaGel system	Nationa Diagnostics
Skim milk powder	Töpfer
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Serva
Tris base	Serva
Triton-X-100	Serva
Trypsin/EDTA	GE Healthcare
Tween20	Serva

6.2 Puffer und Lösungen

Bromphenolblau Ladepuffer (2x)	:	Urea	8 M
		EDTA	50 mM
		Bromphenolblau	0,2- 0,4 mg/ml
Blaumarker	:	Bromphenolblau	0,25 %
		Glycerol	50 %
		EDTA	50 mM
Blockingpuffer	:	Magermilchpulver in PBS-Puffer	5% (w/v)
Crosslinkreagenz	:	Methylimidazol	245 µl
		EDC-Hydrochlorid ad 24 ml H ₂ O	0,75 g
50x Denhardt's Solution	:	Albumin fraction V	1 %

Material und Methode

		Polyvinylpyrrolidon K30	1 %
		Ficoll 400	1 %
dNTPs	:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je	10 mM
ECL-Lösung A	:	Luminol in DMSO	250 mM
ECL-Lösung B	:	p-Coumarsäure in DMSO	90 mM
ECL-Lösung C	:	Tris HCL pH 8,5	1 M
ECL-Lösungs-Mix	:	Lösung A	2,5 ml
		Lösung B	1,113 ml
		Lösung C	25 ml
		ad 250 ml H ₂ O	
Ethidiumbromidlösung	:	Ethidiumbromid	10 mg/ ml H ₂ O
Hybridisierungspuffer (Northern Blot)	:	20x SSC	7,5 ml
		1 M Na ₂ HPO ₄	0,6 ml
		10 % SDS	21,0 ml
		50x Denhardt´s Solution	0,6 ml
		Blockreagenz wenige mg	
HEBS Buffer (2X)	:	NaCl	244 mM
		KCl	10 mM
		Na ₂ HPO ₄	1,4 mM
		Glucose	15 mM
		Hepes	42 mM
		Ad to 450 ml, and to 500 ml after adjusting pH	
Lysepuffer (0,15M)	:	NaCl	0,1 %
		Igepal	0,1 %
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.	

Material und Methode

		Zugabe von Proteaseinhibitoren direkt vor Gebrauch	
MgCl ₂ (2M)	:	MgCl ₂ x 6H ₂ O MgSO ₄ x 7H ₂ O ad 100 ml H ₂ O bidest.	20,33 g (1M) 24,65 g (1M)
5x MSE	:	1 M MOPS 0,3 M NAAc 0,5 M EDTA ad 1000 ml H ₂ O bidest.	200 ml 16,7 ml 16,7 ml
PBS	:	NaCl KCl MgCl ₂ CaCl ₂ Na-K-Phosphat	140 mM 25 mM 0,5 mM 1 mM 10 mM
PBS (ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)	:	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O KH ₂ PO ₄ ad pH 7,4	8,0 g/l 0,2 g/l 2,9 g/l 0,2 g/l
Polymerase-Reaktionspuffer (10x), (Sigma)	:	KCl Tris-HCl, pH 8,3 Gelatine	500 mM 100 mM 1 mg/ml
Puffer N2	:	Tris Ethanol KCl Triton X-100 ad pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	100 mM 15 % 900 mM 0,15 % (v/v)
Puffer N3	:	Tris Ethanol KCl	100 mM 15 % (v/v) 1,15 M

Material und Methode

		ad pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
Puffer N5	:	Tris	100 mM
		Ethanol	15 % (v/v)
		KCl	1 M
		ad pH 8,5 mit H ₃ PO ₄	
RNA-Ladepuffer II	:	Formamid	750 µl
		5x MSE	150 µ
		Formaldehyd	240 µl
		50% Glycerol	200 µl
		Spatelspitze Bromphenolblau	
		Spatelspitze Xylen-Cyanol FF	
		160 µl Aqua bidest.	
S1-Puffer	:	Tris-HCl	50 mM
		EDTA	10 mM
		RNase A	100 µg/ml
		pH 8,0	
S2-Puffer	:	NaOH	200 mM
		SDS	1 %
S3-Puffer	:	Kaliumacetat	2,8 M
		pH 5,1	
Sammelgelstock	:	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
		SDS	0,4 %
Sample-Buffer (2x)	:	Tris HCL (pH 6,8)	130 mM
		SDS	6 %
		3Mercapto1,2-propanediol	10 %
		Glycerol	10 %
		Bromphenolblau	0,05 %
SDS-Laufpuffer	:	Tris/HCl	0,025 M
		SDS	0,1 %

Material und Methode

		Glycin	0,2 M
SOB-Medium	:	Trypton	20,0 g
		Hefe-Extrakt	5,0 g
		NaCl	0,6 g
		KCl	0,5 g
		ad 1000ml H ₂ O bidest, autoklaviert	
		Zugabe von 20 mM MgCl ₂ direkt vor Gebrauch	
SSC-Puffer (20x)	:	NaCl	3 M
		Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	0,3 M
STET-Puffer	:	Tris (pH 8,0)	10 mM
		EDTA (pH 8,0)	50 mM
		Triton X-100	0,5 % (v/v)
		Saccharose	8% (w/v)
		Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym direkt vor Gebrauch	
Stripping-Puffer	:	Tris (pH 8,0)	0,05 mM
		EDTA (pH 8,0)	0,2 mM
		Na-Pyrophosphat	0,05 % (v/v)
		Denhardt's Solution	0,1x
T4-Ligasepuffer (10fach)	:	ATP	10 mM
		MgCl ₂	50 mM
		DTT	10 mM
		Tris/HCl (pH 7,5)	660 mM
TAE-Puffer (50x)	:	Tris	2 M
		Natriumacetat	25 mM
		EDTA	0,5 M
		add pH 7,8 mit Essigsäure	
TBE-Puffer (10x)	:	Tris	89 mM
		Borsäure	89 mM

Material und Methode

		EDTA	2 mM
TE-Puffer	:	Tris/HCL	10 mM
		EDTA	1 mM
		add pH 7,6 mit Essigsäure	
Transferpuffer	:	Tris/HCl	25 mM
		Glycin	192 mM
		Methanol	20 % (v/v)
		SDS	0,05 % (w/v)
Transformations-Lösung 1	:	RbCl	0,10 M
		MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,05 M
		CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,01 M
		CH ₃ COOH (pH7)	0,03 M
		Glycerol	15,0 % (v/v)
		ad 1000 ml H ₂ O bidest, sterilfiltriert	
		ad pH 5,8 mit 0,2 M CH ₃ COOH	
Transformations-Lösung 2	:	MOPS (pH 6,8)	0,500 M
		RbCl	0,010 M
		CaCl ₂ ·H ₂ O	0,075 M
		Glycerol	15%(v/v)
		ad 1000 ml H ₂ O bidest, sterilfiltriert	
Trenngelstock	:	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
		SDS 0,4 % (w/v)	
Hochsalzpuffer I	:	5x SSC	
		1 % SDS	
Niedriegsalzpuffer II	:	1x SSC	
		1 % SDS	

6.3 Membranen, Filter und Säulen

Hybond TM -N membrane	Amersham Biosciences
Hyperfilm ECL TM	Amersham Biosciences
Nitrocellulosefilter	Schleicher & Schuell
NucleoBond [®]	Machery-Nagel
Protran TM nitrocellulose membrane	Schleicher & Schuell

6.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
DNase I	Invitrogen
Klenow fragment	Fermentas
Lysozym	Sigma Aldrich
Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Restictionendonuclease	New England Biolabs
T4-DNA Ligase	New England Biolabs
T7-RNA Polymerase	New England Biolabs
Taq Polymerase	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA	GE Healthcare

6.5 Zelllinien

6.5.1 293T-Zelllinie

Die 293T-Zelllinie ist humanen Ursprungs und abgeleitet aus HEK (human embryonic kidney) Zellen, die durch Transformation mit dem Adenovirus 5 kanzerogene Charakteristika erworben hat. Die Zelllinie ist einfach zu kultivieren und die Zellen nehmen fremdes DNA-Material in Transfektionsexperimenten auf. Durch die ursprüngliche Transformation besitzen die Zellen die genetische Information für das SV40 "large T Antigen". Daher ist nach Transfektion mit Plasmiden, die einen SV40 ori aufweisen, die Replikation der Fremd-DNA möglich. Sowohl der Vektor pSG5 als auch der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-) besitzen einen SV40 ori. Der Einfachheit halber wurde somit ausschließlich mit 293T-Zellen gearbeitet. Nur bei den

Positivkontrollen der Northern Blots wurden BJAB und JURKAT RNA-Extrakte, wegen der Überexpression der miR-142 in Lymphozyten genutzt.

6.6 Medium für Zellkulturen

6.6.1 Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM ist ein gängiges Medium zur Kultivierung adhärenter Zellkulturen. Es beinhaltet Aminosäuren, Vitamine, Glucose, Phenolrot, Natriumpyruvat sowie anorganische Salze und bildet somit ein ideales Nährmedium für Zellen. Um ausschließlich eukaryotische Zellen zu züchten, wurde es mit 1 % Penicillin (40 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) vermischt. 10 % FKS wurde dem Medium beigemengt. Dieses enthält neben Wachstumsfaktoren eine Vielzahl an weiteren Proteinen.

6.7 Bakterien

6.7.1 *E. coli* DH5α Bakterien

Bei *E. coli* DH5α Bakterien handelt es sich um gentechnisch veränderte *Escherichia coli* Bakterien. Die Bakterien weisen genetische Modifikationen auf, die die Transformation und damit die Aufnahme fremder DNA erleichtern. Hierfür weist deren Genom einige Mutationen in der prokaryotischen DNA auf, welche die Aufnahme und den intrazellulären Erhalt von Fremd-DNA erleichtern. Dieser Bakterienstamm besitzt beispielsweise eine recA1 "missense"-Mutation, die verhindert, dass eine DNA Rekombination der Plasmide erfolgt. Dies sorgt für eine Stabilisierung des aufgenommenen Plasmids. Zudem ist das endA1 Protein, eine Endonuklease, die Fremd-DNA verdaut, mutiert. Daher ist die Einschleusung von Plasmiden im Vergleich zu nativen *E. coli* Stämmen erleichtert.

6.7.2 Medium für Bakterien

Die Bakterien wurden in Lysogeny Broth (LB) Medium kultiviert, in diesem Medium über Nacht ca. 12 h auf dem Schüttler bei 37 °C gelagert und durch Zentrifugation vom Medium getrennt. Durch Zusatz von 0,1 % Ampicillin ließen sich spezifisch die Bakterien, die ein Resistenzgen für Ampicillin besitzen, selektionieren. Da die Vektoren pSG5 und pcDNA3.1/Hygro(-) beide ein Ampicillinresistenzgen besitzen, wurde stets das Antibiotikum zur Kultivierung beigemengt. LB-Agar Platten wurden zur Ausplattierung nach Transformation genutzt. Die Konzentration des LB-Agars betrug 3,75 %. 0,1 % Ampicillin wurde als Selektionsfaktor dem Medium beigemengt.

6.8 Vektoren

6.8.1 Der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)

Der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-) ist ca. 5,6 kB groß und eignet sich zur Transfektion und Genexpression in eukaryotischen Zellen. Der Vektor enthält zudem einen prokaryotischen T7-Promotor. Zur Selektion besitzt das Plasmid zwei Antibiotikaresistenzgene, ein Gen für eine Ampicillinresistenz sowie eines für Hygromycin. Der CMV Promotor ist hervorragend geeignet um eine hohe Genexpressionsrate in Säugerzellen zu erzielen. Durch den SV40 ori erfolgt eine Replikation in Zellen, die das SV40 "large T Antigen" bilden. In der MCS stehen diverse Schnittstellen für Klonierungsexperimente zur Verfügung. Der Vektor wurde zur Ko-Expression von GFP und der miR-142 benutzt. Es wurden insgesamt drei verschiedene Endprodukte gebildet: die Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3.

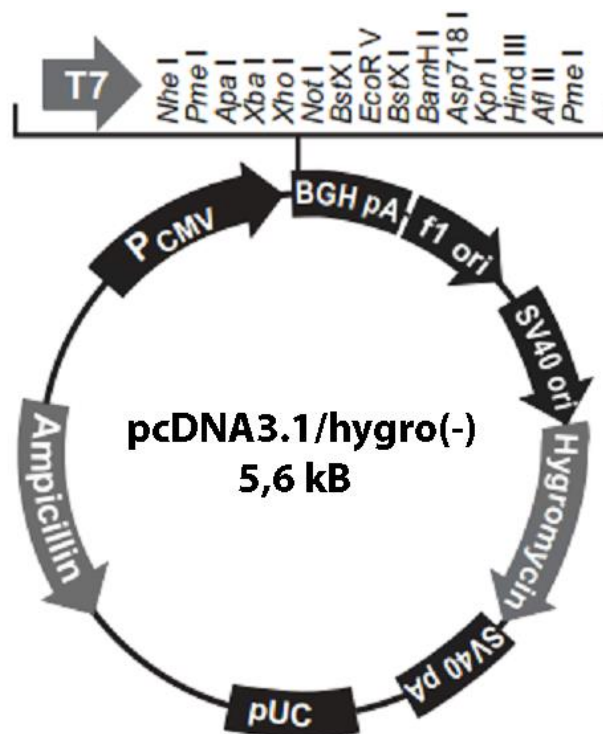


Abb. 7: „Gene map“ des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-); verändert nach (<http://www.biofeng.com>): Zu sehen ist der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-). Dieser ist ca. 5,6 kB groß. Nach dem CMV-Promotor innerhalb der MCS ist die Reihenfolge der Schnittstellen der einzelnen Restriktionsenzyme aufgelistet. Zudem sind die Antibiotikaresistenzgene hellgrau abgebildet.

6.8.2 Der Vektor pSG5

Der Vektor pSG5 ist ca. 4,1 kB groß. Durch seinen SV40 ori kann die Replikation in eukaryotischen Zellen, die das SV40 "large T Antigen" besitzen, stattfinden. Als Selektionsmedium kann Ampicillin benutzt werden. Nachgelagert dem T7 Promotor weist der Vektor pSG5 3 Schnittstellen für Restriktionsenzyme auf. In genannter Reihenfolge kann EcoRI, BamHI und BglII genutzt werden.

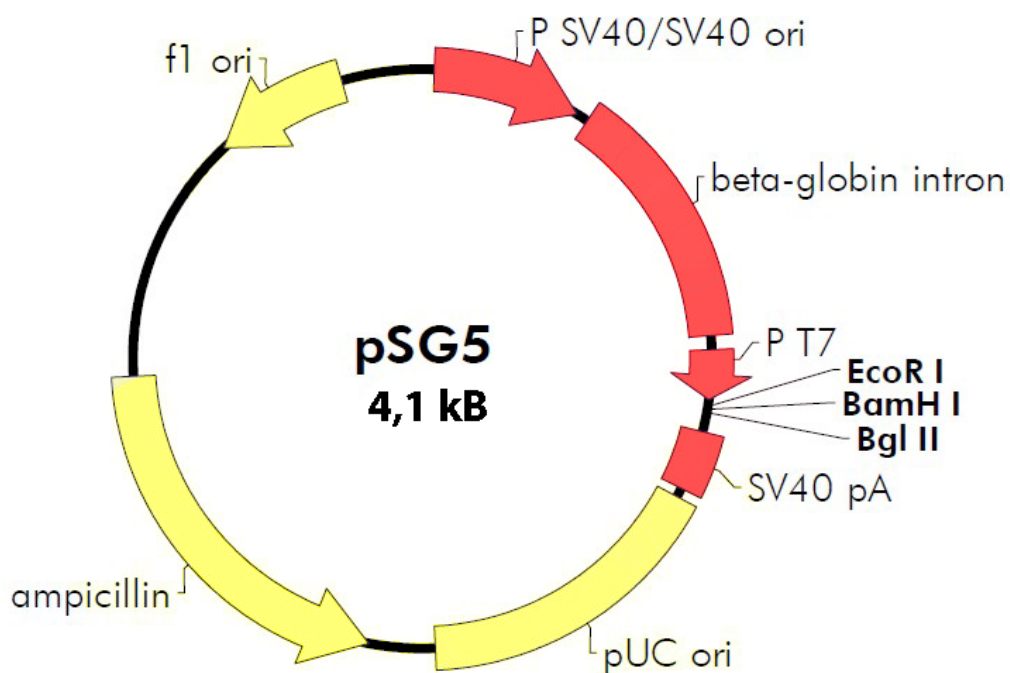


Abb. 8: „Gene map“ des Vektors pSG5; verändert nach (<http://www.biofeng.com>): Dargestellt ist der Vektor pSG5. Dieser besitzt eine Größe von ca. 4,1kB. Innerhalb der MCS sind die 3 Schnittstellen für Restriktionsenzyme zu sehen. Ebenfalls abgebildet in gelb ist das Resistenzgen für Ampicillin.

6.9 Marker

6.9.1 "DNA Ladder"

Als Referenz für PCR, Verdau und allen Verfahren, denen sich eine Gelelektrophorese von DNA anschloss, wurde die "2-log DNA Ladder" von neb benutzt. Diese beinhaltet Nukleinsäuren von 0,1 bis 10 kb und die hohe Auflösung der Banden ermöglicht ein genaues Ablesen der Fragmentlänge.

2-Log DNA Ladder

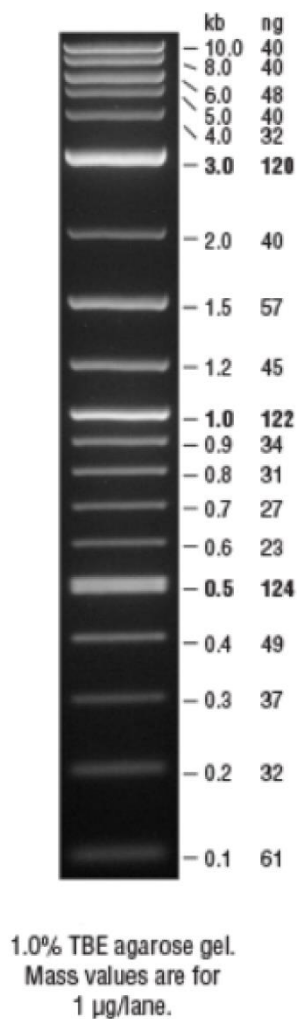


Abb. 9: "2-log DNA Ladder" (0,1-10kb); verändert nach (www.neb.com): Die "2-log DNA Ladder" besteht aus aufgereinigten und klar definierten Nukleotiden, die durch elektrophoretische Auftrennung die Zuordnung von DNA in einem Bereich von 0,1 bis 10 kb ermöglicht. 3 Banden sind hervorgehoben, da sie in der "Ladder" durch größere Mengen an DNA repräsentiert sind. Dies erleichtert das Ablesen. Hervorgehoben sind die Banden 0,5, 1 und 3kb.

6.9.2 “Protein Standard Ladder“

Als Referenz für das SDS-PAGE Verfahren wurde der “Blue Prestained Protein Standard“, “Broad Range“ von neb gewählt. Dieser bildet auf 11 Banden Proteine mit einer Molekülmasse von 11 bis 190 kDa ab, deren Kopplung an ein blaues Chromophor ein direktes Ablesen nach der Elektrophorese ermöglicht.

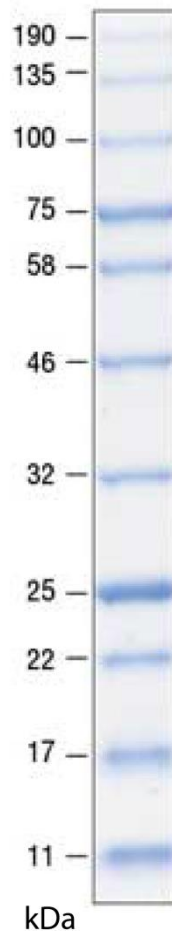


Abb. 10: “Blue Prestained Protein Standard“, “Broad Range“ (11-190kDa); verändert nach (www.neb.com): Der “Blue Prestained Protein Standard“, “Broad Range“ bildet auf scharfen Banden durch die hohe Reinheit ausgewählter Proteine eine Bandbreite der Molekülmasse von 11 bis 190 kDa ab. Die blaue Färbung entsteht durch eine Kopplung an ein blaues Chromophor. Besonders hervorgehoben sind die Banden für 25 und 75kDa wodurch ein leichteres Ablesen der Größe möglich ist.

6.10 Antikörper und Primer

6.10.1 Primäre Antikörper

In den Western Blot Verfahren wurden primäre Antikörper genutzt um die Expression von Fluoreszenzproteinen zu detektieren. Zudem wurde die Expression des "house-keeping-Gens" beta-Aktin als interne Kontrolle für alle Proben überprüft.

Primärer GFP Antikörper: Der primäre Antikörper, der zur Detektion von GFP genutzt wurde, richtet sich gegen das humane Protein und stammt aus Ratten. Es ist ein monoklonaler Antikörper der Firma Santa-Cruz, der in einer Verdünnung von 1:200 angewandt wurde.

Primärer beta-Aktin Antikörper: Der primäre Antikörper wurde zur Detektion von beta-Aktin genutzt, richtet sich gegen das humane Protein und stammt aus Mäusen. Es ist ein monoklonaler Antikörper der Firma Santa-Cruz, der in einer Verdünnung von 1:5000 angewandt wurde.

6.10.2 Sekundäre Antikörper

Durch die Kopplung einer Meerrettichperoxidase an die sekundären Antikörper wird die Oxidation von Luminol unter Reduktion von Wasserstoffperoxid katalysiert, wobei Chemilumineszenz entsteht. Dieses Verfahren wurde bei allen sekundären Antikörpern genutzt. Zur Kopplung an den primären GFP Antikörper wurde ein α -rat-pox Antikörper verwendet. Zur Kopplung an den primären beta-Aktin Antikörper wurde ein α -mouse-pox Antikörper genutzt. Beide fanden in einer Verdünnung von 1:5000 Anwendung.

6.10.3 Primer für die Klonierung

Tabelle (Tab.) 1: Primer für die Klonierung: In der folgenden Tabelle sind die Primer in 5'-3' Konfiguration mit Schmelz- (T_M) und Hybridisierungstemperatur (T_A) dargestellt. Die Primer wurden durchnummeriert. Im Ergebnisteil werde ich mich nur noch auf die Nummern beziehen.

Nr	Name	Sequenz (5'-3')	T_M in °C	T_A in °C
(1)	FOR:EcoR1-mir-34a	GGAATTCGAGATGGAGTCTTGCTAGTTGC	58	63
(2)	REV:SpeI-mir-34a	GACTAGTGAAGAGCTTCCGAAGTCCTG	58	63
(3)	FOR:XbaI-GFP	GCTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	68	63
(4)	REV:HindIII-XhoI-NotI-BamH1- GFP1	CCAAGCTTCTCGAGGCGGCCGCGGATCCTTA CTTGACAGCTCGTC	77	63
(5)	FOR:HindIII-mCherry	CCCAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	70	65
(6)	REV:XbaI-SpeI-NotI-mCherry	CCAAGCTTCTCGAGGCGGCCGCGGATCCCTA CTTGACAGCTCGTCCATG	79	65
(7)	FOR:BamH1-mir-142	CGGGATCCGGGATCTTAGGAAGCCACAA	68	63
(8)	REV:XhoI-mir-142	CCGCTCGAGATGGAGGCCTTTCAGGCATCTG	72	63

6.10.4 Primer für die Sequenzierung

Tab. 2: Primer für die Sequenzierung: In der folgenden Tabelle sind die Primer in 5'-3' Konfiguration mit Schmelz- (T_M) und Hybridisierungstemperatur (T_A) dargestellt. Diese Primer wurden für die Colony-PCR oder zur Sequenzierung genutzt.

Nr	Name	Sequenz (5'-3')	T_M in °C	T_A in °C
(9)	FOR:pSG5	ATCACTCTCGGCATGGACGAG	62	50
(10)	REV: pSG5	GCAGAACTTGTTTATTGCAGC	55	50
(11)	FOR: pSG5-GFP	ATCACTCTCGGCATGGACGAG	62	50
(12)	REV: pSG5-GFP	GCTGCAATAACAAGTTCTGC	55	50
(13)	FOR:pcDNA	GAGCTCTCTGGCTAACTAG	54	49
(14)	REV: pcDNA	ACAGTCGAGGCTGATCAG	56	49

6.11 Bakterielle Zellkultur

6.11.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien

modifiziert nach (Hart, 2014)

Die Amplifizierung von Plasmiden erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem jeweiligen Plasmid, Selektion dieser Bakterien durch Ausplattieren auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin und deren anschließende Inkubation über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurden zur Analyse der Plasmid-DNA die Bakterien der einzelnen Kolonien mit einem Zahnstocher gepickt, diese in ein Eppendorfgefäß überführt und jeweils in einem PCR-Ansatz der gewünschte Abschnitt des Plasmids amplifiziert. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese nach Kontrollverdau zur Verifizierung der Transformation also der Überprüfung der Anwesenheit eines rekombinanten Plasmids. Zur Amplifizierung und Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 100ml LB-Medium plus Ampicillin (0,1% (w/v)) mit der zuvor analysierten Bakterienkolonie oder mit Bakterien aus einer DMSO-Stammhaltung beimpft. Kurzfristig gelagert wurden die Bakterien in Form von Zellkolonien auf mit Parafilm abgedichteten Agarplatten bei 4°C. Zur Langzeitlagerung der Bakterien wurden 500µl der Bakteriensuspension mit 20% (v/v) DMSO versetzt und bei -70°C eingefroren.

6.11.2 Herstellung kompetenter Bakterien

(Hart, 2014), CaCl₂-Methode (Kushner, 1978)

E. coli Bakterien sind normalerweise nicht in der Lage Fremd-DNA aufzunehmen, sondern versuchen sich mittels speziell entwickelter Schutzmechanismen, wie z. B. durch Restriktionsenzyme, davor zu schützen. Um nun Plasmid-DNA effizient in Bakterien vermehren zu können, ist es nötig, diese künstlich in die Bakterien einzuschleusen, d. h. die Bakterien müssen erst für die Aufnahme der Fremd-DNA kompetent gemacht werden. Diese Kompetenzinduktion kann mit Hilfe von Chemikalien durchgeführt werden. Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien beginnt damit, dass 30 ml SOB-Medium 1:100 mit einer 2 M MgCl₂-Lösung versetzt und mit 50 µl einer auf Eis aufgetauten *E. coli* pMOS-Suspension inokuliert wurden. Danach wurde diese sog. Vorkultur auf einem Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 200 ml SOB-Medium mit 8 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C unter ständigem Schütteln solange kultiviert bis die Bakteriensuspension eine OD 550nm von ~0,3 erreicht hatte und die Bakterien sich somit in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Dann wurde die in vier 50 ml Falcons aliquotierte Bakteriensuspension für 15 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterienpellets in je 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und erneut 15 min auf Eis gehalten. Nun folgte eine erneute, 10 minütige

Zentrifugation der Bakteriensuspensionen bei 3000 rpm und 4°C. Die Bakterienpellets wurden jeweils in 4 ml Transformations-Lösung 2 resuspendiert, zu je 150 µl in Eppendorfgläser aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -70°C.

6.11.3 Transformation kompetenter Bakterien

(Lederberg und Cohen, 1974), (Hart, 2014)

Das künstliche Einbringen von löslicher Plasmid-DNA in eine dafür kompetente Bakterienzelle wird als Transformation bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Hitzeschock-Transformation gearbeitet. Hierzu wurden entweder max. 1 µg Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes zu 50 µl einer zuvor auf Eis aufgetauten, kompetenten *DH5α*-Suspension pipettiert. Dieser Ligationsansatz wurde 20 min lang auf Eis inkubiert, was dazu führte, dass sich die DNA an der Bakterienzellwand anlagern konnte. Im nächsten Schritt erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42°C. Der Mechanismus des Hitzeschocks ist noch ungeklärt, aber es scheint als verursache der rasche Temperaturanstieg eine Permeabilisierung der Bakterienzellwand, sodass die DNA ins Cytosol aufgenommen werden kann. Danach wird der Transformationsansatz sofort auf Eis abgekühlt und 100 µl antibiotikafreies LB-Medium hinzugegeben, um den durch den Hitzeschock gestressten Bakterien das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase zu erleichtern. Diese sogenannte Vorkultur wird mindestens für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf einer LB-Agarplatte ausplattiert oder zum Inokulieren einer LB-Flüssigkultur verwendet. Die Agarplatte oder Flüssigkultur wird danach über Nacht bei 37°C über Kopf inkubiert bzw. geschüttelt. Die effiziente Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien richtete sich nach dem jeweiligen, auf dem Plasmid kodierten Resistenzgen. Daher wurden alle in dieser Arbeit verwendeten LB-Agarplatten bzw. LB-Medien mit 0,1% (w/v) Ampicillin versetzt.

6.11.4 Colony-PCR

Die Colony-PCR mit anschließender Gelelektrophorese erfolgte zum Nachweis eines rekombinanten Plasmids. Hierfür wurden von einer beimpften LB-Agarplatte Bakterien mit einem Zahnstocher gepickt und in einen PCR-Ansatz überführt. Die Lyse der Bakterien unter Freisetzung des genetischen Materials erfolgte hierbei durch die Bedingungen der PCR. Für Folgeexperimente wurde ein geringer Anteil der Bakterien einer Kolonie jeweils auf eine neue LB-Agarplatte überführt. Die PCR erfolgte wie unter DNA-Techniken PCR (Kapitel 6.13.3) beschrieben mit geringen Modifikationen. Der erste Schritt, die Denaturierung erfolgte bei 98 Grad Celsius und dauerte 2x 1 min, also länger als in gängigen PCR-Protokollen. Diese

Änderung wurde vorgenommen um die Effizienz der Denaturierung der DNA und der Zellyse zu steigern. Die restlichen Schritte wurden aus dem weiter unten beschriebenen Protokoll übernommen. Insgesamt stellte sich die Colony-PCR mit anschließender Gelelektrophorese als zuverlässige Methode heraus, mit der die Orientierung, die Transformation und die Anwesenheit rekombinanter DNA bestätigt werden konnte.

6.12 Eukaryotische Zellkultur

6.12.1 Kultivierung von adhärennten Monolayer Zellkulturen

modifiziert nach (Hart, 2014)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit adhärennt wachsenden Monolayer-Zellkulturen gearbeitet: 293T-Zellen. Kultiviert wurden alle Zelllinien in Zellkulturflaschen (75 cm²) bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank. Die entsprechenden Medien, in denen diese Zelllinien kultiviert wurden, sind in Kapitel 6.6 aufgeführt. In der Regel wurden die Zellen montags und freitags gesplittet. Dazu wurde der Zellrasen, nachdem das alte Kulturmedium steril abgenommen wurde, zur vollständigen Entfernung aller Mediumreste mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA wenige Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Enzym Trypsin ist eine Protease und ermöglicht das Ablösen der Zellen von der Flaschenoberfläche, sowie das Vereinzeln der Zellen durch den enzymatischen Abbau einiger Zelloberflächenproteine. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe des entsprechenden Mediums gestoppt, ein Teil dieser Suspension in eine neue Kulturflasche überführt und mit dem jeweiligen Kulturmedium auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

6.12.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Calciumphosphatmethode

Die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte mittels der Calciumphosphatmethode. Die Konfluenz der zu transfizierenden Zellen sollte 60-80 Prozent betragen um die Effizienz der Methode zu optimieren. Die 293T-Zellen wurden in einer 6-Wellplate kultiviert. Hierfür wurden die Zellen in einer 1:10 Verdünnung ausgesät und 24h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Für die Transfektion wurden 5 µg DNA in ein Eppendorfgefäß vorgelegt. Unter der Sterilbank wurden die weiteren Schritte durchgeführt. Zur DNA wurden 214 µl Aqua dest. hinzupipettiert und unter permanentem Vortexen 31 µl 2 M CaCl₂-Lösung tropfenweise dazugegeben. Vorbereitend wurden in einem neuen 1,5 ml Eppendorfgefäß 250 µg HEBS-Puffer vorgelegt. Die Lösung aus DNA und CaCl₂ wurde ebenfalls unter dauerhaftem Vortexen zum HEBS Puffer tropfenweise und langsam hinzugefügt (Testoni et al., 2015). Hierbei kommt es zum Aneinanderlagern der DNA an die Calciumphosphatkristalle aufgrund elektrostatischer

Wechselwirkungen. Die entstehenden Präzipitate sollten feinkörnig und weiß erscheinen. War der Niederschlag grobkörnig, so wurde die zuvor beschriebene Prozedur wiederholt. Nach dem Zusammenführen wurde 25 min gewartet, bevor die Präzipitate tropfenweise zum Well hinzupipettiert wurden. Hierbei wurde auf eine homogene Verteilung des Transfektionsagens geachtet. Die DNA-Kristall Präzipitate werden bei Kontakt mit der Zellmembran durch Endozytose aufgenommen und gelangen somit ins Zytoplasma. Das Medium wurde 4h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank stehen gelassen und danach mit PBS gewaschen um die toxischen Effekte des Calciumphosphats auf die Zellen so gering wie möglich zu halten. Der Mediumwechsel wurde ebenfalls durchgeführt. 2 Wells einer 6-Wellplate waren für die Proteinmenge eines Western Blots i. d. R. ausreichend. Die Transfektion der 293T-Zellen mit der Calciumphosphatmethode wurde zur Proteingewinnung für Western Blots durchgeführt.

6.12.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit PolyFect (Qiagen)

modifiziert nach (Hart, 2014)

Zur Transfektion von 293T-Zellen wurde PolyFect verwendet. Es ist ein DNA-Transfektionsreagenz und wird durch die Anwesenheit von Serum während der Transfektion nicht beeinflusst. Dieses Transfektionsreagenz besitzt eine hohe Transfektionseffizienz, sowie eine geringe Zytotoxizität und besteht aus einem positiv geladenen Polymer, das von einem porösen Nanopartikel umgeben ist. Die positive Ladung des Polymers dient dazu, die zu transfizierende, negativ geladene DNA zu binden und so die Formierung eines Nanopartikel-Polymer-DNA-Komplexes sicherzustellen. Dieser Komplex wird von den eukaryotischen Zellen endozytotisch aufgenommen und der Nanopartikel-Komplex schützt dabei die DNA vor dem Abbau. Die eukaryotischen, adhärenen Zellen wurden laut Vorschrift ausgesät, bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, nach 24 h entsprechend den Herstellervorgaben transfiziert und nach 48 h geerntet oder weiterverwendet. Die Transfektion der 293T-Zellen mit PolyFect wurde zur RNA-Gewinnung für Northern Blots durchgeführt.

6.13 DNA-Techniken

6.13.1 Präparative Plasmid-Isolation mittels NucleoBond-Kit

(Hart, 2014)

Zur Isolation großer Mengen an hochreiner Plasmid-DNA aus einer Bakteriensuspension, wurde das NUCLEOBOND™-Kit von Macherey Nagel benutzt. Nach Firmenprotokoll wurden die Bakterien zunächst einer alkalischen Lyse unterzogen und das erhaltene Zelllysate mittels einer Anionenaustauschersäule aufgearbeitet. Die NUCLEOBOND™-AX 100-Säulen (Midi) ermöglichen eine Aufbereitung von bis zu 100 ml Bakterienkultur. Zunächst wurde eine 50 ml Übernachtskultur Bakterien, welche mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurden, 10 min bei 5000 rpm und 4°C mit Hilfe der Heraeus Megafuge 1.0 RF pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml Puffer S1 (+RNaseA) resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 4 ml Puffer S2, der Ansatz wurde gevortext und für maximal 5 min bei RT inkubiert. Der S2-Puffer enthält SDS, das die bakterielle Zellwand zerstört, die Bakterien lysiert und zur Freisetzung der intrazellulären Zellbestandteile führt. Darüber hinaus enthält dieser Puffer NaOH, welches die chromosomale DNA, die Plasmid-DNA und die Proteine denaturiert. Im nächsten Schritt wurde die Suspension mit 4 ml Puffer S3 neutralisiert, durch mehrmaliges invertieren gemischt und darauffolgend 5 min auf Eis inkubiert. In diesem Zeitraum hybridisieren die beiden Stränge der wesentlich kleineren Plasmid-DNA wieder und verbleiben in Lösung, wohingegen die weitaus größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und mit den ebenfalls denaturierten Proteinen ausfällt. Danach erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt (25 min, 6000 rpm, 4°C) und der DNA-enhaltende Überstand wurde auf die zuvor mit 4 ml Puffer N2 equilibrierte NUCLEOBOND™-AX 100-Säule gegeben und wegen der Salz- und pH-Bedingungen, die im Lysat herrschten, konnten die stark negativ geladenen Nukleinsäuren an die Säulenmatrix binden und wurden zurückgehalten. Danach wurde die Säule zur Entfernung der RNA und den übrigen Proteinen 2 x mit 5 ml Puffer N2 gewaschen und anschließend die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer N5 eluiert. Nun erfolgte die DNA-Fällung durch Zugabe von 3,6 ml Isopropanol und die Pelletierung der Plasmid-DNA durch Zentrifugation (30 min, 6000 rpm, 4°C). Abschließend wurde die DNA mit 2 ml Ethanol (70%) gewaschen, abhängig von der Größe des DNA-Pellets in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer gelöst und der DNA-Gehalt, sowie der Reinheitsgrad photometrisch bestimmt.

6.13.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

(Hart, 2014)

Zur Messung der Konzentration und des Reinheitsgrades von DNA und RNA wurde mit Hilfe des Ultraspec 3000 Photometers bzw. des NanoDropTM 2000c die Extinktion bei 260 nm bzw. 280 nm bestimmt. Da Nukleinsäuren Licht der Wellenlänge 260 nm absorbieren, ist die Absorption ein Maß für den DNA-Gehalt einer Lösung. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei $\lambda = 260$ nm entspricht:

doppelsträngige DNA (dsDNA) einer Konzentration von 50 mg/ml

einzelsträngige DNA (ssDNA) einer Konzentration von 40 mg/ml

einzelsträngige RNA (ssRNA) einer Konzentration von 40 mg/ml

Oligonukleotid-DNA einer Konzentration von 33 mg/ml

Die Ursache für die höhere Absorption einzelsträngiger DNA im Vergleich zu doppelsträngiger DNA ist im Hyperchromizitätseffekt begründet. Die Reinheit von Nukleinsäuren wurde über den Quotienten aus OD_{260 nm} / OD_{280 nm} bestimmt. Da Proteine Licht der Wellenlänge 280 nm absorbieren, beschreibt der Quotient OD_{260nm} / OD_{280 nm} den Reinheitsgrad der DNA-/RNA-Probe. Dieser sollte bei reiner DNA bzw. RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Tiefere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten. Für die Messung mit dem Ultraspec 3000 Photometer wurde die DNA-/RNA-Lösung 1:100 mit H₂O bidest auf ein Endvolumen von 500 μ l verdünnt und die OD_{260 nm} und OD_{280 nm} gemessen. Bei Messungen am NanoDropTM 2000c wurden 2 μ l unverdünnte DNA-/RNA-Lösung eingesetzt. Als Referenz diente H₂O bidest.

6.13.3 Polymerase-Kettenreaktion

(Hart, 2014)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein enzymatisches *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäuresequenzen definierter Länge aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen dar. Grundlage dieser Methode ist die Eigenschaft von DNA-Polymerasen ausgehend von einem freien 3'-Hydroxy-Ende einer einzelsträngigen DNA-Matrize (Template) den dazu komplementären DNA-Einzelstrang synthetisieren zu können. Im Folgenden ist ein gängiges PCR-Pipettierschema dargestellt:

Tab. 3: Pipettierschema eines 50µl Standard-PCR-Ansatzes

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
dNTP's	2 µl	je 100 mM
10×Reaktionspuffer	5 µl	1×
5'-Primer	1 µl	50 µM
3'-Primer	1 µl	50 µM
Matrizen DNA	1-5 µl	0,1-0,5 µg
Taq-Polymerase	0,5 µl	5 U
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	

Am Anfang der PCR wird zunächst die doppelsträngige DNA-Matrize bei 95°C in zwei Einzelstränge denaturiert. Danach wird die Reaktion wieder abgekühlt, damit synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer), die jeweils zu einer spezifischen DNA-Sequenz der beiden einzelsträngigen Matrizen komplementär sind, mit diesen hybridisieren können. Dieser Schritt wird als Annealing bezeichnet. Die dafür ausgewählte Annealing-Temperatur ist abhängig von Länge und Sequenz bzw. GC-Gehalt der verwendeten Primer. Die Annealing-Temperatur liegt meistens zwischen 51°C und 65°C. Durch das Annealing der Primer an ihre komplementären Sequenzen der einzelsträngigen Matrizenstränge steht nun der DNA-Polymerase ein freies 3'-Hydroxy-Ende zur Verfügung, das als Startpunkt für die Synthese des zum Template komplementären Tochterstranges dient. Dieser, als Elongation bezeichnete Schritt der PCR, läuft bei 72°C ab, dem Temperaturoptimum der Polymerase und benötigt zur Synthese der Tochterstränge freie dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) im Reaktionsmix. Obwohl die im ersten Elongationszyklus synthetisierten Tochterstränge oft länger als der zu amplifizierende Sequenzbereich sind, besitzen sie jedoch durch die Primer festgelegte Startpunkte, die auf diese Weise den zu amplifizierenden Sequenzbereich genau bestimmen. Während des zweiten Reaktionszyklus (Denaturierung, Annealing und Elongation) werden die zuvor neu synthetisierten DNA-Doppelstränge ebenfalls als Templates genutzt. Ab dem dritten Reaktionszyklus entstehen hauptsächlich Doppelstränge, die von Primern flankiert werden. Die zyklischen Wiederholungen von Denaturierung, Annealing und Elongation ermöglichen eine nahezu exponentielle Amplifikation der gewünschten Zielsequenz, in denen alle neu synthetisierten Tochterstränge als Templates dienen können. Die am häufigsten in PCRs eingesetzte DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt und auch noch bei den 94°C heißen Denaturierungsschritten stabil bleibt. Beim Design der Oligonukleotid-Primer wurde darauf geachtet, dass beide Primer ähnliche Schmelztemperaturen aufweisen und sich keine Primerdimere durch Selbstkomplementarität

bilden konnten. Alle verwendeten Primer wurden in lyophilisierter Form bezogen und vor der Verwendung in sterilem, DNase-freiem Wasser gelöst. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research durchgeführt. In der Tabelle 4 ist ein Standard-PCR-Programm dargestellt, dessen Annealing-Temperatur den jeweiligen Schmelztemperaturen der Primer und dessen Elongationszeit der jeweiligen Sequenzlänge des Amplifikats (0,5-1 min pro kb Sequenzlänge) angepasst wurde. Um eventuelle Kontaminationen ausschließen zu können, wurde bei jeder PCR eine Wasserkontrolle mitgeführt, welche alle Komponenten des PCR-Ansatzes bis auf das DNA-Template enthielt. Der letzte Schritt einer jeden PCR bestand aus einem stark verlängerten Elongationsschritt, der zum Auffüllen noch einzelsträngig vorliegender DNA-Stränge diente. Um zu überprüfen, ob die PCR erfolgreich ablief, wurden 25 µl eines PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Tab. 4: Einstellungen eines Standard PCR Programms

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1) Denaturierung	95°C	2 min
2) Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	Abhängig vom Primer	1 min
Elongation	72°C	0,5 – 1 min
3) Letzte Elongation	72°C	ca. 10min

6.13.4 Agarosegelelektrophorese

(Hart, 2014), (Sambrook et al., 1989)

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren, um DNA-Fragmente verschiedener Größen sichtbar zu machen. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandert diese im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Dabei wirken die Agarosegele wie Molekularsiebe, wobei kleinere DNA-Fragmente schneller durch die Poren des Gels wandern als größere. Die Porengröße des Agarosegels wird durch die Agarosekonzentration des Gels bestimmt, daher richtet sich die eingesetzte Konzentration nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Mittels eines bekannten DNA-Molekulargewichtstandards kann die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmt werden. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarose in 450 ml 1x TAE-Puffer durch aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen mittels Magnetrührgerät auf etwa 60°C mit 25 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml in H₂O) versetzt. Danach wurde die Agaroselösung auf eine Glasplatte mit Messingrahmen (24,5 cm x 24,5 cm x 1 cm), der zuvor mit 1% Agaroselösung abgedichtet wurde und bereitgestellten

Halterungen mit Messing-Kämmen, die zur Aussparung der ca. 35 µl fassenden Probetaschen dienen, gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Agarosegels wurden die Käbme gezogen, das Gel in Klarsichtfolie verpackt und bis zur Verwendung bei 4°C zwischengelagert. Um das Absinken der DNA-Proben in die Geltaschen gewährleisten zu können, wurden diese mit einem Fünftel ihres Gesamtvolumens an glycerolhaltigem Blaumarker versetzt und auf diese Weise konnte auch gleichzeitig, durch den im Blaumarker enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau, die Lauffront der DNA-Proben im Gel sichtbar gemacht werden. Ein Gelstück mit der adäquaten Anzahl an Taschen wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer verbracht. Zur Bestimmung der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente, wurde in die äußeren Taschen separat 10 µl eines Molekulargewichtstandards ("2-log-kb DNA Ladder", neb) aufgetragen. Danach wurden die mit Blaumarker versetzten DNA-Proben in die restlichen Geltaschen pipettiert. Abschließend wurden die DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (140V für ca. 1h). Durch die Zugabe des unter UV-Licht fluoreszierenden Ethidiumbromids, das in doppelsträngige DNA interkaliert, war es möglich, die DNA-Fragmente nach erfolgter Auftrennung unter UV-Licht bei 254 nm als fluoreszierende Banden zu dokumentieren (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad). Aber diese kurzwellige UV-Strahlung schädigt die DNA so stark, dass diese unbrauchbar für weitere gentechnische Arbeiten wird. Daher wurden DNA-Fragmente, die zur Klonierung weiterverwendet wurden, vor der Dokumentation des Gels mittels einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

6.13.5 NucleoSpin-Gelextraktion von DNA

(Hart, 2014)

Zur Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel oder zur Aufreinigung einer DNA-Lösung (PCR-Clean-up) wurde das Monarch® DNA Gel Extraction Kit von neb unter Verwendung des Firmenprotokolls benutzt. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie, welchem die Bindung von DNA an eine silicahaltige Säule zu Grunde liegt. Danach wurden durch einen Waschschrift unspezifisch gebundene Moleküle von der Säule entfernt und anschließend die DNA mit einem Elutionspuffer und Zentrifugation von der Säule in ein frisches Eppendorfgefäß eluiert. Die auf diese Weise extrahierte DNA wurde nun entweder mit Restriktionsenzymen geschnitten oder zur direkten Ligation in den Vektor benutzt.

6.13.6 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(Hart, 2014), (Sambrook et al., 1989)

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) stammen ursprünglich aus Mikroorganismen und verdauen Fremd-DNA zur Abwehr von Bakteriophagen. Dabei wird die von den Enzymen als fremd erkannte DNA abgebaut. Allgemein unterscheidet man drei Klassen von Restriktionsendonukleasen. Jedoch nur Restriktionsenzyme der Klasse II finden in der Molekularbiologie Verwendung. Diese Klasse von Endonukleasen erkennt spezifisch eine Sequenz von vier bis acht Basenpaaren in doppelsträngiger DNA, wobei diese Sequenzen normalerweise auch die Schnittstelle selbst beinhalten. Diese Erkennungssequenzen sind meist palindromische Sequenzen. Die Restriktionsendonukleasen können zwei unterschiedliche Arten von Schnitten erzeugen. Einerseits können die Restriktionsenzyme direkt gegenüberliegende Basenpaare schneiden, so dass glatte Enden, sog. blunt ends, entstehen. Andererseits können sie die DNA versetzt schneiden, wodurch überhängende Enden am 5'- oder am 3'-Ende, sog. "sticky ends", gebildet werden. Die Aktivität von Restriktionsenzymen ist durch die Enzymmenge definiert, die benötigt wird, um 1 µg DNA im optimalen Milieu bei optimaler Temperatur (meist 37°C) innerhalb von 60 min vollständig zu schneiden und wird in Units (u) angegeben.

In einem Restriktionsansatz wurden für analytische Zwecke 0,5-1 µg DNA und für präparative Zwecke bis zu 4 µg DNA eingesetzt. Die Anzahl der verwendeten Units betrug je nach Restriktionsenzym zwischen 2-10 U/g DNA. Der Restriktionsverdau erfolgte jeweils gemäß dem Herstellerprotokoll (Temperatur, Inkubationsdauer, Puffer) mit den mitgelieferten 10 x Puffern und falls benötigt 10 x BSA. Es besteht auch die Möglichkeit einen Doppelverdau durchzuführen, was bedeutet, dass die DNA mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten wird. Dabei muss darauf geachtet werden, dass ein entsprechender Puffer verwendet wird, in dem beide Enzyme eine angemessene Restriktionsaktivität besitzen.

Vor der Zugabe der Enzyme, wurden die Restriktionsansätze gevortext, kurz abzentrifugiert, die Enzyme hinzupipettiert und für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, um einerseits den Erfolg des Restriktionsverdaus zu überprüfen und andererseits gleichzeitig die DNA von Restriktionspuffer und Enzymen zu reinigen.

Tab. 5: Pipettierschema eines Standard Restriktionsverdaus

Komponente	Menge / Volumen
Restriktionsenzym	1 U
10 x Restriktionspuffer	2 μ l
DNA	1-2 μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 20 μ l

6.13.7 Dephosphorylierung von Vektor DNA

(Hart, 2014), (Bolivar et al., 1977), (Chaconas und van de Sande, 1980)

Nach dem Restriktionsverdaus linearisierte Vektor-DNA, wurde unter Verwendung von alkalischer Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) die reaktive Phosphatgruppe am 5'-Ende entfernt, um eine Rezirkularisierung oder auch Konkatemisierung des Vektors zu verhindern. Wenn Vektoren mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut wurden, ist eine Rezirkularisierung eher unwahrscheinlich, jedoch eine Konkatemisierung, d.h. eine Verbindung mehrerer Vektoren miteinander, möglich. Daher wurde auch nach einem Doppelverdaus der Vektor dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde nicht in einem separaten Schritt durchgeführt, sondern stattdessen wurde der Restriktionsansatz zusätzlich mit 1 μ l CIP versetzt und mindestens für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Dephosphorylierungs- und Restriktionsansatz mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, der Vektor aus dem Gel ausgeschnitten, über NUCLEOSPIN™-Säulen reisoliert und zur Ligation von DNA-Fragmenten weiterverwendet.

6.13.8 Ligation von DNA Fragmenten

(Hart, 2014), (Dugaiczky et al., 1975), (Western und Rose, 1991)

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, welche aus mit dem Bakteriophagen T4 infizierten *E. coli* Bakterien isoliert wurde, erfolgte während einer Ligation die enzymatische Verknüpfung von zueinander passenden DNA-Fragmenten. Dieses Enzym katalysiert *in-vitro* unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden in doppelsträngiger DNA und ermöglicht somit die Bildung einer intakten, rekombinanten ds-Plasmid-DNA. Dabei können die beiden Enden der zu ligierenden Nukleinsäuremoleküle entweder überhängend oder stumpf sein. Um eine effektive Ligation von zwei Nukleinsäure-molekülen zu gewährleisten, wurden die Konzentrationen der eingesetzten Vektor- und Insert-DNA so gewählt, dass beide im Reaktionsansatz äquimolar

vorlagen. Die nachfolgende Tabelle 6 zeigt einen typischen Ligationsansatz. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte über Nacht bei 4°C. Zur anschließenden Transformation kompetenter Bakterien, wurden 5 µl eines Ligationsansatzes verwendet. Zur Überprüfung der erfolgreichen Dephosphorylierung des Vektors, wurde bei jeder Ligation ein Ligationsansatz ohne Insert als Kontrolle mitgeführt.

Tab. 6: Standard Ligationsansatz

Komponente	Volumen
Insert	4-7 µl
dephosphorylierter Vektor	1-4 µl
10 x T4-Ligase-Puffer	1 µl
T4-Ligase (1U/µl)	1 µl

6.14 RNA-Techniken

6.14.1 RNA-Isolation

(Hart, 2014)

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen, wurde das peqGOLD TriFast™-Reagenz (PEQLAB) nach einem modifizierten Protokoll verwendet. Hierbei handelt es sich um eine optimierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode zur gleichzeitigen Extraktion von RNA, DNA und Proteinen. Um RNA aus Monolayer-Zellkulturen zu extrahieren, wurde zuerst das Zellkulturmedium aus den Kulturschalen entfernt. Nun wurde 1 ml peqGOLD TriFast™ pro 10 cm² Oberfläche auf den Zellrasen pipettiert, die Zellen lysiert, abgeschabt und die Zell-TriFast-Suspension für eine 5 minütige Inkubation in ein Falcon überführt, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe sicherzustellen. Nach der Inkubation wurde pro verwendetem ml TriFast™ 0,2 ml Chloroform zur Suspension pipettiert, die Proben 15 sek geschüttelt und wieder 10 min lang bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Zentrifugationsschritt (30 min, 6000 rpm, 4°C), um eine Phasentrennung des Homogenats zu erreichen. Dabei trennte sich das Homogenat in drei Phasen, in eine untere rot gefärbte Phenol-Chloroform-Phase, eine weiße Interphase und in eine obere, wässrige Phase, die ausschließlich die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde darauf in ein frisches Falcon überführt. Zur Fällung der RNA wurden pro ml eingesetzten TriFast 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben, gevortext und die Lösung 15 min auf Eis gekühlt.

Nun erfolgte wieder ein 30-60 minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 6000 rpm, um die gefällte RNA zu pelletieren. Das RNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und danach in 100-200 µl DEPC-Wasser bei 4°C über Nacht gelöst.

6.14.2 Northern Blot

(Hart, 2014)

Die Methode des Northern Blots diente zur Auftrennung und Identifikation von einzelsträngigen RNA-Molekülen. Zunächst wurde die Gesamt-RNA mittels einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, die RNA-Fragmente auf eine Nylonmembran geblottet und fixiert. Danach wurde das entsprechende Fragment durch Hybridisierung mit einer spezifisch markierten Sonde, die aus einzelsträngiger DNA oder RNA besteht und an das fixierte RNA-Fragment mittels homologer Basenpaarung bindet, nachgewiesen. Die Sonde kann sowohl mit radioaktiven Molekülen oder nicht-radioaktiven Bestandteilen, wie z.B. Digoxigenin oder Biotin, markiert sein.

6.14.3 Herstellung des Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese

modifiziert nach (Hart, 2014)

Für die Herstellung des 12% Polyacrylamidgels wurde das SequaGel® Kit (National Diagnostics) verwendet. Das Kit besteht aus drei Komponenten: SequaGel-Konzentrat, -Verdünner und -Puffer. Die Lösungen enthalten neben Acrylamid und Bisacrylamid auch Harnstoff (7M) zur Denaturierung der RNA und Auflösung ihrer Sekundärstrukturen. Die Auftrennung der RNA-Proben im Polyacrylamidgel erfolgte durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, wobei die negativ geladene RNA in Richtung der Anode wandert. Wegen der Vernetzung des Gels wandern größere RNA-Moleküle langsamer durch das Gel als kürzere. Nach dem Zusammenpipettieren aller Komponenten wurde das noch flüssige Gel zum Auspolymerisieren zwischen zwei, durch Spacer getrennte und zuvor mit 1%iger Agarose abgedichtete, Glasplatten (24 cm x 16,5 cm) gegossen und ein Kamm für 16 Taschen zwischen die Platten geschoben. Zur Probenvorbereitung wurden 20 µg RNA für die miR-Expressionskontrollen, sowie für die Northern Blots der 293T-Zelllinien und 5 µg RNA mit 5-10 µl RNA-Ladepuffer II versetzt. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Die Auftrennung der RNA-Proben erfolgte für ~3 h bei 15 Watt. Danach wurde der Erfolg der Elektrophorese nach Anfärben der RNA in einem Ethidiumbromidbad (10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml) in 100 ml 1x TBE) bei einer Wellenlänge von 254 nm dokumentiert.

6.14.4 RNA Transfer

(Hart, 2014)

Nach der Dokumentation des Polyacrylamidgels, erfolgte der RNA-Transfer auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond™-N+, Amersham) mit Hilfe einer "Semi-dry-blotting-Apparatur" (StarLab). Zum Blotten wurden fünf Lagen in H₂O bidest getränkte Whatman Filterpapiere auf die Anode gelegt, darauf die Nylonmembran, gefolgt von dem Polyacrylamidgel und fünf weiteren Lagen H₂O bidest getränkter Filterpapiere. Danach wurde die Kathode aufgelegt und die RNA für 30 min bei 15 V auf die Nylonmembran geblottet. Zur Fixierung der besonders kleinen microRNA-Moleküle auf der Nylonmembran, wurde diese auf drei Whatman Filterpapiere, die mit einem chemischen Crosslinkreagenz (Pall and Hamilton, 2008) getränkt waren, aufgelegt, in Klarsichtfolie luftdicht verpackt und für 1-2 h bei 55°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert.

6.14.5 Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

(Hart, 2014)

Zum Nachweis von RNA-Molekülen auf einer Nylonmembran wurden radioaktiv markierte, einzelsträngige RNA-Sonden benutzt. Die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden erfolgte mit Hilfe des mirVana™ miRNA Probe Construction-Kit von Ambion. Die zur Synthese der RNA-Sonde benötigten DNA-Oligonukleotide, deren Sequenzen der nachzuweisenden microRNA-Sequenzen entsprachen, enthielten am 3'-Ende zusätzlich eine 8 nt lange Sequenz (5'-CCTGTCTC-3'), welche mit dem T7-Promotorprimer hybridisieren kann. Dadurch konnte durch Hybridisierung des Templates mit dem T7-Promotorprimer mit Hilfe des Exo-Klenow Enzyms ein doppelsträngiges DNA-Template synthetisiert werden. Der Hybridisierungsmix bestand aus 2 µl T7-Promotor-Primer (100 µM), 6 µl Hybridisierungspuffer und 2 µl Oligonukleotid-Template (100 µM). Dieser Hybridisierungsmix wurde zur Hybridisierung von Template und Primer zuerst 5 min bei 70°C und anschließend ebenfalls 5 min bei RT inkubiert. Zu den hybridisierten Oligonukleotiden wurde der folgende Reaktionsmix aus 2 µl 10x Klenow Reaction Buffer, 2 µl 10x dNTP Mix, 4 µl Nuklease-freiem Wasser und 2 µl Exo-Klenow pipettiert und dieser Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Das so hergestellte dsDNA-Template konnte nun entweder bei -20°C gelagert oder für die *in-vitro*-Transkription mit radioaktiv markierten UTPs mittels der T7-RNA-Polymerase eingesetzt werden. Der *in-vitro*-Transkriptionsmix wurde aus folgenden Komponenten zusammenpipettiert: 1 µl dsDNA Template, 2 µl 10x Transkriptions-Puffer, 1 µl ATP, 1 µl CTP, 1 µl GTP, 5 µl gelabeltes UTP (³²P), 2 µl T7-RNA-Polymerase, 7 µl Nuklease-freies Wasser. Dieser Ansatz wurde gevortext, kurz abzentrifugiert und 10 min lang bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das noch vorhandene dsDNA-Template durch Inkubation des Ansatzes bei 37°C für 10 min mit 1 µl

DNaseI entfernt. Die so hergestellte, radioaktiv markierte Sonde wurde danach sofort im Northern Blot eingesetzt.

6.14.6 Spezifischer Nachweis von RNA

(Hart, 2014)

Nach dem chemischen Crosslinken der RNA mit der Nylonmembran, wurde diese in eine Hybridisierungsröhre aus Glas transferiert und 30 min bei 50°C mit Hybridisierungspuffer auf dem Drehrad eines Hybridisierungsofens prähybridisiert. Im nächsten Schritt wurde, die zuvor hergestellte radioaktiv markierte Sonde, welche spezifisch die nachzuweisende RNA-Sequenz binden kann, in den Hybridisierungspuffer pipettiert und die Membran über Nacht bei 50°C auf dem Drehrad eines Hybridisierungsofens inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der Hybridisierungspuffer mit der Sonde entfernt. Danach wurde der Blot zuerst zweimal 15 min mit jeweils 30 ml Hochsalzpuffer (5x SSC/1% SDS) bei 50°C auf dem Drehrad des Hybridisierungsofens gewaschen und darauf wiederum zweimal 15 min mit jeweils 30 ml Niedrigsalzpuffer (1x SSC/1% SDS) bei 50°C inkubiert. Zum Abschluss wurde der Blot in Klarsichtfolie verpackt und über Nacht auf einem Phospho-Imager-Screen exponiert und am nächsten Tag mit einem Phosphoimager™-Typhoon (Molecular Dynamics) gescannt.

6.15 Protein Techniken

6.15.1 Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen unter reduzierenden Bedingungen

(Hart, 2014), (Deininger, 1990)

Die Gesamtzellextrakte aus adhärennten Monolayerzelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, wurden unter Verwendung eines 2x Sample-Buffers hergestellt. Der 2x Sample-Buffer enthält einerseits 3-Mercapto-1,2-propanediol, das Disulfidbrücken reduziert und dadurch die Tertiärstrukturen von Proteinen aufspaltet, und andererseits SDS, welches Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen löst und bei allen Proteinen für ein gleiches Masse-/Ladungsverhältnis sorgt. Daher ist das Laufverhalten der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese nicht mehr abhängig von ihrer Ladung, sondern nur noch von ihrer Masse. Zur Herstellung von Proteinextrakten aus adhärennten Monolayerzelllinien wurde das Kulturmedium abgenommen, der Zellrasen mit PBS abgespült, die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm bei 4°C pelletiert und nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde zunächst auf Eis mit einer definierten Menge 2x SDS-Sample-Buffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 3 x 5 sek lange Sonifizierung der Zellen, daraufhin

die Denaturierung der Proteine für 5-10 min bei 98,5°C im Wasserbad und ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und 4°C zur Sedimentierung nicht löslicher Zellbestandteile. Da in dieser Arbeit 2x Sample-Buffer ohne Bromphenolblau benutzt wurde, konnte der Proteingehalt einer 1:100 Verdünnung der Gesamtzellextrakte in 0,1 M NaOH photometrisch durch Messung der OD_{280nm} bestimmt werden. Die Berechnung der Proteinmenge, die in der Gelelektrophorese eingesetzt werden soll, erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{6,4}{OD_{280}} = 30 \mu\text{g Protein}$$

Das Ergebnis dieser Formel stimmt mit der Proteinextraktmenge (in μl) überein, die 30 μg Protein entspricht. Bis zur Verwendung wurden die Proteinextrakte bei -20°C gelagert.

6.15.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

(Hart, 2014), (Laemmli, 1970)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, ihrer Gesamtladung oder ihrer dreidimensionalen Struktur. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung der Proteinextrakte ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen, da der verwendete Laufpuffer, das Polyacrylamidgel und der 2x Sample Buffer, das negativ geladene Detergens SDS im Überschuss enthielten. Dieses Detergens lagerte sich an die hydrophoben Regionen der Proteine an und zwar ein SDS-Molekül an je zwei Aminosäurereste. Dadurch wurden nahezu alle nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb der Proteine gelöst und das Protein war proportional zu seiner Masse negativ geladen, wodurch die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar wurde. Darüber hinaus wurden alle Disulfidbrücken im Protein durch das 3-Mercapto-1,2-propanediol des 2x Sample Buffers gespalten und die Proteine hauptsächlich wegen ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladungen erfolgte nach Anlegen eines elektrischen Feldes eine Wanderung der Proteine hin zur Anode. Bei der Herstellung von Polyacrylamidgelen kommt es zur Polymerisation von Acrylamid, welches über N,N'-Methyl-Bisacrylamid quervernetzt wird. Die Polymerisationsreaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Die Laufstrecke der Proteine in einem Polyacrylamidgel mit geeigneter Porengröße ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Das Mischungsverhältnis aus Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt die Porengröße der Gelmatrix. Zur Erhöhung der Auflösung bei der Auftrennung der Proteine, wurde in dieser Arbeit ausschließlich eine

diskontinuierliche Gelelektrophorese eingesetzt, die in zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt wurde. Zuerst müssen die Proteine ein grobporiges Sammelgel (Uppergel) passieren, um eine einheitliche Lauffront zu bilden, bevor sie in einem feinporigen Trenngel (Bottomgel) aufgetrennt wurden. Um das relative Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine bestimmen zu können, wurde parallel zu diesen ein Molekulargewichtsmarker mit aufgetrennt, der aus Proteinen bekannter Molekulargewichte bestand.

6.15.3 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels und Gelelektrophorese

(Hart, 2014)

Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels wurden zwei Glasplatten (14,5 x 16,5 cm), die zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigt wurden, durch Teflon-Abstandshalter voneinander getrennt und mit 1%iger Agaroselösung abgedichtet. Danach wurde zunächst das Trenngel in den Zwischenraum zwischen den zwei Glasplatten gegossen und mit H₂O bidest überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Zur Aussparung der Taschen im Sammelgel, in die später die Proteinproben pipettiert wurden, wurde ein Teflonkamm eingesetzt. Der Teflonkamm und der unterste Teflon-Spacer wurden entfernt, sobald das Sammelgel auspolymerisiert war und danach wurde das Gel senkrecht in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt. Die obere und untere Kammer der Gelelektrophoreseapparatur wurde mit SDS-Laufpuffer und die Geltaschen entweder mit 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers oder Proteinproben befüllt. Die elektrophoretische Trennung der Proteinproben erfolgte im Sammelgel bei 25 mA und im Trenngel bei 35 mA für ~2 h. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich 8,75%ige Polyacrylamidgele verwendet.

6.15.4 Western Blot

(Hart, 2014)

Mit Hilfe der Methode des Western Blots, wurden die zuvor in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen auf dieser Membran immobilisiert. Dabei behalten die aufgetrennten und immobilisierten Proteine weitgehend ihre funktionelle Aktivität und Immunreaktivität. Dadurch wird es möglich einzelne Proteine durch spezifische Antikörper immunologisch nachzuweisen (Immunoblot). Gebundene Antikörper können entweder radioaktiv oder durch Chemilumineszenz detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine und die daran gebundenen Antikörper ausschließlich mittels Chemilumineszenz

nachgewiesen. Der Western Blot wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Plastikwanne luftblasenfrei zusammengebaut, unter Verwendung eines zusammensteckbaren PVC-Gitters. Die zum Aufbau benötigten Komponenten wurden im PVC-Gitter in folgender Reihenfolge zusammengefügt: ein Wattetuch, zwei Whatman-Filterpapiere, das Polyacrylamidgel, die Protran™-Nitrocellulose-Methoden Membran (Schleicher & Schuell), zwei Filterpapiere und zum Abschluss wieder ein Wattetuch. Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) für 1,5 -2 h bei 350 mA. Nach dem Western blotting wurden die auf der Membran fixierten Proteine unspezifisch mittels PonceauS™ (Sigma-Aldrich) angefärbt und die Markerspuren mit einem Skalpell abgeschnitten. Zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen der übrigen Membran, wurde diese zunächst 30 min bei RT in 5%iger PBS-Milch geblockt und darauffolgend mit dem entsprechenden Primärantikörpern in 2-5 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in eine Klarsichthülle eingeschweißt. Die mit dem Primärantikörper eingeschweißte Membran wurde über Nacht bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3 x 15 min in PBS auf einem Schüttler gewaschen, um unspezifisch gebundene Primärantikörper zu entfernen. Zum Nachweis der gebundenen Primärantikörper erfolgte nun eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Der Sekundärantikörper wurde 1:5000 in 5%iger PBS-Milch verdünnt und 1 h lang bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 3 x 15 min in PBS-Puffer gewaschen und anschließend die mit Antikörpern markierten Proteine mittels einer enzymkatalysierten ECL-Lichtreaktion (Enhanced Chemoluminescence) detektiert. Nach Zugabe von 5 µl H₂O₂ und 10 ml ECL-Reagenz auf die Membran erfolgte eine Peroxidase-katalysierte Reduktion von H₂O₂ und gleichzeitige Oxidation von Luminol, was eine Licht-Emission der Wellenlänge λ =428 nm bewirkte, die durch Auflegen eines lichtempfindlichen ECL™-Films (Hyperfilm ECL™, Amersham) auf die Membran dokumentiert wurde. Danach wurde dieser Film entwickelt, fixiert und getrocknet.

6.15.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde angewendet um die Expression von GFP bzw. mCherry visuell bei allen Klonierungsprodukten nachzuweisen. Hierfür wurden 293T-Zellen auf 6-Well Plates ausgesät. Die 293T-Zellen wurden entsprechend Kapitel 6.12.3 mit dem Ziel-Vektor transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Hier konnte bei Anregung durch blaues Licht die Emission von Licht der Wellenlänge 509nm erzeugt werden und somit die Expression von GFP bewiesen werden. Zum Nachweis von mCherry wurde zur Anregung grünes Licht verwendet, sodass mCherry durch rote Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnte.

7 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung von Vektoren zur Expression von miRNAs in einem Vektor, welcher zusätzlich das GFP-Protein bzw mCherry-Protein exprimiert. Die miRNA-kodierende Sequenz sollte dazu auf die 3'-Seite des stop-Codons des GFP-Proteins kloniert werden, so dass ein Transkript bestehend aus GFP-miRNA-polyA entsteht (Rodriguez et al., 2004). Im folgenden Ergebnisteil wird die Herstellung des Ko-Expressionsvektors pSG5-GFP-miR-34a aus den Vektoren pSG5-miR-34a und pSG5-GFP sowie die Herstellung des Ko-Expressionsvektors aus pcDNA3.1/Hygro(-) beschrieben. Beim letztgenannten Vektor wurde die Wildtyp pre-miRNA-142 sowie zwei mutierte pre-miRNAs-142 (im Folgenden als mut2 und mut3 bezeichnet) in den Ko-Expressionsvektor kloniert, nachdem *eGFP* aus dem Vektor pSG5-GFP in die MCS kloniert wurde und somit die Vektoren pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 hergestellt wurden.

Für den resultierenden Vektor pSG5-GFP-miR-34a wurde die *eGFP*-Expression mittels Western Blot nachgewiesen, die Expression der einklonierten miRNA mittels Northern Blot. Abschließend wurde eine Sequenzierung des Abschnitts, der für *eGFP* und die *pre-miRNA* kodiert, durchgeführt.

Für den Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 wurde entsprechend vorgegangen und sowohl für den Wildtyp-Vektor als auch für die 3p (-mut2) und 5p-Mutante (-mut3) die *eGFP*-Expression mittels Western Blot nachgewiesen. Der Nachweis der einklonierten miRNA erfolgte mittels Northern Blot. Ausgangsvektor für die Herstellung der verschiedenen Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 war der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-), in den zunächst *eGFP* aus dem pSG5-GFP und anschließend die jeweilige miR-142 aus den Vektoren pSG5-miR-142, pSG5-miR-142-mut2 bzw. pSG5-miR-142-mut3 einkloniert wurde.

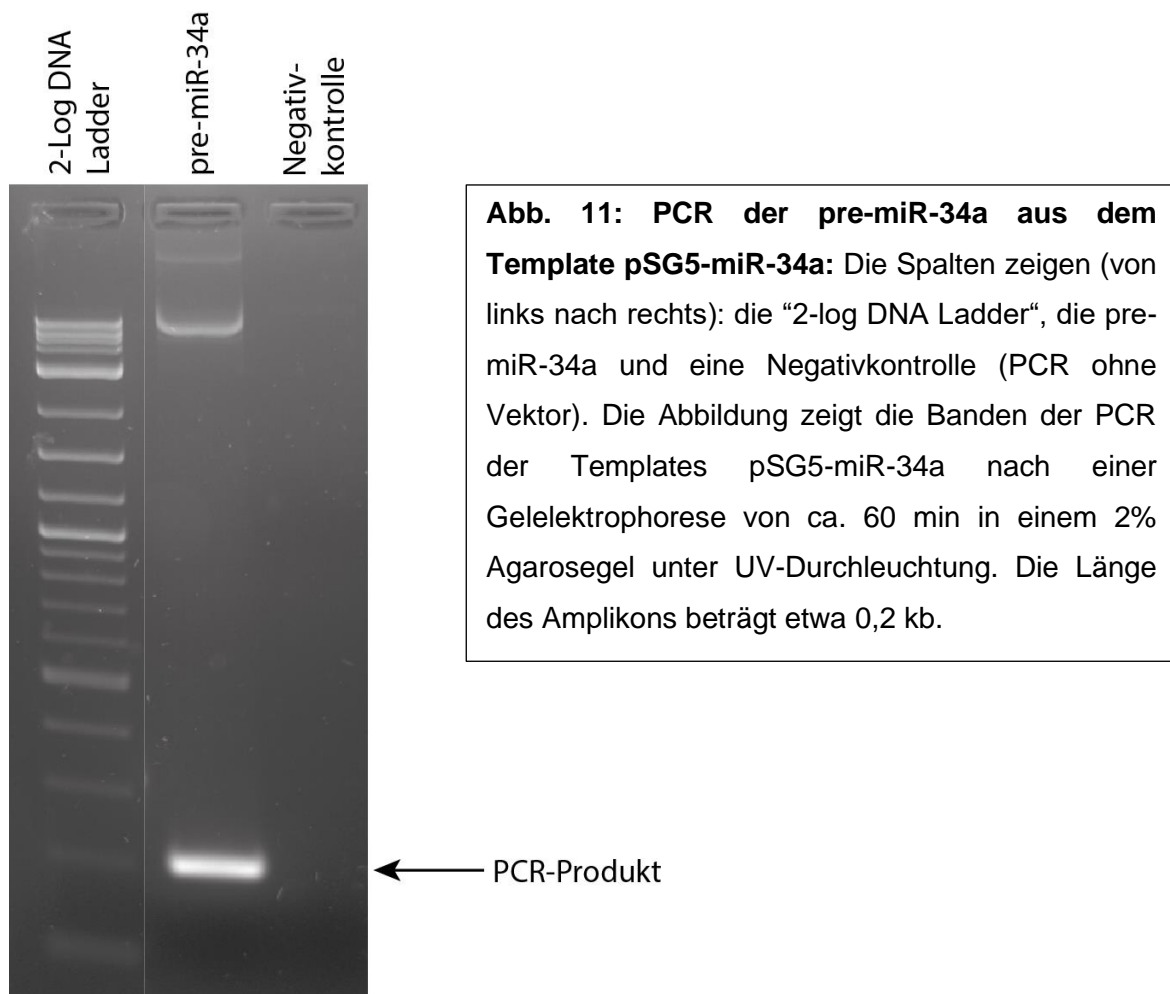
Für die Vervielfältigung der Vektoren wurde *E. coli* verwendet, Transfektionsversuche zur Expression der miRNAs und von Fluoreszenzproteinen wurden mit 293T-Zellen durchgeführt. Mit den Vektoren wurden außerdem verschiedene weitere Versuche durchgeführt. Die *eGFP*- und für den auf pcDNA basierenden Vektor zusätzlich die mCherry-Expression wurden fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Außerdem wurden entsprechende Versuche mit der miR-200c durchgeführt und der Vektor pSG5-GFP-miR-200c analog zu den miR-34a-Expressionsvektoren erstellt. In diesem Fall wurde ausschließlich der Western Blot zum Nachweis der Expression von *eGFP*, die Sequenzierung des Klonierungsprodukts und der mikroskopische *eGFP*-Nachweis durchgeführt. Da die Arbeitsgruppe sich dagegen entschied mit dem Vektor pSG5-GFP-miR-200c weiterzuarbeiten, wurde auf die RNA-Analyse mittels Northern Blot verzichtet. Ebenso wird in der Diskussion nicht weiter auf diesen Vektor eingegangen.

7.1 Erstellung des Ko-Expressionsvektors pSG5-GFP-miR-34a

In den folgenden Kapiteln ist die Erstellung des Vektors pSG5-GFP-miR-34a beschrieben.

7.1.1 PCR der pre-miR-34a des Vektors pSG5-miR-34a

Zur Kontrolle des Vektors pSG5-miR-34a wurde dieser mittels der Primer (1) und (2) auf das Vorhandensein der pre-miR-34a geprüft und gleichzeitig die pre-miR-34a für die weiteren Klonierungsversuche amplifiziert.



Die Abbildung 11 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese des Vektors pSG5-miR-34a nach Amplifikation der pre-miR-34a mit den Primern (1) und (2). 0,2 µg Plasmid DNA wurde mittels PCR entsprechend Kapitel 6.13.3 behandelt und dadurch die pre-miR-34a Sequenz aus dem Vektor spezifisch amplifiziert. Die Abbildung zeigt, dass der Vektor pSG5-miR-34a die für die Klonierung benötigte pre-miR-34a enthält. Das PCR-Produkt ist etwa 0,2 kb lang. Zur Kontrolle der Sequenz wurde ein ausgewählter Teil des Vektors durch die Fa. Seq-it sequenziert. Die Sequenzierung ist im Anhang zu finden und bestätigt das Vorhandensein der pre-miR-34a.

7.1.2 Erstellung des Ko-Expressionsvektors pSG5-GFP-miR-34a durch Klonierung

Ausgangsvektor für die Erstellung des Vektors pSG5-GFP-miR-34a war der Vektor pSG5-GFP und der Vektor pSG5-miR-34a, die aus *E. coli* aufgereinigt in Lösung vorlagen. Sowohl die pre-miR-34a-Sequenz als auch das Gen eGFP sollen unter der Kontrolle des SV40-Promotors vom Vektor pSG5 ko-exprimiert werden. Mittels der Primer (1) und (2) wurde die pre-miRNA aus dem Vektor pSG5-miR-34a *in-vitro* amplifiziert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die etwa 0,2 kb lange Bande, welche die pre-miR-34a enthielt, wurde ausgeschnitten, mittels eines Cleanup-Kits wie in Kapitel 6.13.5 beschrieben aufgereinigt und mit EcoRI und SpeI geschnitten um "sticky-ends" zu erzeugen.

Der Vektor pSG5-GFP wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SpeI innerhalb der MCS geschnitten, und mit der CIP dephosphoryliert. Nach erfolgter Dephosphorylierung wurden der linearisierte Vektor pSG5-GFP und die pre-miR-34a Sequenz mittels T4-DNA-Ligase ligiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetenten *E. coli* Bakterien mittels Hitzeschockmethode transformiert. Diese wurden zunächst bei 37 °C in LB-Medium ohne Antibiotika inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert und am Folgetag die gewachsenen Kolonien für eine Colony-PCR verwendet. So konnten diejenigen Kolonien identifiziert werden, die den Vektor pSG5-GFP-miR-34a enthielten. Mit zwei ausgewählten Kolonien wurden die weiteren Versuche durchgeführt und der Vektor charakterisiert. Diese werden im Folgenden als pSG5-GFP-miR-34a-1 und pSG5-GFP-miR-34a-2 bezeichnet. Abb. 12 zeigt schematisch das Konstrukt pSG5-GFP-miR-34a.

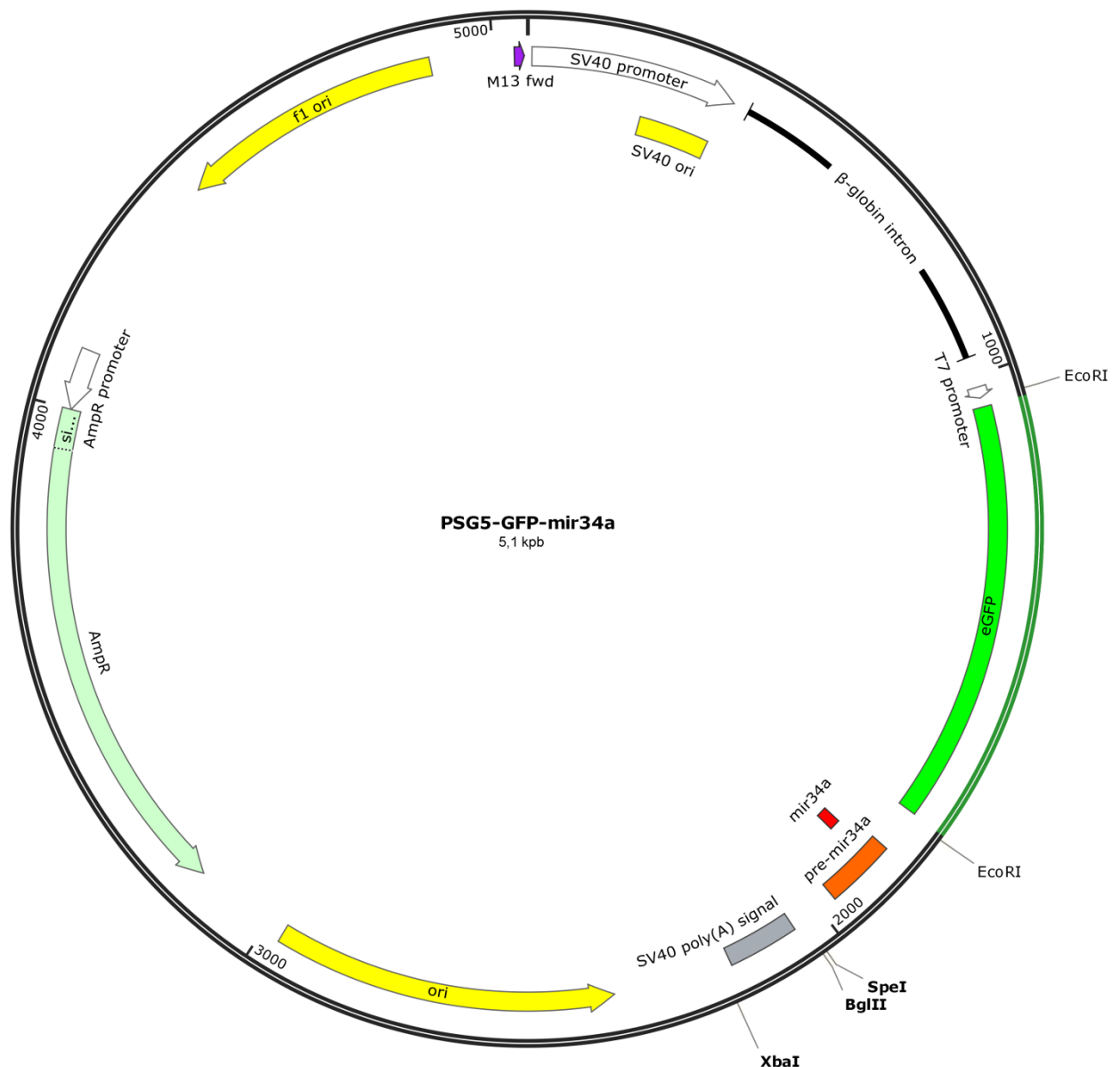


Abb. 12: Schematische Darstellung des Vektors pSG5-GFP-miR-34a: Die Abbildung zeigt die Struktur des Vektors pSG5-GFP-miR-34a und die Anordnung der verschiedenen Gene. Der Vektor hat eine Größe von ca. 5,1 kbp.

7.1.3 Sequenzierung des relevanten Bereichs innerhalb des Vektors pSG5-GFP-miR-34a

Ausgangspunkt für die Sequenzierung war der Vektor pSG5-GFP-miR-34a-1. Die im Anhang abgebildete Sequenz stellt das Sequenzierungsprodukt der Klonierung „pSG5-GFP-miR-34a“ dar, zusammengesetzt aus den überlappenden Sequenzen der Produkte aus „forward“ und „reverse“ Sequenzierung. Im Anhang zu sehen ist ein ca. 2 kb langer Bereich des Vektors pSG5-GFP-miR-34a. Hierfür wurden die Sequenzierungsprimer „forward“ und

“reverse“ so gewählt, dass durch überlappende Abschnitte der überwiegende Teil von eGFP, sowie die vollständige pre-miR-34a und die ausgewählten Schnittstellen EcoR1, SpeI und BglII dargestellt werden konnten. Das Sequenzierungsprodukt ist in der 5´-3´ Orientierung rekonstruiert, welche mittels Sanger-Sequenzierung durch die Firma Seq-it erstellt wurde. Die Sequenz ist im FASTA-Format dargestellt.

Die Sequenzierung zeigt, dass innerhalb der MCS im Vektor pSG5-GFP-miR-34a sowohl die pre-miR-34a als auch das eGFP-Gen vorhanden sind. Somit konnte gezeigt werden, dass die unter Kapitel 7.1 vorgeschlagene Herstellung des Vektor pSG5-GFP-miR-34a erfolgreich war. Da die Sequenzierung positive Ergebnisse zeigte, sollte nachfolgend die Expression von *eGFP* und der *pre-miR-34a* nach Transfektion in Säugerzellen nachgewiesen werden. Die Primersequenzen (1) und (2) konnten durch die Sequenzierung nicht wiedergefunden werden. Diese waren verwendet worden, um die pre-miR-34a aus dem Vektor pSG5-miR-34a zu amplifizieren, welches in den pSG5-GFP inseriert wurde. Im Rahmen der Sequenzierung wurden außerdem für einzelne Basenpaare Unterschiede zwischen den Vektoren pSG5-GFP-miR-34a-1 und pSG5-GFP-miR-34a-2 gefunden. Diese wurden orange markiert und werden im Rahmen der Ergebnisdiskussion Kapitel 8.7 diskutiert. Der sequenzierte Teil der Vektoren pSG5-GFP-miR-34a entspricht der theoretischen Vektorkarte (Abb. 12).

7.1.4 Nachweis der eGFP Expression im Vektor pSG5-GFP-miR-34a durch Western Blot

Zum Nachweis der eGFP Expression auf Proteinebene wurden Western Blot Versuche durchgeführt. 293T-Zellen wurden mit der Calciumphosphatmethode mit den Vektoren pSG5, pSG5-miR-34a, pSG5-GFP, pSG5-GFP-miR-34a-1 und pSG5-GFP-miR-34a-2 wie im Kapitel 6.12.2 beschrieben transfiziert und für 24 h in Medium DMEM im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend Kapitel 6.15.1 lysiert, die Lysate mittels SDS-Page aufgetrennt und durch Elektroblot auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Diese wurde mit spezifischen Antikörpern gegen eGFP bzw. beta-Aktin inkubiert und mit Sekundärantikörpern die Lokalisation der Proteine durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Im Folgenden konnten sowohl eGFP als auch beta-Aktin nachgewiesen werden. Die Größe der beiden Proteine wurde anhand der parallel aufgetrennten “Blue Prestained Protein Standard Ladder“ bestätigt.

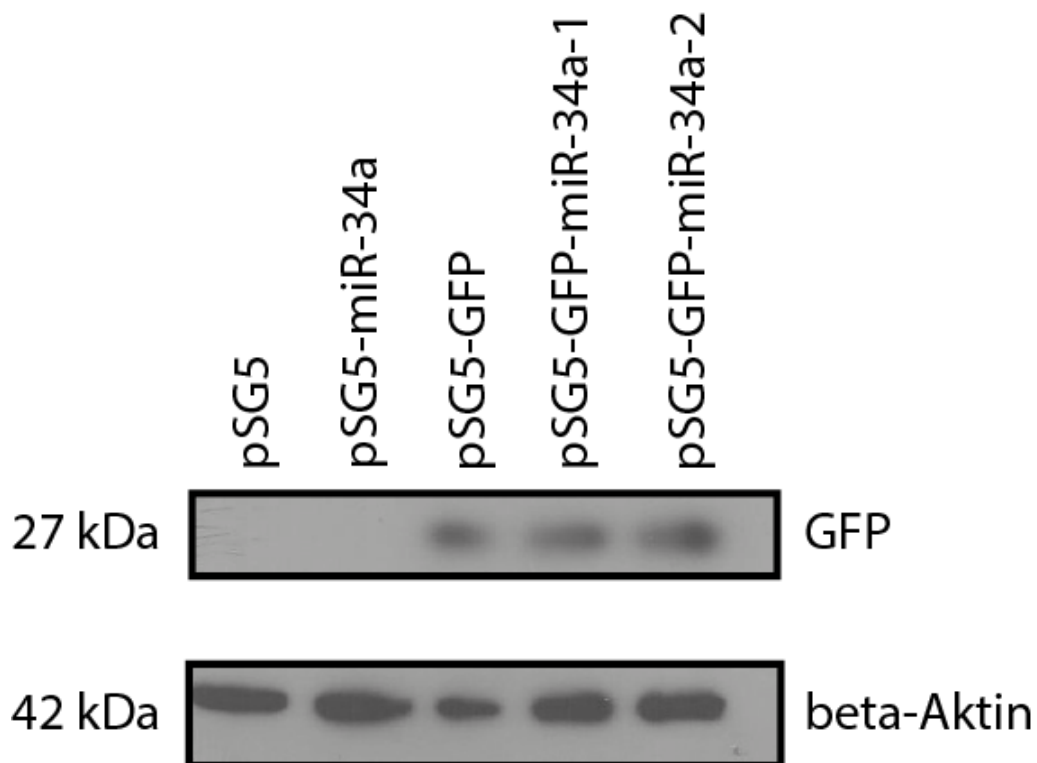


Abb. 13: Western Blot von eGFP und beta-Aktin in Zelllysaten transfizierter 293T-Zellen: 30 µg des wie in Kapitel 6.15.1 beschrieben aufgereinigten Proteins wurden mittels SDS-Page aufgetrennt, geblottet und mittels Primär bzw. Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Die Spalten zeigen (von links nach rechts) Proteinextrakte von Zellen, die mit dem Vektor pSG5, pSG5-miR-34a, pSG5-GFP, pSG5-GFP-miR-34a-1 und pSG5-GFP-miR-34a-2 transfiziert wurden.

Durch den Western Blot, der in Abb. 13 zu sehen ist, konnte gezeigt werden, dass eGFP sowohl von den mit dem Vektor pSG5-GFP als auch durch die mit den Vektoren pSG5-GFP-miR-34a transfizierten 293T-Zellen exprimiert wird. Dies bestätigt, dass die transfizierten 293T-Zellen ein geeignetes Expressionssystem für eGFP darstellen und dass die inklonierte pre-miR-34a im Vektor pSG5-GFP-miR-34a die Expression von GFP nicht verhindert.

Die Expression von GFP in den transfizierten Zellen konnte außerdem fluoreszenzmikroskopisch durch Anregung der grünen GFP-Fluoreszenz mit blauem Licht optisch nachgewiesen werden, was die Ergebnisse des Western-Blots untermauert. Um außerdem zu zeigen, dass das pSG5-GFP-miR-34a Konstrukt in 293T-Zellen zur Expression der pre-miR-34a und der miR-34a führt, wurden im folgenden Northern-Blot Versuche durchgeführt.

7.1.5 Nachweis der miR-34a Expression durch den Vektor pSG5-GFP-miR-34a durch Northern Blot

Zum Nachweis der Expression der miR-34a wurden Northern Blot Versuche durchgeführt. 293T-Zellen wurden mit PolyFect mit den Vektoren pSG5, pSG5-miR-34a, pSG5-GFP, pSG5-GFP-miR-34a-1 und pSG5-GFP-miR-34a-2 wie im Kapitel 6.12.3 beschrieben transfiziert und für 24 h in DMEM im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend Kapitel 6.14.1 lysiert, die gereinigte RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einem "Semi-dry" Blotter auf eine Nylonmembran geblottet. Nach Herstellung, Hybridisierung und mehreren Waschschrritten wurden durch die gebundenen radioaktiv markierten Sonden die miRNAs auf Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Der Northern Blot zeigt, dass die miR-34a im pSG5-miR-34a-1 und pSG5-miR-34a-2 sowie in den beiden pSG5-GFP-miR-34a Bahnen deutlich exprimiert wird. Der pSG5-GFP zeigt ebenfalls Expression der miR-34a. Keine Expression der miR-34a ist in der pSG5-Bahn zu sehen. Die pre-miR-34a wird von allen transfizierten Zellen exprimiert. Der Northern Blot zeigt, dass die Erstellung des Vektors pSG5-GFP-miR-34a erfolgreich war und dieser zur Expression der miR-34a führt. Dies bestätigt das Ergebnis der Sequenzierung in Kapitel 11, in der die Sequenz der pre-miR-34a im pSG5-GFP-miR-34a nachgewiesen wurde. Die pSG5-GFP-Bahn zeigt eine Bande für die miR-34a. Hierauf wird im Rahmen der Ergebnisdiskussion näher eingegangen.

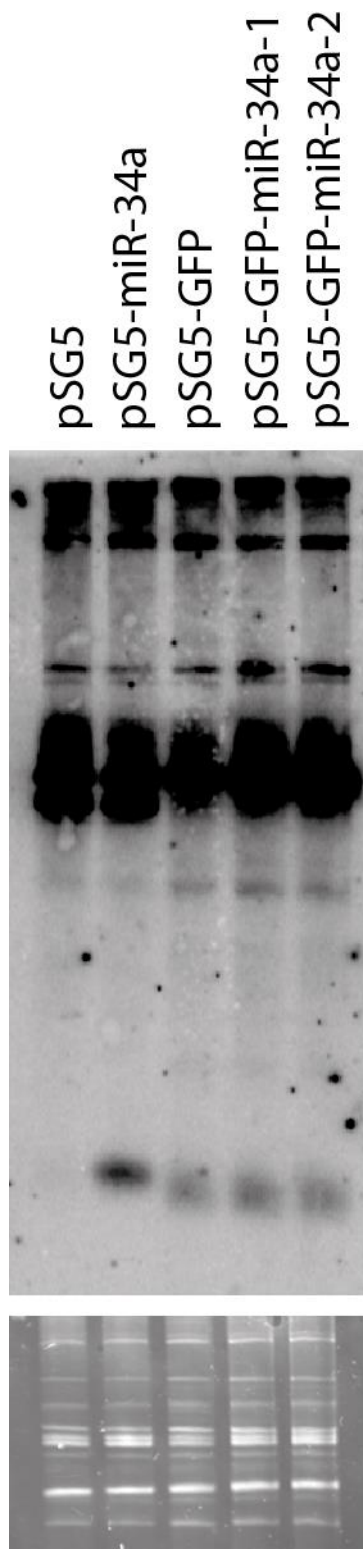


Abb. 14: Northern Blot der miR-34a: 5 µg RNA wurde mittels Gelelektrophorese (s. Kapitel 6.14.2) aufgetrennt, geblottet und mittels radioaktiv markierter Sonden sichtbar gemacht. Die Spalten zeigen RNA Extrakte aus 293T-Zellen die mit folgenden Vektoren transfiziert wurden (von links nach rechts): pSG5, pSG5-miR-34a, pSG5-GFP und zweimal pSG5-GFP-miR-34a. Unter dem Northern Blot ist eine Ladekontrolle abgebildet. Die Membran wurde hierzu mit Ethidiumbromid angefärbt und eine Fluoreszenzaufnahme angefertigt.

7.2 Erstellung des Ko-Expressionsvektors pSG5-GFP-miR-200c

In den folgenden Kapiteln ist die Erstellung des Vektors pSG5-GFP-miR-200c beschrieben. Die Abbildungen der PCR und des Western Blots werden gezeigt, ebenso wie die Sequenzierung (s. Kapitel 11). Noch vor der Durchführung des Northern Blots wurde sich gegen eine Nutzung des Klonierungsprodukts für Folgeexperimente entschieden, sodass auf die Durchführung eines Northern Blots verzichtet wurde. Prinzipiell erfolgte die Erstellung analog zum pSG5-GFP-miR-34a, sodass prinzipiell nichts gegen eine Ko-expression des Fluoreszenzproteins und der miR-200c spricht.

7.2.1 PCR der pre-miR-200c des Vektors pSG5-miR-200c

Zur Amplifizierung der pre-miR-200c wurde der Vektor pSG5-miR-200c als Template verwendet. Es erfolgte eine PCR der pre-miR-200c, welche gleichzeitig für die weiteren Klonierungsversuche benutzt werden konnte.

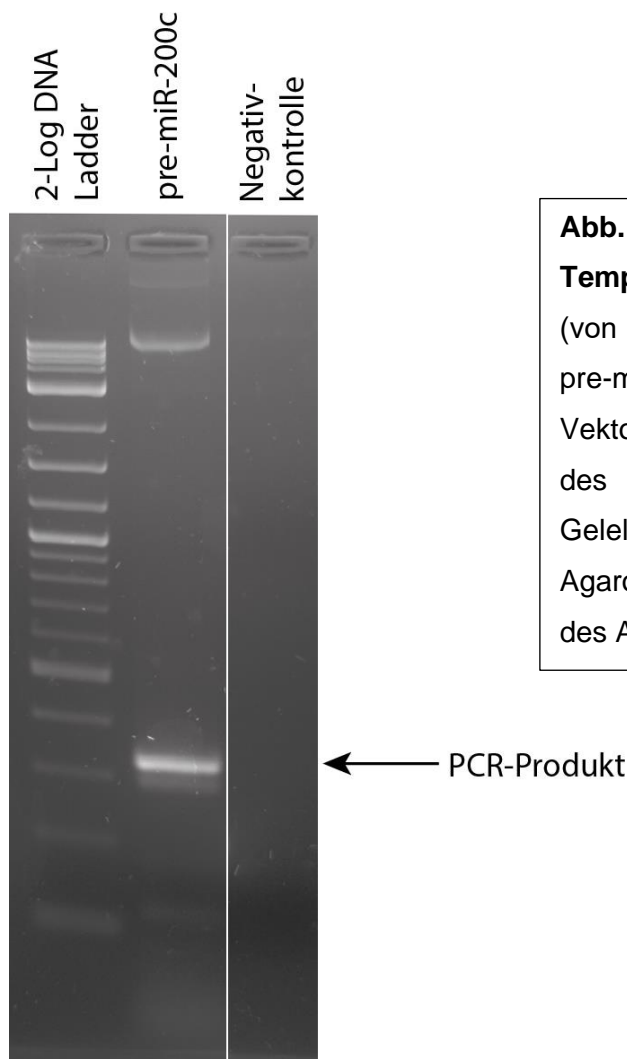


Abb. 15: PCR der pre-miR-200c aus dem Template pSG5-miR-200c: Die Spalten zeigen (von links nach rechts): die "2-log DNA Ladder", die pre-miR-200c und eine Negativkontrolle (PCR ohne Vektor). Die Abbildung zeigt die Banden der PCR des Templates pSG5-miR-200c nach einer Gelelektrophorese von ca. 60 min in einem 2% Agarosegel unter UV-Durchleuchtung. Die Länge des Amplikons beträgt ca. 0,33 kb.

Die Abbildung 15 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese des Vektors pSG5-miR-200c nach Amplifikation der pre-miR-200c. 0,2 µg Plasmid DNA wurde mittels PCR entsprechend Kapitel 6.13.3 behandelt und dadurch die pre-miR-200c Sequenz aus dem Vektor spezifisch amplifiziert. Die Abbildung zeigt, dass der Vektor pSG5-miR-200c die für die Klonierung benötigte pre-miR-200c enthält. Das PCR-Produkt ist etwa 0,33 kb lang. Zur Kontrolle der Sequenz wurde ein ausgewählter Teil des Vektors amplifiziert und durch die Fa. Seq-it sequenziert. Die Sequenzierung ist im Anhang zu finden und bestätigt das Vorhandensein der pre-miR-200c.

7.2.2 Erstellung des Ko-Expressionsvektors pSG5-GFP-miR-200c durch Klonierung

Ausgangsvektor für die Herstellung des Vektors pSG5-GFP-miR-200c war der Vektor pSG5-GFP und der Vektor pSG5-miR-200c, die aus *E. coli* aufgereinigt in Lösung vorlagen. Sowohl die pre-miR-200c-Sequenz als auch das Gen eGFP sollen unter der Kontrolle des SV40-Promotors vom Vektor pSG5 ko-exprimiert werden. Die pre-miRNA wurde aus dem Vektor pSG5-miR-200c *in-vitro* amplifiziert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die etwa 0,33 kb lange Bande, welche die pre-miR-200c enthielt, wurde ausgeschnitten, mittels eines Cleanup-Kits wie in Kapitel 6.13.5 beschrieben aufgereinigt und mit EcoRI und SpeI geschnitten um "sticky-ends" zu erzeugen.

Der Vektor pSG5-GFP wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SpeI innerhalb der MCS geschnitten, und mit der CIP dephosphoryliert. Nach erfolgter Dephosphorylierung wurden der linearisierte Vektor pSG5-GFP und die pre-miR-200c Sequenz mittels T4-DNA-Ligase ligiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetenten *E. coli* Zellen mittels Hitzeschockmethode transformiert. Diese wurden zunächst bei 37 °C in LB-Medium ohne Antibiotika inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert und am Folgetag die gewachsenen Kolonien für eine Colony-PCR verwendet. So konnten diejenigen Kolonien identifiziert werden, die den Vektor pSG5-GFP-miR-200c enthielten.

7.2.3 Sequenzierung des relevanten Bereichs innerhalb des Vektors pSG5-GFP-miR-200c

Ausgangsprodukt für die Sequenzierung war der Vektor pSG5-GFP-miR-200c. Die im Anhang abgebildete Sequenz stellt das Sequenzierungsprodukt der Klonierung „pSG5-GFP-miR-200c“ dar. Der ca. 2kb große Abschnitt, der sequenziert wurde, zeigt den überwiegenden Teil der Sequenz von eGFP, sowie die vollständige pre-miR-200c und die ausgewählten Schnittstellen EcoR1, SpeI und BglII. Das Sequenzierungsprodukt ist im Anhang unbearbeitet im Rahme der “forward“-Sequenzierung in der 5´-3´ Orientierung dargestellt. Ergänzend ist die “reverse“-Sequenzierung in 3´-5´ Orientierung abgebildet. Diese wurden mittels Sanger-Sequenzierung durch die Firma Seq-it erstellt. Die Sequenz ist im FASTA-Format dargestellt. Somit konnte gezeigt werden, dass die unter Kapitel 7.2 vorgeschlagene Herstellung des Vektor pSG5-GFP-miR-200c erfolgreich war. Da die Sequenzierung positive Ergebnisse gezeigt hatte, soll im folgenden Kapitel die Expression von *eGFP* nach Transfektion in Säugerzellen nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher Klonierung wurde sich gegen ein Weiterarbeiten mit dem Klonierungsprodukt entschieden und somit auch gegen die Erstellung eines Northern Blots.

7.2.4 Nachweis der eGFP Expression im Vektor pSG5-GFP-miR-200c durch Western Blot

Zum Nachweis der eGFP Expression auf Proteinebene wurden Western Blot Versuche durchgeführt. 293T-Zellen wurden mit der Calciumphosphatmethode mit den Vektoren pSG5, pSG5-miR-200c, pSG5-GFP, pSG5-GFP-miR-200c-1 und pSG5-GFP-miR-200c-2 wie im Kapitel 6.12.2 beschrieben transfiziert und für 24 h in Medium DMEM im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend Kapitel 6.15.1 lysiert, die Lysate mittels SDS-Page aufgetrennt und in einem Elektrolot auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Diese wurde mit spezifischen Antikörpern gegen eGFP bzw. beta-Aktin inkubiert und mit Sekundärantikörpern die Lokalisation der Proteine durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Im Folgenden konnten sowohl eGFP als auch beta-Aktin nachgewiesen werden. Die Größe der beiden Proteine wurde anhand der parallel aufgetrennten “Blue Prestained Protein Standard Ladder“ bestätigt.

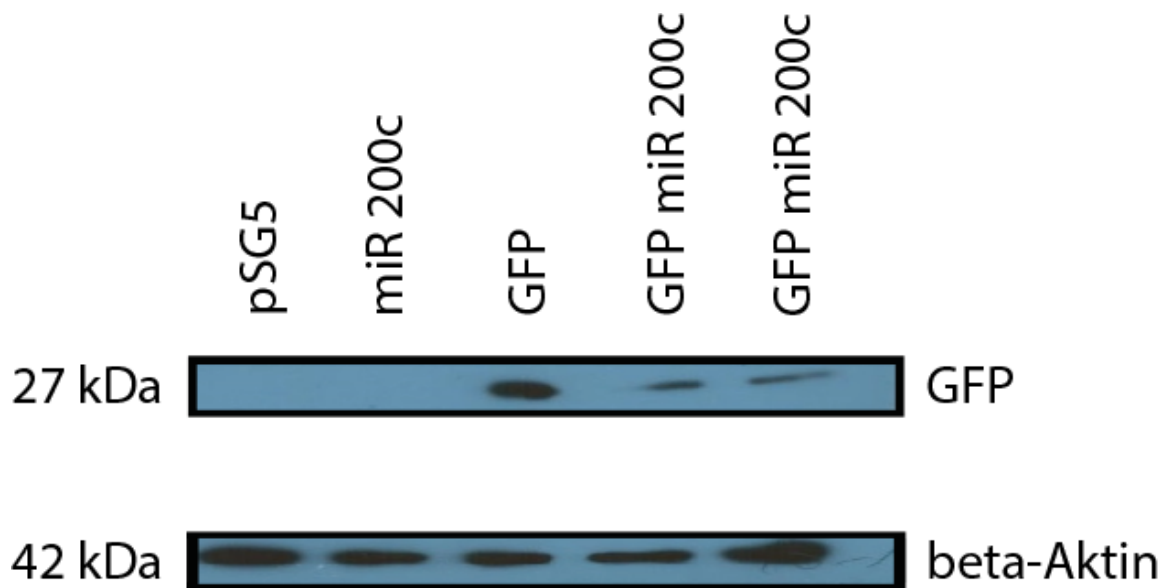


Abb. 16: Western Blot von eGFP und beta-Aktin in Zelllysaten transfizierter 293T-Zellen: 30 µg des wie in Kapitel 6.15.1 beschrieben aufgereinigten Proteins wurden mittels SDS-Page aufgetrennt, geblottet und mittels Primär bzw. Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Die Spalten zeigen (von links nach rechts) Proteinextrakte von Zellen, die mit dem Vektor pSG5, pSG5-miR-200c-, pSG5-GFP, pSG5-GFP-miR-200c-1 und pSG5-GFP-miR-200c-2 transfizierte wurden.

Durch den Western Blot, der in Abb. 16 zu sehen ist, konnte gezeigt werden, dass eGFP sowohl durch den Vektor pSG5-GFP als durch pSG5-GFP-miR-200c exprimiert wird. Dies bestätigt, dass die transfizierten 293T-Zellen ein geeignetes Expressionssystem für eGFP darstellen und dass die einklonierte pre-miR-200c im Vektor pSG5-GFP-miR-200c die Expression von GFP nicht verhindert.

Die Expression von GFP in den transfizierten Zellen konnte außerdem fluoreszenzmikroskopisch durch Anregung der grünen GFP-Fluoreszenz mit blauem Licht optisch nachgewiesen werden, was die Ergebnisse des Western-Blots untermauert.

7.3 Erstellung der Ko-Expressionsvektoren pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3

In den folgenden Kapiteln ist die Erstellung der Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 beschrieben.

7.3.1 PCR der pre-miR-142 des Vektors pSG5-miR-142, pSG5-miR-142-mut2 und pSG5-miR-142-mut3

Zur Kontrolle der Vektoren pSG5-miR-142, pSG5-miR-142-mut2 und pSG5-miR-142-mut3 wurde in diesen sequenzspezifisch die pre-miR-142 und deren Mutanten amplifiziert. Dazu wurden die Primer (7) und (8) verwendet. Das PCR Produkt wurde jeweils für die weiteren Klonierungsversuche verwendet.

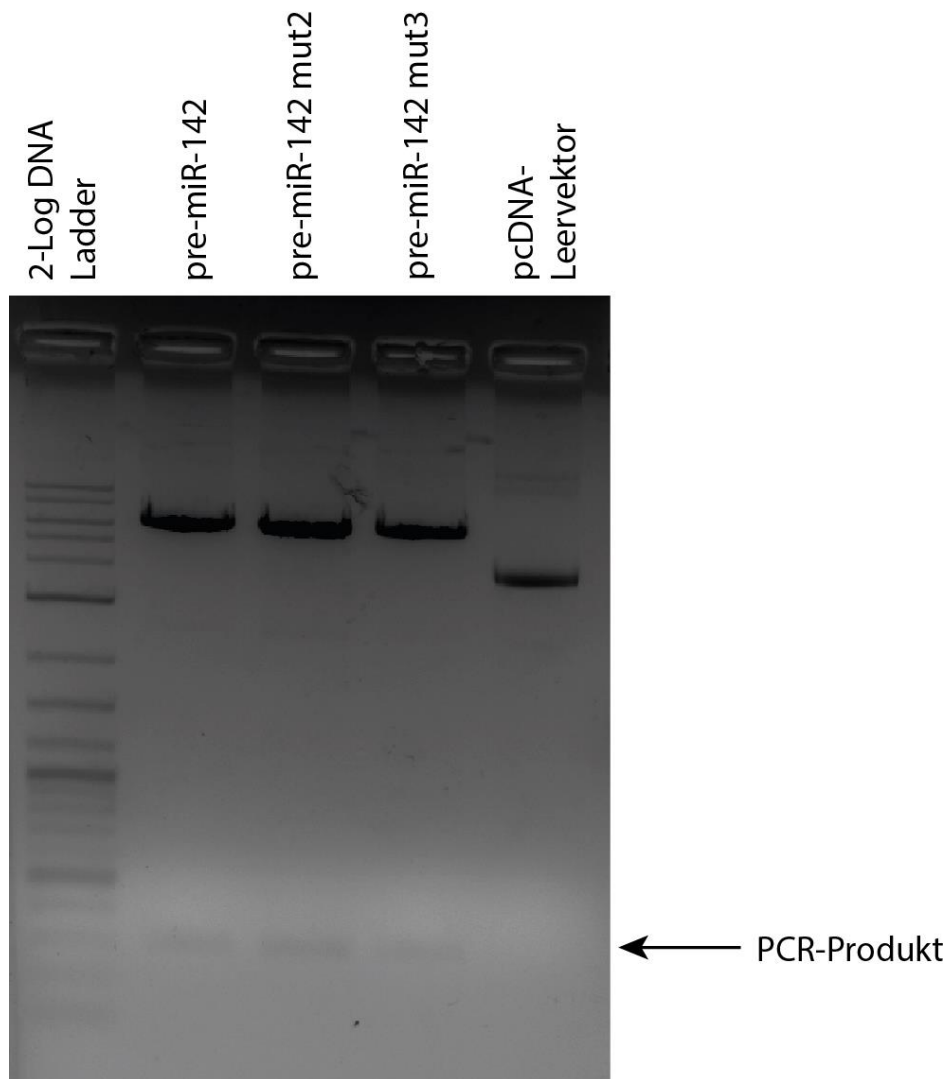


Abb. 17: PCR der pre-miR-142 aus den Templates pSG5-miR-142, pSG5-miR-142-mut2 und pSG5-miR-142-mut3: Die Spalten zeigen (von links nach rechts): die “2-log DNA Ladder“, die pre-miR-142-wt sowie deren Mutanten mut2 und mut3 und eine Negativkontrolle (PCR ohne Vektor). Die Abbildung zeigt die Banden der PCR der Templates pSG5-miR-142, pSG5-miR-142-mut2 und pSG5-miR-142-mut3 nach einer Gelelektrophorese von ca. 60 min in einem 2% Agarosegel unter UV-Durchleuchtung. Die Länge des Amplikons beträgt etwa 0,3 kb.

Die Abbildung 17 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese der Vektoren pSG5-miR-142, pSG5-miR-142-mut2 und pSG5-miR-142-mut3 nach Amplifikation der pre-miR-142 mit den Primern (7) und (8). 0,2 µg Plasmid DNA wurde mittels PCR entsprechend Kapitel 6.13.3 behandelt und dadurch die pre-miR-142 Sequenzen aus den Vektoren spezifisch amplifiziert. Die Abbildung zeigt, dass die pre-miR-142 in den Vektoren pSG5-miR-142, pSG5-miR-142-mut2 und pSG5-miR-142-mut3 vorhanden ist. Das PCR-Produkt ist etwa 0,3 kb lang.

7.3.2 Erstellung der Ko-Expressionsvektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 durch Klonierung

Ausgangsvektor für die Herstellung des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 und der zwei erstellten Mutanten war der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-), der Vektor pSG5-GFP sowie die Vektoren pSG5-miR-142, pSG5-miR-142-mut2 und pSG5-miR-142-mut3, die aus *E. coli* aufgereinigt in Lösung vorlagen. Sowohl die pre-miR-142 Sequenz wie auch deren Mutanten und das eGFP-Gen sollten unter der Kontrolle des CMV-Promotors auf dem Vektor pcDNA3.1/Hygro(-) ko-exprimiert werden. Mittels der Primer (3) und (4) wurde zunächst eGFP aus dem Vektor pSG5-GFP amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die etwa 0,7 kb lange Bande, welche die eGFP Sequenz enthielt wurden ausgeschnitten, mittels eines "Cleanup-Kits", wie in Kapitel 6.13.5 beschrieben, aufgereinigt und mit XbaI und HindIII geschnitten um "sticky-ends" zu erzeugen. Der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-) wurde ebenfalls mit XbaI und HindIII innerhalb der MCS geschnitten und mit der CIP dephosphoryliert. Nach erfolgter Dephosphorylierung wurden der linearisierte Vektor pcDNA3.1/Hygro(-) und die eGFP Sequenz mittels T4-DNA-Ligase ligiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli* Zellen mittels Hitzeschockmethode transformiert. Die Bakterien wurden zunächst bei 37 °C in LB-Medium ohne Antibiotika inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert und am Folgetag die gewachsenen Kolonien durch eine Colony-PCR analysiert. So konnten diejenigen Kolonien identifiziert werden, die einen Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP enthielten. Mit maximal zwei ausgewählten Kolonien wurden die weiteren Versuche durchgeführt und die miR-142 bzw. deren Mutanten einkloniert. Die Sequenz der ausgewählten Kolonie ist im Anhang abgebildet.

Zur Einklonierung der pre-miR-142 und deren Mutanten in den Vektor pcDNA3.1/Hygro (-)GFP wurde analog vorgegangen. Die pre-miRNA aus den Vektoren pSG5-miR-142, die die Sequenz für die mutierte miR-142 enthielten, wurden *in-vitro* amplifiziert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die etwa 0,3 kb langen Banden, welche die pre-miR-142, die pre-miR-142-mut2 bzw. die pre-miR-142-mut3 enthielten wurden ausgeschnitten, mittels eines Cleanup-Kits wie in Kapitel 6.13.5 beschrieben aufgereinigt und mit BamHI und XhoI geschnitten um "sticky-ends" zu erzeugen.

Der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI innerhalb der MCS geschnitten und mit der CIP dephosphoryliert. Nach erfolgter Dephosphorylierung wurden der linearisierte pcDNA3.1/Hygro(-)GFP und die drei pre-miR-142 Sequenzen in drei Versuchsansätzen mittels T4-DNA-Ligase ligiert. Die Ligationsansätze wurden für die wt-Sequenz sowie für die mut2 und die mut3 in kompetente *E. coli* Zellen mittels

Hitzeschockmethode transformiert. Diese wurden zunächst bei 37 °C in LB-Medium ohne Antibiotika inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert und am Folgetag die gewachsenen Kolonien durch drei Colony-PCR Versuchsreihen analysiert. So konnten diejenigen Kolonien identifiziert werden, die den Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 bzw. die mut2 oder mut3 enthielten. Mit zwei ausgewählten Kolonien des pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 bzw. einer Kolonie des pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und des pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 wurden die weiteren Versuche durchgeführt. Die Abbildung zeigt schematisch das Konstrukt pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 (Abb. 18). Dieses wurde übereinstimmend mit der Sequenzierung (s. Kapitel 11) erstellt und dient der Veranschaulichung des erstellten Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142. Analog zu der hier abgebildeten schematischen Rekonstruktion des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 sind die weiteren schematischen Rekonstruktion im Anhang dargestellt. Dort befinden sich somit folgende Rekonstruktionen: der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 (Abb. 27) und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 (Abb. 28).

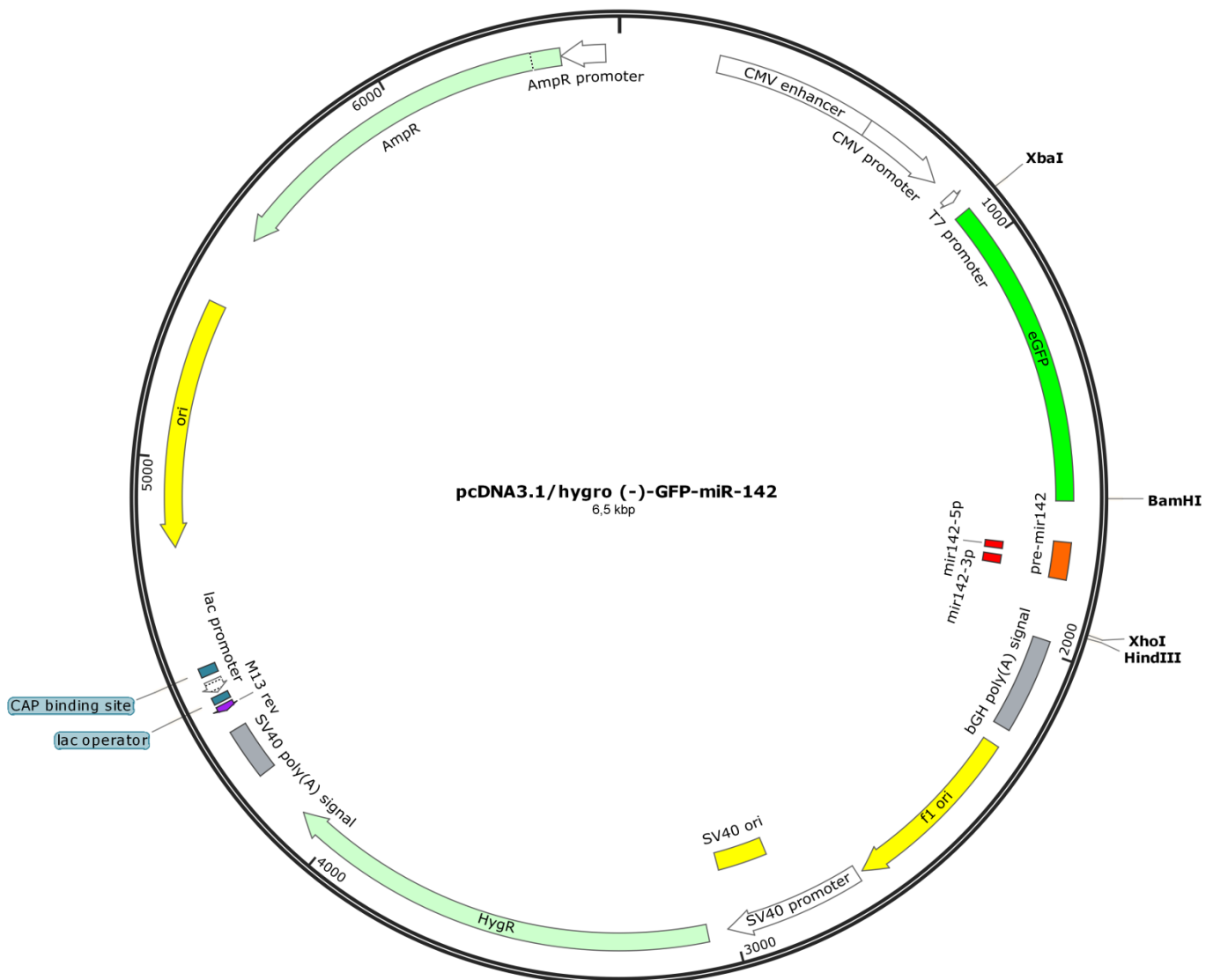


Abb. 18: Schematische Darstellung des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142: Die Abbildung zeigt die Struktur des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 und die Anordnung der verschiedenen Gene und DNA-Sequenzen. Der Vektor hat eine Größe von ca. 6,5 kbp.

7.3.3 Sequenzierung der relevanten Bereiche innerhalb der Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142- mut3

Ausgangspunkt für die Sequenzierung waren die Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 wie sie im vorherigen Kapitel und im Anhang schematisch dargestellt sind. Die zusammengesetzte DNA-Sequenz sowie die unbearbeiteten Sequenzen sind im Anhang abgebildet.

Die Sequenzen stellen die Produkte der jeweiligen Klonierung dar, zusammengesetzt aus den überlappenden Bereichen der Produkte der "forward" und "reverse" Sequenzierung. Zu sehen ist ein ca. 1.9 kb langer Bereich der MCS des jeweiligen Vektors. Für die Sequenzierung wurden die Sequenzierungsprimer "forward" und "reverse" so gewählt, dass durch überlappende Abschnitte der überwiegende Teil von eGFP, sowie die vollständige pre-miR, der "forward" PCR-Primer und die ausgewählten Schnittstellen BamHI, XhoI und HindIII dargestellt werden konnten. Die DNA-Sequenz ist in der 5'-3' Orientierung rekonstruiert. Die Originalsequenzen wurden durch die Firma Seq-it erstellt. Die Sequenz ist im FASTA-Format dargestellt.

Im Rahmen der Sequenzierung des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1 wurden für einzelne Basenpaare Unterschiede zwischen den Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2 gefunden. Diese wurden orange markiert und durchgestrichen oder eingeklammert (s. Legende) und werden im Rahmen der Ergebnisdiskussion (Kapitel 8.7) diskutiert. Der sequenzierte Teil des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1 entspricht der theoretischen Vektorkarte (Abb. 18).

Die DNA-Sequenzen zeigen, dass innerhalb der MCS im Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 bzw. den mutierten Versionen des Vektors sowohl die pre-miR-142a als auch das eGFP-Gen vorhanden sind. Außerdem werden die Punktmutationen in der Mutante 2 und 3 nachgewiesen (Kwanhian et al., 2012). Somit konnte gezeigt werden, dass die unter Kapitel 7.3.2 beschriebene Erstellung der Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 erfolgreich durchgeführt wurde.

Da die Sequenzierung die gewünschten Ergebnisse gezeigt hatte, sollte anschließend die Expression von eGFP und der miR-142 bzw. deren Mutanten nach Transfektion in Säugerzellen nachgewiesen werden.

7.3.4 Nachweis der eGFP-Expression durch die Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 mittels Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie

Zum Nachweis der eGFP Expression auf Proteinebene wurden Western Blot Versuche durchgeführt. 293T-Zellen wurden mit der Calciumphosphatmethode mit den Vektoren pSG5, pSG5-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-), pcDNA3.1/Hygro(-)GFP, pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142-1, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und

pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 wie im Kapitel 6.12.2 beschrieben transfiziert und für 24 h in Medium DMEM im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend Kapitel 6.15.1 lysiert, die Lysate mittels SDS-Page aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert. Die Membranen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen eGFP bzw. beta-Aktin inkubiert und die gebundenen Antikörper und durch die Proteine durch Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Es konnten sowohl eGFP als auch beta-Aktin nachgewiesen werden. Die Größe der beiden Proteine wurde anhand der parallel aufgetrennten "Blue Prestained Protein Standard" bestimmt.

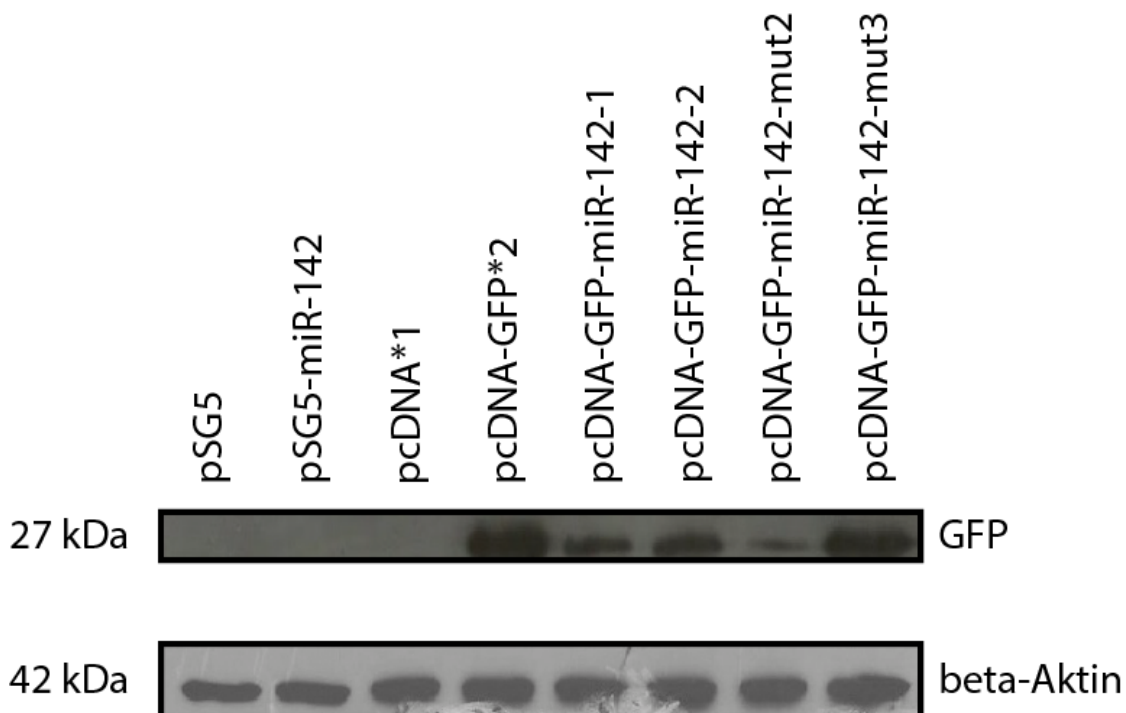


Abb. 19: Western Blot von eGFP und beta-Aktin in Zelllysaten transfizierter 293T-Zellen: 30 µg des wie in Kapitel 6.15.1 beschrieben aufgereinigte Proteins wurden durch SDS-Page aufgetrennt, geblottet und mittels Primär bzw. Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Die Spalten zeigen (von links nach rechts) Proteinextrakte von Zellen, die mit dem Vektor pSG5, pSG5-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-), pcDNA3.1/Hygro(-)GFP, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2, pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142-mut2 bzw. pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 transfiziert wurden. pcDNA*1 ist der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-), pcDNA-GFP*2 ist der Vektor pcDNA3.1/Hygro (-)GFP.

Durch den WB, der in Abb. 19 zu sehen ist, konnte gezeigt werden, dass eGFP sowohl durch den Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP, als auch durch alle Vektoren, in die zusätzlich die pre-miR-142 inkloniert wurde, exprimiert wird. Als Ladekontrolle entschieden wir uns für β-Aktin.

Der Western Blot bestätigt, dass die transfizierten 293T-Zellen ein geeignetes Expressionssystem für eGFP bzw. die Vektoren darstellen und dass die inklonierte pre-miR-142 in den Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP die Expression von eGFP nicht verhindert.

Die Expression von eGFP in den transfizierten Zellen konnte außerdem fluoreszenzmikroskopisch durch Anregung der grünen GFP-Fluoreszenz mit blauem Licht optisch nachgewiesen werden, was die Ergebnisse des Western Blots untermauert.

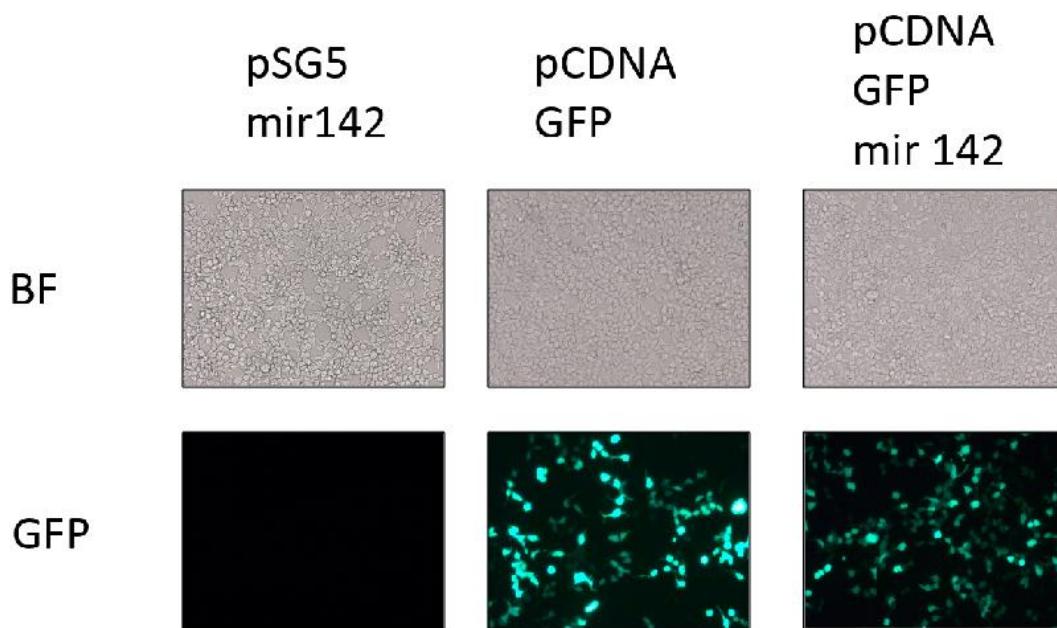


Abb. 20: Transfizierte 293T-Zellen in der Bright Field (BF) Mikroskopie und in der Fluoreszenzaufnahme (GFP); (von links nach rechts): Mit dem pSG5-miR-142 transfizierte Zellen, mit dem pcDNA3.1/Hygro(-)GFP transfizierte Zellen und mit dem pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR142 Vektor transfizierte Zellen. In der oberen Zeile ist der Zellrasen in der BF Mikroskopie zu sehen, darunter in der Fluoreszenzmikroskopie. (Abbildung freundlicherweise erstellt von Frau Dr. rer. nat. Jennifer Menegatti)

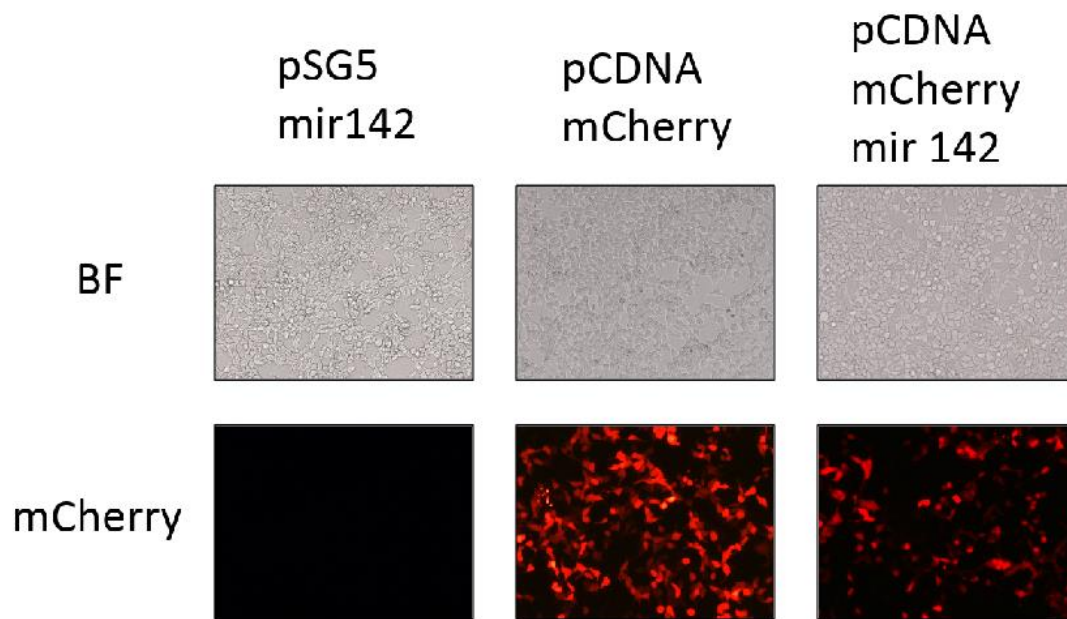


Abb. 21: Transfizierte 293T-Zellen in der Bright Field (BF) Mikroskopie und in der Fluoreszenzaufnahme (mCherry): (von links nach rechts): Mit dem pSG5-miR-142 transfizierte Zellen, mit dem pcDNA3.1/Hygro(-)mCherry transfizierte Zellen und mit dem pcDNA3.1/Hygro(-)mCherry-miR142 Vektor transfizierte Zellen. Der pcDNA-mCherry-miR142 Vektor wurde in einem Anschlussprojekt der Arbeitsgruppe erstellt. In der oberen Zeile ist der Zellrasen in der BF Mikroskopie zu sehen, darunter in der Fluoreszenzmikroskopie. (Abbildung freundlicherweise erstellt von Frau Dr. rer. nat. Jennifer Menegatti).

Somit wurde die Expression von GFP und mCherry auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Die gezeigten Aufnahmen belegen die Expression von GFP bzw. mCherry nach Transfektion von 293T-Zellen. Die Abb. 20 und 21 zeigt, dass nach Transfektion der 293T-Zellen mit den Vektoren, die ein Fluoreszenzprotein bzw. ein Fluoreszenzprotein und die jeweilige miRNA enthielten, dies weiterhin zur Expression des Fluoreszenzproteins führt. Eine leichte Abnahme der Fluoreszenz ist in den Zellen zu beobachten, bei denen der Vektor sowohl die Sequenz des Fluoreszenzproteins als auch der miRNA enthält. Eine verminderte Expression von GFP bei gleichzeitiger Anwesenheit von miR-142 wurde schon im Western Blot beobachtet (Abb.19). Um außerdem zu zeigen, dass die pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 Konstrukte in 293T-Zellen zur Expression der pre-miR-142 und der miR-142 führen, wurden im folgenden Northern Blot Versuche durchgeführt.

7.3.5 Nachweis der miR-142 Expression durch die Vektoren pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 mittels Northern Blot

Zum Nachweis der pre-miR-142 Expression und der miR-142 Expression auf RNA Ebene wurden Northern Blot Versuche durchgeführt. 293T-Zellen wurden mit PolyFect mit den Vektoren pSG5, pSG5-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-), pcDNA3.1/Hygro(-)GFP, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2, pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 wie im Kapitel 6.12.3 beschrieben transfiziert und für 24 h in DMEM im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend Kapitel 6.14.1 lysiert, die RNA aufgereinigt, anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem "Semi-dry" Blotter auf eine Nylonmembran geblottet. Die RNA wurde mittels Crosslinking auf der Nylonmembran fixiert und im Anschluss mittels radioaktiv markierter RNA-Sonden auf Röntgenfilm sichtbar gemacht. Es erfolgte in je zwei unabhängigen Northern Blot Versuchsansätzen die Hybridisierung mit einer miR-142-3p Sonde (Abb. 22) bzw. eine miR-142-5p Sonde (Abb. 23) um die beiden miRNAs spezifisch sichtbar zu machen. Zusätzlich wurden jeweils Jurkat-Zelllysate aufgetragen (Spur 5), da Jurkat-Zellen die miR-142 konstitutiv exprimieren.

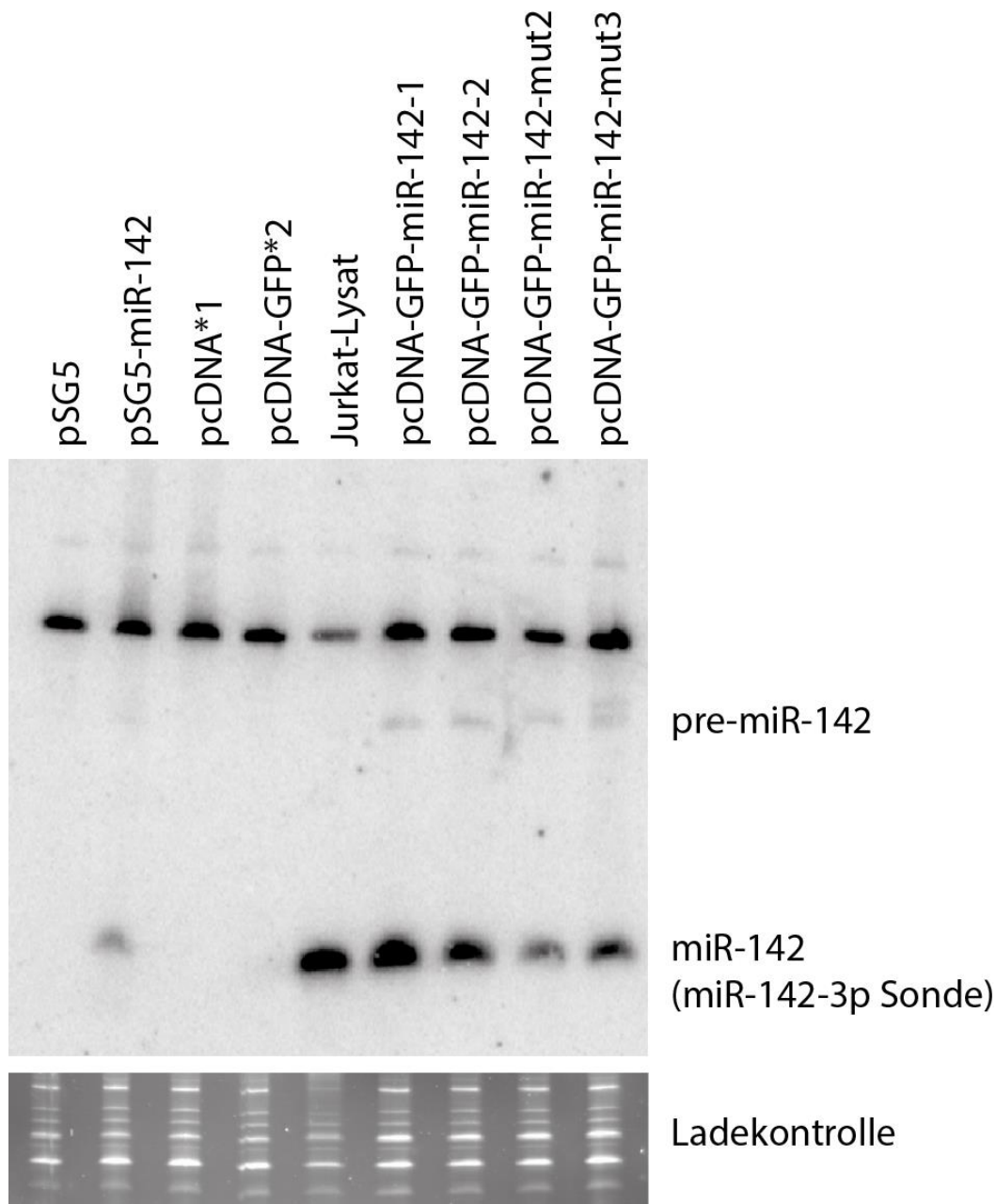


Abb. 22: Northern Blot zum Nachweis der Expression der miR-142-3p (mittels miR-142-3p Sonde): 5 µg RNA wurde mittels Gelelektrophorese (s. Kapitel 6.14.2.) aufgetrennt, geblottet und mittels radioaktiv markierter Sonden sichtbar gemacht. Die Spalten zeigen RNA-Extrakte aus 293T-Zellen die mit folgenden Vektoren transfiziert wurden (von links nach rechts): pSG5, pSG5-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-), pcDNA3.1/Hygro(-)GFP, Jurkat-Zelllysat (untransfiziert), pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3. Unter dem NB ist eine Ladekontrolle abgebildet. Die Membran wurde hierzu mit Ethidiumbromid angefärbt und eine Fluoreszenzaufnahme angefertigt. pcDNA*1 ist der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-), pcDNA*2 ist der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP. Analog wurde die Expression der miR-142-5p durch NB analysiert.

Der NB in Abb.22 zeigt, dass die miR-142-3p Variante in den Spuren pSG5-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2, pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 nachgewiesen werden konnte. Jurkat-Zelllysate zeigten ebenfalls Expression der miR-142-3p. Keine Expression der miR-142 ist in der Spur pSG5 sowie in den pcDNA3.1/Hygro(-) und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP Spuren zu sehen. Die pre-miR-142 wird von den mit pSG5-miR-142, pcDNA3.1/Hygro (-)GFP-miR-142-1, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 transfizierten Zellen exprimiert. Die Bindung der miR-142-3p Sonde in der Spur pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 ist schwächer ausgeprägt als in den anderen pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 Varianten. Bei diesem Konstrukt ist die miR-142-3p mutiert, wodurch die Bindung der ³²P-markierten Sonde etwas vermindert wird (Kwanhian et al., 2012).

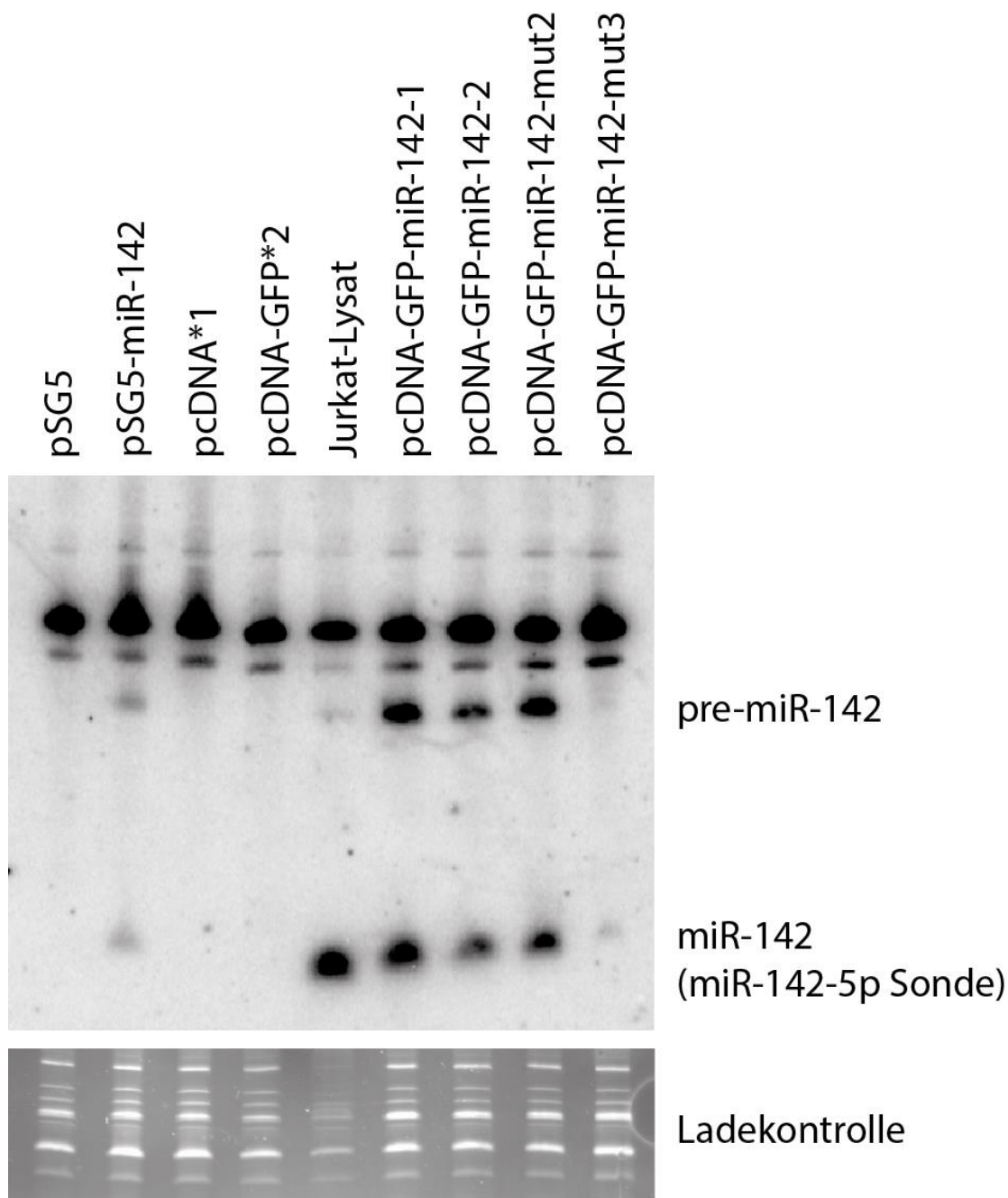


Abb. 23: Northern Blot zum Nachweis der Expression der miR-142-5p (letztgenannte mittels miR-142-5p Sonde): 5 µg RNA wurde mittels Gelelektrophorese (s. Kapitel 6.14.2) aufgetrennt, geblottet und mittels radioaktiv markierter Sonden sichtbar gemacht. Die Spalten zeigen RNA-Extrakte aus 293T-Zellen die mit folgenden Vektoren transfiziert wurden (von links nach rechts): pSG5, pSG5-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-), pcDNA3.1/Hygro(-)GFP, Jurkat-Zelllysat (untransfiziert), pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3. Unter dem Northern Blot ist eine Ladekontrolle abgebildet. Die Membran wurde hierzu mit Ethidiumbromid angefärbt und eine Fluoreszenzaufnahme angefertigt. pcDNA*1 ist der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-), pcDNA*2 ist der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP.

Der Northern Blot in Abb.23 zeigt, dass die miR-142-5p Variante in den Bahnen pSG5-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 exprimiert wird. Jurkat-Zellysate zeigen ebenfalls Expression der miR-142-5p. Keine Expression der miR-142 ist in der pSG5-Bahn und in den pcDNA3.1/Hygro(-) und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP Bahnen zu sehen. Die pre-miR-142 wird von den mit pSG5-miR-142, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2, pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 transfizierten Zellen und Jurkat-Zellen exprimiert. Die Bindung der miR-142-5p Sonde in der Bahn pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 ist deutlich schwächer ausgeprägt als in den anderen pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 Varianten. Bei diesem Konstrukt ist die miR-142-5p mutiert. Im Vergleich mit der Mutante 2 ist die Signalstärke der Mutante 3 deutlich schwächer ausgeprägt. Dies ist auf die verringerte Bindung der ³²P-markierten Sonde zurückzuführen (Kwanhian et al., 2012).

Die NBs in Abb. 22 und Abb. 23 zeigen, dass die hergestellten Vektoren neben GFP auch die inklonierten miRNAs exprimieren. Die Klonierung der Vektoren war somit erfolgreich und führte zur Expression der miR-142 in 293T-Zellen. Auf Sequenzebene konnte dies ebenfalls bestätigt werden (s. Kapitel 11). In der Sequenz konnte die pre-miR-142 im pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 bzw. dessen Mutanten ebenso wie GFP nachgewiesen werden.

8 Diskussion

8.1 MicroRNAs und Karzinogenese

Im Folgenden wird der Einfluss von miRNAs auf die Krebsentstehung diskutiert. Die Bedeutung vieler miRNAs für die Karzinogenese ist weiterhin ein großes Forschungsgebiet und deren Beitrag zur Entstehung von Krebs ist noch größtenteils unklar. Daher ist die Forschung auf diesem Gebiet von großer Wichtigkeit.

Der genetische Code von mehr als 50% aller miRNAs ist in krebsassoziierten Chromosomenbereichen lokalisiert oder befinden sich auf fragilen genomischen Arealen (Calin et al., 2004). Dies Erkenntnis legt nahe, dass miRNAs einen Einfluss auf die Karzinogenese ausüben (Zhang et al., 2007). miRNAs sind wichtige Steuerelemente wesentlicher Prozesse wie z. B. des Zellzyklus, der Proliferation und der Zellteilung (Calin und Croce, 2006). Veränderungen der Genexpression einzelner miRNAs können zur Tumorentstehung beitragen. Genexpressionsmuster der miRNAs von histologischen Proben konnten diagnostische Rückschlüsse auf die Tumorart geben und es konnten sogar genetische miRNA Fingerabdrücke mittels Microarrays für diverse Tumoren erstellt werden (Iorio und Croce, 2012). miRNAs besitzen zudem prognostische und viele potentielle therapeutische Anwendungsgebiete (Bader et al., 2010). Im Falle einer abnormen Genexpression wird das zelluläre mRNA-miRNA Gleichgewicht gestört. Führt eine miRNA zur Inhibierung der Translation der mRNA eines Protoonkogens, so wirkt sie als Tumorsuppressor. Sie inhibiert ein Protoonkogen, das zur Proliferation der Zelle beitragen würde. Kommt es zur verminderten Genexpression der miRNA, so kann die miRNA ihre ursprüngliche Funktion nicht mehr erfüllen. Infolgedessen wird die Zellproliferation gesteigert, was zur Krebsentstehung beitragen kann. Ein prominentes Beispiel hierfür stellt die miR-200c dar (Mutlu et al., 2016). Kommt es jedoch zu einer Überexpression einer miRNA, deren Nukleotidsequenz Ago-vermittelt an die 3' UTR einer Tumorsuppressor mRNA bindet, so wird die Aktivität dieses Enzyms abnehmen mit der Folge, dass der Tumorsuppressor seine Funktion nur noch sehr eingeschränkt ausüben kann (Esquela-Kerscher und Slack, 2006). Eine solche Onkomir ist die miR-21-3p, die in Interaktion mit dem Tumorsuppressor P53 tritt (Medina et al., 2010).

Das bislang einzige Beispiel für die Mutation einer miRNA in Tumoren ist der Nachweis von Mutationen der miR-142 in DLBCL, AML und follikulären Lymphomen. Die Bedeutung dieses Mechanismus im Rahmen der Krebsentstehung der genannten hämatoonkologischen Krebsarten ist noch größtenteils unklar. Die für miRNAs codierenden Regionen sind hochkonservierte genetische Bereiche und die gefundenen Mutationen stellen einen interessanten Forschungsansatz dar. Inwiefern diese Mutationen die Krebsentstehung fördern ist bisher weiterhin nicht vollständig geklärt. Um weitere Forschung zu ermöglichen wurden

jeweils eine 3p und eine 5p-Mutante sowie der Wildtyp in einen Ko-Expressionsvektor im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert.

Auch bei der häufigsten hämatologischen Krebsart, der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), konnten Veränderungen der quantitativen intrazellulären miRNA Mengen gefunden werden. Bei der molekularbiologischen Analyse von mehr als 60 CLL Proben im Vergleich mit CD5⁺-B-Lymphozyten gesunder Patienten, konnte gezeigt werden, dass in mehr als der Hälfte der Fälle eine Deletion des Chromosoms 13 auf dem kurzen Arm, der Position 13q14 vorkommt (Calin et al., 2002). Die entsprechenden microRNAs deren Genexpression hierdurch abnormal verändert ist, waren die miR-15 und miR-16 (Calin et al., 2002). Beide befinden sich in der deletierten Region und waren in ca. 68 % der untersuchten CLL Proben herunterreguliert.

Eine weitere miRNA, bei der ein Zusammenhang zur Krebsentstehung hergestellt werden konnte, war die E μ -mmu-miR-155, deren Überexpression im transgenen Mausmodell zu einer Splenomegalie bereits nach 3 Wochen, einer Leukopenie im peripheren Blut, histologischer Vermehrung der roten Pulpa der Milz unter Verdrängung der weißen Pulpa mit atypischen und blastischen Lymphozytenmorphologie in der Milz und letztendlich zu lymphoproliferativen Erkrankungen führte (Costinean et al., 2006). Sie lieferte einen weiteren Beweis, dass bereits die Überexpression einer einzigen miRNA zu Krebs führen kann. Auch im Menschen wurden erhöhte miR-155 Konzentrationen in Tumoren gefunden, allen voran im DLBCL und anderen aggressiven Lymphomen; aber auch in nicht lymphatischen, soliden Tumoren wie dem Mamma-, Bronchial- und Colonkarzinom (Volinia et al., 2006). Verschiedene miRNAs könnten daher eine entscheidende Rolle für zukünftige diagnostische und therapeutische Konzepte spielen.

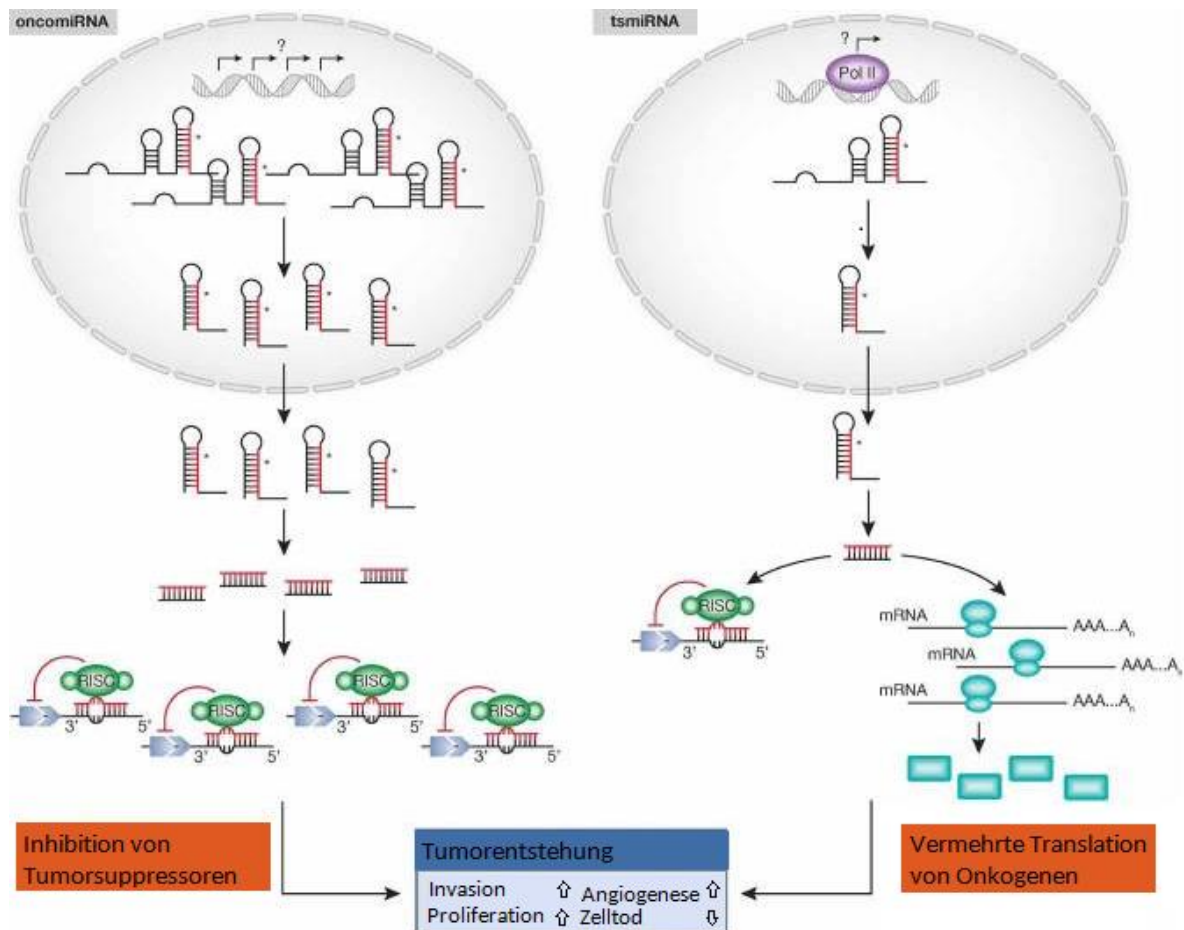


Abb. 24: Wirkung der miRNA als onkogene miRNA oder Tumorsuppressor miRNA; verändert nach (Iorio und Croce, 2012): Erfolgt die komplementäre Bindung der miRNA an eine mRNA, die einen Tumorsuppressor transkribiert, so führt eine erniedrigte Expression dieser miRNA durch posttranskriptionelle Genregulation zu einer stärkeren Wirkung des Tumorsuppressors, wodurch eine Tumorentstehung verhindert wird ggf. bei kumulativen Zellschäden geht die Zelle in die Apoptose. Eine vermehrte Transkription der miRNA, Genamplifikation oder Hypomethylierung, die zu einer funktionellen Wirkverstärkung der Tumorsuppressor mRNA führt, hätte dann keinen krebsfördernden Einfluss. Dem entgegengesetzt kommt es bei einer geringeren Aktivität einer miRNA, die komplementär im funktionellen Zustand ein Onkogen antagonisiert, zu einer Hochregulierung des Onkogens und schlussendlich kann dies zur Krebsentstehung führen. Weitere Prozesse, wie Hypermethylierung, Deletion oder verminderte Transkription einer tumorsuppressiv wirkenden miRNA können ebenso zur Krebsentstehung beitragen (Iorio und Croce, 2012).

8.2 Einfluss der miR-34a auf den Tumorsuppressor P53 und die Krebsentstehung

In vorliegender Doktorarbeit wurden Vektoren zur Ko-Expression von fluoreszierenden Proteinen und miRNAs erstellt. Die miR-34a Expression ist in vielen Tumoren vermindert. Zudem hat sie Einfluss auf mehr als 700 Transkripte, die Zellproliferation, -teilung und -differenzierung mitgestalten (Ghandadi und Sahebkar, 2016). Es gab sogar bereits klinische Versuche bei Krebspatienten mit dem Ziel eine Steigerung der Expression der miR-34a in Krebszellen zu bewirken und somit deren intrazelluläres Vorkommen zu erhöhen (Slabakova et al., 2017).

Das Protein P53 ist einer der bedeutendsten Tumorsuppressoren mit Einfluss auf die miR-34a. Seit dem Jahr seiner Entdeckung 1979 hat es enormes wissenschaftliches Interesse erweckt. Rund 17.000 Publikationen bis zum Ende des Jahres 2000 zeugen von einem immensen Interesse und deuten das Potential dieses Proteins für die Vermeidung der Krebsentstehung und als Tumorsuppressor an (Vogelstein et al., 2000). Es gibt viele Wege, die zu einer Funktionsabschwächung des Proteins P53 führen, allen gemeinsam ist die Häufung in diversen Krebsarten. Pathomechanistisch finden sich verschiedene Formen, wobei oft die Häufung eines Mechanismus in einer Krebsarten überwiegt. Die Mutation der Gensequenz ist die bekannteste und weitreichendste Form (Martincorena und Campbell, 2015). In den meisten Fällen ist es jedoch nicht eine Mutation die unmittelbar zu Krebs führt, sondern vielmehr ein two-hit-model bzw. multiple-hit-model (Wang et al., 2018).

Mutationen der Gensequenz *p53* wurden in sehr vielen Krebszellen gefunden. Hierbei kommt es durch Abweichung der Nukleotidsequenz konsekutiv zu einer veränderten Aminosäuresequenz und schlussendlich zur Inaktivität oder verminderten Affinität des Proteins P53 zu dessen Bindungsstellen an der DNA (Blandino et al., 2019). Somit kann die Aktivierung Apoptose-triggernder Proteine nicht adäquat gestartet werden (Mrakovcic et al., 2019). Onkogene Viren vermögen P53 funktionell auszuschalten, indem sie an P53 binden oder dieses degradieren und dadurch dessen Wirkung blockieren (Tornesello et al., 2018). Diese virusbedingte Dysregulation tritt vermehrt in hepatozellulären Karzinomen, Zervixkarzinomen und Lymphomen auf.

Das Protein P53 hat auch einen Einfluss auf das Vorkommen von diversen microRNAs in der Zelle z.B. induziert es durch Bindung an den miR-34a Promotor die Expression von miR-34a (Nie et al., 2019). Kommt es zu einer Mutation von *p53* oder dessen Bindungsstelle am Promotor der miR-34a, so kann dies zu niedrigeren Mengen von miR-34a in den Zellen führen. Auch eine Hypermethylierung der CpG-Region am Promotor kann das gleiche Resultat herbeiführen. Auch im Multiplem Myelom (MM) konnten Fehlregulierungen der miR-34a gefunden werden. In Myelom Zellen wurde eine Herunterregulierung der miR-34a festgestellt

(Nie et al., 2019). Als Folge daraus ergab sich, dass essentielle molekulare Mechanismen der Zellproliferation und Apoptose der dysregulierten Zellen nun verändert ablaufen (Misso et al., 2014). Einer der Pathomechanismen bei Wirkungsverlust der miR-34a, ist die Fehlregulation des "Erk2/Akt-pathway". (Di Martino et al., 2014) führte zur Untersuchung dieses Zusammenhangs Experimente an Myelom Zellen durch. Nach Transfektion der MM-Zellen mit miR-34a mimics wurde die Beeinflussung mehrerer Signalkaskaden untersucht. Die miR-34a mimics trugen zur Inaktivierung der antiapoptotischen Proteine Erk2 und Akt bei. Durch die Funktionsabschwächung der Kinasen kommt es zur Aktivierung der Caspasen 6 und 3 und schlussendlich zur miR-34a-vermittelten Apoptose (Di Martino et al., 2014). Im Umkehrschluss, falls die miR-34a Aktivität vermindert wird, so wird die Balance des Zellzyklus im Rahmen des "Erk2/Akt-pathways" gestört. Die Kinasen sind vermehrt aktiv und durch deren Phosphorylierungsaktivität wird die Apoptose geschädigter, potentiell karzinogener Zellen erschwert. Dieser Zusammenhang wurde *in-vitro* mit einer murinen Myelomzelllinie mittels miR-34a mimics näher erforscht (Di Martino et al., 2014). Eine weitere Publikation unterstützte diese These und somit den antiproliferativen, proapoptotischen und antitumorösen Charakter der miR-142 durch posttranskriptionelle Interaktion mit dem "Erk2 und Akt-pathway" (El Bezawy et al., 2017).

Ein direktes "target" der miR-34a stellt die mRNA des "forkhead box transcription factor 1", das sogenannte FOXP1 dar. Als Regulationsmechanismus nimmt der Transkriptionsfaktor FOXP1 Einfluss auf viele Gene, unter anderem den "Wnt/ β -Catenin-pathway" (Walker et al., 2015). In diesem Signalweg wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors u. a. über den Wnt-Liganden kontrolliert (Nusse und Clevers, 2017). Der Wnt-Ligand unterdrückt im aktiven Zustand eine Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungskaskade des β -Catenins. Durch Ubiquitinierung und Phosphorylierung wird β -Catenin für das Proteasom markiert und proteolytisch abgebaut. Dieser Regulationsmechanismus ist in vielen Tumoren aberrant, wodurch es zur Verstärkung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs und damit zu verstärkter Aktivität des Transkriptionsfaktors im Nukleus kommt. Dies stellt mechanistisch einen wichtigen "hallmark of cancer" in diversen Krebsarten dar (Duchartre et al., 2016).

Im DLBCL stellt die Überexpression des Gens *foxp1* einen negativen Prognosefaktor dar. Das Protein FOXP1 scheint als Coaktivator zu fungieren und den Wnt-Signalweg zu verstärken, indem es durch Aktivierung der CBP-Acetyltransferase die Acetylierung von β -Catenin herbeiführt. Diese Aktivierung ist für den Transkriptionsfaktor von entscheidender Bedeutung (Walker et al., 2015).

Die miR-34a hat das Potential als prognostischer Marker von Tumoren zu fungieren. Eine geringe Konzentration von miR-34a in Tumorzellen hat sich als negativer prognostischer

Parameter in Brustkrebszellen gezeigt (Agarwal et al., 2015). Es zeigte sich, dass ein Verlust des Tumorsuppressors miR-34a mit einem kürzeren Überleben einherging.

Daher könnte die miR-34a zukünftig in den klinischen Alltag zur prognostischen Einschätzung Einzug halten.

8.3 Weitere “targets“ der miR-34a

PD-1 ist ein Transmembranprotein, das durch seine immunsuppressive Funktion bei vielen pathologischen und physiologischen Prozessen mitwirkt. Auch bei verschiedenen Tumoren werden erhöhte Mengen von PD-1 gefunden (Droeser et al., 2013). Der PD-1 aktivierende Ligand ist PD-L1. Im Zusammenspiel bewirken Sie eine Supprimierung der Immunantwort. Diesen Mechanismus haben sich viele Tumorzellen zu nutzen gemacht um der körpereigenen Immunantwort zu entgehen. Besondere Aufmerksamkeit hat der Ligand durch seine Überexpression in malignen Krebsarten gefunden. Durch Aktivierung des “PD-L1/PD-1-pathway“ entgehen die malignen Zellen dem Zelltod (Menter et al., 2016). Durch dessen immunsuppressive Funktion entgeht die Tumorzelle der Zerstörung durch das eigene Immunsystem und erlaubt daher eine unentdeckte Proliferation. Durch Inhibition spezieller Immuncheckpoints entgeht die maligne Zelle der durch T-Lymphozyten eingeleiteten Apoptose. So wurde die Überexpression des Rezeptors oder dessen Liganden bereits in vielen Tumoren wie Pankreaskarzinomen, Magenkarzinomen, dem malignen Melanom, Hodgkin Lymphomen und des NSCLC dokumentiert (Liu et al., 2008).

Wang et al. (2015) fanden heraus, dass eine inverse Korrelation bei der AML zwischen der miR-34a und PD-L1 besteht. Dies wurde durch Bindung der miR-34a an die mRNA des PDL-1 Proteins und dessen erniedrigte Proteinbiosynthese nach miRNA-mRNA-Interaktion erklärt (Wang et al., 2015). Die inverse Korrelation bedeutet, dass die miR-34a durch dessen Einfluss auf den “PD-L1/PD-1-pathway“ einen entscheidenden Beitrag zur Immunantwort und dem Schutz vor der Krebsentstehung beitragen könnte. Durch Repression der Translation des PD-L1 durch Bindung der miR-34a an die 3'UTR der PDL-1 mRNA wirkt sie somit als Immunmodulator. Der Einfluss der Immunantwort an der Krebsentstehung ist bereits im klinischen und therapeutischen Bereich verankert. Hier werden sogenannte Checkpoint-Inhibitoren bereits zur Krebstherapie eingesetzt um durch Unterdrückung dieses Mechanismus die Krebszellen dem körpereigenen Immunsystem zugänglich zu machen (Sundar et al., 2015).

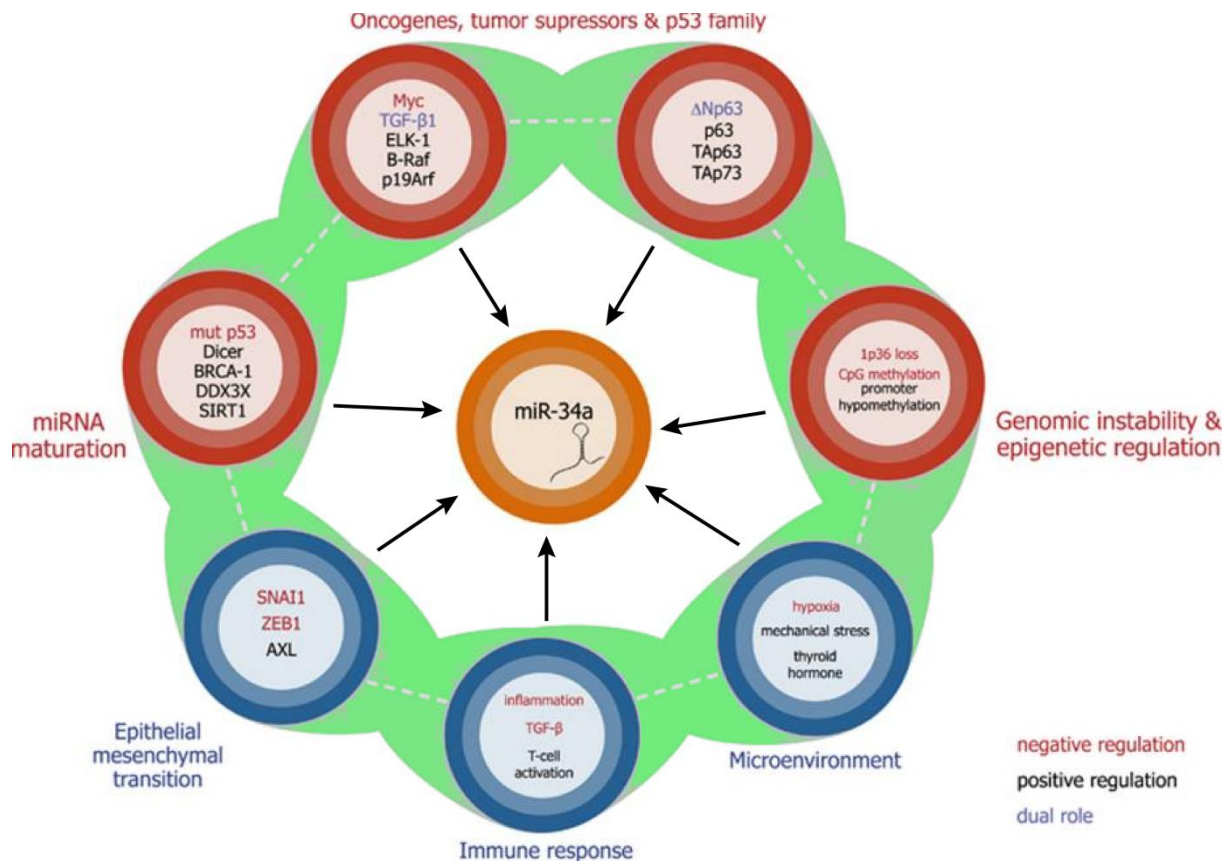


Abb. 25: P53-unabhängige Regulierung der miR-34a; verändert nach (Slabakova et al., 2017): Die Abbildung 25 zeigt einige exemplarische Beispiele, die im komplexen Gefüge als Regulations- und Feedback Mechanismen einen Einfluss auf die miR-34a haben. Blau umkreist sind extrinsische Einflüsse durch die Umgebung, das Immunsystem und Faktoren die zur EMT beitragen. Rot umkreist sind intrinsische Mechanismen z. B. epigenetische Faktoren, miRNA Reifungsprozesse, Onkogene und Tumorsuppressoren. Es wird ebenfalls zwischen **negativen Regulationsmechanismen** (rote Buchstaben z.B. Myc), positiven Regulationsmechanismen (schwarze Buchstaben z.B. BRCA-1) unterschieden, wobei viele Faktoren kontextabhängige **duale Funktionen** besitzen können (blaue Buchstaben) (Slabakova et al., 2017).

8.4 Einfluss der miR-142 auf die Krebsentstehung

Bei der Prozessierung der pre-miR-142 entstehen zwei reife microRNA, die miR-142-3p und die miR-142-5p (Sharma, 2017). In verschiedensten Tumoren konnte eine Überexpression, Mutation oder Herabregulierung der reifen miR-142 gefunden werden (Tsang et al., 2015). Im Folgenden werden einige Beispiele aufgeführt, bei denen eine Assoziation der miR-142 mit der Krebsentstehung gefunden wurde.

MALT-Lymphome sind eine spezielle Krebsart, deren Entstehungsmechanismus im Magen überwiegend auf der chronischen Entzündungsreaktion durch *Helicobacter pylori* beruht.

Folglich sind die Frühstadien bei Helicobacter-positiven MALT-Lymphomen auch durch eine rein antibiotische Eradikationstherapie des Bakteriums ohne Chemotherapie oder Operationen erfolgreich zu behandeln (Thieblemont und Zucca, 2017). Patienten die keine vollständige Remission (CR) aufwiesen, zeigten eine Überexpression von miR-142-5p in den histologischen Proben des MALT-Lymphoms. Patienten mit vollständiger Remission wiesen deutlich niedrigere Spiegel von miR-142-5p in den Gewebeproben auf (Saito et al., 2012). Die miR-142-5p hat als potentiell "target" die 3' UTR der mRNA des proapoptotisch wirkenden Proteins TP53INP1 (Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1) (Fernandez et al., 2017). Diese mRNA wird, wie der Name andeutet, durch P53 induziert und führt bei zellulärem Stress zum programmierten Zelltod (Wang et al., 2016). Dieser Zusammenhang weist einen prognostischen Biomarker für MALT-Lymphome nach. Anhand der miR-142-5p Spiegel kann man von einem Ansprechen des MALT-Lymphoms auf die Eradikationstherapie schließen (Saito et al., 2012).

Auch in einer zweiten hämatoonkologischen Krebsart konnten neue Erkenntnisse zur miR-142 gewonnen werden. Im DLBCL, dem häufigsten in Europa auftretendem Lymphom fanden sich Mutationen in der miR-142 Sequenz, wohingegen in nicht karzinogenem Gewebe keine Mutationen nachgewiesen wurden (Kwanhian et al., 2012). Die Mutationen der B-Lymphozyten konnten sowohl in der Sequenz der reifen miR-142-3p als auch in der reifen miR-142-5p gefunden werden. Zusätzlich zu DLBCL konnten auch in follikulären Lymphomen Mutationen der miR-142 nachgewiesen werden (Hezaveh et al., 2016). Die Häufigkeit dieser Mutationen wurde in den genannten Publikationen in DLBCL zwischen 10-20 %, in follikulären Lymphomen bei ca. 10 % beschrieben.

Außer in B-Zell-Lymphomen konnten Punktmutationen der miR-142-3p auch in AML-Zellen festgestellt werden (Trissal et al., 2018). Hier konnte gezeigt werden, dass infolge der Punktmutation der miR-142-3p eine funktionelle Abschwächung beider reifer miR-142 Formen und somit auch der miR-142-5p auftritt. Die Hemmung der Translation der meisten "targets" der miR-142-3p konnte durch die Mutationen nicht mehr erfolgen z.B. TGFBR1, ASH1L und RAC1. Die Punktmutationen stellen somit "loss-of function" Mutationen dar. ASH1L spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Hoxa-Gene. Durch fehlende Repression der miR-142 kam es zur vermehrten Expression der Hoxa9/a10 Gene und somit zur Beeinflussung der hämatopoetischen Zellteilung. Dieser Signalweg trägt vermutlich zur Leukämieentstehung bei (Trissal et al., 2018).

In nicht lymphatischem Krebs konnte eine Überexpression der miR-142 nachgewiesen werden. Im NSCLC, welcher weiterhin der Krebs in Deutschland mit der höchsten Mortalität ist, konnten in Gewebeproben erniedrigte TGFβR1 Spiegel nachgewiesen werden (Lei et al., 2014). TGFβR1 als Tumorsuppressor ist ein Schlüsselfaktor im TGF-β Signalweg. Die miR-

miR-142-3p reguliert durch Bindung an die 3'UTR der mRNA des Proteins TGF β R1 dessen Translation und führt somit zu einer Herunterregulierung seiner Proteinbiosynthese. Folglich sinkt die Aktivität des Tumorsuppressors (Yang et al., 2017). Auch die miR-142-5p scheint eine Rolle beim NSCLC zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass diese miRNA bei Krebszellen ebenfalls herunterreguliert war und es wurde vermutet, dass die miR-142-5p als Tumorsuppressor der Karzinogenese entgegenwirkt, indem sie Invasion, Migration und Proliferation von Zellen verhindert (Wang et al., 2017). Diese Wirkung könnte durch das Protein PIK3CA vermittelt sein, das als direktes "target" der miR-142-5p identifiziert wurde (Wang et al., 2017).

Auch in einem weiteren Tumor, dem Kolonkarzinom, könnte miR-142-3p als Biomarker fungieren (Gao et al., 2019b). In der vorgestellten Studie wurden insgesamt mehr als 500 Proben kolorektaler Schleimhaut untersucht, davon 363 Proben kolorektaler Karzinome und 156 Kontrollproben. In allen konnte miR-142-3p nachgewiesen werden, wobei die Spiegel in Proben von kolorektalen Karzinomen signifikant niedriger waren. Darüber hinaus konnten sogar prognostische Rückschlüsse getroffen werden. Patienten mit niedrigen miR-142-3p Serumspiegel wiesen eine schlechtere Prognose auf. Das Überleben von Patienten mit niedrigem miR-142-3p Spiegel war vergleichsweise niedrig. In dieser Publikation konnte somit gezeigt werden, dass die miR-142-3p durchaus Potential als Biomarker besitzt, sowohl zur Differenzierung zwischen gesunder kolorektaler Schleimhaut als auch zur prognostischen Wertung (Zhu et al., 2018).

8.5 Weitere "targets" der miR-142

Zu den hämatologischen Zellen gehören die myeloische und lymphatische Zellreihe. Zu den Krebsarten der hämatologischen Zellenreihe zählen die NHL, Leukämien, das Multiple Myelom sowie viele weitere.

Die miR-142 spielt eine entscheidende Rolle in hämatopoetischen Zellen (Shrestha et al., 2015). In DLBCL, der häufigste Lymphomart des alternden Menschen, konnte in 20% aller Proben Mutationen der miR-142 nachgewiesen werden (Kwanhian et al., 2012). Der WNT/ β -Catenin-Signalweg hat einen wesentlichen Einfluss auf Zellproliferation, Differenzierung und Karzinogenese und nimmt somit Einfluss auf Initiation, Promotion und Progression bei der Umwandlung einer gesunden zu einer Krebszelle. Das Protein APC fungiert als Tumorsuppressor und nimmt ebenfalls an dieser Signaltransduktionskaskade des WNT/ β -Catenin teil und zwar in einem Multi-Protein-Komplex, der infolge einer Proteinkaskade letztlich zur Phosphorylierung von β -Catenin und somit zur Degradierung durch das Proteasom führt (Ayala-Calvillo et al., 2018). Da β -Catenin im Rahmen des WNT/ β -Catenin-Signalwegs als Wachstumsfaktor zu Zellwachstum führt, wirkt APC durch Beschleunigung dessen Abbaus

proapoptotisch (Benchabane und Ahmed, 2009). Außer APC wirkt auch die miR-142-3p inhibitorisch auf den WNT/ β -Catenin-Signalweg. Dies erfolgt durch direkte Interaktion der miR-142 mit β -Catenin und somit durch Unterdrückung dessen Translation (Hu et al., 2016). Der Einfluss der Schleifenstruktur der pre-miR-142 scheint hier von größter Bedeutung. Mutationen, die zu einer Veränderung der Schleifenstruktur der pre-miR-142 führten, verloren ihr inhibitorisches Potential auf den WNT/ β -Catenin-Signalweg (Hu et al., 2016).

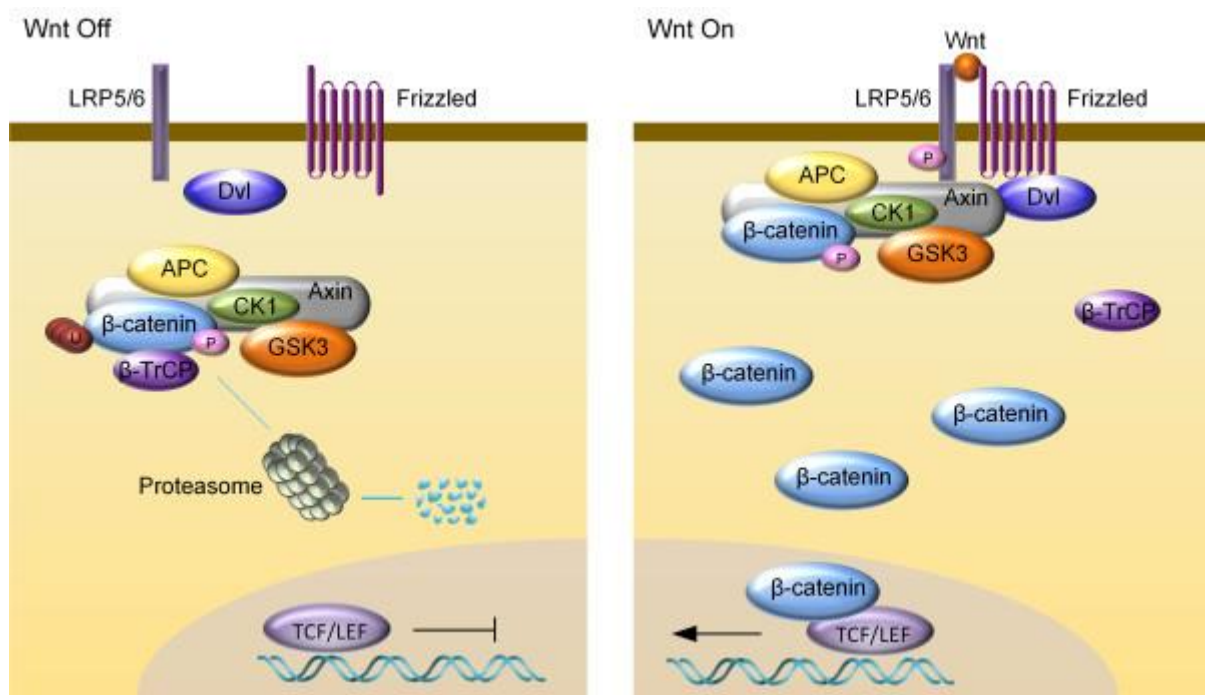


Abb. 26: Der WNT/ β -Catenin-Signalweg; verändert nach (Gao et al., 2014): Abbildung 26 zeigt verschiedene Regulationsprozesse, durch deren Einfluss der WNT/ β -Catenin Signalweg gesteuert wird. In der linken Hälfte ist das aktivierte Protein APC sowie der Multi-Enzym-Komplex zu erkennen, durch dessen Einfluss in Abwesenheit von WNT der Abbau von β -Catenin gefördert wird. Dieser Schritt führt nach Markierung durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung zum Funktionsverlust von β -Catenin durch enzymatische Spaltung durch das Proteasom. Rechte Hälfte: Sobald WNT an seinen Rezeptor bindet, kommt es zur Spaltung des Multi-Enzym-Komplexes. Hierbei lagert sich Axin an LRP5/6 und β -Catenin wird nicht mehr phosphoryliert. β -Catenin lagert sich an das Protein TCF im Nucleus mit dessen Hilfe es zur Hochregulierung diverser Gene kommt (Gao et al., 2014).

8.6 Funktion der miR-142 im Immunsystem

Ein interessanter Aspekt der miR-142 ist deren Funktion im Immunsystem. Die miR-142 ist eine der wenigen miRNA, die spezifisch in hämatopoetischen Zellen vorkommt und deren Differenzierung beeinflusst (Landgraf et al., 2007). Auch in regulatorischen T-Zellen (Tregs) scheint die miR-142 von Bedeutung zu sein (Gao et al., 2019a). Tregs sind an der Selbsttoleranz beteiligt und dienen somit der Prävention von Autoimmunerkrankungen, einer immer größer werdenden Gruppe an Erkrankungen, bei denen das Immunsystem seine eigentliche Aufgabe verfehlt und körpereigenes Gewebe angreift. Die Funktion der Tregs ist abhängig vom intrazellulären cAMP-Spiegel (Anandagoda et al., 2019). Die miR-142-5p nimmt Einfluss auf den cAMP-cGMP Umbau. Als entscheidendes "target" wurde die Phosphodiesterase-3b (*Pde3b*) mRNA gefunden, die die enzymatische Reaktion katalysiert. Unterstützend wurde durch (Anandagoda et al., 2019) ein murines Modell von spezifischen Tregs miR-142 defizienten Mäusen etabliert. Diese zeigten multisystemische Inflammationsreaktionen a.e. autoimmuner Genese in Leber, Lunge und Haut; trotz initial normaler Anzahl an Tregs während der Entwicklung.

Ein weiteres murines Modell untersuchte die Bedeutung der miR-142 auf das Immunsystem. Hierfür wurden gezielt miR-142 knock-out Mäuse erzeugt und untersucht (Shrestha et al., 2015). MiR-142^{-/-} Mäuse wiesen eine Splenomegalie auf und zeigten laborchemisch eine Leukopenie, wobei lediglich die lymphatische, nicht aber die myeloische Zellreihe betroffen war. In diesen Tierreihen wurde der knock-out durch homologe Rekombination erzeugt und die Tiere wiesen reduzierte miR-142-3p und miR-142-5p Spiegel auf. Die Tiere zeigten eine Immundefizienz und insbesondere die Abwehr von Viren war vermindert.

Das Modell hat erneut an Bedeutung gewonnen in Bezug auf die Überlegung, dass in AML-Zellen "loss-of function" Mutationen der miR-142 gefunden wurden, die sowohl die Funktion der miR-143-3p als auch der miR-142-5p abschwächt (Trissal et al., 2018).

Das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) ist ein essentieller Bestandteil der Immunantwort und verbindet durch Antigenpräsentation das unspezifische mit dem spezifischen Immunsystem. Dendritische Zellen sind ein wesentlicher Bestandteil davon und durch Antigenpräsentation können sie den Lymphozyten zur spezifischen Immunantwort und zum Immungedächtnis verhelfen. In CD4⁺-dendritischen Zellen wurden hohe Spiegel an miR-142 gemessen. Die hohe Expression der miR-142 scheint eine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung zur dendritischen Zelle zu haben (Mildner et al., 2013). Die miR-142-3p konnte in höherer Konzentration als die miR-142-5p gefunden werden. Erwartungsgemäß konnten in der Milz der miR-142^{-/-} Mäusen eine 2,5fach erniedrigte Zahl an CD4⁺-dendritischen Zellen im FACS detektiert werden. Durch die kompromittierte Funktion der dendritischen Zellen, ist die Funktion der CD4⁺ T-Lymphozyten ebenfalls beeinträchtigt (Mildner et al., 2013).

Auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden in Ihrer Funktion von der miR-142 beeinflusst (Berrien-Elliott et al., 2019). NK-Zellen sind wesentlich an der Immunantwort gegen Viren beteiligt. Wie oben erwähnt waren die miR-142^{-/-} Mäuse anfällig gegenüber Viren im Rahmen der Immundefizienz. Dies wurde anhand des murinen Cytomegalievirus (MCMV) getestet. Der zugrundeliegende Mechanismus hierbei scheint vom IL-15 Signalweg abhängig zu sein. IL-15 induziert die Expression der miR-142. Durch fehlende Induzierbarkeit bei MiR-142^{-/-} Mäusen kam es vermutlich zur intrinsischen Apoptose der NK-Zellen (Berrien-Elliott et al., 2019).

8.7 Ergebnisdiskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenen miRNA-Expressionsvektoren erstellt, wobei von der miR-142 in den entsprechenden Expressionsvektor eine Wildtyp und zwei mutierte miRNA Varianten inkloniert wurden. Die erstellten Vektoren pSG5-GFP-miR-34a und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 sowie die beiden Mutationen wurden in Bezug auf die Expression der miR-34a, der miR-142, der miR-142-mut2 und der miR-142-mut3 sowie auf die Expression von eGFP charakterisiert. Da sich die Arbeitsgruppe gegen ein Weiterforschen an der miR-200c entschieden hatte, wurde in Bezug auf den Vektor pSG5-GFP-miR-200c auf die Erstellung eines Northern Blot verzichtet. Bei den verbliebenen Vektoren wurden neben der eigentlichen Klonierung Western Blots, Northern Blots, Sequenzanalysen und mikroskopische Analysen der exprimierenden Zellen durchgeführt. Die transfizierten 293T-Zellen zeigten sowohl die Expression der jeweiligen miRNA als auch von eGFP. Die Klonierungen der Vektoren und die Analysen konnten somit erfolgreich durchgeführt werden.

Bei der Erstellung der Vektoren pSG5-GFP-miR-34a und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 zeigte sich, dass die Sequenzierung der erstellten Konstrukte Unterschiede in der Sequenz lieferte. Die meisten gefundenen „Mutationen“, insbesondere diejenigen im 3'-Teil der Sequenz sind wahrscheinlich auf Ungenauigkeiten der Sequenzierung zurückzuführen. Eine genaue Sequenzierung wird durch die Fa. Seq-it nur für die ersten ca. 0,3 kb garantiert. Die Ätiologie anderer Mutationen konnte nicht einfach geklärt werden. Für den Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 betrifft dies insbesondere das Fehlen der XhoI Konsensussequenz in der zweiten Sequenzierung. Das Fehlen dieser essentiellen Sequenz in einer der Sequenzierungen bei gleichzeitigem Vorhandensein der Sequenz für die pre-miR-142 und eGFP könnte auf einen Fehler bei der Sequenzierung hindeuten.

Die Vektoren pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 wurden nur jeweils einmal erstellt und daher auch nicht zweimal sequenziert. Für die zweimal sequenzierten Vektoren wurde nur jeweils die längere und vollständigere Sequenz zusammengefügt im Anhang abgebildet, die anderen Sequenzen wurden original und unbearbeitet als "reverse" und "forward" Sequenzierungen im Anhang gezeigt.

Bei der Erstellung und Testung des Vektors pSG5-GFP-miR-34a fiel auf, dass im Northern Blot (Kapitel 7.1.5, Abb. 14) eine miR-34a-Expression auch in der Northern Blot Spur nachgewiesen werden konnte, die Lysat von pSG5-GFP transfizierten Zellen enthielt. Dies könnte auf eine versehentliche Stimulation der Zellen, z. B. durch eine Kontamination hinweisen, die zur miR-34a Expression führte. Auch ein Fehlpipettieren ist hier möglich. Da alle weiteren Experimente mit diesem Vektor normal waren, deutet nichts auf einen grundsätzlichen Fehler bei der Klonierung hin.

Für den Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 und seine Mutanten wurden im Northern Blot die miR-142 durch eine 3p und eine 5p-Sonde nachgewiesen. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da aus der pre-miR-142 zwei reife miRNAs entstehen, die miR-142-3p und die miR-142-5p. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die spezifisch bindenden Sonden an die miR-142-3p bzw. 5p-Varianten, die mutiert waren nicht so stark gebunden hat. Die -mut2 hatte eine Mutation in der 3p-Variante, die -mut3 hatte eine Mutation in der 5p-Variante. Das Bindungsverhalten der Sonden lässt sich über deren Sequenzen erklären, die zwar komplementär zur normalen 3p- und 5p-Variante sind, allerdings nicht zu der jeweiligen Punktmutation in den Mutanten. Für die 5p-Variante war die Affinität der Sonde geringer ausgeprägt als für die 3p-Variante (s. Abb. 22 und Abb. 23). Die Punktmutationen können aus Kapitel 11 (in der Sequenzierung, Mutationen jeweils orange markiert) ersehen werden. Diese befinden sich in der "seed"-Sequenz der miR-142-3p bzw. -5p.

Analoge Versuche zum Vektor pSG5-GFP-miR-34a wurden mit einer anderen miRNA im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls durchgeführt. Die miR-200c wurde analog zur miR-34a für Klonierungen verwendet. Mit diesem erstellten Konstrukt wurden alle Versuche bis auf den Northern Blot durchgeführt.

Erwähnenswert im Rahmen der Ergebnisdiskussion ist außerdem, dass ein Vektor kloniert wurde anhand des pcDNA3.1/Hygro(-), der das rot fluoreszierende Protein mCherry beinhaltet. Der Vektor wird als pcDNA3.1/Hygro(-)mCherry bezeichnet. Dies wurde entsprechend dem eGFP Protein im Rahmen dieser Arbeit in den transfizierten 293T-Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Aufgrund des Umfangs wurde darauf verzichtet analog zu den GFP Vektoren die miR-142 und deren Mutanten in den pcDNA3.1/Hygro (-)mCherry zu klonieren. Dies wurde in Folgeprojekten der Arbeitsgruppe durchgeführt (s. Abb 21).

8.8 Ausblick

Durch die Erstellung der Klonierungsvektoren zur Ko-Expression von eGFP und der miR-34a oder miR-142 könnten in Anschlussprojekten wichtige Informationen zum Beitrag der miRNAs zur Krebsentstehung gewonnen werden. Hierbei ist die Charakterisierung der beiden miRNA wie sie im Rahmen dieser Arbeit begonnen wurde ein essentieller Schritt um mögliche klinische Anwendungsgebiete zu erforschen. Die Klonierungsvektoren sind erstellt worden um weitere molekularbiologische Forschung zu ermöglichen.

Die miR-34a und die miR-142, stellen vielversprechende Kandidaten für therapeutische und prognostische Zwecke dar. Für weitere Versuchsreihen und Projekte wäre es daher vielversprechend, Gen- und Proteinexpressionsstudien in weiteren Säugerzelllinien durchzuführen um die Wirkung der miRNAs besser zu verstehen. Eine Charakterisierung des Transkriptoms und Proteoms in Relation zur miRNA Expressionsrate wäre hier von großem Interesse.

In-vitro könnten stabil transfizierte Zelllinien mit den induzierbaren miR-142 Mutanten weitere Studien erleichtern. Dabei könnte die mutierten miRNAs, und deren Klonierungsprodukte und Charakterisierung das Verständnis vom Effekt der Mutation der miRNAs steigern. Schlussendlich könnten dann Versuche mit primären Zellen und ggf. Versuche in Tiermodellen Aufschluss über weitere *in vivo* Effekte geben und auch das Verständnis der Rolle der miR-34a und der miR-142 und deren Mutationen für die Krebsentstehung und Tumorprogression verbessern. In Bezug auf den

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primer für die Klonierung	S. 30
Tab. 2: Primer für die Sequenzierung	S. 30
Tab. 3: Pipettierschema eines 50µl Standard-PCR-Ansatzes	S. 37
Tab. 4: Einstellungen eines Standard PCR Programms	S. 38
Tab. 5: Pipettierschema eines Standard Restriktionsverdau	S. 41
Tab. 6: Standard Ligationsansatz	S. 42

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 : miRNA Prozessierung	S. 6
Abb. 2 : Häufigkeit der Lymphom-Subtypen	S. 8
Abb. 3 : Nukleotidsequenz der miR-142	S. 9
Abb. 4 : Nukleotidsequenz der miR-34a	S. 10
Abb. 5 : Regulationsmechanismen der Transkription der miR-34a	S. 11
Abb. 6 : Nukleotidsequenz der miR-200c	S. 12
Abb. 7 : Der Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)	S. 25
Abb. 8 : Der Vektor pSG5	S. 26
Abb. 9 : “2-log DNA Ladder”	S. 27
Abb. 10: “Blue Prestained Protein Standard” “Broad Range”	S. 28
Abb. 11: PCR der pre-miR-34a des Template pSG5-miR-34a	S. 51
Abb. 12: Vektorkarte pSG5-GFP-miR-34a	S. 53
Abb. 13: Western Blot von eGFP und beta-Aktin d. pSG5-GFP-miR-34a	S. 55
Abb. 14: Northern Blot der miR-34a	S. 57
Abb. 15: PCR der pre-miR-200c des Templates pSG5-miR-200c	S. 58
Abb. 16: Western Blot von eGFP und beta-Aktin d. pSG5-GFP-miR-200c	S. 61
Abb. 17: PCR der pre-miR-142 und Mutanten	S. 63
Abb. 18: Vektorkarte pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142	S. 66
Abb. 19: Western Blot von eGFP und beta-Aktin d. pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142	S. 68
Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GFP in 293T-Zellen	S. 69
Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mCherry in 293T-Zellen	S. 70
Abb. 22: Northern Blot der miR-142 (-3p Sonde)	S. 72
Abb. 23: Northern Blot der miR-142 (5p Sonde)	S. 74
Abb. 24: Wirkung der miRNA bei der Krebsentstehung	S. 78
Abb. 25: P53-unabhängige Regulierung der miR-34a	S. 82
Abb. 26: Der WNT/ β -Catenin-Signalweg	S. 85
Abb. 27: Vektorkarte pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2	S.102
Abb. 28: Vektorkarte pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3	S.105

11 Anhang

Im Folgenden werden die Sequenzierungsergebnisse gezeigt. Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger durch die Firma SEQ-it.

Originalsequenz: "forward" Sequenzierung pSG5-GFP-miR-34a-1

```
5'GGGGTCGTGACAGACCCACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGG
CATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGATCGGAATCCAGGCCTGTCCCCGAGTCCCCTCCGGATGCCGTGGACCGGCCAGC
TGTGAGTGTTCCTTTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGCAATAGTAAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGCCCTAGAA
GTGCTGCACGTTGTGGGGCCCAAGAGGGAAGATGAAGCGAGAGATGCCAGACCAGTGGGAGACGCCAGGACACTAGTA
GATCTTATTAAGCAGAACTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGC
ATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGTCTGACTCTAGACTCTCCGC
TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCC
GCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTAC
CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTG
GGTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCGACCCTGCGCCTTATCCGGTACTATCGTC
TTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCACTGGGCAGCTAGCCACTGGTACAGGATTAGCAGAGCGTAGGTATGTA
GGCGGTGGCTACAAGAGTTCTGGAAGTTG3'
```

Originalsequenz: "reverse" Sequenzierung pSG5-GFP-miR-34a-1

```
3'AGAATAACCTAGTGTCTGGCGTCTCCCACTGGTCTGGGCATCTCTCGTTCATCTTCCCTCTTGGGCCCCACAACGTGCA
GCACTTCTAGGGCAGTATACTTGTGATTGCTTCCCTACTATTGCTCACAAACACCAGCTAAGACACTGCCAAAGAAACACT
CACAGCTGGCCGGTCCACGGCATCCGGAGGGGACTCGGGGACAGGCCTGGAATCCGATCTTTACTTGTACAGCTCGTC
CATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGCGGTACGAATCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCA
GGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGT
GGTGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCTCGATGTTGTGGCGGATTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCG
GCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGAT5'
```

Originalsequenz: "forward" Sequenzierung pSG5-GFP-miR-34a-2

```
5'GGAGTCTGCAGACCCACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCA
TGGACGAGCTGTACAAGTAAAGATCGGAATCCAGGCCTGTCCCCGAGTCCCCTCCGGATGCCGTGGACCGGCCAGCTG
TGAGTGTTCCTTTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGCAATAGTAAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGCCCTAGAAGT
GCTGCACGTTGTGGGGCCCAAGAGGGAAGATGAAGCGAGAGATGCCAGACCAGTGGGAGACGCCAGGACACTAGTAGA
TCTTATTAAGCAGAACTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCAT
TTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGTCTGACTCTAGACTCTCCGCTT
CCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA
TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGC
GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACC
GGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAG
GTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCGACCCTGCGCTTTATCCGGTAACTATCGTCTT
GAGTCCACCCGGTAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGTTATGTAGCCGT
GCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGCCTTACCTACGCTACCCTAGATGAACAGTATTGTATCTGCCCTCTGCTGAGCAGTTACT
TCGAAAAAGGTTGTAGCTCTTATCCCGCCACACTCACGCTGGTATCGATGGGTTTTTGTGCCAGCGCACCAAATTATCT
GG3'
```

Originalsequenz: "reverse" Sequenzierung pSG5-GFP-miR-34a-2

3'AATTTTCTAGTGTCTGGCGTCTCCCACTGGTCTGGGCATCTCTCGCTTCATCTTCCCTCTTGGGCCCCACAACGTGCAGC
ACTTCTAGGGCAGTATACTTGCTGATTGCTTCTTACTATTGCTCACAACAACCAGCTAAGACACTGCCAAAGAAACACTCA
CAGCTGGCCGGTCCACGGCATCCGGAGGGGACTCGGGGACAGGCCTGGAATTCCGATCTTTACTTGTACAGCTCGTCCA
TGCCGAGAGTGATCCCGGCGGGTCCAGCAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGG
GCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGT
CGGCGAGCTGCACGCTGCCGCTCTCGATGTTGTGGCGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCCGCCA
TGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGACTCCAGCTTGTGCCCAAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTT
CAGCTCGATGCGGTTACCAGGGTGTGCCCTCGAACTTACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGA
AGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTAGCG
GCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGTACAGAGGTGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGAT
GAACTTCAGGGTACGCTTCCGTTAGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCGCC
GTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGTCAACATGGTGGCCTGAATTAATTCGC
CCTATAGTGAGTCGATTACATTCTTTGCCAAATGATGAGACAGCACATACCAGCACGTTGCCAGAGCTGTAGGAAAAAGA
GATGCATGACATGATAGCAGAGGGGCCGATTGACTCAGAGTATTTATCCTCATCTCAAACAGTGTATATCATTGTACCAT
AAAAGAGAAGGCAGATGATGAACCAGGATGTGAGGTGGTTTCTACAATAGAAATTCACGCCCCAGCCAGGAATAATGCCA
ATTTCTACCGTAACTGAGTAACCAGTGTCTCTAAACCGTGTGCCTGA5'

Legende:

Grün: eGFP-Gen

Gelb EcoRI Konsensussequenz

Blau: Spel Konsensussequenz

Rot pre-miR-34a Sequenz

Lila BglII Konsensussequenz

> Vektor pSG5-GFP-miR-34a-1

; Sequenzierung pSG5-GFP-miR-34a-1, zusammengesetzt aus den Sequenzierungen ("forward") und ("reverse"), durchgeführt von der Fa. Seq-it.

; Der zuletzt am 3'-Ende markierte Teil wurde in der Sequenzierung des anderen Klons nicht mitsequenziert (kursiv)

; weiße Buchstaben in der Spel und BglII Konsensussequenz zur besseren Sichtbarkeit

5'TCAGGCACACGTTTAGGAGACACTGGTACTCAGTTACGGTGAGAAATTCGCATTATTCCTGGCTGGGGCGTGAAATTT
CTATTGTAGAAACCACCTCACATCCTGGTTCATCATCTGCCTTCTCTTTTATGGTACAATGATATACACTGTTTGTAGATGAGG
ATAAAATACTCTGAGTCAATCGGGCCCTCTGCTATCATGTGCATCTCTTTTTCTACAGCTCTGGGCAACGTGCTGGT
ATGTGCTGTCTCATCATTTGGCAAAGAATGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTAATTCAGGCCACCATGGTGTGAGCAAGG
GCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTGAGCGTGTG
CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTT
GGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTC
TTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC
CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATC
CTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACCGGCATCAAGGT
GAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGC
GACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCG
ATCAGATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGATCGGAA
TTCAGGCCGTGCCCGGAGTCCCTCCCGATGCCGTGGACCAGCCAGCTGTGAGTGTCTTTGGCAGTGTCTTAGCTG
GTTGTTGTGAGCAATAGTAAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGCCCTAGAAGTGCTGCACGTTGTGGGGCCCAAGAGGGA
AGAATGAAGCGAGAGATGCCAGACAGTGGGAGACGCCAGGACACTAGTAGATCTTATTAAAGCAGAAGCTGTTTATTGCA
GCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG
TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGTGCAGCTAGACTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTGCTGCTGCTGCGG
TCGTTCCGCTGCGGGCAGCGGTATCAGTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAACTCAGGGGATAACGCAGGA
AAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAGGCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGT

TTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGG
GAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC
ACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTTATCCGGTA ACTATCGTCTTGAGTCCA(A)CCCGGTAAGACACGACTTA
TCGC(C)ACTGGCAGCTAGCCACTGGTA(A)CAGGATTAGCAGAGCGTAGTTATGTAGCCGCTGCTACAAGAGTCT(T)G
GAAGTGGTGCCCTTACCTACGCTACCCTAGATGAACAGTATTGTATCTGCCCTCTGCTGAGCAGTTACTTCGGAAAAGGTT
GTAGCTCTTGATCCCGCCACACTCACGCTGGTATCGATGGGTTTTTGTGCCAGCGCACCAAATTATCTGG 3'

; Ende der Sequenz

Originalsequenz: "forward" Sequenzierung pSG5-GFP-miR-200c-1

5'GAGGCGGACAGACCCACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCA
TGGACGAGCTGTACAAGTAAAGATCGGAATTCACCAGGAAAGTGTCCCCAGGGACTCGGGTGGTGGGGGATGGGAGCCA
GGGATCTGCAGCTTTTCCGCAGGGATCCTGGGCTGAAGCTGCCTGACCCAAGGTGGGCGGGCTGGGCGGGGGCCCTC
GTCTTACCCAGCAGTGTGGTGGTGGGAGTCTCTAATACTGCCGGTAATGATGGAGGCCCTGTCCCTGTGTCA
GCAACATCCATCGCTCAGTCCCGCCCTTAGCTGGCTGCAGCCCCCTCCCACTTCCCACGCACCCCGGAAGCCCT
CGTCTTGAGCTGAGAGCGTTGCACAAGGGGTGACTAGTAGATCTTATAAAGCAGAAGTGTATTATGCAGCTTATAATGGT
TACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATC
AATGTATCTTATCATGTCTGGTCTGACTCTAGACTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGTGCCTCGGTCTGGCTGC
GGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGA
GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA
GCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTCGGAA
GCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTACCAGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGC
TTCTCATAGCTCACGCTGAGGATCTCAGATCGGGTAAGTCGTTGCTCCAGCTGGGCAGGGCAGATACCCCGCTCAG
CCCGACCCTGACGGCTTATGCAGTACTATCGTCTGAGGTGCCAACTCGGTAGACACGTACATATGCCACCTGGACA
GCACCAACCTGCTAGCATGACTAGCAGAGGCAGAGTATCGTTAGGCCAGCGTACTACAAGTCTCTGCAAGAAGGTGACTAC
CTACGCGTCACTATGAGACCGAACTGACCATGGCCATGTCTGCGTATCGGACCTGCAGCTAC3'

Originalsequenz: "reverse" Sequenzierung pSG5-GFP-miR-200c-1

3'CGAATTTCTAGTCCCCCTTGTGCACGCTCTCAGCTCAAGACGAGGGGCTTCCGGGTGCGTGGGAAGTGGGAGGGG
GCTGCAGCCAGCTAAGGGCTGGGGACCTGAGGCGATGGATGTTGCTGACACAGGGACAGGGGCTCCATCATTACCCGG
CAGTATTAGAGACTCCCAACCGCACCCAAACACTGCTGGGTAAGACGAGGGCCCCCGCCAGCCCGCCACCTTGGGTCA
GGCAGCTTACAGCCCAGGATCCCTGCGGAAAAGTGCAGATCCCTGGCTCCCATCCCCCACCACCCGAGTCCCTGGGG
ACACTTCTGGTGAATCCGATCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGGTACGAACTCCAG
CAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTGTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTGGGCAGCA
GCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTGGCGAGCTGCACGCTGCCGCTCCTCGATGTTGTGGCG
GATCTTGAAGTTACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGACTCCAGC
TTGTGCCCCAGGATGTTGCCGCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTACGCTCGATGCGGTTACACAGGGTGTCCGCTCGAA
CTTACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGCTGCTTGAAGAAGATGGTGGCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGG
CGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGTCAGGTGGTACGA
GGGTGGCCAGGGCACGGGACGCTTGGCGGTGGTGCAGATGAATTCAGGGTCAGCTTGGCGTAGTGGCATCGCCCTCG
CCCTCGCCGGACAGCTGACTTGTGGCCGTTTACGTCGCGTCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGACAGCTC
CTCGCTGCTCCACCATGTGCTGATATCGCTATAGTGAGTCGATTACATCTTGAATGATGAGACAGCACAATACAGCA
CGTGCAGGACTGTAGAAAGGAGAGCATGAACTGGTTAGCAGGGCCGGTACTGAGATTATCTTACTCCAACGTTATACAC
TTGAAACCGTAAGGAAAAGGGGCTA5'

Originalsequenz: "forward" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)mCherry

5'ATGGGTACTGGACATCATCAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTACGAGA
TCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGC
CCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGAC
TACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGA
CCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCC
CGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGGCTGGGAGGCCCTCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGA
GATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCCTACAAGGCCAAGAAGCCC
GTGCAGCTGCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACCATCGTGAACA
GTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGGGATCCGCGGCCGCCTCGAG
AAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCT
TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTC
ATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAT
GCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGAAAGAACCAGCTGTGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCCGCG
CATAAGCCGCTTAGTGTTACGCGCAGCGTGAACCGCTTCTTGAAGGCCCTACGGCAGCTCATAGATTCTTCTTCATT
TCGCCACGGTCGCGGTTTCCGGTCAGGCTAAATCGGGGCTCCCCTTAGGTGATAGCCTTACCGGACCCTGACCTTAAAA
CTCTGACATATAGCGT3'

Originalsequenz: "reverse" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)mCherry

3'CCCCGGCCGGTGGAGTGGCGGCCCTCGGCGCGTTCGACTGTTCCACGATGGTGTAGTCCGTTGTGGGAGGTGAT
GTCCAACTTGATGTTGACGTTGTAGGCGCCGGCAGCTGCACGGGCTTCTTGGCCTTGTAGTGGTCTTGACCTCAGCGT
CGTAGTGGCCGCCGTCCTTCAGCTTCAGCCTCTGCTTATGATCTCGCCCTTCAGGGCGCCGTCCTCGGGGTACATCCGCTCG
GAGGAGGCTCCCAGCCATGGTCTTCTTCTGCATTACGGGGCCGTCGGAGGGGAAGTTGGTGCCGCGCAGCTTCACCTT
GTAGATGAACTCGCCGTCCTGCAGGGAGGAGTCTGGGTACGGTACCCACGCCGCGCTCCTCGAAGTTCATCACGCGCT
CCCCTTGAAGCCCTCGGGGAAGGACAGCTTCAAGTAGTCCGGGATGTCCGGCGGGTGTTCACGTAGGCCCTTGGAGCC
GTACATGAACTGAGGGGACAGGATGTCCAGGCGAAGGGCAGGGGGCCACCCTTGGTACCTTCAGCTTGGCGGTCTGG
GTGCCCTCGTAGGGGCGGCCCTCGCCCTCGCCCTCGATCTCGAAGTCTGGCCGTTACGGAGCCCTCCATGTGCACCTT
GAAGCGCATGAACTCCTTGATGATGGCCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGTCTACCATTCTAGAGGGCCCCGTTTAAACGCTA
GCCAGCTTGGGTCTCCCTATAGTGAGTGTATTAATTTGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGC
TCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCATACCGCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAA
TCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAACTCCCATTGACGTCATGGGGTGGAGACTTGGGAAATCCCCGGTGAGTCAACCGCT
ATCCACGCCCATGATGACTGCCAAACCGCATACCATGGTAATAGCGATGACTATACGTAGATGACTGCCAGTAGCA
AAGTCCCATAGTCATGACTTGGCATTATGCCAAGGCGGGCCATTTAACGTCCATTGGACGTCATAGGGGGCGTTACCTT
GCATATTGAATAACTTGAAGTTACATGCAAGTTGGCAGTACGGTAATTCTCCACATGACTCATTGAAAGTCAATTTGTGCTAG
CTATATGACGATCATATCG5'

Originalsequenz: "forward" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP

5'GCCGCTTTACGGGGTGGTGCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAG
GGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTCCCTGGCCCA
CCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAG
TCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT
GAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
CACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGTGAACCTC
AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCC
CCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATATG
GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGATCCGCGGCCGCCT
CGAGAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCG
TGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCCATTGTCTGAGTA
GGTGTCACTTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGG3'

Originalsequenz: "reverse" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP

3' CCAAGTGCCCGAGAGTGATCCCGGCGGGTCACGAACCTCCAGCAGGACCATGTGACGGCGTCTCGTTGGGGTCTTTG
CTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGG
TAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTG
TCGGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCCTTGAAGTCG
ATGCCCTCAGCTCGATGCGGTTACCCAGGGTGTCCGCTCGAACCTTCACCTCGGCAGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTC
CTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGG
GGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGTACAGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGG
TGCAGATGAACCTCAGGGTCACTTGCCTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGACACGCTGAACCTTGTGGCCGTT
TACGTCGCCGTCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGTTCCTCGCCCTTTGCTCACCATTCTAGAAG
GG5'

Originalsequenz: "forward" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1

5' CCCCCCTGTGGCAGACCCACGAGAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGATCACTCTCGG
CATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGATCCGGGATCTTAGGAAGCCACAAGGAGGGCTGGGGGGCTCTTGGAGCAGGAGTC
AGGAGGCCTGGGCAGCCTGAAGAGTACACGCCGACGGACAGACAGACAGTGCAGTCACCCATAAAGTAGAAAGCACTACT
AACAGCACTGGAGGGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGATGAGTGTACTGTGGGCTTCGGAGATCACGCCACTGCTGCCGCC
CGCTGCCGCCACCATCTTCTCGGCGCTCGGGGACCTCGTGTGACAGGTGAGCACCTTACGGCCCTCCCTACCCCGA
AGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTCCTT
CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA
TTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG
GTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCAT
TAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTC
TTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCTCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGATTTAGT
GCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTATTAGGGTGTGTTTACAGTGTGTTGACAGTGCACCTGATAGACGGTTTTTCGC
CCTTGACGTTGGAGTCCACGCTTTATAGTACTCTGTCAAACCTGACACACTCACCTATCTCGCTATCTTATTATAAGGAAT
TGCCGAATCCGGCTATGTTAAAATGGACTGATACAAATTTACGCGATATCGTGAATGTGTCAGTAGTGAAGTCAGTCCAGCC
AGCCAGATGC3'

Originalsequenz: "reverse" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1

3' TGGGGAGGCTAGGGGAACTCTCGAGCGGGTAGGGAGGGGCCGTTAAGGTGCTCACCTGTACACGAGGTCCCGGAGC
GCCGAGGAAGATGGTGGCGGGCAGCGGGCGGCAGCAGTGGCGTGATCTCCGAAGCCCACAGTACACTCATCCATAAAGT
AGGAAACACTACACCCTCCAGTGCTGTTAGTAGTGCTTTCTACTTTATGGGTGACTGCACTGTCTGTCTGTCGGTCGGCGT
GACTCTTACAGGCTGCCAGGCCTCCTGACTCCTGCTCCAAGAGCCCCCAGCCCTCCTTGTGGCTTCTAAGATCCCGG
ATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGGTCCACGAACCTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGC
TTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTGCGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGA
TGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTG
ATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGC
CGTCCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTCAGCTCGATGCGGTTACCCAGGGTGTGCGCCCTCGAACCTTCACCTCGGCAGGGTGC
TTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTG
CTGCTTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGTCAGGGTGGTACAGAGGGTGGGCCAGGGCACG
GGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACCTCAGGGTCACTTGCCTAGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGACACGCTG
AATTGTGACGTTTACGTCGCTCCAGCTCGACAGGGATGGCACACCACCCCGGTGACAGCTCTCGCCCTTGTCTCACATTCTA
GAGGGACCGTTTAAACGCTAGCAGCTGGGTCTCCTATAGTGTGATGTAATATTTTCGATAGACAGTTAAGCCAGTGGTCCCTC
TAGGTAGCCGAAGCTCTGGCTATAGATCTCCACGTAACGCTACGCAATGGCTTCATTGGCCGGAAT5'

Legende:

grün hinterlegt wurde eGFP

gelb hinterlegt wurde BamHI

blau hinterlegt wurde XhoI

rot hinterlegt wurde pre-miR-142

lila hinterlegt wurde HindIII

türkis hinterlegt wurde PCR-Primer

orange geschrieben sind

- orange geschrieben und durchgestrichen sind Nukleotide, die nur in der anderen durchgeführten Sequenzierung gefunden wurden
- (orange geschrieben und eingeklammert) sind Nukleotide, die nur in dieser Sequenzierung gefunden wurden

> Sequenzierung 1: pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1 vector, partial sequence
; Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-1, zusammengesetzt aus den Sequenzierungen "forward" und "reverse", durchgeführt von der Fa. Seq-it.

```
5'CCGTAAACATCCGCCATGAGCGCATGCCGTAGCGTTACGTGAAGTCCATATTAAGCCAAGCCTTTCTGCCTACTAGA
GAACCACTGCTTACTGCTAATCGAAATATACGACTCACCTATAGGGAGACCAGCTTGCTAGCGTTAAACGGTCCCTCCTAG
AATGGTGGAGCAGGGCGAGGAGCTGTCACCGGGGGTGGTGCCATCCTGTGCGAGCTGACGGCGACGTAACGCCACAAG
TTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGC
TGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGCTGCAGTGCCTTCAAGGACGACGGCAACTACA
GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACA
AGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA
CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACC
GCATCAAGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACC
CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACG
AGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTTCGTGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
GGATCCGGGATCTTAGGAAGCCACAAAGGAGGGCTGGGGGGCTCTTGAGCAGGAGTCAGGAGGCCTGGGCAGCCTGAA
GAGTACACGCCGACGACAGACA GACAGTGCAGTACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTAACAGCACTGGAGGGTGTAGT
GTTTCCTACTTTATGGATGAGTGTACTGTGGCTTCGGAGATCACGCCACTGCTGCCGCCGCTGCCGCCACCATCTTCC
TCGGCGCTCGGGACCTCGTGTGACAGGTGAGCACCTTACGGCCCTCCCTACCCCGCTCGAGTAAAGCTTAAAGTTAAAC
CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTCCCCCTCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAA
GGTGCCACTCCCCTGCTCTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG
GTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
CTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTTAGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGG
TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTCCTTCT
CGCCACGTTCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCT
CGACCCAAAACTTGATTAGGGTGATGG(G)TTCACGTAGTGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTT(T)GACGT
GGAGTCCACGTCTT(A)ATAGTACTCT(G)GTCAAAGTACACACTCACCTATCTCGCTATCTT(GAT(CCTTTGAAT))TATAAG
GAATT(T)GCGGATCCGCTATG(C)CTAAAA(A)TGAC(C)TGATACAAATTA(A)CGCGATAT(C)GTG(G)AATGTGTCAGT
3'
```

; Ende der Sequenz

Originalsequenz: "forward" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2

5'CCCCTGGCCAGACCCACGAGAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCA
TGGACGAGCTGTACAAGTAAGGATCCGGGATCTTAGGAAGCCACAAGGAGGGCTGGGGGGCTCTTGGAGCAGGAGTCAG
GAGGCCTGGGCAGCCTGAAGAGTACACGCCGACGGACAGACAGACAGTGCAGTCACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTAA
CAGCACTGGAGGGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGATGAGTGTACTGTGGGCTTCGGAGATCACGCCACTGCTGCCGCCC
GCTGCCCGCCACCATCTTCCTCGGCGCTCGGGGACCTCGTGTGACAGGTGAGCACCTTACGGCCCCCTCCCTACCCCGCT
CGAGAAGCTTAAGTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCG
TGCTTCCTTGACCCTGGAAGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
GTGTCACTTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGG
GATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCG
GCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGCTCCTTT
CGCTTTCTCCCTTCTTCCTTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCG
ATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAATTGATTAGGGTATGGGTTACGTAAGTGGCCATCGCCCTGATAGACG
GTTTTCGCCCTTGACGTGGAGTCACGTCTTAATAGTACTCTGGTCAACTGACACACTCACCTATCTCGTCTTATCCTTTGA
ATTATAGGAATTTGCGATTCCGCTATGCCTAAAAATGACCTGATACAAATTAACGCGATATCCGTGGAATGTGTACAGTAGG
TGAAGTCCAGCTCCAGCAGGC3'

Originalsequenz: "reverse" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-2

3'CCAGTGCTAGGGTGC GGCTCGAGCGGGGTAGGGAGGGGGCCGTAAGGTGCTCACCTGTACACGAGGTCCCCGAGCGC
CGAGGAAGATGGTGGCGGGCAGCGGGCGGCAGCAGTGGCGTGATCTCCGAAGCCCACAGTACACTCATCCATAAAGTAG
GAAACTACACCCTCCAGTGTGTTAGTAGTCTTTCTACTTTATGGGTGACTGCACTGTCTGTCTGTCGGTCCGTCGGCGTGA
CTTTCAGGCTGCCAGGCCTCTGACTCCTGCTCCAAGAGCCCCCAGCCCTCCTTGTGGCTTCTAAGATCCCGGATC
CTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGCGGCGGTACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTC
TCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCCGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGG
GGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCCGGCAGCTGCACGCTGCCGCTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATG
CCGTTCTTCTGCTTGTCCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTAAGTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCG
TCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTACACAGGGTGTCCGCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTT
GTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCT
GCTTCATGTGGTCCGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGTCAGGTGGTACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGC
AGCTTCCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGA
ACTTGTGGCGTTTACGTCGCCGTCAGCTCGACAGGATGGGCACCACCCCGGTGACAGCTCCTCGCCCTGCTCCACCATT
CTAGGAGGGACCGTTTAAACGCTAGCAAGCTGGTCTCCCTATAGGTGAGTCGTATATTTGATTAGCAGTAAGCAGTGGTT
CTCTAGTAGGCAGAAAGGCTTGGCTTAATATAGGACCTTCACGTAACGCTACGGCATGCGCTCATGGCGGATGTTTACGG
5'

Originalsequenz: "forward" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2

5'TCCGGTGGCAGGACCCACGAGAGCGGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGC
ATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGATCCGGGATCTTAGGAAGCCACAAGGAGGGCTGGGGGGCTCTGGAGCAGGAGTCA
GGAGGCCTGGGCAGCCTGAAGAGTACACGCCGACGGACAGACAGACAGTGCAGTCACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTA
ACAGCACTGGAGGGTGTAGTGATTCTACTTTATGGATGAGTGTACTGTGGGCTTCGGAGATCACGCCACTGCTGCCGCC
CGCTGCCCCGCCACCATCTTCCTCGGCGCTCGGGGACCTCGTGTGACAGGTGAGCACCTTACGGCCCCTCCCTACCCGCT
CGAGAAGCTTAAGTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCG
TGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
GTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGG
GATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCG
GCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTACCCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGCTCCTTT
CGCTTTCTCCCTTCTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC
GATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAATTGATTAGGGTATGGGTTACAGTAGTGGCCATCGCCTGATAGA
CGGTTTTCGCCCTTGACGTGGAGTACGTTCTTAATAGTGGACTCTGTCAACTGGACACACTCACCTATCTCGTCTATTC
CTTTGAATTATAAGGGATTTGCCGAATCCGCTATGAAAAATGGACTGATACAAAATTTACCGATATCGTGATAGTCAAGT
GCTGATAAGTCCCAGGTCCAGCAGCAGAAAAGT3'

Originalsequenz: "reverse" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2

3'CTGGGGGCTAGGGAGTCTCGAGCGGGTAGGGAGGGGCCGTAAGGTGCTCACCTGTACACGAGGTCCCCGAGCGCCG
AGGAAGATGGTGGCGGGCAGCGGGCGGCAGCAGTGGCGTGATCTCCGAAGCCCACAGTACACTCATCCATAAAGTAGGA
ATCACTACACCCTCCAGTCTGTAGTAGTCTTTCTACTTTATGGGTGACTGCACTGTCTGTCTGCCGTCGGCGTACT
CTTACGGCTGCCCAGGCCTCTGACTCCTGCTCCAAGAGCCCCCAGCCCTCCTTGTGGCTTCTAAGATCCCGGATCCTT
ACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGGTACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCG
TTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGG
GTGTTCTGCTGGTAGTGGTCCGCGAGCTGCACGCTGCCGCTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTGAAGTTCACCTTGATGCC
GTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTAAGTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTC
CTCCTTGAAGTCGATGCCCTCAGCTCGATGCGGTTACAGGGTGTGCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGT
AGTTGCCGTCGCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGC
TTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGTCAGGTGGTACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAG
CTTGGCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGTGAGTCCGCTAGTGGCATCGCCCTCGCCTCGCGACACGCTGACTGTGGCGT
TTACGTCGCGTCAGCTCGACAGATGGCACCACCCGTGAACAGCTCCTCGCCTGCTCACATCTAGAGGACGGTTTTAACGCTA
GCCAGCTTGGGTCTCTATAGTGAAGTCGATATTCGATAGCCAGTAAGCATGGGTCTAGTTAGCCGAAGTCTTATAGAAC
TCCACGTAACGCATACGCATGCGTATGCGATGTCAACGACATTGAAGTCT5'

Legende:

grün hinterlegt wurde eGFP

gelb hinterlegt wurde BamHI

blau hinterlegt wurde XhoI

rot hinterlegt wurde pre-miR-142

lila hinterlegt wurde HindIII

türkis hinterlegt wurde PCR-Primer

orange geschrieben ist die Punktmutation in der miR-142-3p

Sequenz:

> Sequenzierung 2: pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 vector, partial sequence

; Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2, zusammengesetzt aus den Sequenzierungen, durchgeführt von der Fa. SEQ-it.

```
5'AGACTTCAATGTCGTTGACATCGCATACGCATGCGTATGCGTTACGTGGAGTTCTATAAGCAGCTTCGGCTAACTAGGAC
CCATGCTTACTGGCTATCGAATATCGACTACTATAGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTAAACCGTCTCTAGATGTGAGCA
GGCGAGGAGCTGTTACGGGTGGTGCCATCTGTCGAGCTGACGCGACGTAACGCCACAGTCAGCGTGTGCGGAGGCCGA
GGGCGATGCCACTACGGCAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTG
ACCACCTGACTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAGTCCGCCATGC
CCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG
GGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG
AGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCC
ACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGGCCCGCTGCTGCT
GCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGG
AGTTTCGTGACCGCCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGGATCCGGGATCTTAGGAAGCCACAAG
GAGGGCTGGGGGGCTCTTGGAGCAGGAGTCAGGAGGCCTGGGCAGCCTGAAGAGTACACGCCGACGGACAGACAAGACA
GTGCAGTCAACCATAAAGTAGAAAGCACTACTAACAGCACTGGAGGGTGTAGTGAATTCCTACTTTATGGATGAGTGTACTGT
GGGCTTCGGAGATCACGCCACTGCTGCCGCCGCTGCCGCCACCATCTTCTCGGCGCTCGGGGACCTCGTGTGACAG
GTGAGCACCTTACGGCCCTCCCTACCCGCTCGAGAAGCTTAAGTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGT
TGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTAATAAAA
ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG
GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCT
CTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTAC
ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCCGGCTTTCCCCGTAAGC
TCTAAATCGGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGTTGATTAGGGTGATG
GGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCTGATAGACGGTTTTGCCCCTTTGACGTGGAGTCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTGTC
AACTGGACACACTCACCTATCTCGTCTATTCTTTGAATTATAAGGGATTTGCCGAATCCGCTATGAAAAATGGACTGATAC
AAAATTTACCGATATCGTGATAGGTGAGTATGCTGATAAGTCCCAGGTCCAGCAGCAGAAAAGT3'
```

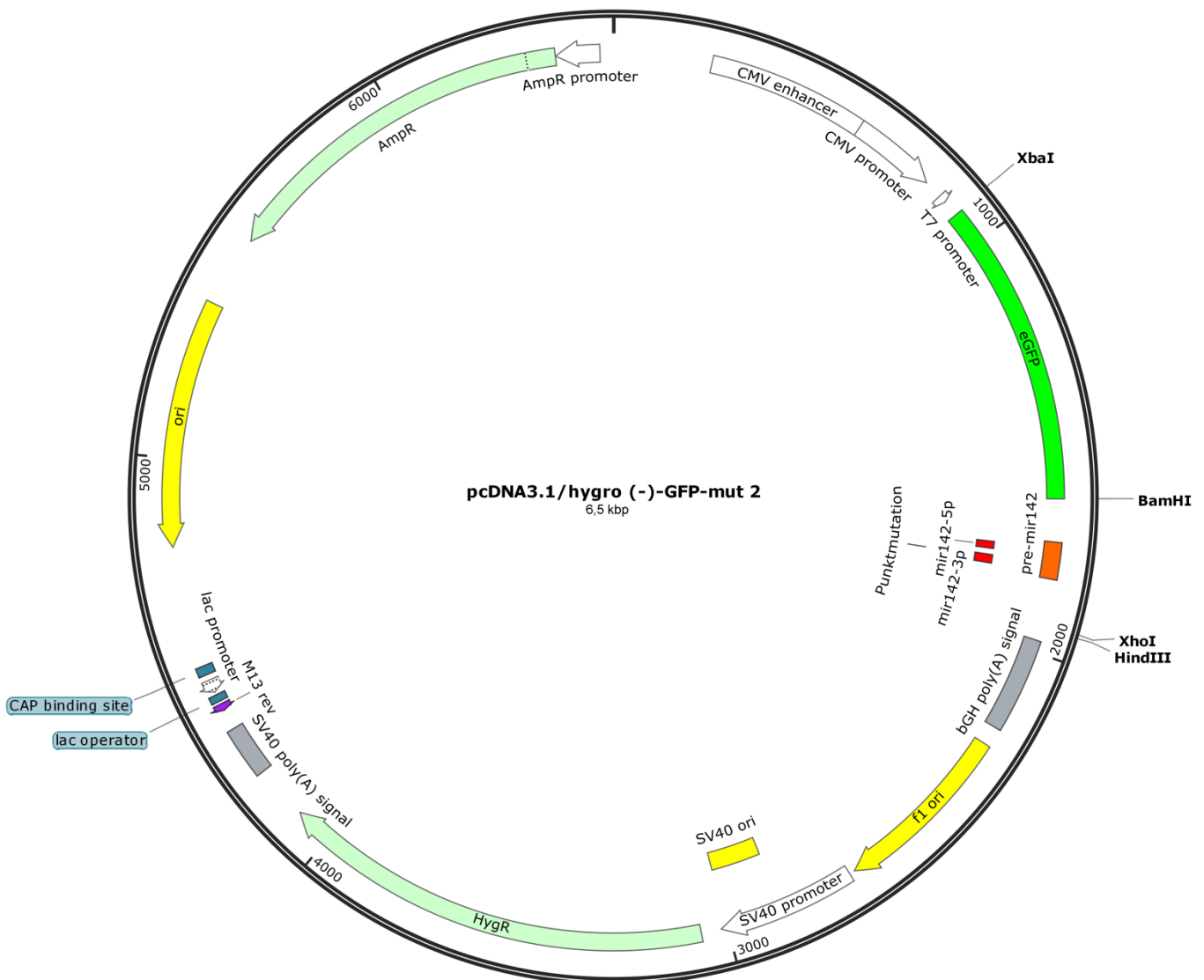


Abb. 27: Schematische Darstellung des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2:

Die Abbildung zeigt die Struktur des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut2 und die Anordnung der verschiedenen Gene und DNA-Sequenzen. Dieser Vektor unterscheidet sich vom Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142 durch eine Punktmutation in der 3p-Variante der miR-142. Der Vektor hat eine Größe von ca. 6,5 kbp.

Originalsequenz: "forward" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3

5'CATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGATCCGGGATCTTAGGAAGCCACAAGGAGGGCTGGGGGGCTCTTGAGCAGGAGT
CAGGAGGCCTGGGCAGCCTGAAGAGTACACGCCGACGGACAGACAGACAGTGCAGTCACCCATAAATTAGAAAGCACTAC
TAACAGCACTGGAGGGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGATGAGTGTACTGTGGGCTTCGGAGATCACGCCACTGCTGCCGC
CCGCTGCCCCGCCACCATCTTCCTCGGCGCTCGGGGACCTCGTGTGACAGGTGAGCACCTTACGGCCCCCTCCCTACCCCG
CTCGAGAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCC
GTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCACTTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG
GGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGC
GGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTT
TCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC
GATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTTCACGTAGTGGGCCATCGGCCCTGATA
GAACGGTTTTGCCTTGGACGTTGGAGTCCACGTTCTTATAGTGGACTCTTGTGCAGACTGGACTACACTTCAACCTATCT
TCGGTCTATTCTTTGAATTTATGAGGG'3

Originalsequenz: "reverse" Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3

3'TCAGTCGTTAATTGGCTGGTAGTCTGAGCGGGTTGGAGGGGCGTAGGTGCTCACCTGTCACACGAGGTCCCCGAGCG
CCGAGGAAGATGGTGGCGGGCAGCGGGCGGCAGCAGTGGCGTGATCTCCGAAGCCACAGTACACTCATCCATAAAGTA
GGAAACTACACCCTCCAGTGCTGTTAGTAGTGCTTCTAATTTATGGGTGACTGCACTGTCTGTCTGTCCGTGGCGGT
ACTCTTCAGGCTGCCAGGCCTCCTGACTCCTGCTCCAAGAGCCCCCAGCCCTCCTTGTGGCTTCTAAGATCCCGGAT
CCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGCGCGGGTACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTT
CTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCCGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATG
GGGGTGTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGAT
GCCGTTCTTCTGCTTGTCCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCC
GTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTACCAGGGTGTGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCT
TGAGTTGCCGTCGCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGC
TGCTTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAGGGTGGTACAGGGTGGGCCAGGGCACG
GGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAATTCAGGTCAGCTTGCCGTAGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCGGACACCGCT
GAACTTGGTGGCCGTTTACGTCGCCGTTCCAGCTTCGACCAGGATGGCCACCCACCCCGTGAACAGCTTCTCGCCCTTG
CTCTACCATTTCTAGAAGGCCGTTAACGCTAGCAAGCTTGGGGTCCCTCCCTATGTGAGGTCGTAATTATATTGAATAGGC
AGTAGCAGTGGGGTTTCTTCTAGTAGCCAGAAGACTCGGGCTTATATGACCTCTCCACCGGTATACGG5'

Legende:

grün hinterlegt wurde eGFP

gelb hinterlegt wurde BamHI

blau hinterlegt wurde XhoI

rot hinterlegt wurde die pre-miR-142

lila hinterlegt wurde HINDIII

türkis hinterlegt wurde PCR-Primer

orange geschrieben ist die Punktmutation in der miR-142-5p

Sequenz:

> Sequenzierung 3: pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3 Sequenz

; Sequenzierung pcDNA3.1/Hygro(-)GFP-miR-142-mut3, zusammengesetzt aus den Sequenzierungen, durchgeführt von der Fa. SEQ-it.

```
5'CCGTATACCGGTGGGAGAGGTCATATAAAGCCGAGTCTTCTGGCTACTAGAAGAAACCCCACTGCTACTGCCTATTCGAA
TATAATTACGACCTCACATAGGGAGGACCCCAAGCTTGCTAGCGTTAAACGGCCTTCTAGAAATGGTAGAGCAAGGGCGAG
AAGCTGTTACGGGGGTGGGTGGCCATCTGGTCGAAGCTGGAACGGCGACGTAACGGCCACCAAGTTCAGCGGTGTC
CGCGAGGGCGAAGGGCGATGCCACTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTG
GCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGGACTTCT
TCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC
GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC
TGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG
AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCCA
CGGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT
CACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGGATCCGGGAT
CTTAGGAAGCCACAAGGAGGGCTGGGGGGCTCTTGAGCAGGAGTCAGGAGGCCTGGGCAGCCTGAAGAGTACACGCC
GACGGACAGACAACACAGTGCAGTCACCCATAAAATAGAAAAGCACTACTAACAGCACTGGAGGGTGTAGTGTTCCTACTT
ATGGATGAGTGTACTGTGGCTTCGGAGATCACGCCACTGCTGCCGCCCGCTGCCCGCCACCATCTTCTCGGCGCTCGG
GGACCTCGTGTGACAGGTGAGCACCTTACGGCCCTCCCTACCCCGCTCGAGAAAGCTTAAAGTTAAACCGCTGATCAGCC
TCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
ACTGTCCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG
CAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGG
AAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGCGGGTGTGGTGGTTAC
GCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCG
CGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAA
ACTTGATTAGGGTGTAGTGGTTTACGTAAGTGGGCCATCGGCCCTGATAGAACGGTTTTTCGCTTTGACGTTGGAGTCCACGT
TCTTTATAGTGACTCTTGTGCAGACTGGACTACACTTCAACCTATCTTCGGTCTATTCTTTTGAATTTATGAGGG3'
```

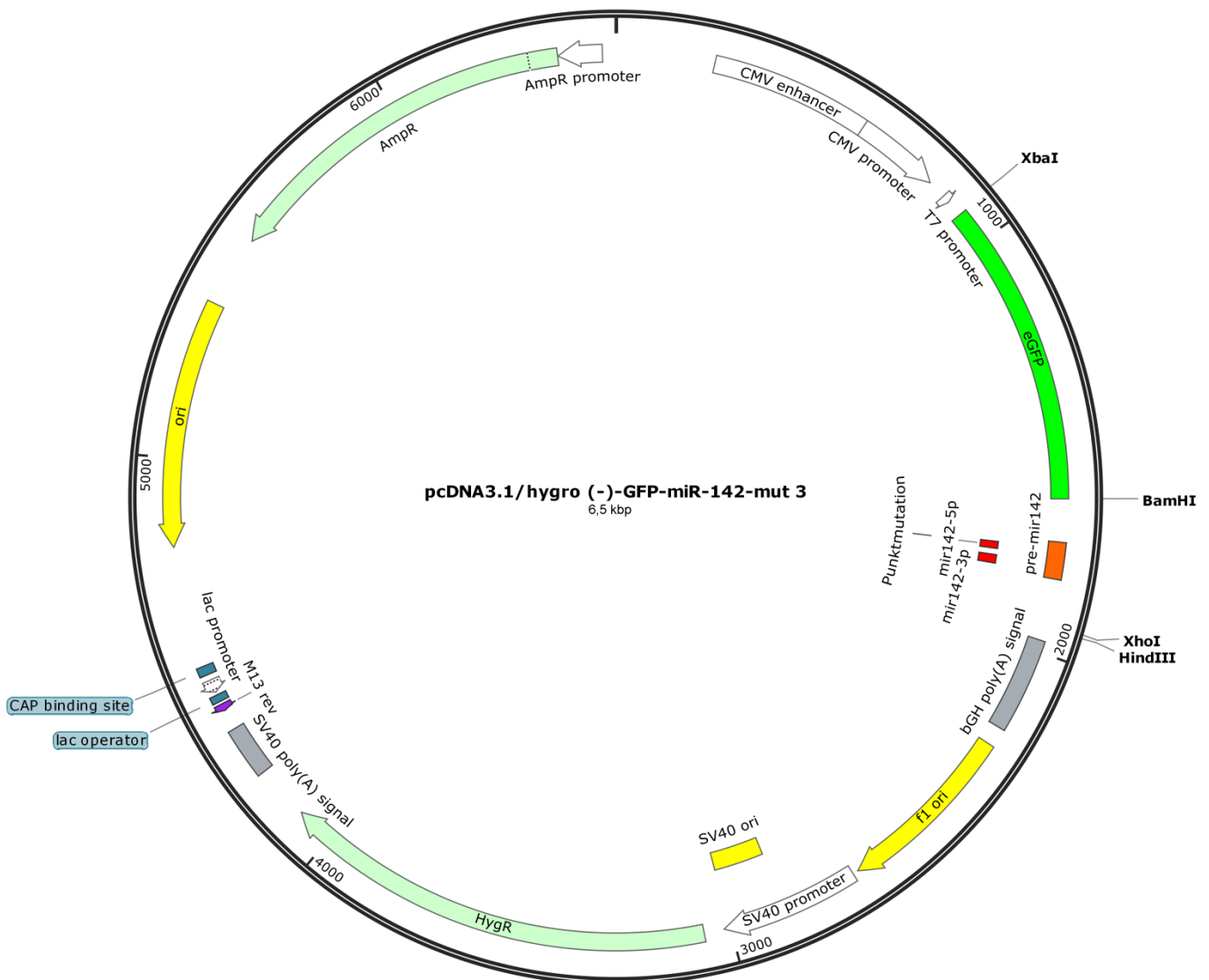


Abb. 28: Schematische Darstellung des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)-GFP-miR-142-mut3:

Die Abbildung zeigt die Struktur des Vektors pcDNA3.1/Hygro(-)-GFP-miR-142-mut3 und die Anordnung der verschiedenen Gene und DNA-Sequenzen. Dieser Vektor unterscheidet sich vom Vektor pcDNA3.1/Hygro(-)-GFP-miR-142 durch eine Punktmutation in der 5p-Variante der miR-142. Der Vektor hat eine Größe von ca. 6,5 kbp.

12 Curriculum vitae

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

13 Literaturverzeichnis

- 1) **Adams BD, Parsons C, Slack FJ** (2016). The tumor-suppressive and potential therapeutic functions of miR-34a in epithelial carcinomas. *Expert Opin Ther Targets*, 20, 737-753.
- 2) **Agarwal S, Hanna J, Sherman ME, Figueroa J, Rimm DL** (2015). Quantitative assessment of miR34a as an independent prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer*, 112, 61-68.
- 3) **Anandagoda N, Willis JC, Hertweck A, Roberts LB, Jackson I, Gokmen MR, Jenner RG, Howard JK, Lord GM** (2019). microRNA-142-mediated repression of phosphodiesterase 3B critically regulates peripheral immune tolerance. *J Clin Invest*, 129, 1257-1271.
- 4) **Ayala-Calvillo E, Mojica-Vazquez LH, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Maya L** (2018). Wnt/betacatenin pathway activation and silencing of the APC gene in HPV positive human cervical cancer derived cells. *Mol Med Rep*, 17, 200-208.
- 5) **Ayoubian H, Ludwig N, Fehlmann T, Menegatti J, Gröger L, Anastasiadou E, Trivedi P, Keller A, Meese E, Grässer FA** (2019). Epstein-Barr Virus Infection of Cell Lines Derived from Diffuse Large B-Cell Lymphomas Alters MicroRNA Loading of the Ago2 Complex. *Journal of virology*, 93, e01297-01218.
- 6) **Bader AG, Brown D, Winkler M** (2010). The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res*, 70, 7027-7030.
- 7) **Benchabane H, Ahmed Y** (2009). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 656, 75-84.
- 8) **Berrien-Elliott MM, Sun Y, Neal C, Ireland A, Trissal MC, Sullivan RP, Wagner JA, Leong JW, Wong P, Mah-Som AY, Wong TN, Schappe T, Keppel CR, Cortez VS, Stamatiades EG, Li MO, Colonna M, Link DC, French AR, Cooper MA, Wang WL, Boldin MP, Reddy P, Fehniger TA** (2019). MicroRNA-142 Is Critical for the Homeostasis and Function of Type 1 Innate Lymphoid Cells. *Immunity*, 51, 479-490 e476.
- 9) **Blandino G, Valenti F, Sacconi A, Di Agostino S**. (Year) Published. Wild type- and mutant p53 proteins in mitochondrial dysfunction: emerging insights in cancer disease. *Seminars in cell & developmental biology*, 2019. Elsevier.
- 10) **Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S** (1977). Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2, 95-113.
- 11) **Calin GA, Croce CM** (2006). MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res*, 66, 7390-7394.

- 12) **Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM** (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15524-15529.
- 13) **Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM** (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2999-3004.
- 14) **Chaconas G, Van De Sande JH** (1980). [10] 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods in enzymology*. Elsevier.
- 15) **Chen F, Hu SJ** (2012). Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, 26, 79-86.
- 16) **Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM** (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7024-7029.
- 17) **Deininger P** (1990). *Molecular cloning: A laboratory manual*: Edited by J. Sambrook, EF Fritsch, and T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (in 3 volumes). Academic Press.
- 18) **Di Martino MT, Campani V, Misso G, Gallo Cantafio ME, Gulla A, Foresta U, Guzzi PH, Castellano M, Grimaldi A, Gigantino V, Franco R, Lusa S, Cannataro M, Tagliaferri P, De Rosa G, Tassone P, Caraglia M** (2014). In vivo activity of miR-34a mimics delivered by stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) against multiple myeloma. *PLoS One*, 9, e90005.
- 19) **Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, Zlobec I, Eppenberger-Castori S, Tzankov A, Rosso R, Zuber M, Muraro MG, Amicarella F, Cremonesi E, Heberer M, Iezzi G, Lugli A, Terracciano L, Sconocchia G, Oertli D, Spagnoli GC, Tornillo L** (2013). Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 49, 2233-2242.
- 20) **Duchartre Y, Kim Y-M, Kahn M** (2016). The Wnt signaling pathway in cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 99, 141-149.
- 21) **Dugaiczyk A, Boyer HW, Goodman HM** (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of molecular biology*, 96, 171-184
- 22) **El Bezawy R, De Cesare M, Pennati M, Deraco M, Gandellini P, Zuco V, Zaffaroni N** (2017). Antitumor activity of miR-34a in peritoneal mesothelioma relies on c-MET and AXL inhibition: persistent activation of ERK and AKT

- signaling as a possible cytoprotective mechanism. *Journal of hematology & oncology*, 10, 19.
- 23) **Esquela-Kerscher A, Slack FJ** (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 259-269.
- 24) **Fernandez C, Bellosillo B, Ferraro M, Seoane A, Sanchez-Gonzalez B, Pairet S, Pons A, Barranco L, Vela MC, Gimeno E, Colomo L, Besses C, Navarro A, Salar A** (2017). MicroRNAs 142-3p, miR-155 and miR-203 Are Deregulated in Gastric MALT Lymphomas Compared to Chronic Gastritis. *Cancer Genomics Proteomics*, 14, 75-82.
- 25) **Flores O, Kennedy EM, Skalsky RL, Cullen BR** (2014). Differential RISC association of endogenous human microRNAs predicts their inhibitory potential. *Nucleic Acids Res*, 42, 4629-4639.
- 26) **Gao C, Xiao G, Hu J** (2014). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell & Bioscience*, 4, 13.
- 27) **Gao J, Gu J, Pan X, Gan X, Ju Z, Zhang S, Xia Y, Lu L, Wang X** (2019a). Blockade of miR-142-3p promotes anti-apoptotic and suppressive function by inducing KDM6A-mediated H3K27me3 demethylation in induced regulatory T cells. *Cell Death Dis*, 10, 332.
- 28) **Gao W, Pang D, Yu S** (2019b). Serum level of miR-142-3p predicts prognostic outcome for colorectal cancer following curative resection. *J Int Med Res*, 300060519834815.
- 29) **Ghandadi M, Sahebkar A** (2016). MicroRNA-34a and its target genes: Key factors in cancer multidrug resistance. *Curr Pharm Des*, 22, 933-939.
- 30) **He L, Hannon GJ** (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5, 522-531.
- 31) **Hermeking H** (2007). p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell*, 12, 414-418.
- 32) **Hezaveh K, Kloetgen A, Bernhart SH, Mahapatra KD, Lenze D, Richter J, Haake A, Bergmann AK, Brors B, Burkhardt B, Claviez A, Drexler HG, Eils R, Haas S, Hoffmann S, Karsch D, Klapper W, Kleinheinz K, Korbel J, Kretzmer H, Kreuz M, Kuppers R, Lawerenz C, Leich E, Loeffler M, Mantovani-Loeffler L, Lopez C, Mchardy AC, Moller P, Rohde M, Rosenstiel P, Rosenwald A, Schilhabel M, Schlesner M, Scholz I, Stadler PF, Stilgenbauer S, Sungalee S, Szczepanowski M, Trumper L, Weniger MA, Siebert R, Borkhardt A, Hummel M, Hoell JI** (2016). Alterations of microRNA and microRNA-regulated messenger RNA expression in germinal center B-cell lymphomas determined by integrative sequencing analysis. *Haematologica*, 101, 1380-1389.

- 33) **Hu T, Phiwpan K, Guo J, Zhang W, Guo J, Zhang Z, Zou M, Zhang X, Zhang J, Zhou X** (2016). MicroRNA-142-3p Negatively Regulates Canonical Wnt Signaling Pathway. *PLoS One*, 11, e0158432.
- 34) **Hwang HW, Mendell JT** (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*, 94, 776-780
- 35) **Iorio MV, Croce CM** (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*, 4, 143-159.
- 36) **Jiang L, Hermeking H** (2017). miR-34a and miR-34b/c suppress intestinal tumorigenesis. *Cancer research*, 77, 2746-2758.
- 37) **Kim VN** (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 376-385.
- 38) **Korpál M, Kang Y** (2008). The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA biology*, 5, 115-119.
- 39) **Kramer NJ, Wang WL, Reyes EY, Kumar B, Chen CC, Ramakrishna C, Cantin EM, Vonderfecht SL, Taganov KD, Chau N, Boldin MP** (2015). Altered lymphopoiesis and immunodeficiency in miR-142 null mice. *Blood*, 125, 3720-3730.
- 40) **Kushner SR** (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids, Elsevier Amsterdam.
- 41) **Kwanhian W, Lenze D, Alles J, Motsch N, Barth S, Doll C, Imig J, Hummel M, Tinguely M, Trivedi P, Lulitanond V, Meister G, Renner C, Grasser FA** (2012). MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med*, 1, 141-155.
- 42) **Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680.
- 43) **Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter H, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T** (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129, 1401-1414.
- 44) **Lederberg EM, Cohen SN** (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 119, 1072-1074.

- 45) **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.
- 46) **Lei Z, Xu G, Wang L, Yang H, Liu X, Zhao J, Zhang HT** (2014). MiR-142-3p represses TGF-beta-induced growth inhibition through repression of TGFbetaR1 in non-small cell lung cancer. *FASEB J*, 28, 2696-2704.
- 47) **Leisegang MS, Martin R, Ramirez AS, Bohnsack MT** (2012). Exportin t and Exportin 5: tRNA and miRNA biogenesis - and beyond. *Biol Chem*, 393, 599-604.
- 48) **Liao JM, Cao B, Zhou X, Lu H** (2014). New insights into p53 functions through its target microRNAs. *J Mol Cell Biol*, 6, 206-213.
- 49) **Liu SM, Meng Q, Zhang QX, Wang SD, Liu ZJ, Zhang XF** (2008). [Expression and significance of B7-H1 and its receptor PD-1 in human gastric carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 30, 192-195.
- 50) **Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H** (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell cycle*, 7, 2591-2600.
- 51) **Lowry L, Lynch D** (2013). Non-Hodgkin's lymphoma. *Medicine*, 41, 282-289.
- 52) **Lynch SM, O'Neill KM, Mckenna MM, Walsh CP, Mckenna DJ** (2016). Regulation of miR-200c and miR-141 by Methylation in Prostate Cancer. *Prostate*, 76, 1146-1159.
- 53) **Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA** (2013). Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 87, 146-171.
- 54) **Martincorena I, Campbell PJ** (2015). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 349, 1483-1489.
- 55) **Medina PP, Nolde M, Slack FJ** (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*, 467, 86.
- 56) **Menter T, Bodmer-Haecki A, Dirnhofer S, Tzankov A** (2016). Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. *Hum Pathol*, 54, 17-24.
- 57) **Mildner A, Chapnik E, Manor O, Yona S, Kim KW, Aychek T, Varol D, Beck G, Itzhaki ZB, Feldmesser E, Amit I, Hornstein E, Jung S** (2013). Mononuclear phagocyte miRNome analysis identifies miR-142 as critical regulator of murine dendritic cell homeostasis. *Blood*, 121, 1016-1027.
- 58) **Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, Zarone MR, Gulla A, Tagliaferri P, Tassone P, Caraglia M** (2014). Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol Ther Nucleic Acids*, 3, e194.

- 59) **Mongroo PS, Rustgi AK** (2010). The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer biology & therapy*, 10, 219-222.
- 60) **Mrakovcic M, Kleinheinz J, Fröhlich LF** (2019). p53 at the Crossroads between Different Types of HDAC Inhibitor-Mediated Cancer Cell Death. *International journal of molecular sciences*, 20, 2415.
- 61) **Mutlu M, Raza U, Saatci Ö, Eyüpoğlu E, Yurdusev E, Şahin Ö** (2016). miR-200c: a versatile watchdog in cancer progression, EMT, and drug resistance. *Journal of Molecular Medicine*, 94, 629-644.
- 62) **Neves R, Scheel C, Weinhold S, Honisch E, Iwaniuk KM, Trompeter H-I, Niederacher D, Wernet P, Santourlidis S, Uhrberg M** (2010). Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells. *BMC research notes*, 3, 219.
- 63) **Nie D, Fu J, Chen H, Cheng J, Fu J** (2019). Roles of MicroRNA-34a in Epithelial to Mesenchymal Transition, Competing Endogenous RNA Sponging and Its Therapeutic Potential. *International journal of molecular sciences*, 20, 861.
- 64) **Nusse R, Clevers H** (2017). Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell*, 169, 985-999.
- 65) **Qadir MI, Faheem A** (2017). miRNA: A Diagnostic and Therapeutic Tool for Pancreatic Cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 27, 197-204.
- 66) **Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A** (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, 14, 1902-1910.
- 67) **Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermeking H** (2014). The p53/miR-34 axis in development and disease. *J Mol Cell Biol*, 6, 214-230.
- 68) **Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Hosoe N, Nakamura M, Mukai M, Saito H, Hibi T** (2012). Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma resistant to *Helicobacter pylori* eradication. *PLoS One*, 7, e47396.
- 69) **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. VIII. Appendix A. pBIND Vector Sequence (continued) A. pBIND Vector Sequence (continued) B. pBIND Vector Restriction Sites Enzyme# of Sites Location Dra I, 4, 4877.
- 70) **Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW** (2012). Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, 380, 848-857.
- 71) **Sharma S** (2017). Immunomodulation: A definitive role of microRNA-142. *Dev Comp Immunol*, 77, 150-156.

- 72) **Shrestha A, Carraro G, El Agha E, Mukhametshina R, Chao CM, Rizvanov A, Barreto G, Bellusci S** (2015). Generation and Validation of miR-142 Knock Out Mice. *PLoS One*, 10, e0136913.
- 73) **Shrestha A, Mukhametshina RT, Taghizadeh S, Vasquez-Pacheco E, Cabrera-Fuentes H, Rizvanov A, Mari B, Carraro G, Bellusci S** (2017). MicroRNA-142 is a multifaceted regulator in organogenesis, homeostasis, and disease. *Dev Dyn*, 246, 285-290.
- 74) **Slabakova E, Culig Z, Remsik J, Soucek K** (2017). Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer. *Cell Death Dis*, 8, e3100.
- 75) **Sun W, Shen W, Yang S, Hu F, Li H, Zhu TH** (2010). miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP-beta. *Cell Res*, 20, 1158-1169.
- 76) **Sundar R, Cho BC, Brahmer JR, Soo RA** (2015). Nivolumab in NSCLC: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol*, 7, 85-96.
- 77) **Teruel-Montoya R, Kong X, Abraham S, Ma L, Kunapuli SP, Holinstat M, Shaw CA, Mckenzie SE, Edelstein LC, Bray PF** (2014). MicroRNA expression differences in human hematopoietic cell lineages enable regulated transgene expression. *PLoS One*, 9, e102259.
- 78) **Testoni M, Zucca E, Young KH, Bertoni F** (2015). Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol*.
- 79) **Thieblemont C, Zucca E** (2017). Clinical aspects and therapy of gastrointestinal MALT lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 30, 109-117.
- 80) **Tornesello ML, Annunziata C, Tornesello AL, Buonaguro L, Buonaguro FM** (2018). Human oncoviruses and p53 tumor suppressor pathway deregulation at the origin of human cancers. *Cancers*, 10, 213.
- 81) **Trissal MC, Wong TN, Yao JC, Ramaswamy R, Kuo I, Baty J, Sun Y, Jih G, Parikh N, Berrien-Elliott MM, Fehniger TA, Ley TJ, Maillard I, Reddy PR, Link DC** (2018). MIR142 Loss-of-Function Mutations Derepress ASH1L to Increase HOXA Gene Expression and Promote Leukemogenesis. *Cancer Res*, 78, 3510-3521.
- 82) **Tsang FH, Au SL, Wei L, Fan DN, Lee JM, Wong CC, Ng IO, Wong CM** (2015). MicroRNA-142-3p and microRNA-142-5p are downregulated in hepatocellular carcinoma and exhibit synergistic effects on cell motility. *Front Med*, 9, 331-343.
- 83) **Vogelstein B, Lane D, Levine AJ** (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-310.
- 84) **Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM** (2006). A microRNA

- expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2257-2261.
- 85) **Walker MP, Stopford CM, Cederlund M, Fang F, Jahn C, Rabinowitz AD, Goldfarb D, Graham DM, Yan F, Deal AM, Fedoriw Y, Richards KL, Davis IJ, Weidinger G, Damania B, Major MB** (2015). FOXP1 potentiates Wnt/beta-catenin signaling in diffuse large B cell lymphoma. *Sci Signal*, 8, ra12.
- 86) **Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK** (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51, 2647-2693.
- 87) **Wang X, Li J, Dong K, Lin F, Long M, Ouyang Y, Wei J, Chen X, Weng Y, He T, Zhang H** (2015). Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Signal*, 27, 443-452.
- 88) **Wang X, Wang L, Mo Q, Jia A, Dong Y, Wang G** (2016). A positive feedback loop of p53/miR-19/TP53INP1 modulates pancreatic cancer cell proliferation and apoptosis. *Oncol Rep*, 35, 518-523.
- 89) **Wang Z, Liu Z, Fang X, Yang H** (2017). MiR-142-5p Suppresses Tumorigenesis by Targeting PIK3CA in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 43, 2505-2515.
- 90) **Western LM, Rose SJ** (1991). A novel DNA joining activity catalyzed by T4 DNA ligase. *Nucleic acids research*, 19, 809-813.
- 91) **Wong JJ, Au AY, Gao D, Pinello N, Kwok CT, Thoeng A, Lau KA, Gordon JE, Schmitz U, Feng Y, Nguyen TV, Middleton R, Bailey CG, Holst J, Rasko JE, Ritchie W** (2016). RBM3 regulates temperature sensitive miR-142-5p and miR-143 (thermomirs), which target immune genes and control fever. *Nucleic Acids Res*, 44, 2888-2897.
- 92) **Xu R, Bi C, Song J, Wang L, Ge C, Liu X, Zhang M** (2015). Upregulation of miR-142-5p in atherosclerotic plaques and regulation of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in macrophages. *Mol Med Rep*, 11, 3229-3234.
- 93) **Yadav C, Ahmad A, D'souza B, Agarwal A, Nandini M, Ashok Prabhu K, D'souza V** (2016). Serum Lactate Dehydrogenase in Non-Hodgkin's Lymphoma: A Prognostic Indicator. *Indian J Clin Biochem*, 31, 240-242.
- 94) **Yan X, Tang B, Chen B, Shan Y, Yang H** (2019). Replication Study: The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *eLife*, 8, e43511.
- 95) **Yang X, Dan X, Men R, Ma L, Wen M, Peng Y, Yang L** (2017). MiR-142-3p blocks TGF-beta-induced activation of hepatic stellate cells through targeting TGFbetaRI. *Life Sci*, 187, 22-30.

- 96) **Yilmaz M,Christofori G** (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28, 15-33.
- 97) **Zhang B, Pan X, Cobb GP,Anderson TA** (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302, 1-12.
- 98) **Zhu X, Ma SP, Yang D, Liu Y, Wang YP, Lin T, Li YX, Yang SH, Zhang WC,Wang XL** (2018). miR-142-3p Suppresses Cell Growth by Targeting CDK4 in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 51, 1969-1981.

Sonstige Quellen:

- 99) <http://www.biofeng.com/zaiti/buru/pcDNA3.1-Hygro-.html>: 01.12.2018, 09:00 Uhr
- 100) <http://www.biofeng.com/zaiti/buru/pSG5.html>: 01.12.2018, 08:00 Uhr
- 101) <https://www.neb-online.de/dna-rna-leitern-und-marker/proteinmarker/>: 13.01.2020, 08:00 Uhr
- 102) <https://international.neb.com/products/n3200-1-kb-plus-dna-ladder#Product%20Information>: 13.01.2020, 10:00
- 103) http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000458: 01.12.2018, 12:00 Uhr
- 104) http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000268: 01.12.2018, 10:00 Uhr
- 105) http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000650: 01.12.2018, 11:00 Uhr
- 106) **Hart M.** (2014). *Das komparative MicroRNA-Profil zunehmend maligner Prostatakarzinome und Identifizierung von microRNA-Zielgenen; Dissertation.*
- 107) **Fröhlich J** (2016). Functional analysis of microRNA-142 by CRISPR-Cas 9 mediated knock out; Masterarbeit