

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Untersuchung der direkten Regulation der miR-29c- und
miR-146a-abhängig exprimierten Zielgene mittels
Reportergenassay im ALK-positiven ALCL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gersmann, Ann-Kathrin

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Quintanilla-Martinez de Fend

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jung

Tag der Disputation: 25.01.2017

Inhaltsverzeichnis

1.EINLEITUNG	1
1.1 Das ALK-positive großzellig anaplastische T-Zell-Lymphom	1
1.1.1 Geschichte des ALK-positiven großzellig anaplastischen T-Zell-Lymphoms	1
1.1.2 Epidemiologie und Klinik des ALK-positiven ALCL	2
1.1.3 Diagnose und Stadieneinteilung des ALK-positiven ALCL	3
1.1.4 NPM-ALK	4
1.1.5 Prognose und Therapie	5
1.2 miRNAs: Funktion und charakteristische Expression im ALCL	7
1.2.1 Biogenese und Funktion von miRNAs	7
1.2.2 miRNA-Beteiligung an der Kanzerogenese	9
1.2.3 miRNAs als Therapieoption	11
1.2.4 Aberrante miRNA-Expression im ALCL	11
1.2.5 miRNA 29c	13
1.2.5.1 Funktion der miRNA 29c	13
1.2.5.2 Deregulation der miRNA 29c in Tumoren	14
1.2.6 miRNA 146a	14
1.2.6.1 Funktion der miRNA 146a	14
1.2.6.2 Deregulation der miRNA 146a in Tumoren	15
1.3 Funktionen potentieller Zielgene der miRNAs 29c und 146a	16
1.3.1 Funktionen der potentiellen Zielgene der miRNA 29c	16
1.3.1.1 ADAM Metallopeptidase domain 19 (ADAM19)	16
1.3.1.2 Cyclin A2 (CCNA2)	16
1.3.1.3 Cyclin F (CCNF)	17
1.3.1.4 Collagen, type VI, alpha 3 (COL6A3)	17
1.3.1.5 DOT1-like histone H3K79 methyltransferase (DOT1L)	18
1.3.1.6 Gamma-glutamyl-cyclotransferase (GGCT)	18
1.3.1.7 Lamin B1 (LMNB1)	18
1.3.1.8 Regulator of chromosome condensation 2 (RCC2)	19

1.3.1.9 <i>Thymine-DNA glycosylase (TDG)</i>	19
1.3.2 Funktionen der potentiellen Zielgene der miRNA 146a	19
1.3.2.1 <i>Basigin (BSG)</i>	19
1.3.2.2 <i>Signal recognition particle receptor, B subunit (SRPRB)</i>	20
1.4 Zielsetzung der Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Verzeichnis der verwendeten Geräte und Chemikalien	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 EDV-Programme	22
2.1.3 Enzyme	22
2.1.4 Geräte	22
2.1.5 Kits	23
2.1.6 Medien und Zusätze	24
2.1.7 Plasmide und Bakterien	24
2.1.8 Primer	25
2.1.9 Puffer	27
2.1.10 Reagenzien	27
2.1.11 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.12 Zellen	28
2.1.13 Hersteller	28
2.2 Klonierung der 3`-UTR der potentiellen Zielgene in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor	30
2.2.1 Präparation des Vektors	30
2.2.2 Präparation der Inserts	30
2.2.3 In-Fusion-Klonierung, Transformation und DNA-Extraktion	31
2.2.4 Überprüfung der Klonierung	33
2.2.4.1 <i>Screening-PCR</i>	33
2.2.4.2 <i>Sequenzierung der selektierten Klone</i>	34
2.3 Transfektion der pmirGLO-Konstrukte und der miRNA-Mimic-29c bzw. miRNA-Mimic-146a in HEK293T-Zellen	35
2.3.1 Kultivierung der Zellen	35

2.3.2 Relative Quantifizierung der basalen Expression der miRNAs 29c und 146a in HEK293T- und HeLa-Zellen	36
2.3.2.1 Herstellung von Zellpellets für die miRNA-Extraktion	36
2.3.2.2 miRNA-Extraktion	36
2.3.2.3 Reverse Transkription der miRNA in cDNA	37
2.3.2.4 Relative Quantifizierung der basalen Expression der miRNAs 29c und 146a bei HEK293T- und HeLa-Zellen im Vergleich zu SUDHL-1-Zellen	37
2.3.3 Etablierung der Transfektionsbedingungen	38
2.3.3.1 Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor und der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2	38
2.3.3.2 Zellpellets für DNA- und RNA-Extraktion	39
2.3.3.3 DNA-Extraktion und Überprüfung der Transfektion des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektors	40
2.3.3.4 RNA-Extraktion und Überprüfung der Transfektion der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2	41
2.3.4 Transfektion der HEK293T- Zellen mit miRNA-Mimic 29c bzw. miRNA-Mimic 146a und pmirGLO-Konstrukten	42
2.4 Reporterassay	44
3. ERGEBNISSE	46
3.1 Klonierung der 3`-UTR der potentiellen Zielgene in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor	46
3.1.1 Überprüfung der Klonierung	46
3.1.1.1 Kontrolle des linearisierten Vektors und der amplifizierten Inserts vor Einsatz in die Klonierungsreaktion	46
3.1.1.2 Screening-PCR	47
3.1.1.3 Sequenzierung der selektierten Klone und Überprüfung der vorhergesagten miRNA-Bindungsstellen	49
3.2 Transfektion der pmirGLO-Konstrukte und der miRNA-Mimic-29c bzw. miRNA-Mimic-146a in HEK293T-Zellen	51

3.2.1 Ermittlung der basalen Expression der miRNAs 29c und 146a in HEK293T-Zellen und HeLa-Zellen	51
3.2.2 Etablierung der Transfektionsbedingungen	52
3.2.2.1 Überprüfung der Transfektion des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektors	52
3.2.2.2 Überprüfung der Transfektion der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2	52
3.3 Reporterassay	53
3.3.1 Auswertung der Kontrollen	53
3.3.2 Interaktion zwischen der miRNA 29c und den Kandidatengenen	54
3.3.3 Interaktion zwischen der miRNA 146a und den Kandidatengenen	56
4. DISKUSSION	57
4.1 Reporterassay	57
4.2 Identifizierung der direkten miRNA 29c-Zielgene im ALK-positiven ALCL	59
4.3 Identifizierung der direkten miRNA 146a-Zielgene im ALK-positiven ALCL	62
4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick	64
5. ZUSAMMENFASSUNG	66
6. VERZEICHNISSE	68
6.1 Abkürzungsverzeichnis	68
6.2 Abbildungsverzeichnis	72
6.3 Tabellenverzeichnis	73
6.4 Literaturverzeichnis	74
7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	88
8. DANKSAGUNG	89

1. Einleitung

1.1 Das ALK-positive großzellig anaplastische T-Zell-Lymphom

1.1.1 Geschichte des ALK-positiven großzellig anaplastischen T-Zell-Lymphoms

Bei dem großzellig anaplastischen T-Zell Lymphom (ALCL) handelt es sich um eine Neoplasie, die zu den peripheren T-Zell-Lymphomen gehört und damit zu den Non-Hodgkin-Lymphomen zählt.

Das ALCL wurde erstmalig 1985 als eigene Lymphomentität unter den peripheren T-Zell-Lymphomen beschrieben, gekennzeichnet durch Kriterien wie eine starke CD30-Expression, die Fähigkeit der intrasinusoidalen Ausbreitung und die pleomorphe Morphologie der Tumorzellen (1). Ende der 80er Jahre wurde bei einer Vielzahl von ALCL-Fällen eine charakteristische Translokation zwischen den Chromosomen 2 und 5 (t(2;5) (p23;q35)) gefunden (2-6). Die dabei beteiligten Gene wurden später als *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) auf 2p23 und *NPM* (Nucleophosmin) auf 5q35 identifiziert (7). Im Laufe der Zeit wurden neben *NPM* noch weitere Fusionspartner für das *ALK*-Gen im ALK-positiven ALCL entdeckt.

Das ALK-positive und ALK-negative ALCL galten trotz unterschiedlichem Erkrankungsalter und abweichender Prognose lange Zeit als Untergruppen des systemischen ALCL. Aufgrund der rein kutanen Manifestation, des indolenten Verlaufs und der ausgezeichneten Prognose wurde die kutane Form des ALCL schon früh von den systemischen ALCL-Formen abgegrenzt (8). Die aktuelle WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes von 2008 führt inzwischen das ALK-positive, das ALK-negative und das kutane ALCL als distinkte Entitäten auf (9, 10).

1.1.2 Epidemiologie und Klinik des ALK-positiven ALCL

Laut den aktuellen Daten des ZKFD (Zentrum für Krebsregisterdaten) des Robert Koch-Instituts lag der Anteil der Non-Hodgkin-Lymphome aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 sowohl bei Männern als auch bei Frauen bei 3,4% (Abbildung 1) (11). Die Inzidenz für das Jahr 2011 wurde mit 19,8 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner/Jahr beziffert. Die Diagnose peripheres bzw. kutanes T-Zell-Lymphom wurde in demselben Jahr 1184-mal in Deutschland gestellt (12). In Europa macht das ALK-positive ALCL 6,4%, das ALK-negative ALCL 9,4% und das kutane ALCL 0,8% aller peripheren T-Zell-Lymphome aus (13). Es handelt sich also um eine seltene Erkrankung. Im Gegensatz zum ALK-negativen ALCL, das vor allem ältere Menschen betrifft, tritt das ALK-positive ALCL in der Regel bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen auf (14). An beiden Entitäten erkranken Männer häufiger als Frauen (15).

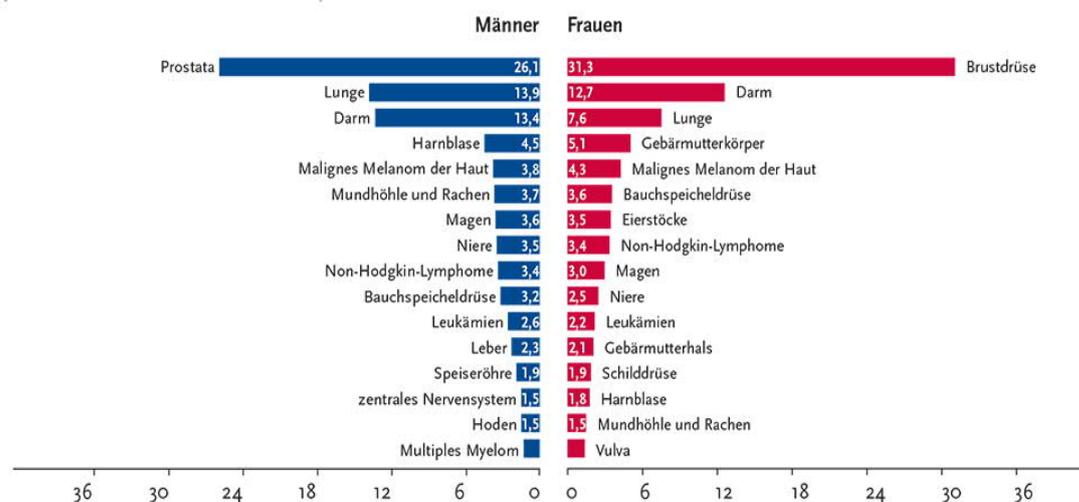


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (RKI und GEKID (Hrsg.), 2013) – Angaben in Prozent (11).

Die Klinik des ALCL entspricht der anderer aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome. Neben Abgeschlagenheit, Infektanfälligkeit und einer Lymphadenopathie kann eine B-Symptomatik, bestehend aus Fieber über 38,0°C, Nachtschweiß und unerklärlichem Gewichtsverlust über 10% innerhalb der letzten 6 Monate, auftreten. Eine extranodale Manifestation ist häufig und

beim ALK-positiven ALCL oft in Knochen, Knochenmark, Haut, Subkutangewebe und Lunge lokalisiert (15).

1.1.3 Diagnose und Stadieneinteilung des ALK-positiven ALCL

Anamnese, körperliche Untersuchung, Labordiagnostik sowie bildgebende Verfahren können nur einen Hinweis auf die Erkrankung ALCL geben. Die endgültige Diagnosestellung erfolgt durch eine feingewebliche Untersuchung nach Lymphknotenexstirpation. Mikroskopisch imponiert das ALCL durch eine intrasinusoidale Infiltration und das anaplastische Aussehen der Tumorzellen. Charakteristisch für das ALCL ist das Auftreten sogenannter „Hallmark-Zellen“. Diese Zellen besitzen einen exzentrisch gelegenen nieren- oder embryoförmigen Kern sowie einen prominenten Golgi-Apparat (16). Beim ALK-positiven ALCL werden morphologisch mehrere Formen unterschieden. Neben der am häufigsten vorkommenden Form mit großen, pleomorphen Tumorzellen, treten in 10% bis 20% der Fälle kleinzellige oder lymphohistiozytische Varianten auf (17). Die kleinzellige Variante weist eine große Anzahl kleiner bis mittelgroßer Tumorzellen auf. Große, anaplastische Zellen finden sich meist perivaskulär. Die lymphohistiozytische Variante ist durch die Histiocyteninfiltration gekennzeichnet (16). Weitere seltenere Formen wie zum Beispiel die sarkomatoide Form oder die siegelringzellige Variante wurden beschrieben (18). Charakteristisch für ALCL-Zellen ist die starke CD30-Expression. Obwohl die Tumorzellen einen T-Zell-Ursprung haben, zeigen sie meist einen abweichenden Immunphänotyp (17). Das ALCL ist häufig gekennzeichnet durch den Verlust des T-Zell-Rezeptor-Komplexes oder der Moleküle des T-Zell-Signalwegs (19). T-Zell-typische Antigene wie CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD43 oder CD45RO sind nicht immer ausgeprägt. Kann keiner dieser Oberflächenmarker nachgewiesen werden, spricht man von einem Null-Phänotyp. TIA-1 (T-cell intracytoplasmic antigen-1), Granzym B, Perforin, Granulysin, EMA (epithelial membrane antigen), Clusterin sowie CD56 können ebenfalls exprimiert werden (17). Die Diagnose ALK-positives ALCL wird schließlich immunhistologisch durch den ALK-Nachweis gestellt.

Die Stadieneinteilung des ALCL von I bis IV erfolgt analog zu der Einteilung der Hodgkin-Lymphome nach Ann Arbor. Dabei werden sowohl die Anzahl als auch die Lokalisation der Tumormanifestationen einbezogen. Die Stadieneinteilung kann unter anderem durch die Bezeichnung A, B oder E ergänzt werden, wobei A bei nicht vorhandener B-Symptomatik und B beim Vorliegen einer B-Symptomatik verwendet wird. E kennzeichnet den extranodalen Befall (20). In der überwiegenden Anzahl der Fälle wird das ALCL in Stadium III oder IV diagnostiziert (21).

1.1.4 NPM-ALK

Die in 75% bis 80% der ALK-positiven ALCL auftretende Translokation zwischen den Chromosomen 2 und 5 wurde Ende der 80er Jahre entdeckt (2-6). 1994 wurden die an der Translokation beteiligten Gene *NPM* auf dem langen Arm des Chromosom 5 und *ALK* auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 identifiziert (7). ALK ist eine Transmembranrezeptor-Tyrosin-Kinase und gehört zur Superfamilie der Insulinrezeptoren. In humanem Gewebe wurden ALK-Transkripte in Hoden, Plazenta, fötaler Leber, Dünn- und Dickdarm, fötalem und adultem Hirn nachgewiesen (7). Immunhistochemisch konnte ALK beim Erwachsenen regulär in Gliazellen, Perizyten und vereinzelt Neuronen in Thalamus, Hypothalamus, Basalganglien, im zerebralen Kortex und im Kleinhirn lokalisiert werden (22). Der Verlust der ALK-Homologen in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* führt zu Defekten in der Mitteldarmentwicklung sowie in der neuronalen Vernetzung und der Plastizität (23). Adulte ALK-defiziente Mäuse hingegen zeigen einen diskreten Phänotyp mit Verbesserung des räumlichen Gedächtnisses (24). Die ALK-Funktion im Menschen ist weitgehend unklar. Die überwiegend pränatale und im zentralen Nervensystem lokalisierte ALK-Expression in Säugetieren könnte auf eine Bedeutung während der neuronalen Entwicklung hindeuten (25). Nucleophosmin ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das am Transport von neusynthetisierten Proteinen zwischen Zytoplasma und Nukleolus beteiligt ist. Durch die Translokation kommt es zur Entstehung eines *NPM-ALK*-Fusionsgens, bestehend aus der 3'-*ALK*-Domäne und der 5'-*NPM*-Domäne.

Die Bildung des Fusionsproteins führt zur konstitutiven Aktivierung der ALK-Kinase-Domäne. Dies resultiert in einer Aktivierung verschiedener wichtiger Signalkaskaden und Veränderungen in entscheidenden Prozessen wie der Zellzyklus-Progression, dem Zellüberleben, der Migration sowie zytoskelettalen Abnormalitäten, einer erhöhten Ribosomenstabilität und einer vermehrten *de novo* Purin-Synthese. Diese Effekte werden unter anderem über die Signalwege JAK/STAT (Januskinase/signaltransducer and activator of transcription), PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase/AKT), MAPKs (mitogen-activated protein kinases) und PLC γ (phospholipase C γ) vermittelt. Die Translokation agiert als Onkogen und trägt entscheidend zur Pathogenese des ALK-positiven ALCL bei. Im Laufe der Zeit wurden noch weitere Gene als Translokationspartner für *ALK* im ALCL identifiziert, wie *TPM3* und *TPM4* (tropomyosin), *ATIC* (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase), *TFG* (TRK-fused gene), *CLTC* (clathrin heavy chain 1), *MSN* (moesin), *MYH9* (myosin, heavy chain 9) und *ALO17* (ALK lymphoma oligomerization partner on chromosome 17). Diese Translokationen führen ebenso zu einer konstitutiven ALK-Aktivierung (17).

1.1.5 Prognose und Therapie

Patienten mit einem ALK-positiven ALCL haben eine weitaus bessere Prognose als solche mit einem ALK-negativen ALCL. Das Fünfjahresüberleben liegt bei ca. 70% im Vergleich zu 49% (15). Zu den Faktoren, die für das ALK-positive ALCL prognostisch ungünstig sind, gehören die CD56-, Survivin- und EMA-Expression sowie eine Erkrankung an der kleinzelligen Variante des ALK-positiven ALCL und ein hoch-intermediärer bis hoher Internationaler Prognostischer Index (IPI) (17, 26-29). Der Internationale Prognostische Index wurde entwickelt, um den Verlauf aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome besser einschätzen zu können. Der LDH-Serum-Spiegel, das Alter des Patienten, die Anzahl extranodaler Manifestationen, der Allgemeinzustand und das Tumorstadium fließen in die Beurteilung ein. Für Patienten unter 60 Jahre wird der altersadaptierte IPI genutzt, der nur den LDH-Serum-Spiegel, den Allgemeinzustand und das Tumorstadium berücksichtigt (30).

Standardtherapie für Patienten mit einem ALK-positiven ALCL ist eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie, meist mit Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednisolon (CHOP). Trotz guter Prognose gibt es Patienten mit therapierefraktärem oder rezidivierendem ALK-positivem ALCL. Deshalb werden alternative Therapien benötigt.

Eine Option bietet der MMAE (Monomethylauristatin E)-gekoppelte CD30-Antikörper Brentuximab Vedotin (BV). Nach Bindung des Antikörpers an den CD30-Rezeptor kommt es zur Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes. Lysosomale Proteolyse führt zur Freisetzung von MMAE, das an Tubulin bindet und so das mikrotubuläre Netzwerk zerstört. Dies resultiert in Zellzyklusarrest und Apoptose der Tumorzelle. Eine klinische Phase II Studie an 58 Patienten mit therapierefraktärem oder rezidivierendem systemischen ALCL zeigte die Wirksamkeit von BV. Die komplette Remissionsrate betrug bei Patienten mit ALK-negativem ALCL 52%, mit ALK-positivem ALCL 69%. Das mittlere progressionsfreie Überleben lag bei 14,3 Monaten. Bei 60% der Patienten traten ausgeprägte oder lebensbedrohliche Nebenwirkungen auf (31). Am 25.10.2012 wurde BV von der Europäischen Arzneimittel-Agentur als Therapeutikum bei therapierefraktärem oder rezidivierendem, systemischem ALCL zugelassen.

Als weitere Zielstruktur der medikamentösen Therapie dient ALK. Die konstitutive ALK-Aktivierung ist direkt in die Pathogenese des ALCL involviert (32). Da ALK physiologischerweise nur in wenigen Zellen exprimiert wird, lässt ihre Blockade auf ein geringes Nebenwirkungsprofil hoffen (33). Verschiedene Substanzen wie CH5424802 (34), GSK1838705A (35) oder NVP-TAE684 (36) wurden *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell getestet und erzielten Erfolge. Crizotinib, ein ALK-Inhibitor, der bereits im ALK-positiven Lungenkarzinom eingesetzt wird, zeigte in einer klinischen Phase II Studie bei geringfügigen Nebenwirkungen auch im ALK-positiven ALCL Wirksamkeit. Alle neun Patienten mit einem ALCL erreichten eine komplette Remission, das progressionsfreie Überleben über zwei Jahre betrug 63,7%, das Zweijahresüberleben 72,7% (37). Problematisch ist hierbei das Auftreten von

Resistenzen im Verlauf der Behandlung (38). Weitere Therapiestrategien zielen auf die Inhibierung einiger Proteine ab, die durch ALK reguliert werden und in die für die Pathogenese des ALCL entscheidenden Signalwege JAK/STAT und PI3K/AKT involviert sind (39).

Eine ALK-Vakzinierung stellt eine mögliche, zukünftige Option dar. ALK ist immunogen. Bei der Mehrzahl der Patienten mit einem ALK-positiven ALCL wurden Antikörper gegen das NPM-ALK-Fusionsprotein entdeckt (40, 41). Es wurde festgestellt, dass der Serumantikörpertiter negativ mit dem Stadium der Erkrankung und der Menge der zirkulierenden Tumorzellen korreliert und bei hohem Titer eine geringere kumulative Rezidivinzidenz auftritt (40). Die DNA-Vakzinierung mit einem Plasmid, das für einen großen Teil der humanen intrazytoplasmatischen ALK-Domäne kodiert, schützte Mäuse vor einem lokalen und systemischen Lymphomwachstum (42).

Eine weitere potentielle therapeutische Möglichkeit könnte die Beeinflussung deregulierter miRNAs darstellen. Aberrant exprimierte miRNAs, die in die Tumorgenese involviert sind, bieten ein mögliches Therapieziel (siehe 1.2.3). Auch im ALCL wurden deregulierte miRNAs identifiziert und könnten einen Angriffspunkt für die Behandlung darstellen (siehe 1.2.4) (39).

1.2 miRNAs: Funktion und charakteristische Expression im ALCL

1.2.1 Biogenese und Funktion von miRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind nichtkodierende, ca. 22 Nukleotide lange RNAs, die durch Bindung an ihre Ziel-mRNAs an der posttranskriptionellen Regulation zahlreicher Gene beteiligt sind. Sie sind evolutionär konserviert und wurden in unterschiedlichen Spezies entdeckt (43). Seit der Erstbeschreibung der miRNA lin-4 in *Caenorhabditis elegans* im Jahr 1993 wurden unzählige miRNAs identifiziert (44). Allein im Menschen sind 2588 reife miRNAs bekannt (45).

Reife miRNAs werden aus Vorläufermolekülen, den pri-miRNAs, gebildet. Pri-miRNAs entstehen durch Transkription unabhängiger miRNA-Gene oder sind Bestandteil der Introns proteinkodierender Transkripte. Sie bilden eine Haarnadelstruktur und werden im Nukleus durch die RNase III Endonuklease Drosha zu 60 bis 70 Nukleotiden langen pre-miRNAs prozessiert. Anschließend wird die pre-miRNA durch das Ran-GTP-abhängige Protein Exportin 5 aktiv ins Zytoplasma transportiert. Dort erfolgt ein weiterer Prozessierungsschritt durch die RNase III Endonuklease Dicer und es entsteht ein imperfekter miRNA-miRNA*-Doppelstrang. Dieser lagert sich unter anderem an ein Argonauteprotein an und wird Bestandteil des miRISCs (miRNA-induced silencing complex). Meist verbleibt der Strang mit dem weniger thermostabilen 5`-Ende im miRISC und führt in Abhängigkeit von der Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA zum Abbau der mRNA oder der translationalen Repression. Die miRNA* wird degradiert.

Die Interaktion zwischen miRNA und Ziel-mRNA erfolgt über komplementäre Basenpaarung. Im Gegensatz zu Pflanzen ist die Bindung zwischen mRNA und miRNA in Metazoen größtenteils imperfekt. Die miRNA-Bindungsstelle liegt meist in der 3`-UTR (untranslated region) der Zielgen-mRNA. Die Erkennung der Zielstruktur basiert vor allem auf drei Mechanismen. Die „Seed-Regel“ besagt, dass die sogenannte „Seed-Region“, die Nukleotide 2 bis 8 des 5`-Endes der miRNA, perfekt an die mRNA binden sollten. Fehlpaarungen zwischen miRNA und mRNA sollten sich in der Mitte des miRNA-mRNA-Doppelstrangs befinden. Des Weiteren sollte das 3`-Ende der miRNA eine gewisse Komplementarität zur Ziel-mRNA aufweisen, um die Wechselwirkung zu stabilisieren. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn die Basenpaarung in der Seed-Region imperfekt ist. Ausnahmen dieser Regeln wurden beobachtet. Zusätzliche Voraussetzungen, wie eine AU-reiche Sequenz in Umgebung der Bindungsstelle sowie eine Bindungsstelle, die in der Nähe des Poly-A-Schwanzes oder des Stoppkodons liegt, erhöhen die Effizienz der miRNA-mRNA-Interaktion.

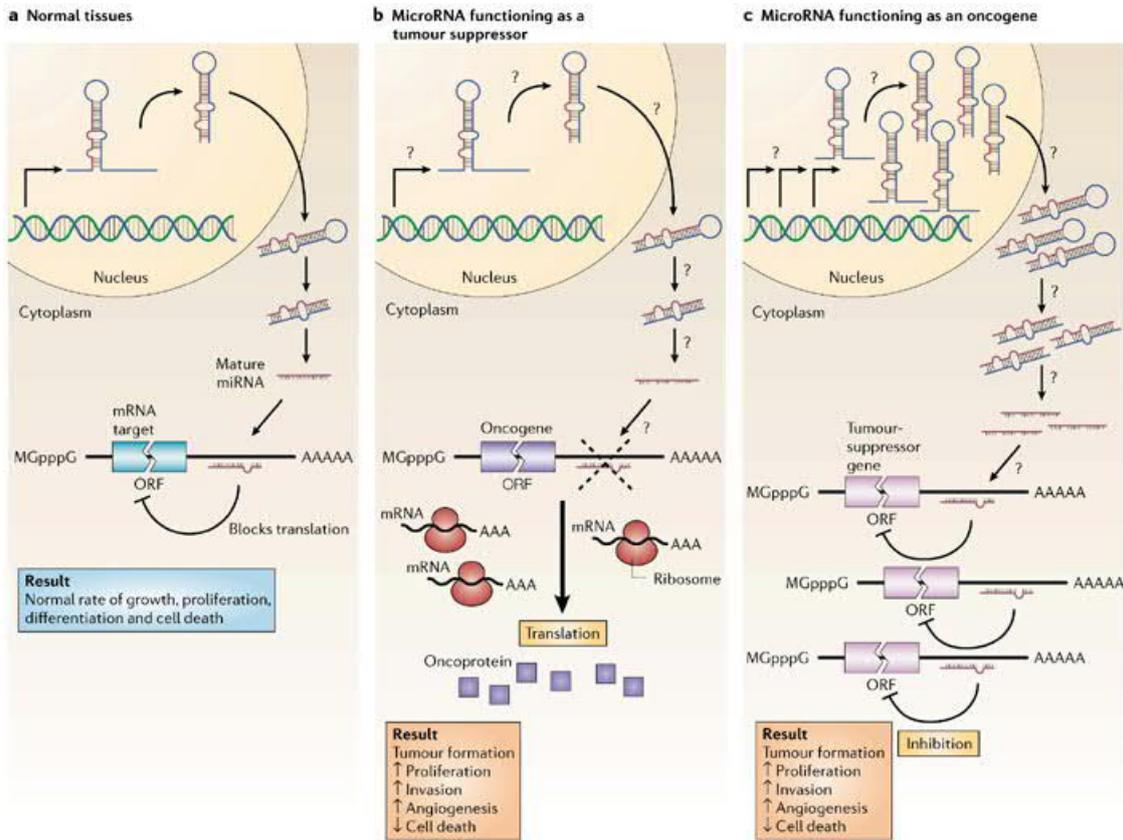
Eine miRNA kann verschiedene Ziel-mRNAs besitzen und so die Expression diverser Gene beeinflussen. Eine mRNA wiederum kann über Bindungsstellen für verschiedene miRNAs verfügen und durch diese reguliert werden (46). Die Bindung mehrerer miRNA-Moleküle innerhalb einer 3'-UTR kann eine Steigerung der Repressionseffektivität bewirken (47).

1.2.2 miRNA-Beteiligung an der Kanzerogenese

miRNAs spielen eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Die Deregulation von miRNAs, die Tumorsuppressor- oder Onkogene oder epigenetische Mechanismen kontrollieren, trägt einen Teil zur Kanzerogenese bei (Abbildung 2) (48).

2002 wurden erstmals B-CLL (Chronisch Lymphatische Leukämie)-Fälle mit einer Deletion auf Chromosom 13 (13q14) auf eine aberrante miRNA-Expression untersucht. Alle proteinkodierenden Gene in diesem Bereich zeigten keine ausgeprägten Veränderungen. Eine Deletions- und Expressionsanalyse ergab eine Deletion bzw. Herunterregulation der miR-15 und miR-16 und ließ eine Funktion dieser miRNAs als Tumorsuppressoren und ihre Involvierung in die Pathogenese der CLL vermuten (49).

Erste Hinweise, dass miRNAs auch als Onkogene fungieren können, wurden mit der Entdeckung der Überexpression der miR-155 und des miR-17~92-Clusters in verschiedenen Tumoren geliefert (48). Die Entwicklung von B-Zell-Malignomen in transgenen Mäusen mit gezielter miR-155-Überexpression bewies zum ersten Mal, dass eine miRNA-Überexpression zu einer malignen Neoplasie führen kann (50). miRNAs sind außerdem an der Regulation von Proteinen, die in epigenetische Mechanismen involviert sind, beteiligt und können so die Transkription von Genen beeinflussen (48).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Abbildung 2: MicroRNAs können als Tumorsuppressoren und Onkogene fungieren. (Esquela-Kerscher, 2006) a) In Normalgewebe resultiert eine korrekte miRNA-Transkription, -Prozessierung und -Bindung an komplementäre Sequenzen der Ziel-mRNA in der Repression der Zielgen-Expression durch Blockade der Proteintranslation oder veränderte mRNA-Stabilität. Das Gesamtergebnis ist eine normale Ausprägung des Zellwachstums, der Proliferation, der Differenzierung und des Zelltods. b) Die verringerte Expression oder Deletion einer miRNA, die als Tumorsuppressor fungiert, führt zur Tumorformation. Eine Reduktion oder eine Elimination reifer miRNAs kann aufgrund von Defekten in jedem Stadium der miRNA-Biogenese auftreten (gekennzeichnet durch Fragezeichen) und führt letztendlich zu einer inadäquaten Expression des miRNA-Zielonkoproteins (violette Viereck). Das Gesamtergebnis könnte eine erhöhte Proliferation, Invasivität oder Angiogenese, eine verminderte Apoptoserate oder undifferenziertes oder entdifferenziertes Gewebe umfassen, was zur Tumorbildung führen würde. c) Die Amplifikation oder Überexpression einer onkogenen miRNA würde ebenfalls in einer Tumorbildung resultieren. In dieser Situation würden erhöhte Mengen einer miRNA, die zu einer inadäquaten Zeit oder im falschen Gewebe gebildet werden, die Expression eines miRNA-Ziel-Tumorsuppressorgens verhindern (pink) und zu einer Tumorprogression führen. Erhöhte Level einer reifen miRNA könnten aufgrund der Amplifikation des miRNA-Gens, eines konstitutiv aktiven Promoters, einer erhöhten Effizienz der miRNA-Prozessierung oder einer erhöhten Stabilität der miRNA auftreten (gekennzeichnet durch Fragezeichen). ORF open reading frame (51).

1.2.3 miRNAs als Therapieoption

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, können miRNAs wesentlich an der Tumorgenese beteiligt sein. Sie bieten so ein potentiell Therapieziel. Je nachdem, ob eine miRNA als Onkogen oder als Onkosuppressorgen wirkt, ist eine Blockade oder eine Wiederherstellung ihrer Aktivität wünschenswert. Eine Aktivitätssteigerung kann durch das Einschleusen doppelsträngiger miRNA-Mimics erreicht werden (52). Um einen Funktionsverlust zu erreichen, gibt es die Möglichkeit, miRNA-Antagonisten zu verabreichen. Dabei handelt es sich um spezifische, chemisch modifizierte Oligonukleotide, die zu einer Blockade der miRNA-Aktivität führen. Eine Herausforderung der miRNA-basierten Therapie ist das Erreichen des Wirkortes. miRNA-Mimics oder miRNA-Antagonisten können derzeit systemisch, lokal oder nasal appliziert werden. Da eine miRNA verschiedene Zielgene besitzt, kann eine Modulation ihrer Aktivität Einfluss auf viele Signalwege nehmen. Dies birgt sowohl hohes therapeutisches Potential als auch die Gefahr ausgeprägter Nebenwirkungen (53). Das einzige miRNA-basierte Therapeutikum, das bislang in einer klinischen Studie zum Einsatz kommt, heißt Miravirsen. Das subkutan verabreichte Miravirsen blockiert die miR-122, eine leberspezifische miRNA, die eine wichtige Rolle im Lebenszyklus des Hepatitis-C-Virus (HCV) spielt. Die Wirksamkeit dieses Medikaments bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion wurde in einer klinischen Phase IIa Studie bestätigt (54).

1.2.4 Aberrante miRNA-Expression im ALCL

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit dem Thema der miRNA-Expression im ALCL befasst. Merkel et al. untersuchten die miRNA-Expression mittels miRNA-Arrays in ALK-positiven und ALK-negativen Zelllinien, in Tumoren von *NPM-ALK*-transgenen Mäusen und in humanem ALCL-Tumorgewebe und identifizierten ein aberrantes miRNA-Profil (55). In einer Studie von Lawrie et al., die mittels miRNA-Array die miRNA-Expression in Zelllinien zahlreicher B- und T-Zell-Neoplasien mit dem gesunden Pendant verglich, waren im ALCL unter anderem miR-21, miR-27a und miR-135b

hochreguliert, während miR-324, miR-454 und miR-342 herunterreguliert waren (56). Matsuyama et al. konzentrierten ihre Beobachtungen auf die miR-135b im ALK-positiven ALCL. Eine Inhibierung der miR-135b *in vitro* führte zu einer verminderten IL-17-Produktion und weiterer Proteine, die für den mit TH17-überlappenden Immunphänotyp des ALCL relevant sind. *In vivo* führte eine reduzierte miR-135b-Expression zu einer Abnahme der Tumorgefäßbildung und des Wachstums im Mausmodell (57). Dejean et al. identifizierten VEGF (vascular endothelial growth factor) als Zielgen der im ALK-positiven ALCL verringert exprimierten miR-16 und konnten zeigen, dass eine miR-16-Überexpression *in vivo* zu einer verminderten Tumorangio-genese und einem geringeren Tumorwachstum führte (58). Des Weiteren wurde eine mit dem ALK-positiven ALCL assoziierte miRNA-Signatur identifiziert, bestehend aus sieben miRNAs, von denen fünf hoch- (miR-512-3p, miR-886-5p, miR-886-3p, miR-708 und miR-135b) und zwei herunterreguliert (miR-146a und miR-155) waren. Zusätzlich wurde ein für das ALK-negative ALCL charakteristisches miRNA-Profil ermittelt, das sich von anderen peripheren T-Zell-Lymphomen unterschied. Unter 32 *in vitro* entdeckten, mit ALK assoziierten miRNAs, befanden sich auch das überexprimierte miR-17~92-Cluster und seine Paralogen, und ließen die Arbeitsgruppe vermuten, dass sie einen wichtigen Bestandteil des ALK-nachgeschalteten Signalwegs darstellen könnten (59). Spaccarotella et al. untersuchten STAT3-abhängig exprimierte miRNAs in ALK-positiven ALCL-Zellen und legten ihr Augenmerk dabei auf das miR-17~92-Cluster. Der STAT3-Verlust führte *in vitro* und *in vivo* zu Zellzyklusarrest und Apoptose. Dies konnte aber durch eine Überexpression des miR-17~92-Clusters verhindert werden. Diese Beobachtung ließ die Arbeitsgruppe über eine Beteiligung des miR-17~92-Clusters an der Lymphomgenese spekulieren (60). Desjobert et al. analysierten mittels RT-qPCR und Northern-Blotting die Expression der miRNA-29-Familie im ALCL. Die miR-29a, b und c waren herunterreguliert, aber in Bezug auf die miR-29b und miR-29c konnte kein signifikanter Unterschied zwischen ALK-positiven und ALK-negativen Zelllinien gefunden werden. Die Expression der miR-29a hingegen war vermindert und ALK-abhängig reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die miR-29a in Zellen

und im Mausmodell die MLC1 (myeloid cell leukemia 1)-Expression minderte und so proapoptotisch wirkte (61).

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte mittels Next Generation-Sequencing Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen den ALK-positiven ALCL-Zelllinien Karpas-299, SUDHL-1 und KiJK und der ALK-negativen ALCL-Zelllinie Mac-1 (62). Dabei fielen besonders die miR-29c und miR-146a auf, die herunterreguliert und im ALK-positiven ALCL signifikant unterschiedlich exprimiert waren. Nach Überexpression dieser miRNAs zeigte eine Transkriptomanalyse per Next Generation-Sequencing zahlreiche herunterregulierte Gene. Nach Transfektion der SUDHL-1-Zellen und Karpas-299-Zellen mit der miR-29c bzw. miR-146a wurde die Expression der Gene, die zusätzlich über durch das Programm miRanda vorhergesagte miRNA-Bindungsstellen verfügten, mit einer RT-qPCR überprüft. Dabei ergaben sich unter anderem für die miR-29c *ADAM19*, *CCNF*, *CCNA2*, *COL6A3*, *DOT1L*, *GGCT*, *LMNB1*, *RCC2* und *TDG*, für die miR-146a *BSG* und *SRPRB* als potentielle Zielgene. Bei einigen dieser Gene wurde eine Überexpression bereits in anderen Tumoren beobachtet, zum Teil mit Auswirkung auf die Malignität der Erkrankung (63).

Im Folgenden soll auf die Funktion der miR-29c und miR-146a sowie der identifizierten Kandidatengene genauer eingegangen werden.

1.2.5 miRNA 29c

1.2.5.1 Funktion der miRNA 29c

Die humane miRNA-Familie 29 besteht aus der miR-29a, miR-29b-1, miR-29b-2 und miR-29c. miR-29a und miR-29b-1 sind auf Chromosom 7q32.3 lokalisiert, miR-29b-2 und miR-29c auf Chromosom 1q32.2. Die für die miRNAs kodierenden Sequenzen liegen innerhalb des Clusters dabei weniger als 1 kb voneinander entfernt und die reifen miRNAs entstehen aus einem gemeinsamen Primärtranskript (64). Die miRNA-29-Familie besitzt zahlreiche Zielgene, welche für Proteine kodieren, die wesentlich an der Bildung der

Extrazellulärmatrix beteiligt sind. Eine Beteiligung der miR-29-Familienmitglieder an physiologisch bedeutsamen Prozessen wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose wurde berichtet (64).

1.2.5.2 *Deregulation der miRNA 29c in Tumoren*

Eine Herunterregulation der miR-29c-Expression wurde unter anderem im Hepatozellulären Karzinom oder im Magenkarzinom beobachtet (65, 66). Bei Patienten mit CLL, malignem Pleuramesotheliom und malignem Melanom ist ein geringes miR-29c-Level zusätzlich mit einer schlechteren Prognose assoziiert (67-69). Die miR-29c könnte eine Rolle bei der Invasivität und dem metastatischen Potential einiger Tumoren spielen. Sengupta et al. beobachteten im Nasopharynxkarzinom (NPC) eine verringerte Expression der miR-29c. Unter den identifizierten Zielgenen der miR-29c befanden sich auch Komponenten der Extrazellulärmatrix und gaben Anlass zu der Vermutung, dass die verringerte Expression der miR-29c an der Invasivität und dem metastatischen Potential der NPC-Zellen beteiligt sein könnte (70). Wang et al. stellten ein vermindertes miR-29c-Level in einer stark metastasierenden im Vergleich zu einer langsam metastasierenden Lungenkarzinomzelllinie fest. *In vitro* Versuche belegten, dass die miR-29c die Adhäsion, Migration und Invasion der Tumorzellen verringerte. *In vivo* konnte eine Hemmung der Tumorerkrankung und Metastasierung beobachtet werden (71).

1.2.6 miRNA 146a

1.2.6.1 *Funktion der miRNA 146a*

Die miR-146a gehört neben der miR-146b zur miRNA-146-Familie. Das Gen für die miR-146a ist auf Chromosom 5, das für die miR-146b auf Chromosom 10 lokalisiert. Die Sequenz der reifen miRNAs unterscheidet sich jedoch nur in zwei Nukleotiden (72). 2006 wurde entdeckt, dass eine LPS-Stimulation von THP1-Zellen, einer monozytischen Zelllinie, die von einem Patienten mit Akuter Monozytenleukämie stammt, eine NF- κ B-abhängige, vermehrte Expression der miR-146a zur Folge hatte (73). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der unter

anderem die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, das Zellüberleben, entzündliche Prozesse und die Immunantwort beeinflusst (74). Die miR-146a inhibiert wiederum TRAF6 und IRAK-1, Bestandteile der NF- κ B-aktivierenden Signalkaskade, und wirkt so negativ rückkoppelnd auf die NF- κ B-Aktivierung (73). Im Laufe der Zeit wurden weitere Zielmoleküle wie das proinflammatorische Zytokin IL-8, das Chemokin CCL-8 und IRAK-2 identifiziert, was die modulatorische Funktion der miR-146a in der angeborenen Immunantwort bestätigt (72). Eine weitere Studie deutet darauf hin, dass die miR-146a zusätzlich eine Rolle in der adaptiven Immunantwort spielt. Eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors hat eine höhere miR-146a-Expression zur Folge. Als Zielgen der miR-146a wurde *FADD* (Fas-associated death domain protein) identifiziert, ein Adaptorprotein, das an der Signalkaskade zur Vermittlung des AICD (activation induced cell death) beteiligt ist (75). AICD ist eine Form der Apoptose, die in T-Zellen durch wiederholte Aktivierung des T-Zell-Rezeptors induziert wird (76). Die miR-146a hat also eine antiapoptotische Wirkung. Des Weiteren wird der miR-146a eine Beteiligung an der hämatopoetischen Zelldifferenzierung zugeschrieben. Verschiedene Studien haben bei Überexpression oder Hinunterregulation der miR-146a Effekte auf die Hämatopoese, insbesondere die Megakaryozytopoese, beobachtet. Die Mechanismen sind weitgehend unklar (72).

1.2.6.2 Deregulation der miRNA 146a in Tumoren

In zahlreichen soliden, malignen Neoplasien wie dem Mammakarzinom, Prostatakarzinom und Magenkarzinom wurde eine aberrante miR-146a-Expression entdeckt (72). Die miR-146a ist ebenfalls in die Entstehung hämatologischer und lymphatischer Neoplasien involviert. In Blut- und Knochenmarkspalten unbehandelter Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie wurde im Vergleich zu CD34+-Zellen gesunder Probanden eine verminderte miR-146a-Expression entdeckt (77). In einer vergleichenden Studie von CLL-Patientenmaterial unterschiedlichen Karyotyps war die miR-146a-Expression im CLL-Subtyp mit einer Trisomie des Chromosom 12 signifikant erniedrigt (78). miR-146a-defiziente Mäuse entwickeln im Alter häufig myeloide

Sarkome in der Milz, bisweilen auch in Leber und Niere. Zusätzlich kommt es zu einer Myeloproliferation im Knochenmark. Auch B- und T-Zell-Lymphome treten bei diesen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen überdurchschnittlich häufig auf (79).

1.3 Funktionen potentieller Zielgene der miRNAs 29c und 146a

1.3.1 Funktionen der potentiellen Zielgene der miRNA 29c

1.3.1.1 *ADAM Metallopeptidase domain 19 (ADAM19)*

Das auf Chromosom 5q33.3 gelegene Gen kodiert für zwei Varianten des *ADAM19*-Gens, einem Mitglied der *ADAM* (a disintegrin and metalloprotease domain)-Familie. *ADAM*-Proteine sind an zellulären Prozessen wie Adhäsion, Migration und Signaltransduktion beteiligt (80). *ADAM19* scheint eine Rolle in der korrekten Entwicklung des kardiovaskulären Systems zu spielen (81). Ramdas et al. vermuteten, dass die Entstehung einer renalen Fibrose durch einen Anstieg von *ADAM19*, vermittelt über einen Abfall des miR-29-Levels, bedingt sein könnte. Ein direkter Nachweis dieser Interaktion wurde jedoch nicht getroffen (82). Eine hohe *ADAM19*-Expression wurde in Nierentumoren beobachtet. In primären Hirntumoren war sie gleichzeitig mit einer erhöhten Tumorzellinvasivität verbunden (83).

1.3.1.2 *Cyclin A2 (CCNA2)*

Das *CCNA2*-Gen ist auf Chromosom 4q27 lokalisiert. Der Zellzyklus in Säugetieren wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) kontrolliert, deren Aktivität durch Komplexbildung mit Cyclinen moduliert wird. *CCNA2* wird in proliferierenden, somatischen Zellen exprimiert und kann *CDK1* und *CDK2* aktivieren. Die Cyclin-A2-Expression steigt zu Beginn der S-Phase, persistiert während S- und G2-Phase und nimmt mit Beginn der Mitose wieder ab (84). Es wird angenommen, dass *CCNA2* das Fortschreiten der S-Phase vorantreibt und eine Bedeutung im Übergang der G2-Phase in die M-Phase hat (85). Eine

abweichende Cyclin-A2-Expression wurde in zahlreichen, verschiedenen Tumoren, unter anderem auch in Non Hodgkin-Lymphomen, beobachtet (86). In einigen Tumoren wie dem Mammakarzinom, dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem Nierenzellkarzinom, dem Larynxkarzinom, dem Weichteilsarkom und dem malignen Melanom ist ein hohes CCNA2-Level mit einer schlechteren Prognose assoziiert (87).

1.3.1.3 Cyclin F (CCNF)

Das auf Chromosom 16p13.3 gelegene Gen kodiert für Cyclin F. Dieses Cyclin wird während der S-Phase exprimiert und erreicht seine höchste Konzentration während der G2-Phase. Cyclin F ist an der Feineinstellung der Zentrosomenduplikation und der DNA-Synthese beteiligt. Es spielt ebenfalls eine Rolle beim Schutz der Zelle vor genomischer Instabilität und dem Erhalt eines ausbalancierten Desoxynukleotid-Pools (88). Eine erhöhte Cyclin F-Expression wurde im Adenokarzinom der Lunge beobachtet (89). Im Hepatozellulären Karzinom war eine verringerte CCNF-Expression mit einer schlechteren Differenzierung und Prognose verbunden (90).

1.3.1.4 Collagen, type VI, alpha 3 (COL6A3)

Dieses auf Chromosom 2q37 gelegene Gen kodiert für die α -3-Kette des Kollagen VI. Kollagen VI ist unter anderem Bestandteil der Extrazellulärmatrix von Muskulatur, Gefäßen, Sehnen und der Haut und interagiert mit anderen Komponenten der Extrazellulärmatrix (91, 92). Mutationen im COL6A3-Gen treten bei Myopathien wie der kongenitalen Muskeldystrophie Typ Ullrich und der Bethlem Myopathie auf. (93, 94) Die COL6A3-Expression korreliert in adipösen Patienten mit Body-Mass-Index und Fettmasse und könnte in die Entzündungsentstehung im Fettgewebe involviert sein (95). Malignome wie das Ovarialkarzinom und das Magenkarzinom zeigen eine vermehrte COL6A3-Expression. Tumorspezifische Splicing-Varianten der COL6A3-mRNA wurden im Blasenkarzinom, Prostatakarzinom und Kolonkarzinom gefunden (96, 97). Des Weiteren könnte eine vermehrte COL6A3-Bildung in Tumorzellen eine wichtige Rolle in der Resistenzentstehung gegen Cisplatin spielen (98).

1.3.1.5 DOT1-like histone H3K79 methyltransferase (DOT1L)

Das *DOT1L*-Gen ist auf Chromosom 19p13.3 gelegen. DOT1L katalysiert die Methylierung des Histon H3 Lysin 79 (H3K79). Kovalente Histonmodifikationen wie die Methylierung wirken auf die Chromatinstruktur und beeinflussen als epigenetische Mechanismen die Transkriptionsregulation. DOT1L ist in Prozesse der Genexpression, der Zellzyklusregulation und der DNA-Reparatur involviert (99). Im Mausmodell wurde die Bedeutung von DOT1L in der Embryonalentwicklung, der Hämatopoese und der kardialen Funktion nachgewiesen (100). DOT1L ist entscheidend an der Entwicklung einiger Leukämien beteiligt, die eine Translokation des *MLL* (mixed lineage leukemia)-Gens aufweisen (101).

1.3.1.6 Gamma-glutamyl-cyclotransferase (GGCT)

Das *GGCT*-Gen ist im Menschen auf Chromosom 7p14-15 lokalisiert und kodiert für ein Protein, das Bestandteil des Gamma-Glutamyl-Zyklus ist und die Bildung des 5-Oxoprolins aus Gamma-Glutamyl-Dipeptiden katalysiert (102). Dieser Zyklus ist an der Homöostase von Glutathion beteiligt, einem Tripeptid, das in viele bedeutende biologische Prozesse wie der DNA- und Proteinsynthese, dem Transport, der Enzymaktivität, dem Metabolismus und dem Schutz der Zelle involviert ist (103). GGCT ist in vielen Geweben exprimiert, insbesondere in Epithelien. Eine abweichende GGCT-Expression wurde in verschiedenen Tumoren beobachtet und GGCT als potentieller Tumormarker diskutiert (104).

1.3.1.7 Lamin B1 (LMNB1)

Lamine sind Hauptbestandteile der Kernmembran und an bedeutenden Prozessen wie der Kernstabilität, der Chromatinstruktur und der Genexpression beteiligt (105). Sie werden abhängig von Sequenz und Expressionsmuster in die Subtypen A und B unterteilt (106). Das auf Chromosom 5q23.2 lokalisierte Gen *LMNB1* kodiert für das Lamin B1 (107). Eine Duplikation des *LMNB1*-Locus führt zu autosomal dominanter Leukodystrophie, einer seltenen, im

Erwachsenenalter auftretenden, demyelinisierenden Erkrankung des zentralen Nervensystems (108). Im Pankreaskarzinom ist LMNB1 in die Pathogenese des Tumors involviert. Es reguliert Zellmigration, Invasion und Wachstum. Eine hohe LMNB1-Konzentration ist mit einer schlechten Prognose verbunden (105). Lamin B1 ist ebenfalls im Hepatozellulären Karzinom (HCC) überexprimiert. Die Bestimmung zirkulierender LMNB1-mRNA könnte der Früherkennung des HCC dienen (109).

1.3.1.8 Regulator of chromosome condensation 2 (RCC2)

Das *RCC2*-Gen ist auf Chromosom 1p36.13 lokalisiert. *RCC2* ist ein zentromerassoziertes Protein und in die Zellzyklusprogression involviert (110). Matsuo et al. identifizierten das im Magenkarzinomgewebe überexprimierte *RCC2* als mögliche Zielstruktur der miR-29c. Die Arbeitsgruppe konnte mittels Reporterassay eine direkte Bindung der miR-29c an die *RCC2*-mRNA nachweisen und vermutete, dass diese Interaktion zur miR-29c induzierten Wachstumsinhibierung in Magenkarzinomzellen beiträgt (111).

1.3.1.9 Thymine-DNA glycosylase (TDG)

Das auf Chromosom 12q24.1 gelegene Gen kodiert für TDG, ein Reparaturenzym, das Thymin oder Uracil aus G:T oder G:U Fehlpaarungen entfernt. Zusätzlich wird TDG eine Rolle in der aktiven DNA-Demethylierung und damit der Aufrechterhaltung des DNA-Methylierungsstatus zugeschrieben (112). Der Nachweis einer direkten *TDG*-Regulation durch die miR-29c mittels Reporterassay wurde bereits im Nasopharynxkarzinom und im Lungenkarzinom beschrieben (70, 113).

1.3.2 Funktionen der potentiellen Zielgene der miRNA 146a

1.3.2.1 Basigin (BSG)

Das auf Chromosom 19p13.3 lokalisierte Gen kodiert für Basigin, ein zur Immunglobulin-Superfamilie gehörendes Transmembranprotein. Basigin wird auch als CD147 oder EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase

inducer) bezeichnet. Es hat zahlreiche Funktionen und spielt unter anderem eine Rolle in der Spermatogenese, der Befruchtung, der Nidation, der neuronalen Entwicklung, der Thymusentwicklung und der T-Zell-Aktivierung (114). Verschiedene Erkrankungen wie zum Beispiel die rheumatoide Arthritis, die Arteriosklerose und chronische Lebererkrankungen sind mit einer vermehrten Basigin-Expression verbunden (115). Im Gewebe zahlreicher Tumore wurden erhöhte Basigin-Level gefunden. Basigin induziert Matrixmetalloproteinasen, die am Abbau der Extrazellulärmatrix beteiligt sind und stimuliert VEGF und ist so vermutlich in die Invasivität und Angiogenese verschiedener Tumoren involviert (116). Eine Überexpression des Basigins wurde auch im ALCL beobachtet (117).

1.3.2.2 Signal recognition particle receptor, B subunit (SRPRB)

Das humane *SRPRB*-Gen liegt auf Chromosom 3q22.1. SRPRB ist ein Mitglied der G-Protein-Superfamilie. Es weist eine hohe Homologie mit dem murinen SR β auf. SR β und SR α bilden in Säugetieren die Untereinheiten des SRP (signal recognition particle)-Rezeptors, der an der Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und SRP bindet. SRP erkennt den N-Terminus entstehender, sekretorischer Proteine und ist an ihrer kotranslationalen Einschleusung in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums beteiligt (118). Eine erhöhte SRPRB-Expression wurde in Karzinomen der Leber, Lunge, Mamma, des Ösophagus und des Kolons entdeckt (119).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Untersuchungen des miRNA-Expressionsprofils im ALK-positiven ALCL in unserer Arbeitsgruppe zeigte unter anderem eine charakteristisch geringe Expression der beiden miRNAs 29c und 146a im ALK-positiven ALCL im Vergleich zum ALK-negativem ALCL und T-Zellen.

Eine Transkriptomanalyse mittels Next-Generation-Sequencing nach Überexpression dieser miRNAs in den ALK-positiven ALCL-Zellen SUDHL-1 ergab zahlreiche herunterregulierte Gene. Nach Transfektion der SUDHL-1- und Karpas-299-Zellen mit der miR-29c bzw. miR-146a wurde die Expression der Gene, die zusätzlich über durch das Programm miRanda vorhergesagte miRNA-Bindungsstellen verfügten, mit einer RT-qPCR überprüft. Dabei ergaben sich unter anderem für die miR-29c *ADAM19*, *CCNF*, *CCNA2*, *COL6A3*, *DOT1L*, *GGCT*, *LMNB1*, *RCC2* und *TDG*, für die miR-146a *BSG* und *SRPRB* als potentielle Zielgene. Eine Überexpression der meisten dieser Gene wurde bereits in anderen malignen Neoplasien beobachtet und einige weisen interessante, tumorrelevante Funktionen auf (63).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer potentiell direkten Interaktion zwischen der entsprechenden miRNA und der Ziel-mRNA der identifizierten Kandidatengene. Dies sollte mithilfe eines Reporterassays erfolgen. Hierfür sollte zunächst der Teil der 3'-UTR der mRNA potentieller Zielgene, welcher die vorhergesagten Bindungsstellen für die miRNA enthielt, in einen Luciferase-exprimierenden Vektor kloniert werden. Nach Transfektion der Konstrukte und der miRNAs in Zellen und deren Lyse sollte die Luciferaseaktivität in An- und Abwesenheit der entsprechenden miRNA gemessen werden. Dies sollte Aufschluss über eine negativ regulierende Wirkung der miRNAs auf die Genexpression der Kandidaten-Zielgene ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Verzeichnis der verwendeten Geräte und Chemikalien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ethanol	Merck
Roti-Chloroform/I	Roth

2.1.2 EDV-Programme

EDV-Programm	Hersteller
GenomeLab GeXP software 10.2	Beckman Coulter
EndNote X7.1	Thomson Reuters
JMP 11	SAS
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation
MikroWin	Mikrotek

2.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K	Roth
RNase OUT	Life Technologies
Sac I	Thermo Fisher Scientific
SuperScript II Reverse Transcriptase	Life Technologies
Uracil-DNA Glycosylase	Roche

2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific
Centrifuge/Vortex Combi Spin FVL 2400	Peqlab

Gerät

Centrifuge 5402
GenomeLab GeXP Genetic Analysis System
Inkubationsschüttler
Inkubationsmischer Thriller
Inkubator B6030
Invertoscope ID 03
Megafuge 1.0
Magnetrührer MR 2000
Microwave 800
Mikrofuge 16 Centrifuge
Mini-Zentrifuge
Mixer Uzusio VTX 3000
Multifuge 1L-R Centrifuge
Nanodrop 2000 Spectrophotometer
Pipetten
Pipetten
Pipettierhilfe accu jet-pro
Thermocycler Gene Amp PCR Systems 9700
TriStar LB941
Wasserbad
Waage
Zählkammer Neubauer improved

Hersteller

Eppendorf
Beckman Coulter
Infors HT Ecotron
Peqlab
Thermo Fisher Scientific
Zeiss
Thermo Fisher Scientific
Heidolph
Severin
Beckman Coulter
Neolab Heidelberg
LMS
Thermo Fisher Scientific
Thermo Fisher Scientific
Gilson
Eppendorf
Brand GmbH und Co KG
Applied Biosystems
Berthold Technologies
GFL
Sartorius
Hecht Assistent

2.1.5 Kits**Kit**

Agencourt Clean Seq Kit
Dual-Luciferase Reporter Assay System
GenomeLab DTCS Quick Start Kit
In-Fusion HD Cloning Kit
innuPREP DOUBLEpure Kit
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit

Hersteller

Beckman Coulter
Promega
Beckman Coulter
Clontech
Analytik Jena
Macherey-Nagel

Kit

PureYield Plasmid Miniprep System
QIAamp DNA Blood Mini Kit
QuantiTect SYBR Green PCR Kit
miRNeasy MiniKit
miScript II RT Kit

Hersteller

Promega
Qiagen
Qiagen
Qiagen
Qiagen

2.1.6 Medien und Zusätze**Medien und Zusätze für Bakterienkulturen**

LE-Agarose
LB-Broth Base Medium
Ampicillin Na-Salt

Hersteller

Biozym
Thermo Fisher Scientific
Sigma-Aldrich

Medien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM (1x) + GlutaMax - I
Opti-Mem I
FCS Fetal Bovine Serum Gold
Penicillin/Streptomycin

Life Technologies
Life Technologies
PAA
Life Technologies

2.1.7 Plasmide und Bakterien**Bakterien**

Stellar Competent Cells

Hersteller

Clontech

Plasmid

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target
Expression Vektor

Promega

2.1.8 Primer

Primer

Hersteller

10x miScript Universal Primer

Qiagen

Hs_RNU6-2_1

Hs_miR-29c_1

Hs_miR-146a_1

Primer für die cDNA-Synthese

Random-Primer

Roche

Oligo dT

Promega

Primer für die Insertsynthese

Sigma-Aldrich

ADAM19inf_F

TTAGTTGTTTAAACGAGGGGAGAGTATGAGGAG

ADAM19inf_R

GACTCGAGGCTAGCGGCCGACTGTGAGAGAGGA

CCNA2inf_F

TTAGTTGTTTAAACGGGGTTCTCAGAATGGAATAA

CCNA2inf_R

GACTCGAGGCTAGCGACAGAACACAGACCACCAG

CCNFinf_F

TTAGTTGTTTAAACGCCCACTTCGGTCTCCCAA

CCNFinf_R

GACTCGAGGCTAGCGGGACGGGTCTACAGTTCC

COL6A3inf_F

TTAGTTGTTTAAACGCCATCGCCA ACTTGTCTC

COL6A3inf_R

GACTCGAGGCTAGCGCAGGCATAACATGAAACTCC

DOT1Linf_F

TTAGTTGTTTAAACGTAAGTGGTAAAAGGCAACTTA

DOT1Linf_R

GACTCGAGGCTAGCGTGCCATCAACCCTGTGGC

GGCTinf_F

TTAGTTGTTTAAACGGGGTGTATGAGGGCCTGA

GGCTinf_R

GACTCGAGGCTAGCGTCAGACAGAGCAGAGCAAT

Primer**Hersteller**Primer für die Insertsynthese

Sigma-Aldrich

LMNB1inf_F	TTAGTTGTTTAAACGTCTTATGAGGAGGGGAGG
LMNB1inf_R	GACTCGAGGCTAGCGGAGTGCTTACATGGTGATTA
RCC2inf_F	TTGATTGTTTAAACGGTTATGAGGTGCCTTTCCC
RCC2inf_R	GACTCGAGGCTAGCGTTCCTCCATCCACCCAAGTC
TDGinf_F	TTAGTTGTTTAAACGACAGGAAGAAGAAAGCCATG
TDGinf_R	GACTCGAGGCTAGCGTGCTCCTAATCCCTGATGC
BSGinf_F	TTAGTTGTTTAAACGCTCCCTGCTCCACGTCTG
BSGinf_R	GACTCGAGGCTAGCGCGGGCTCTCGTGAAACAC
SRPRBinf_F	TTAGTTGTTTAAACGAGGAAGGGGTACAAGATGT
SRPRBinf_R	GACTCGAGGCTAGCGAGACAGGCTGTTTTCTTTAC

Primer für die Sequenzierung

Sigma-Aldrich

pmirGlo_F	TGACCGGCAAGTTGGACGCC
pmirGlo_R	GGCCGCCCAAGGGGTTATG

TaqMan Assays

TaqMan GAPDH-Control Reagents (Human)	Life Technologies
TaqMan TBPGene Assay	Roche

2.1.9 Puffer

Puffer		Hersteller
<u>PBS-Puffer, 0,01 M, pH 7,4</u>	<u>1 l</u>	
50 mM Phosphatpuffer	5 Phosphate buffered saline tablets	Sigma-Aldrich
<u>1x TBE-Puffer</u>	<u>1 l</u>	
89 mM TRIS	10,8 g TRIS	Sigma-Aldrich
89 mM Borsäure	5,5 g Borsäure	Merck
2,5 mM EDTA	0,93 g EDTA	AppliChem
<u>TE-Puffer, pH8</u>	<u>10 ml</u>	
1 mM EDTA-disodium salt	20 µl 0,5 M EDTA-disodium salt solution	Sigma-Aldrich
10 mM TRIS-Hydrochloride	100 µl 1 M Trizma hydrochloride buffer solution	Sigma-Aldrich

2.1.10 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
0,05% Trypsin-EDTA (1X), phenol red	Life Technologies
5x First-Strand Buffer	Life Technologies
5x Phusion HF buffer incl. MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific
6x DNA loading dye	Thermo Fisher Scientific
Buffer Ecl 136 II, Sac I	Thermo Fisher Scientific
dNTPs	Thermo Fisher Scientific
DTT	Life Technologies
Gel Red	Biotium
GeneRuler 100bp DNA ladder	Thermo Fisher Scientific

Reagenz	Hersteller
GeneRuler 1kb DNA ladder	Thermo Fisher Scientific
HiPerfect Transfection Reagent	Qiagen
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific
miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2 (GAPD)	Thermo Fisher Scientific
miRIDIAN microRNA Mimic miRNA 146a-5p	Thermo Fisher Scientific
miRIDIAN microRNA Mimic miRNA 29c-3p	Thermo Fisher Scientific
Probes Master	Roche
Trypanblau	Sigma-Aldrich

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Für die Versuche wurden Verbrauchsmaterialien der Firmen Becton Dickinson, Eppendorf, Hartmann, Lab Ware, Neolab, Peqlab, Sarstedt und Thermo Fisher Scientific verwendet.

2.1.12 Zellen

HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinomzellen)

HEK293T-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)

2.1.13 Hersteller

Hersteller	Standort
Analytik Jena	Jena
AppliChem	Darmstadt
Applied Biosystems	Darmstadt
Beckman Coulter	Krefeld
Biotium	Hayward, USA
Biozym	Hessisch Oldendorf
Brand GmbH und Co KG	Wertheim

Hersteller

Clontech

Eppendorf
GFL
Hecht Assistent
Heidolph
Heraeus
Infors HT Ecotron
Life Technologies
LMS
Macherey Nagel
Merck
Microsoft Corporation
Neolab Heidelberg
PAA
Peqlab
Promega
Qiagen
Roche
Roth
Sarstedt
Sartorius
SAS
Severin
Sigma-Aldrich
Thermo Fisher Scientific
Thomson Reuters
Zeiss

Standort

Saint-Germain-en-Laye,
Frankreich
Hamburg
Burgwedel
Sondheim/Rhön
Schwabach
Hanau
Bottmingen
Darmstadt
Tokio, Japan
Düren
Darmstadt
Redmond, USA
Heidelberg
Cölbe
Erlangen
Madison, USA
Hilden
Penzberg
Karlsruhe
Nümbrecht
Göttingen
Cary, USA
Sundern
Steinheim
Waltham, USA
New York, USA
Oberkochen

2.2 Klonierung der 3`-UTR der potentiellen Zielgene in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor

2.2.1 Präparation des Vektors

Für die Klonierung wurde der pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor von Promega genutzt. Dieser Vektor verfügt unter anderem über ein Firefly-Luciferase-Gen und eine humanisierte Renilla Luciferase-Neomycin Resistenzkassette. Um einen Teil der 3`-UTR der mRNA verschiedener Gene an das 3`-Ende des Firefly-Luciferase-Gens zu klonieren, wurde das Plasmid mittels SacI-Restriktionsverdau linearisiert (Tabelle 1). Der Restriktionsverdau erfolgte für 2 h bei 37°C.

Tabelle 1: Linearisierung des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektors mit SacI

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen [μ l]
SacI	10 U/ μ l	2
Buffer Ecl 136II, SacI	10x	2
Plasmid	489,4 ng/ μ l	16
Gesamtvolumen		20

Anschließend wurde der Restriktionsverdau in einem 1,0%igen Agarosegel bei 140 mV elektrophoretisch aufgetrennt. Die analog zum Größenmarker bei ca. 7,3 kb verlaufende Bande wurde ausgeschnitten und mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit von Analytik Jena nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration des linearisierten und aufgereinigten Vektors wurde am Nanodrop 2000 vermessen.

2.2.2 Präparation der Inserts

Die Inserts stellen einen Teil der 3`-UTR der Kandidatengen-mRNA dar und enthalten die Bindungsstellen für die miRNA. Sie wurden wie in Tabelle 2 beschrieben mittels PCR aus der DNA humaner Lymphozyten amplifiziert. Die verwendeten Primer (2.1.8) wurden mithilfe des In-Fusion Primer design Programms (Clontech) designet.

Tabelle 2: PCR zur Amplifikation der Inserts

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen [μ l]
Phusion HF buffer incl. $MgCl_2$	5x	5,00
dNTPs	10 mM	0,50
Primer F	10 μ M	0,60
Primer R	10 μ M	0,60
Lymphozyten-DNA	50 ng/ μ l	2,00
Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/ μ l	0,25
ddH ₂ O		16,05
Gesamtvolumen		25,00
Programm		
Temperatur	Zeit	
98°C	2 min	
98°C	20 s	} 38 Zyklen
52°C	60 s	
72°C	90 s	
72°C	10 min	
12°C	∞	

Zur Überprüfung der Amplifikation der PCR-Produkte wurden jeweils 10 μ l des PCR-Ansatzes in einem 1,5%igen Agarosegel bei 140 mV gelelektrophoretisch aufgetrennt. Traten zusätzlich zu den der Basenpaarlänge entsprechend spezifischen Produkten unspezifische Banden auf, wurde das Produkt mit der richtigen Größe aus dem Gel ausgeschnitten. Die anderen Produkte wurden direkt aufgereinigt. Dies erfolgte mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel nach Protokoll des Herstellers. Anschließend erfolgte die Vermessung der DNA-Konzentration am Nanodrop 2000.

2.2.3 In-Fusion-Klonierung, Transformation und DNA-Extraktion

Die Klonierung der potentiellen miRNA-Zielregionen in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor erfolgte mit dem In-Fusion HD Cloning Kit von Clontech. Es wurden pro Reaktion 209,2 ng des linearisierten und aufgereinigten Vektors eingesetzt. Die DNA-Menge der Inserts wurde, wie vom Hersteller empfohlen, in Abhängigkeit von deren Größe gewählt (Tabelle 3). Die Ansätze wurden 15 min bei 50°C inkubiert und anschließend für die Transformation 1:10 mit TE-Puffer, pH 8, verdünnt.

Tabelle 3: Klonierung der Inserts in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen [μ l]
Infusion HD Enzyme Premix	5x	2,0
Linearisierter pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor	104,6 ng/ μ l	2,0
Insert:		
ADAM19	53,3 ng/ μ l	2,0
CCNA2	13,8 ng/ μ l	4,0
CCNF	22,4 ng/ μ l	3,0
COL6A3	32,2 ng/ μ l	2,0
DOT1L	28,6 ng/ μ l	4,0
GGCT	36,6 ng/ μ l	2,0
LMNB1	29,1 ng/ μ l	2,0
RCC2	23,4 ng/ μ l	3,0
TDG	62,9 ng/ μ l	1,6
BSG	27,2 ng/ μ l	2,0
SRPRB	53,0 ng/ μ l	2,0
ddH ₂ O		ad 10,0
Gesamtvolumen		10,0

Die die miRNA-Zielregionen enthaltenden Vektoren wurden in Stellar Competent Cells transformiert. Dabei wurden 5 ng DNA in entsprechendem Volumen jeweils zu 50 μ l Bakterien pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s im Wasserbad. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden jeweils 450 μ l auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium zugefügt und die Ansätze für 1 h bei 37°C und 220 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l pro Ansatz auf Agarplatten mit einer Ampicillinkonzentration von 100 μ g/ml ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nach 16 h Inkubationszeit bei 37°C wurden pro Konstrukt zwischen drei und zwölf Kolonien gepickt und in jeweils 3 ml LB-Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 100 μ g/ml übertragen. Die Ansätze wurden 24 h bei 37°C und 220 rpm schüttelnd inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die DNA-Isolation mit dem PureYield Plasmid Miniprep System von Promega nach Protokoll des Herstellers. Die Vermessung der DNA-Konzentration erfolgte am Nanodrop 2000.

2.2.4 Überprüfung der Klonierung

2.2.4.1 Screening-PCR

Zur Überprüfung des korrekten Einbaus der Inserts wurde zunächst orientierend eine PCR unter Verwendung der Sequenzierprimer durchgeführt (Tabelle 4). Der Forward-Primer lagerte sich 132 bp vor der SacI-Schnittstelle an, der Reverse-Primer 95 Basenpaare nach der Schnittstelle, sodass sich bei einer Religation des Vektors eine Produktgröße von 227 bp ergab. Bei korrektem Einbau des Inserts wurde die Produktgröße um die Größe des Inserts verlängert.

Tabelle 4: PCR zur Überprüfung der Klonierung

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Volumen [μ l]
Phusion HF buffer incl. $MgCl_2$	5x	5,00
dNTPs	10 mM	0,50
Primer F	10 μ M	0,60
Primer R	10 μ M	0,60
Linearisierter Vektor bzw. Klon-DNA	10 ng/ μ l	1,00
Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/ μ l	0,25
ddH ₂ O		17,05
Gesamtvolumen		25,00
Programm		
Temperatur	Zeit	
98°C	2 min	
98°C	20 s	} 38 Zyklen
60°C	60 s	
72°C	90 s	
72°C	10 min	
12°C	∞	

Die PCR-Ansätze wurden in einem 1,5%igen Agarosegel bei 140 mV elektrophoretisch aufgetrennt. Im Vergleich mit dem nicht linearisierten Vektor als Kontrolle ließ sich anhand der Basenpaarlängen der PCR-Produkte eine erste Aussage treffen, ob die Klonierung erfolgreich war.

2.2.4.2 Sequenzierung der selektierten Klone

Um den Einbau des entsprechenden Inserts zu kontrollieren und die Sequenz der miRNA-Bindungsstellen zu überprüfen, wurde pro Konstrukt ein per PCR selektierter Klon sequenziert. Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem GenomeLab DTCS Quick Start Kit von Beckman Coulter, das die Kettenabbruchmethode nach Sanger mittels unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide nutzt (Tabelle 5). Als Primer wurden die Sequenzierprimer verwendet.

Es wurden zunächst 400 ng DNA pro Reaktion eingesetzt. Das schwache Signal machte im weiteren Verlauf bei einigen Konstrukten eine Steigerung auf bis zu 600 ng pro Reaktion nötig. Bei einem Konstrukt (pmirGLO + CCNF) war es erforderlich, die DNA vor Einsetzen in die Sequenzierreaktion bei 65°C 5 min zu denaturieren.

Tabelle 5: Sequenzierreaktion mit dem GenomeLab DTCS Quick Start Kit

Reagenz		Volumen [μ l]
DTCS Mix		2,0
Konstrukt	DNA-Menge [ng]	
pmirGLO + ADAM19	400	1,3
pmirGLO + CCNA2	400	1,6
pmirGLO + CCNF	500	1,8
pmirGLO + COL6A3	400	1,5
pmirGLO + DOT1L	600	1,3
pmirGLO + GGCT	400	1,6
pmirGLO + LMNB1	600	2,3
pmirGLO + BSG	400	1,4
pmirGLO + SRPRB	600	3,5
Primer pmirGlo F oder R (10 μ M)		1,0
ddH ₂ O		ad 10,0
Gesamtvolumen		10,0
Programm		
Temperatur	Zeit	
96°C	20 s	} 30 Zyklen
50°C	20 s	
60°C	4 min	

Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung mit dem Agencourt Clean Seq Kit von Beckman Coulter, das die Bindung der DNA an Magnetbeads nutzt. Zu 10 µl der Sequenzierreaktion wurden 10 µl Clean-Seq und 42 µl 85%iges Ethanol zugefügt und gemischt. Anschließend wurde der Ansatz 3 min auf einer Magnetplatte inkubiert. Die Flüssigkeit wurde danach abgesaugt. Dann wurde mit 100 µl 85%igem Ethanol gewaschen und der Rest des Alkohols komplett entfernt. Die Resuspension erfolgt mit 40 µl SLS (Sample Loading Solution).

Anschließend wurden die Ansätze in eine 96-Well-Sequenzierplatte überführt, bis zur Pelletbildung auf eine Magnetplatte gestellt und mit einem Tropfen Mineraloil überschichtet. Eine 96-Well-Puffer-Platte wurde entsprechend der Probenbelegung in der Sequenzierplatte mit Separation-Buffer befüllt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem GeXP-Sequencer von Beckman Coulter. Die anschließende Analyse wurde mit dem GenomeLab GeXP Genetic Analysis System von Beckman Coulter durchgeführt.

Bei zwei Konstrukten (pmirGLO + TDG und pmirGLO + RCC2) war eine Sequenzierung nach diesem Protokoll nicht erfolgreich. Sie wurden extern sequenziert (Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Uniklinikum Tübingen; Applied Biosystems 3130 xL Genetic Analyzer).

2.3 Transfektion der pmirGLO-Konstrukte und der miRNA-Mimic-29c bzw. miRNA-Mimic-146a in HEK293T-Zellen

2.3.1 Kultivierung der Zellen

Es wurden HEK293T-Zellen und HeLa-Zellen kultiviert.

Die Zellen wurden aufgetaut und unmittelbar in 10 ml DMEM mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) gegeben und anschließend bei 700 rpm 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml DMEM mit 10% FCS und 1% P/S resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit 175 cm² Oberfläche überführt. Dazu wurden 20 ml DMEM mit 10% FCS und 1% P/S gegeben. Am nächsten

Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen täglich mikroskopisch kontrolliert und bei konfluierendem Wachstum gesplittet.

2.3.2 Relative Quantifizierung der basalen Expression der miRNAs 29c und 146a in HEK293T- und HeLa-Zellen

2.3.2.1 Herstellung von Zellpellets für die miRNA-Extraktion

Zunächst wurden Zellpellets hergestellt, um daraus die miRNA mit dem miRNeasy MiniKit von Qiagen zu extrahieren. Ein Pellet durfte laut Herstellerangaben die Anzahl von 7×10^6 Zellen nicht übersteigen um die verwendeten Säulen nicht zu überladen. Dies erforderte eine Zellzählung.

Dafür wurden die Zellen nach dem Waschen mit 5 ml PBS mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Die Reaktion wurde mit 8 ml DMEM mit 10% FCS und 1% P/S gestoppt. Ein Teil der Zellsuspension wurde mit Trypanblau gefärbt und die lebenden Zellen anschließend in der Neubauer-Zählkammer über 4 Quadrate ausgezählt. Um die Zellzahl in 10^4 /ml zu erhalten, wurde die durchschnittliche Anzahl Zellen pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Aus der Konzentration der Zellsuspension wurde das benötigte Volumen berechnet und in ein 15 ml-Polypropylenröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden mit 4°C kaltem PBS auf 10 ml aufgefüllt und 5 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml 4°C kühlem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte ein weiterer fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 rpm.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet bei -80°C eingefroren, um die miRNA-Gewinnung zu einem späteren Zeitpunkt fortzusetzen.

2.3.2.2 miRNA-Extraktion

Die miRNA-Extraktion wurde mit dem miRNeasy MiniKit von Qiagen nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wird neben der miRNA auch die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA-Konzentration wurde anschließend am Nanodrop 2000 vermessen.

2.3.2.3 Reverse Transkription der miRNA in cDNA

500 ng der extrahierten RNA der HEK293T-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit dem miScript II RT Kit von Qiagen, wie in Tabelle 6 aufgeführt, in cDNA revers transkribiert. Die Proben wurden im Anschluss mit 80 µl nukleasefreiem Wasser 1:5 verdünnt.

Tabelle 6: Reverse Transkription von miRNA in cDNA mit dem miScript II RT Kit

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen [µl]
miScript HiSpec Buffer	5x	4,0
miScript Nucleics Mix	10x	2,0
miScript RT-Mix		2,0
Template miRNA	440,7 ng/µl	1,1
ddH ₂ O		10,9
Gesamtvolumen		20,0
Programm		
Temperatur	Zeit	
37°C	1 h	
95°C	5 min	
4°C	∞	

2.3.2.4 Relative Quantifizierung der basalen Expression der miRNAs 29c und 146a bei HEK293T- und HeLa-Zellen im Vergleich zu SUDHL-1-Zellen

Die relative Quantifizierung der basalen Expression der miR-29c und miR-146a in HEK293T- und HeLa-Zellen erfolgte mit einer RT-qPCR unter Verwendung des QuantiTect SYBR Green PCR Kits von Qiagen. SYBR Green ist ein Fluoreszenz-emittierender Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und somit durch Messung des Fluoreszenzsignals eine Quantifizierung der DNA erlaubt. Als Vergleich diente cDNA der ALK-positiven ALCL-Zelllinie SUDHL-1. Die RT-qPCR-Reaktion wurde mit den Zelllinien wie in Tabelle 7 beschrieben in Duplikaten durchgeführt. Zur Normalisierung wurde RNU6B amplifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.

Tabelle 7: Relative Quantifizierung der miR-146a und miR-29c mittels RT-qPCR

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen [μ l]
miScript Universal Primer	10x	2
miScript Primer assay (RNUB6 bzw. miRNA29c bzw. miRNA 146a)	10x	2
Template cDNA	5 ng/ μ l	2
QuantiTect Sybr Green PCR MM	2x	10
ddH ₂ O		4
Gesamtvolumen		20
Programm		
Temperatur	Zeit	
95°C	15 min	
95°C	15 s	} 55 Zyklen
55°C	30 s	
70°C	30 s	
60°C bis 97°C	Schmelzkurve	

2.3.3 Etablierung der Transfektionsbedingungen

2.3.3.1 Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor und der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2

Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). Die Lipofektion nutzt Liposomen, um Nukleinsäuren in Zellen zu schleusen. Lipofectamine 2000 enthält kationische Lipide, die mit den anionischen Nukleinsäuren komplexiert werden.

Die Zellen wurden zunächst in einer Dichte von 4×10^5 Zellen/Well in einer 12-Well-Platte ausgesät. Hierfür wurden HEK293T-Zellen in einer Zellkulturflasche abtrypsiniert, resuspendiert und gezählt (2.3.2.1). Das benötigte Volumen der Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Polypropylenröhrchen überführt und bei 700 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in DMEM mit 10% FCS und 1% P/S resuspendiert. 1 ml der Lösung wurde jeweils in ein Well der 12-Well-Platte pipettiert.

Nach 16 h Inkubation wurde das Medium (DMEM mit 10% FCS und 1% P/S) abgesaugt und gegen 1 ml DMEM ohne Zusatz des FCS und Antibiotikums

ausgetauscht. Nach 1 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Transfektion. Zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen wurden verschiedene Mengen des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektors mit unterschiedlichen Volumina Lipofectamine 2000 transfiziert (Tabelle 8). Als miRNA wurde die miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2 von Thermo Fisher Scientific verwendet, die eine Herunterregulation der GAPDH-mRNA bewirkt.

Tabelle 8: Etablierung der Transfektionsbedingungen

Ansatz	Volumen Lipofectamine 2000 [µl]	Volumen miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2 (c=20µM) [µl]	Menge pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor [µg]
1	4	16	1,6
2	6	16	2,0
3 (unbehandelte Kontrolle)	0	0	0

Jeweils 100 µl Opti-Mem I wurden mit 16 µl miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2 sowie der entsprechenden Vektormenge versetzt. Lipofectamine 2000 wurde mit 100 µl Opti-Mem I verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die beiden Ansätze wurden gemischt und zur Komplexbildung 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze vorsichtig in jeweils ein Well mit HEK293T-Zellen gegeben, geschwenkt und 6 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 120 µl FCS.

2.3.3.2 Zellpellets für DNA- und RNA-Extraktion

Nach 16 h Inkubation der Zellen wurden Zellpellets zur RNA- und DNA-Extraktion gewonnen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS sehr vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden 0,5 ml Trypsin-EDTA und nach Ablösen der Zellen 0,5 ml DMEM mit 10% FCS und 1% P/S zugefügt. Diese Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde das Zellpellet in 1 ml 4°C kaltem PBS resuspendiert und auf zwei 1,5 ml-

Reaktionsgefäße aufgeteilt. Danach erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen.

Die Zellpellets wurden bei -80°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet.

2.3.3.3 DNA-Extraktion und Überprüfung der Transfektion des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektors

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) und wurde nach dem Protokoll des Herstellers für kultivierte Zellen durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde am Nanodrop 2000 vermessen und die Proben auf eine Konzentration von 0,4 ng/µl verdünnt.

Anschließend wurde eine RT-qPCR mit dem QuantiTect Sybr Green PCR Kit von Qiagen durchgeführt um den Transfektionserfolg zu beurteilen (Tabelle 9). Dafür wurden die Sequenzierprimer verwendet.

Tabelle 9: DNA-Quantifizierung nach Transfektion

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen [µl]
Primer pmirGlo F	10 µM	2
Primer pmirGlo R	10 µM	2
Template cDNA	0,4 ng/µl	2
QuantiTect Sybr Green PCR MM	2x	10
ddH ₂ O		4
Gesamtvolumen		20
Programm		
Temperatur	Zeit	
95°C	15 min	
95°C	15 s	} 52 Zyklen
60°C	90 s	
70°C	1 s	
60°C bis 97°C	Schmelzkurve	

Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Ct-Werte zwischen den unterschiedlich transfizierten Zellen und der unbehandelten Kontrolle.

2.3.3.4 RNA-Extraktion und Überprüfung der Transfektion der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy MiniKit von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die RNA-Konzentration wurde am Nanodrop 2000 gemessen.

Anschließend wurde die cDNA-Synthese mit der SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) durchgeführt. Zunächst lagerten sich die Primer an die RNA an (Tabelle 10). Daraufhin erfolgte die eigentliche reverse Transkription (Tabelle 11). Danach wurden die Proben mit 80 µl nukleasefreiem Wasser 1:5 verdünnt, um eine Konzentration von 2,5 ng/µl zu erhalten.

Tabelle 10: Primer-Anlagerung an RNA

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen [µl]
Random-Primer pd(N) ₆	1 ng/µl	1
Oligo dT	500 ng/µl	1
RNA	50 ng/µl	5
Gesamt		7
Programm		
Temperatur	Zeit	
70°C	2 min	
20°C	10 min	

Tabelle 11: cDNA-Synthese mit Superscript II Reverse Transcriptase

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen [µl]
First-Strand Buffer	5x	4
DTT	0,1 M	2
dNTPs	10 mM	1
RNAse Out	40 U/µl	1
Superscript II Reverse Transcriptase	200 U/µl	1
ddH ₂ O		4
Gesamtvolumen		20
Programm		
Temperatur	Zeit	
42°C	1 h	
95°C	5 min	

Im Anschluss wurde eine RT-qPCR mit TaqMan-Sonden zur Bestimmung der GAPDH-mRNA-Level durchgeführt. Als TaqMan-Sonden werden Oligonukleotide bezeichnet, die an einem Ende ein Donor-Fluorochrom (Reporter) und am entgegengesetzten Ende ein Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) besitzen. Wird das Donor-Fluorochrom durch eine bestimmte Lichtwellenlänge angeregt, so nimmt das Akzeptorfluorochrom bei räumlicher Nähe einen Teil der Energie auf. Eine Zunahme des räumlichen Abstands zwischen Reporter und Quencher bei Abbau durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase bei DNA-Synthese resultiert in einer Steigerung der Reporterfluoreszenz. Diese Fluoreszenz wird gemessen und erlaubt Rückschlüsse auf die entstandene DNA-Menge.

Die RT-qPCR wurde wie in Tabelle 12 dargestellt in Duplikaten durchgeführt. Normalisiert wurde mit TBP (TATA-box binding protein). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.

Tabelle 12: RT-qPCR mit TaqMan-Sonden zur Ermittlung der GAPDH-mRNA-Level

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen [μ l]
Uracil-DNA Glycosylase	2 U/ μ l	0,2
Assay (GAPDH bzw. TBP)	10x	2,0
Probes Master	2x	10,0
cDNA	2,5 ng/ μ l	4,0
ddH ₂ O		3,8
Gesamtvolumen		20,0
Programm		
Temperatur	Zeit	
40°C	10 min	
95°C	10 min	
95°C	15 s	} 55 Zyklen
60°C	1 min	

2.3.4 Transfektion der HEK293T- Zellen mit miRNA-Mimic 29c bzw. miRNA-Mimic 146a und pmirGLO-Konstrukten

Zunächst wurden 4×10^5 HEK293T-Zellen/Well in 29 Wells dreier 12-Well-Platten ausgesät. Diese Zellen wurden nach 20 h Inkubationszeit bei 37°C und

5% CO₂ mit 2 µg Vektor-DNA sowie 16 µl miRIDIAN microRNA Mimic miRNA 146a bzw. miRNA 29c mit 6 µl Lipofectamine 2000 transfiziert (Tabelle 13).

Tabelle 13: Transfektion der HEK293T-Zellen

	Ansatz	Vektor-DNA	miRIDIAN microRNA Mimic	Volumen Lipofectamine 2000 [µl]
1	Unbehandelte Kontrolle			
2	Lipofectamine 2000			6
3	miRNA 29c		miRNA 29c	6
4	miRNA 146a		miRNA 146a	6
5	Vektor	pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor		6
6	Vektor + miRNA 29c	pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor	miRNA 29c	6
7	Vektor + miRNA 146a	pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor	miRNA 146a	6
8	Vektor + ADAM19	pmirGLO + ADAM19		6
9	Vektor + ADAM19 mit miRNA 29c	pmirGLO + ADAM19	miRNA 29c	6
10	Vektor + CCNA2	pmirGLO + CCNA2		6
11	Vektor + CCNA2 mit miRNA 29c	pmirGLO + CCNA2	miRNA 29c	6
12	Vektor + CCNF	pmirGLO + CCNF		6
13	Vektor + CCNF mit miRNA 29c	pmirGLO + CCNF	miRNA 29c	6
14	Vektor + COL6A3	pmirGLO + COL6A3		6
15	Vektor + COL6A3 mit miRNA 29c	pmirGLO + COL6A3	miRNA 29c	6
16	Vektor + DOT1L	pmirGLO + DOT1L		6
17	Vektor + DOT1L mit miRNA 29c	pmirGLO + DOT1L	miRNA 29c	6
18	Vektor + GGCT	pmirGLO + GGCT		6
19	Vektor + GGCT mit miRNA 29c	pmirGLO + GGCT	miRNA 29c	6
20	Vektor + LMNB1	pmirGLO + LMNB1		6
21	Vektor + LMNB1 mit miRNA 29c	pmirGLO + LMNB1	miRNA 29c	6
22	Vektor + RCC2	pmirGLO + RCC2		6
23	Vektor + RCC2 mit miRNA 29c	pmirGLO + RCC2	miRNA 29c	6
24	Vektor + TDG	pmirGLO + TDG		6
25	Vektor + TDG mit miRNA 29c	pmirGLO + TDG	miRNA 29c	6
26	Vektor + BSG	pmirGLO + BSG		6
27	Vektor + BSG mit miRNA 146a	pmirGLO + BSG	miRNA 146a	6
28	Vektor + SRPRB	pmirGLO + SRPRB		6
29	Vektor + SRPRB mit miRNA 146a	pmirGLO + SRPRB	miRNA 146a	6

Nach weiteren 20 h wurden die Zellen abtrypsiniert, gezählt und in Triplikaten à 3×10^4 Zellen/Well in 180 µl DMEM mit 10% FCS und 1% P/S in einer 96-Well-Platte ausgesät.

2.4 Reporterassay

Das Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega basiert auf der Messung der Firefly-Luciferase- und der Renilla-Luciferase-Aktivität. An das 3`-Ende des Firefly-Luciferase-Gens, das im pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor enthalten ist, wurde jeweils der 3`-UTR-Genabschnitt der Kandidatengene, der durch das miRanda-Programm vorhergesagte Bindungsstellen der entsprechenden miRNA enthält, kloniert. Bindet nach Transfektion die miRNA an die Zielstruktur, resultiert dies in der Degradierung der mRNA oder in translationaler Repression. Dies führt zu einer verminderten Firefly-Luciferase-Aktivität. Die Aktivität der Renilla-Luciferase bleibt davon unbeeinflusst und kann so zur Normalisierung genutzt werden. Nach Lyse der Zellen kann dies mit einem Luminometer erfasst werden.

Das Medium der in den 96-Well-Platten ausgesäten Zellen wurde nach 20 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ abgesaugt und die Zellen mit 180 µl PBS gewaschen. 20 µl 1x Passive Lysis Buffer wurden pro Well zugefügt. Danach wurde die Platte 15 min auf einer Wippe inkubiert. Nach vollständiger Lyse wurde der Reporterassay durchgeführt.

Zunächst wurde den Zelllysaten 100 µl Luciferase Assay Reagent zugefügt. Dies enthielt Beetle Luciferin, das Substrat der Firefly-Luciferase. Anschließend wurde die Lumineszenz gemessen. In einem darauffolgenden Schritt wurden 100 µl Stop and Glo Reagent zugefügt. Dies beinhaltete Coelenterazine, das Substrat der Renilla-Luciferase, sowie eine Firefly-Luciferase supprimierende Substanz. Anschließend wurde die Lichtemission erneut gemessen. Das Pipettieren und die Messung wurden mit dem TriStar LB941 (Berthold Technologies) mit dem in Tabelle 14 benannten Programm durchgeführt.

Tabelle 14: Programm des TriStar LB941 von Berthold Technologies

Programm
100 µl Luciferase Assay Reagent II
2 s schütteln
10 s Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität
100 µl Stop and Glo Reagent
2 s schütteln
10 s Messung der Renilla-Luciferase-Aktivität

Es ergaben sich pro Probe jeweils ein Messwert für die Lumineszenz nach Zugabe des Luciferase Assay Reagent und des Stop and Glo Reagent. Um die Hintergrundlumineszenz während der Messung der Firefly-Luciferase nicht in die Berechnung einfließen zu lassen, wurde der Mittelwert der in Triplikaten angesetzten unbehandelten Kontrolle berechnet und von allen Messwerten abgezogen. Die Hintergrundaktivität der Renilla-Luciferase wurde auf die entsprechende Weise eliminiert. Um die Messwerte zu normalisieren und so Unterschiede zwischen der Transfektionseffizienz nicht zu berücksichtigen, wurde der Firefly-Luciferase-Messwert jeder Probe durch ihren zugehörigen Renilla-Luciferase-Messwert dividiert.

Der Vergleich der aus den Triplikaten gebildeten Mittelwerte erfolgte mit dem Wilcoxon-Test mithilfe der JMP 11-Software. Als statistisch signifikant wurden Veränderungen mit einem p-Wert $\leq 0,05$ angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung der 3`-UTR der potentiellen Zielgene in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor

3.1.1 Überprüfung der Klonierung

3.1.1.1 Kontrolle des linearisierten Vektors und der amplifizierten Inserts vor Einsatz in die Klonierungsreaktion

Vor Einsatz des linearisierten Vektors und der amplifizierten Inserts in die Klonierungsreaktion wurden diese über eine elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel überprüft.

Der Größenvergleich des linearisierten pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektors mit dem Marker auf dem 1,0%igen Agarosegel ließ auf eine Übereinstimmung mit der tatsächlichen Größe von 7350 bp schließen (nicht gezeigt). Nach Auftrennung der per PCR amplifizierten Inserts in einem 1,5%igen Agarosegel wurde die Größe des entstandenen Produkts mit der anhand des PCR-Designs zu erwartenden Produktlänge verglichen (Tabelle 15). Bei der Amplifikation der 3`-UTR von CCNF, GGCT und BSG traten zusätzliche, unspezifische Banden auf (Abbildung 3). In diesen Fällen wurde das PCR-Produkt mit der richtigen Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit von Analytik Jena extrahiert.

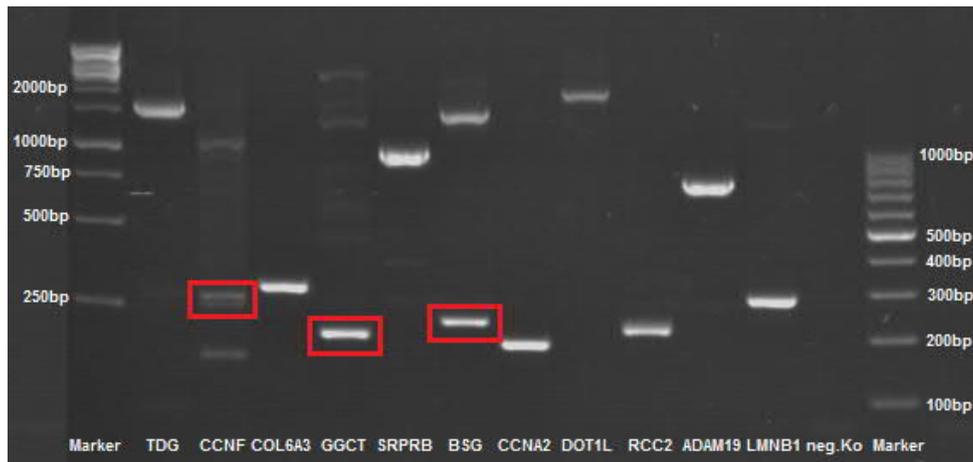


Abbildung 3: Gelelektrophoretische Auftrennung der per PCR amplifizierten Inserts

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1,5%igen Agarosegel bei 140 mV. Bei der Amplifikation der 3`-UTR der mRNA von CCNF, GGCT und BSG traten zusätzliche Banden auf. Die auf der richtigen Höhe verlaufenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten (rote Markierung). neg. Ko Negativkontrolle.

Tabelle 15: Produktgrößen der amplifizierten Inserts

Insert	Anhand des PCR-Designs berechnete Größe	Ungefähr abgeschätzte Größe auf dem Gel
TDG	1479 bp	1500 bp
CCNF	245 bp	1000 bp/ 260 bp/ 150 bp
COL6A3	268 bp	270 bp
GGCT	166 bp	200 bp
SRPRB	917 bp	1000 bp
BSG	197 bp	200 bp/ 1500 bp
CCNA2	153 bp	190 bp
DOT1L	1438 bp	1700 bp
RCC2	187 bp	200 bp
ADAM19	675 bp	750 bp
LMNB1	255 bp	300 bp

3.1.1.2 Screening-PCR

Um eine erste Aussage treffen zu können, ob die Klonierung erfolgreich war, wurde eine Screening-PCR mit der aus den Klonen extrahierten Plasmid-DNA durchgeführt.

Die mit dem unverdauten pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor als Template durchgeführte PCR lieferte das Produkt mit einer Größe von 227 bp, das basierend auf der Lokalisation der Primer ohne ein Insert zu

erwarten war. Bei korrektem Einbau des jeweiligen Inserts wurde das Produkt um dessen Größe verlängert (Tabelle 16). Nach Auftragen der PCR-Produkte auf ein 1,5%iges Agarosegel und elektrophoretischer Auftrennung bei 140 mV konnte durch den Größenvergleich der PCR-Produkte eine Auswahl positiver Klone getroffen werden (Abbildung 4). Für alle Konstrukte konnte so jeweils ein Klon ausgewählt werden, der anschließend sequenziert wurde.

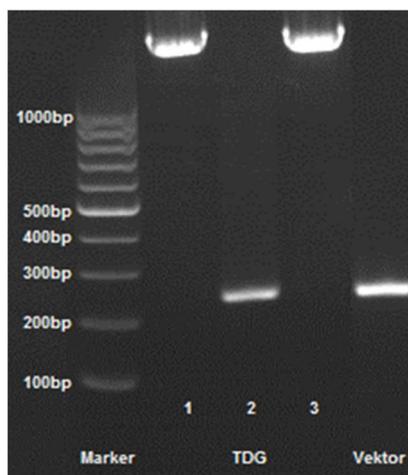


Abbildung 4: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der Screening-PCR am Beispiel des pmirGLO-Konstrukts nach Integration der 3'-UTR der TDG-mRNA

Für die Screening-PCR zur Überprüfung der erfolgreichen Integration des 3'-UTR-Abschnitts der TDG-mRNA in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor, wurde die extrahierte Plasmid-DNA der Klone 1, 2 und 3 als Template verwendet und anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel bei 140 mV elektrophoretisch aufgetrennt. Das PCR-Produkt von Klon 2 zeigte mit ungefähr 250 bp die gleiche Größe wie der unverdaute Vektor. Die Produkte von Klon 1 und 3 hingegen waren ca. 1,7 kb groß.

Tabelle 16: Größe der PCR-Produkte in Abhängigkeit von der Integration der verschiedenen 3'-UTR-Abschnitte in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor

Konstrukt	Anhand des PCR-Designs berechnete Größe	Ungefähr abgeschätzte Größe auf dem Gel
Vektor, religiert	227 bp	300 bp
Vektor mit ADAM19	902 bp	1000 bp
Vektor mit CCNA2	380 bp	400 bp
Vektor mit CCNF	472 bp	500 bp
Vektor mit COL6A3	495 bp	500 bp
Vektor mit DOT1L	1665 bp	1500 bp
Vektor mit GGCT	393 bp	400 bp
Vektor mit LMNB1	482 bp	500 bp
Vektor mit RCC2	414 bp	400 bp
Vektor mit TDG	1706 bp	1700 bp
Vektor mit BSG	424 bp	450 bp
Vektor mit SRPRB	1144 bp	1000 bp

3.1.1.3 Sequenzierung der selektierten Klone und Überprüfung der vorhergesagten miRNA-Bindungsstellen

Die selektierten Klone wurden sequenziert. Zunächst diente die Sequenzierung der Bestätigung, dass tatsächlich das richtige Insert kloniert wurde. Dies traf in allen Fällen zu. In einem zweiten Schritt wurde die Sequenz der durch das Zielgen-Vorhersage-Programm miRanda ermittelten miRNA-Bindungsstellen mit der Sequenz der Klone verglichen, um von korrekten potentiellen Bindungsstellen ausgehen zu können (Abbildung 5 und 6). In der 3`-UTR von ADAM19, DOT1L sowie TDG lagen miRNA-Bindungsstellen außerhalb des sequenzierten Bereichs. In diesen Fällen war eine Bestätigung nicht möglich (Abbildung 6).



Abbildung 5: Durch das Zielgen-Vorhersage-Programm miRanda vorhergesagte Bindungsstellen für die miR-146a (verändert nach Steinhilber, 2014)

Grün unterlegte Bindungsstellen stimmten in den Sequenzen überein. Die Abbildung wurde in Anlehnung an die Dissertation von Steinhilber, J. erstellt (63).

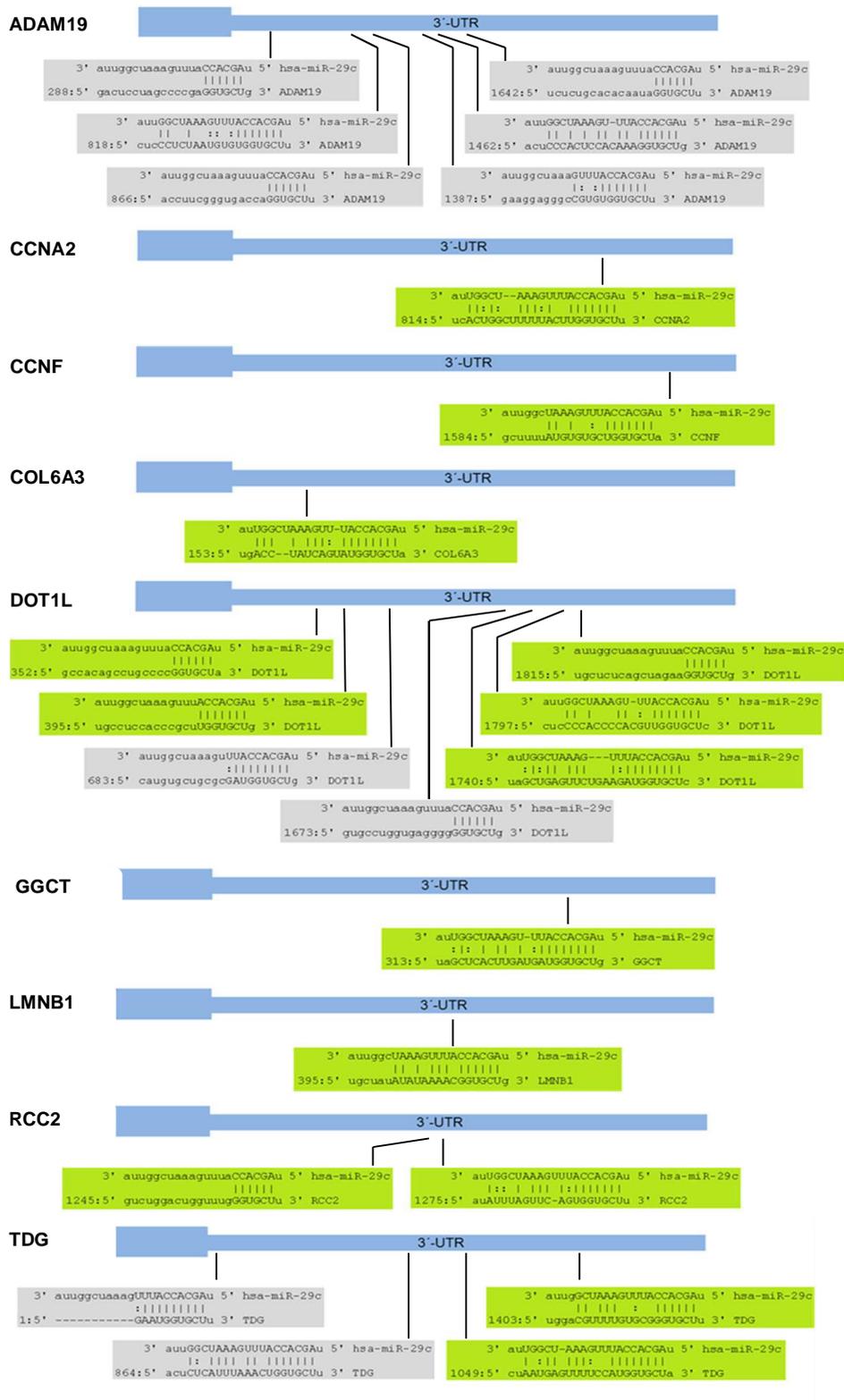


Abbildung 6: Durch das Zielgen-Vorhersage-Programm miRanda vorhergesagte Bindungsstellen für die miR-29c (verändert nach Steinhilber, 2014)

Grün unterlegte Bindungsstellen stimmten in den Sequenzen überein. Grau unterlegte Bindungsstellen lagen außerhalb des sequenzierten Bereichs. Die Abbildung wurde in Anlehnung an die Dissertation von Steinhilber, J. erstellt (63).

3.2 Transfektion der pmirGLO-Konstrukte und der miRNA-Mimic-29c bzw. miRNA-Mimic-146a in HEK293T-Zellen

3.2.1 Ermittlung der basalen Expression der miRNAs 29c und 146a in HEK293T-Zellen und HeLa-Zellen

Um die basale Expression der miR-29c und miR-146a in HEK293T-Zellen und HeLa-Zellen zu bestimmen wurde eine RT-qPCR in Duplikaten durchgeführt. Als Kalibrator diente die Zelllinie SUDHL-1, die eine schwache Expression dieser miRNAs zeigt (63).

Das miR-29c-Level war sowohl in HEK293T-Zellen als auch in HeLa-Zellen mit 0,4% bzw. 0,5% erheblich geringer ausgeprägt als in SUDHL-1-Zellen. Die Expression der miR-146a war in HeLa-Zellen mit 105% geringfügig höher als in SUDHL-1-Zellen. HEK293T-Zellen wiesen mit 11% eine niedrigere Expression auf (Abbildung 7). Da HEK293T-Zellen in Bezug auf beide miRNAs niedrigere Level als HeLa-Zellen aufwiesen, wurden sie für die Transfektion ausgewählt.

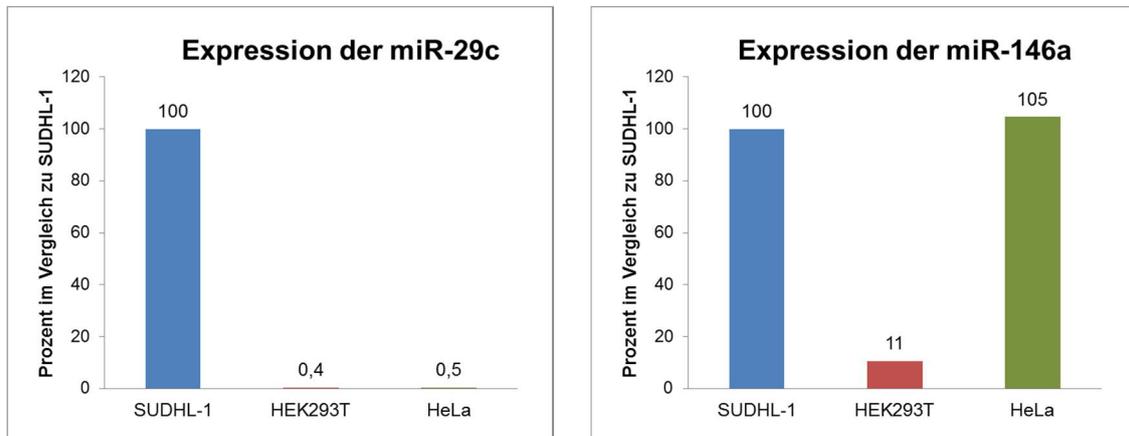


Abbildung 7: Basale Expression der miR-29c und miR-146a in HEK293T-Zellen, HeLa-Zellen und SUDHL-1-Zellen

Die relative Quantifizierung der Expression der miR-29c und miR-146a in den Zelllinien erfolgte per RT-qPCR. Normalisiert wurde mit RNU6B. Die Daten der Duplikate wurden mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode analysiert. Die miRNA-Expressionslevel der HEK293T- und HeLa-Zellen werden prozentual im Verhältnis zum Mittelwert der SUDHL-1-Zellen dargestellt.

3.2.2 Etablierung der Transfektionsbedingungen

3.2.2.1 Überprüfung der Transfektion des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektors

Um die Transfektionsbedingungen zu optimieren, wurden verschiedene Volumina Lipofectamine 2000 verwendet und unterschiedliche Mengen des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektors transfiziert. Die Überprüfung der Transfektion des Vektors erfolgte 22 h nach der Transfektion über eine qPCR unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green (LightCycler 480, Roche Applied Science). Sie wurde jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die Beurteilung der Transfektion beruhte auf dem Vergleich der Ct-Werte der transfizierten Zellen. Der durchschnittliche Ct-Wert der mit 2,0 µg Vektor und 6 µl Lipofectamine 2000 transfizierten Zellen lag mit 18,80 niedriger als nach der Transfektion mit 1,6 µg Vektor und 4 µl Lipofectamine 2000 (Tabelle 17). Deshalb wurden für die Transfektion der HEK293T-Zellen mit den pmirGLO-Konstrukten und miRNA-Mimics diese Bedingungen ausgewählt.

Tabelle 17: Mittels LightCycler 480 ermittelte Ct-Werte der qPCR der verschiedenen Transfektionsansätze

Ansatz	Ct-Wert	Mittelwert Ct-Werte
Transfektion mit 1,6 µg pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor und 4 µl Lipofectamine 2000	19,57	19,54
	19,50	
Transfektion mit 2,0 µg pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor und 6 µl Lipofectamine 2000	18,91	18,80
	18,68	

3.2.2.2 Überprüfung der Transfektion der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2

Die Überexpression der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2 resultiert in einer Herunterregulation der GAPDH-mRNA. Um die Transfektion zu überprüfen und die Unterschiede zwischen der Verwendung von 4 µl und 6 µl Lipofectamine 2000 zu ermitteln, wurde 22 h nach der Transfektion eine RT-qPCR zur relativen Quantifizierung der GAPDH-mRNA durchgeführt.

Die Transfektion der HEK293T-Zellen mit der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2 unter Verwendung von 4 µl Lipofectamine 2000 bewirkte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Herunterregulation der RNA auf 43%. Da der Einsatz von 6 µl Lipofectamine 2000 ohne stärkeren zytotoxischen Effekt in einer noch geringeren GAPDH-Expression von 36% resultierte, wurde dieses Volumen für die Transfektion der HEK293T-Zellen mit den pmirGLO-Konstrukten und der miRNA-Mimics ausgewählt (Abbildung 8).

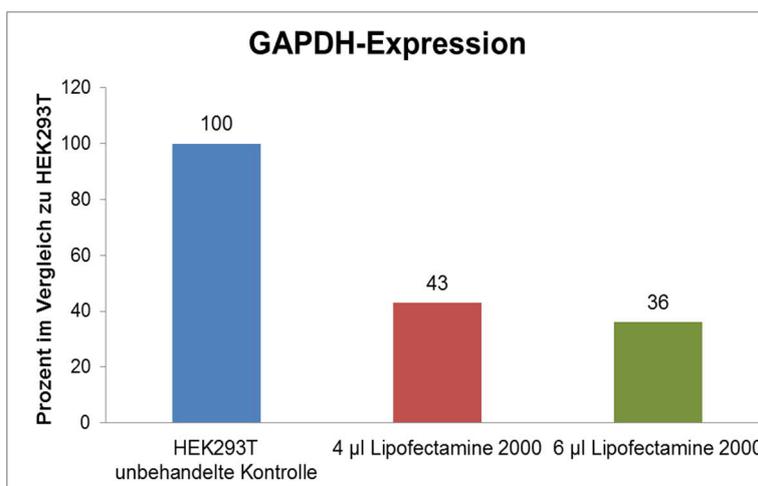


Abbildung 8: GAPDH-Expression nach Transfektion der HEK293T-Zellen mit der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2 unter Verwendung unterschiedlicher Volumina Lipofectamine 2000

Die relative Quantifizierung der GAPDH-Expression erfolgte 22 h nach Transfektion der HEK293T-Zellen mittels RT-qPCR. Normalisiert wurde mit TBP. Die Daten der Duplikate wurden mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode analysiert. Die Resultate werden als mRNA-Level im Verhältnis zum Mittelwert der unbehandelten HEK293T-Zellen dargestellt.

3.3 Reporterassay

3.3.1 Auswertung der Kontrollen

Die direkte Interaktion zwischen miRNA und mRNA wurde mittels eines Reporterassays erfasst (2.3.4).

Nicht transfizierte HEK293T-Zellen dienten als unbehandelte Kontrolle und die hier gemessene Lumineszenz wurde als Leerwert angenommen. Des Weiteren wurde Zellen das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 ohne Zugabe von

Plasmid oder miRNA-Mimics zugefügt. Zusätzlich wurden HEK293T-Zellen nur mit der miRNA-Mimic-29c bzw. miRNA-Mimic-146a transfiziert. Da in diesen Ansätzen kein Reporterplasmid vorhanden war, entsprach die dort gemessene Lumineszenz wie erwartet in etwa dem Leerwert. Weiterhin wurden Zellen mit dem Reporterplasmid transfiziert, sowohl ohne, als auch mit Zugabe der miRNA-Mimic-29c bzw. miRNA-Mimic-146a. Der Vergleich zwischen diesen Ansätzen ergab keinen signifikanten Unterschied in der Firefly-Luciferase-Aktivität (Abbildung 9). Da alle Kontrollen erwartungsgemäß ausfielen, erfolgte die weitere Auswertung der Ergebnisse.

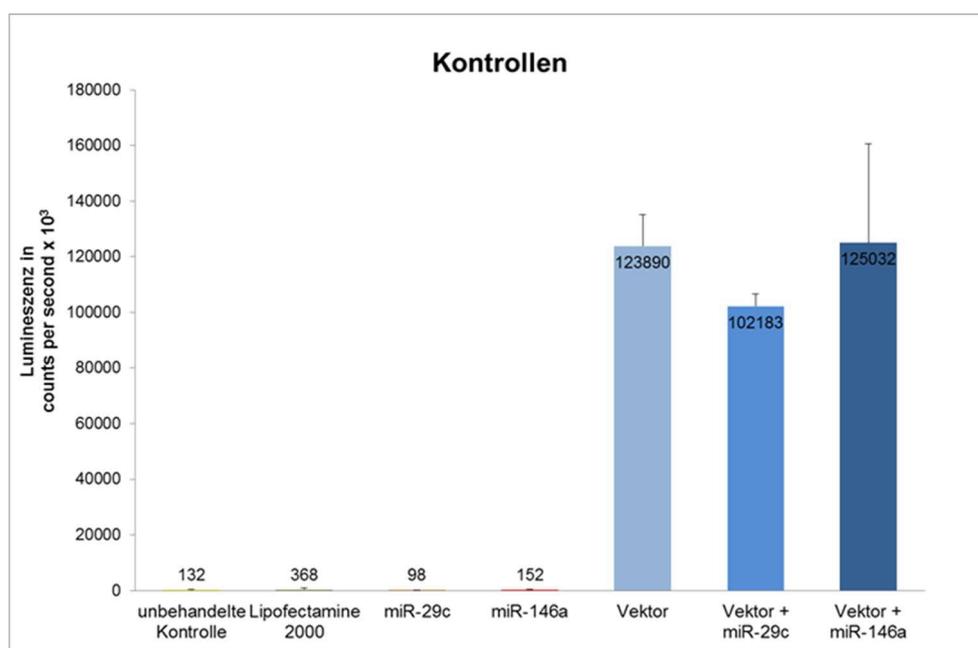


Abbildung 9: Firefly-Luciferase-Aktivität nach Transfektion in den Kontrollen

Die Messung der Lumineszenz erfolgte 40 h nach der Transfektion. Dargestellt sind die aus den Triplikaten berechneten Mittelwerte der nicht normalisierten, absoluten Messwerte der Firefly-Luciferase-Aktivität in den Kontrollen sowie die Standardabweichung nach oben.

3.3.2 Interaktion zwischen der miRNA 29c und den Kandidatengen

Die HEK293T-Zellen wurden sowohl allein mit einem pmirGLO-Konstrukt mit integrierter potentieller miRNA-Binderegion als auch mit dem pmirGLO-Konstrukt und der miRNA-Mimic transfiziert. Die normalisierte Firefly-Luciferase-Aktivität dieser beiden Ansätze wurde miteinander verglichen. Eine signifikant reduzierte Firefly-Luciferase-Expression resultierte aus der Bindung der transfizierten miRNA-Mimic an den 3'-UTR-Abschnitt des miRNA-Zielgens.

Die Überexpression der miR-29c führte bei den pmirGLO-Konstrukten mit der 3`-UTR von ADAM19, CCNA2, COL6A3, GGCT, LMNB1, RCC2 und TDG zu einer signifikanten Abnahme der relativen Firefly-Luciferase-Aktivität. Die Lumineszenz in den mit den pmirGLO-Konstrukten mit der 3`-UTR von CCNF und DOT1L transfizierten Zellen war bei Kotransfektion der miR-29c nicht signifikant erniedrigt (Abbildung 10).

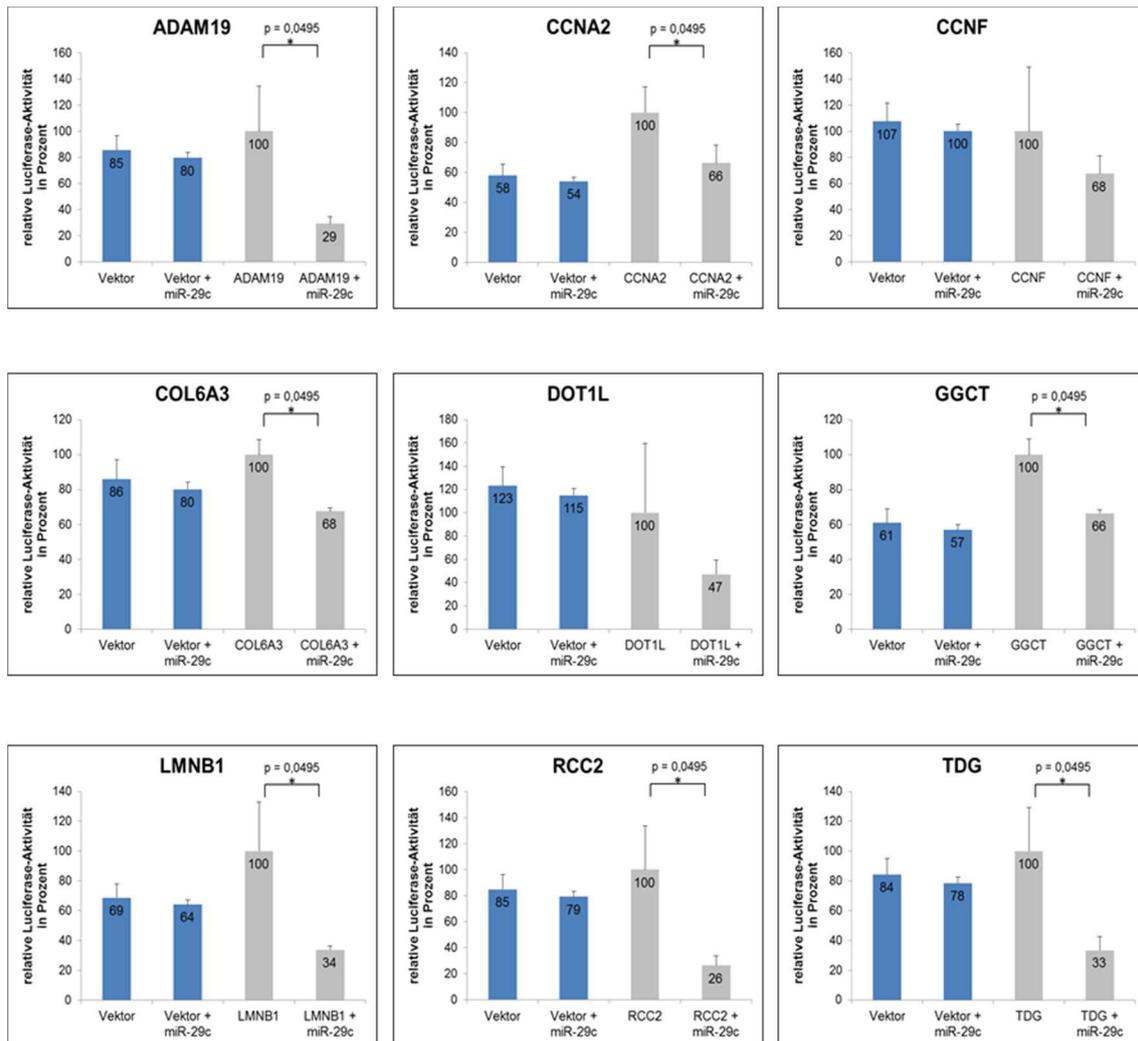


Abbildung 10: Relative Firefly-Luciferase-Aktivität nach Transfektion der pmirGLO-Konstrukte mit und ohne Überexpression der miR-29c

Die Luciferase-Aktivität der mit dem Vektor bzw. mit dem Vektor und der miRNA-Mimic-29c transfizierten HEK293T-Zellen wurde 40 h nach der Transfektion in den Zelllysaten bestimmt. Ebenso erfolgte die Messung in den mit den pmirGLO-Konstrukten transfizierten Zellen mit und ohne Überexpression der miR-29c. Normalisiert wurde mit der Renilla-Luciferase-Aktivität. Aus der normalisierten Firefly-Luciferase-Aktivität der Triplikate wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Resultate werden als relative Firefly-Luciferase-Aktivität im Verhältnis zum Mittelwert der mit dem jeweiligen pmirGLO-Konstrukt transfizierten HEK293T-Zellen dargestellt. Zusätzlich ist die Standardabweichung nach oben abgebildet. Der Vergleich der aus den Triplikaten gebildeten Mittelwerte erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen (*).

3.3.3 Interaktion zwischen der miRNA 146a und den Kandidatengen

Die gleichzeitige Transfektion des pmirGLO-Konstrukts mit der 3`-UTR von SRPRB und der miRNA-Mimic-146a führte in HEK293T-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Firefly-Luciferase-Aktivität.

Die Überexpression der miR-146a führte zu keiner signifikanten Abnahme der relativen Firefly-Luciferase-Aktivität des pmirGLO-Konstrukts mit der 3`-UTR von BSG (Abbildung 11).

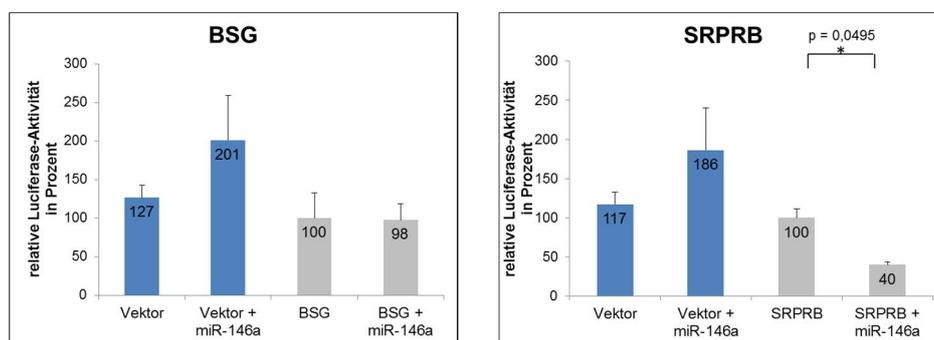


Abbildung 11: Relative Firefly-Luciferase-Aktivität nach Transfektion der pmirGLO-Konstrukte mit und ohne Überexpression der miR-146a

Die Luciferase-Aktivität der mit dem Vektor bzw. mit dem Vektor und der miRNA-Mimic-146a transfizierten HEK293T-Zellen wurde 40 h nach der Transfektion in den Zelllysaten bestimmt. Ebenso erfolgte die Messung in den mit den pmirGLO-Konstrukten transfizierten Zellen mit und ohne Überexpression der miR-146a. Normalisiert wurde mit der Renilla-Luciferase-Aktivität. Aus der normalisierten Firefly-Luciferase-Aktivität der Triplikate wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Resultate werden als relative Firefly-Luciferase-Aktivität im Verhältnis zum Mittelwert der mit dem jeweiligen Konstrukt transfizierten HEK293T-Zellen dargestellt. Zusätzlich ist die Standardabweichung nach oben abgebildet. Der Vergleich der aus den Triplikaten gebildeten Mittelwerte erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen (*).

4. Diskussion

4.1 Reporterassay

Die miRNAs 29c und 146a sind im ALK-positiven ALCL charakteristisch stark herunterreguliert. Nach Überexpression dieser miRNAs in ALK-positiven ALCL-Zellen ergab eine Transkriptomanalyse mit anschließender RT-qPCR-Validierung potentielle Zielgene für die miRNAs. Als Kandidatengene für die miR-29c wurden *ADAM19*, *CCNA2*, *CCNF*, *COL6A3*, *DOT1L*, *GGCT*, *LMNB1*, *RCC2* und *TDG*, für die miR-146a *BSG* und *SRPRB* identifiziert. Eine veränderte Expression von miRNAs und die damit verbundene Deregulation ihrer Zielgene kann zur Entstehung von Tumorerkrankungen beitragen (48). Die Identifikation der direkten miR-29c- und miR-146a-Zielgene im ALK-positiven ALCL in der vorliegenden Arbeit sollte das Verständnis der ALK-vermittelten Onkogenese erweitern und dadurch auch potentielle neue Therapieoptionen beleuchten.

Es wird vermutet, dass jede miRNA an zahlreiche mRNAs binden und die Expression verschiedener Gene beeinflussen kann (120). Daher stellt die Identifikation der Zielstrukturen einer miRNA eine besondere Herausforderung dar. Verschiedene Methoden stehen dabei zur Verfügung.

Es existieren zahlreiche computerbasierte Zielgen-Vorhersage-Programme. Die verschiedenen Algorithmen, nach denen die potentiellen Zielgene ausgewählt werden, berücksichtigen im Wesentlichen die Eigenschaften der Bindung zwischen miRNA und mRNA sowie die hohe evolutionäre Konservierung der miRNA-Bindungsstellen. Diese Programme sind zeitsparend und wenig kostenintensiv, liefern jedoch auch viele falsch-negative und -positive Ergebnisse (121). Daher ist eine experimentelle Analyse unerlässlich. Bei biochemischen Verfahren wie CLASH (crosslinking, ligation and sequencing of hybrids) oder CLIP (crosslinking and immunoprecipitation) und deren Varianten werden nach Immunopräzipitation des miRISC die damit assoziierten RNAs

mittels Sequenzierung analysiert (122). Die Untersuchung des Transkriptoms vor und nach Herunterregulation oder Überexpression einer miRNA bietet die Möglichkeit, Zielgene zu ermitteln, die über den Abbau der entsprechenden mRNA reguliert werden. Die Regulation der Genexpression durch translationale Repression wird hierbei allerdings nicht erfasst. Diese Möglichkeit bieten Untersuchungsverfahren auf Proteomebene wie SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) (123). Sowohl bei der Transkriptom- als auch bei der Proteomanalyse kann nicht zwischen direkten oder indirekten Zielgenen unterschieden werden. Hier liegt der große Vorteil des Reportergenassays. Er erlaubt den Nachweis der direkten Regulation eines Zielgens durch eine miRNA.

In dieser Arbeit bot die Durchführung des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega die Möglichkeit, eine direkte Interaktion zwischen der miR-29c bzw. miR-146a und der mRNA des entsprechenden Kandidatengens zu bestätigen. Analysesysteme, die Luciferase als Reportergen nutzen, sind weit verbreitet. Die Vorteile von Firefly-Luciferase-Testsystemen liegen in der guten Sensitivität und dem breiten linearen Messbereich über mehrere Potenzen (124). Für die Durchführung des Experiments wurde der Teil der 3'-UTR, der die Bindungsstellen der miRNA enthielt, in den Reportervektor kloniert. Eine Bindung der miRNA an die Zielstruktur resultierte durch Destabilisierung der mRNA oder Blockade der Translation in einer verminderten Luciferaseaktivität. Als Reporterplasmid wurde der pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor der Firma Promega verwendet. Dieser Vektor hat den Vorteil neben der Firefly-Luciferase als primärem Reportergen auch über eine Renilla-Luciferase als Kontrollreporter zu verfügen. Durch die Normalisierung auf die interne Kontrolle wurden experimentelle Schwankungen effektiv eliminiert. Unterschiede, bedingt durch Zellzahldifferenzen, Variationen in der Transfektions- und Zellyseeffizienz sowie Abweichungen des Pipettierolumens, konnten so minimiert und die Aussagekraft des Tests erhöht werden.

Mit diesem Experiment ist es gelungen, *ADAM19*, *CCNA2*, *COL6A3*, *GGCT*, *LMNB1*, *RCC2* und *TDG* als direkte Zielgene der miR-29c im ALK-positiven ALCL zu identifizieren. Des Weiteren konnte eine direkte *SRPRB*-Regulation durch die miR-146a gezeigt werden.

4.2 Identifizierung der direkten miRNA 29c-Zielgene im ALK-positiven ALCL

Eine geringe Expression der miR-29c wurde neben dem ALK-positiven ALCL in zahlreichen malignen Neoplasien wie dem Hepatozellulären Karzinom, Magenkarzinom, Pleuramesotheliom, Nasopharynxkarzinom oder dem Lungenkarzinom nachgewiesen, zum Teil verbunden mit einer schlechteren Prognose und einer höheren Malignität des Tumors (65-71). Eine genauere Untersuchung der miR-29c im ALK-positiven ALCL ergab mittels Transkriptomanalyse verschiedene, potentielle Zielgene (63). Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer direkten Regulation dieser Gene durch die miR-29c. Der Reporterassay konnte dies für *ADAM19*, *CCNA2*, *COL6A3*, *GGCT*, *LMNB1*, *RCC2* und *TDG* bestätigen.

Angesichts dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß die verminderte Expression der miR-29c über die fehlende Herunterregulation der genannten Gene einen Einfluss auf die Pathogenese des ALK-positiven ALCL hat.

Die TDG-Repression durch die miR-29c konnte bereits von Sengupta et al. im Nasopharynxkarzinom und Morita et al. im Lungenkarzinom mittels Reporterassay nachgewiesen werden. Morita et al. vermuteten, dass die miR-29c unter anderem mithilfe dieses Mechanismus eine Aufrechterhaltung des DNA-Methylierungsstatus bewirkt und damit eine tumorprotektive Wirkung haben könnte (70, 113). Tatsächlich gehören Hypo- und Hypermethylierung zu den epigenetischen Veränderungen, die in Tumoren beobachtet werden (125). Es ist gut möglich, dass die verminderte Repression von TDG durch die miR-29c auch im ALK-positiven ALCL zur Tumorentstehung beiträgt.

Das Protein GGCT ist am Gamma-Glutamyl-Zyklus und so an der Glutathion-Homöostase beteiligt (102). GGCT ist in zahlreichen Normalgeweben, insbesondere in Epithelien, exprimiert. Eine signifikant verminderte GGCT-Expression findet sich in Tumoren der Niere und des Urothels. In Tumoren des Magens, der Gallenwege, der Lunge und des Ösophagus hingegen ist die GGCT-Expression erhöht (104). Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus korreliert die GGCT-Expression mit der Wahrscheinlichkeit von Lymphknotenmetastasen und einer geringgradigeren Differenzierung der Tumorzellen (126). Die siRNA-Injektion zur Herunterregulation der GGCT-Expression führte in Mäusen mit Lungentumoren zu signifikant geringerem Tumorwachstum (127).

RCC2 ist ein zentromerassoziiertes Protein, das sowohl bei der Zellzyklusprogression als auch bei der Mitose eine Bedeutung hat (110, 128). Matsuo et al. identifizierten *RCC2* bereits im Magenkarzinom als Zielgen der miR-29c. Sowohl die Überexpression der miR-29c als auch der *RCC2*-Knockdown führten zu einer Wachstumsinhibierung der Magenkarzinomzellen und ließen die Arbeitsgruppe annehmen, dass der Wachstumsvorteil der Tumorzellen aus einer erhöhten *RCC2*-Expression resultieren könnte (111).

CCNA2 ist ebenfalls in die Zellzyklusprogression involviert. In zahlreichen Malignomen wurde eine erhöhte Cyclin A2-Expression beobachtet, oft korrelierend mit einer gesteigerten Proliferation, einem höheren Tumorstadium und einer schlechteren Prognose (84). Die verminderte Regulation von *GGCT*, *RCC2* und *CCNA2* durch die miR-29c im ALK-positiven ALCL könnte auch hier einen Einfluss auf die Tumorzellproliferation und damit auf das Tumorwachstum haben.

Eine aberrante *LMNB1*-Expression wurde unter anderem im Mammakarzinom, im Pankreaskarzinom und im Hepatozellulären Karzinom nachgewiesen (129). Im Pankreaskarzinom ist ein erhöhtes *LMNB1*-Expressionslevel mit einer höheren Anzahl an Fernmetastasen, einer geringgradigeren Differenzierung sowie einer schlechteren Prognose verbunden (105). Eine vermehrte *LMNB1*-Expression ist im Hepatozellulären Karzinom mit einem höheren Tumorstadium,

einer gesteigerten Tumorgroße und einer größeren Anzahl an Lymphknotenmetastasen assoziiert (109). Auch im ALK-positiven ALCL könnte LMNB1 zu vermehrter Tumorzellausbreitung führen und so zu den häufig vorkommenden extranodalen Manifestationen in Knochen, Knochenmark, Haut, Subkutangewebe und Lunge beitragen.

ADAM19 ist ein Mitglied der ADAM-Familie, die in Prozesse wie die Proteolyse sowie Zellmigration, -fusion und -adhäsion involviert ist. Eine höhere Expression wurde im Nierenzellkarzinom und in primären Hirntumoren nachgewiesen. In letzteren war diese verbunden mit einer höheren Tumorinvasivität (83). Da ADAM19 an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist, ist es gut vorstellbar, dass es auch im ALK-positiven ALCL zur Tumorzellinvasivität beiträgt.

Ein ähnlicher Effekt ist für *COL6A3* denkbar. Das *COL6A3*-Gen kodiert für die α -Kette des Kollagen VI, einem Kollagen, das in nahezu allen Bindegeweben gebildet wird und mit anderen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix interagiert (130). *COL6A3* ist im Ovarialkarzinom überexprimiert und dort mit einer geringgradigeren Differenzierung und somit einer schlechteren Prognose verbunden (98). Im Magenkarzinom und im duktalem Adenokarzinom des Pankreas wird *COL6A3* ebenfalls stark exprimiert (131, 132). Eine gesteigerte *COL6A3*-Expression im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom ist mit dem Vorliegen einer perineuralen Invasion assoziiert (133).

Es liegt die Vermutung nahe, dass die geringe Expression der miR-29c zu einer erhöhten Expression dieser Gene im ALK-positiven ALCL führt. Ob sie dort tatsächlich überexprimiert sind, sollte durch eine quantitative Analyse auf Proteinebene zum Beispiel mittels Westernblot oder auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR im Vergleich zu Lymphknotengewebe bzw. T-Zellen und dem ALK-negativen ALCL ermittelt werden. Da die Expression all dieser Gene bereits in anderen Tumorerkrankungen untersucht worden ist und eine hohe Expression in vielen Entitäten zum Teil mit einer geringeren Differenzierung sowie einer gesteigerten Proliferation, Invasivität oder Metastasierung in Verbindung gebracht werden konnte, stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß dies auch

für das ALK-positive ALCL zutrifft. Dazu sollte das biologische Verhalten der Tumorzellen funktionell mit und ohne Überexpression der miR-29c untersucht werden. Die Invasivität könnte beispielsweise über einen Invasionsassay, die Proliferation über eine Wachstumskurve *in vitro* erfasst werden.

Innerhalb der 3`-UTR von *DOT1L* und *CCNF* ließen sich keine Bindungsstellen der miR-29c nachweisen. Da miRNA-Bindungsstellen jedoch auch außerhalb der 3`-UTR im kodierenden Bereich oder in der 5`-UTR der mRNA liegen können, kann eine direkte Regulation der Genexpression von *DOT1L* oder *CCNF* nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden (134, 135). Es könnte sich jedoch auch um indirekte Zielgene der miR-29c handeln. Ebenso lässt sich nicht vollständig ausschließen, dass die in der Transkriptomanalyse gezeigte Regulation dieser Gene auf sekundäre Effekte zurückzuführen ist. Die Überexpression einer miRNA kann durch die unphysiologisch hohe miRNA-Konzentration in der Zelle beispielsweise Fehlpaarungen zwischen miRNA und mRNA begünstigen und so zu Artefakten führen (136, 137). Des Weiteren können experimentelle Verfahren wie zum Beispiel die Transfektion ein verändertes Genexpressionsmuster in Zellen verursachen (138).

4.3 Identifizierung der direkten miRNA 146a-Zielgene im ALK-positiven ALCL

Die miR-146a ist an Mechanismen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort beteiligt und spielt eine Rolle bei der Hämatopoese, insbesondere der Megakaryozytopoese (72, 75, 139). Eine aberrante miR-146a-Expression wurde bereits in vielen anderen Tumoren beobachtet. Neben dem ALK-positiven ALCL wurde ein vermindertes miR-146a-Expressionslevel in anderen hämatologischen und lymphatischen Neoplasien nachgewiesen (77, 78). Auch in soliden Neoplasien wie unter anderem im Prostatakarzinom, im Pankreaskarzinom, im Magenkarzinom oder im Hepatozellulären Karzinom tritt eine erniedrigte miR-146a-Expression auf (72, 140). Im Hepatozellulären Karzinom korreliert eine niedrigere miR-146a-Expression mit einem

fortgeschrittenen Tumorstadium (140). Im Magenkarzinom ist ein geringeres miR-146a-Level mit Lymphknotenmetastasierung und venöser Invasion assoziiert und kann als unabhängiger, prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben gelten (141). Im Gegensatz dazu werden der miR-146a im oralen Plattenepithelkarzinom und dem Zervixkarzinom tumorfördernde Eigenschaften zugeschrieben (142, 143).

Eine direkte *BSG*-Regulation durch die miR-146a konnte im Reporterassay nicht gezeigt werden. Da die Bindung einer miRNA jedoch auch außerhalb der 3'-UTR im kodierenden Bereich oder der 5'-UTR der mRNA erfolgen kann, schließt dieses Experiment eine direkte Regulation nicht aus (134, 135). Es könnte sich jedoch auch um ein indirektes Zielgen der miR-146a handeln. Ebenso könnte die in der Transkriptomanalyse gezeigte Regulation dieser Gene durch sekundäre Effekte verursacht sein.

Die miR-146a zeigte hingegen eine direkte Interaktion mit *SRPRB*. Die Rolle von *SRPRB* im Menschen ist weitgehend unklar. *SRPRB* zeigt eine große Homologie mit dem murinen SR β und könnte an der Einschleusung von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen in das endoplasmatische Retikulum beteiligt sein (119). Eine verglichen mit Normalgewebe erhöhte *SRPRB*-Konzentration wurde in Karzinomen der Leber, Lunge, Mamma, des Ösophagus und des Kolons nachgewiesen (118, 119). Li et al. hingegen konnten keine *SRPRB*-Expression in Hepatozellulären Karzinom-Zellen nachweisen. Eine Erhöhung der *SRPRB*-Expression führte zu einer Wachstums- und Zellzyklushemmung in den Hepatozellulären Karzinom-Zellen. Dies ließ die Arbeitsgruppe vermuten, dass *SRPRB* in die Regulation des Zellzyklus involviert sein könnte (144).

Durch die fehlende *SRPRB*-Regulation durch die miR-146a im ALK-positiven ALCL könnte es zu einer erhöhten *SRPRB*-Expression kommen. Ob, und wenn ja, wie, *SRPRB* an der Tumorprogression des ALK-positiven ALCL beteiligt ist, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen werden. Eine Analyse des biologischen Verhaltens in ALK-positiven Zellkulturlinien mit und ohne Überexpression dieses Gens könnte erste Hinweise darauf geben.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass die im ALK-positiven ALCL herunterregulierten miRNAs 29c und 146a direkte Interaktionen mit verschiedenen Genen zeigen, die in anderen Entitäten interessante, tumorrelevante Funktionen aufweisen. *ADAM19*, *CCNA2*, *COL6A3*, *GGCT*, *LMNB1*, *RCC2* und *TDG* werden unmittelbar durch die miR-29c reguliert. Die miR-146a beeinflusst direkt die SRPRB-Expression.

Dies lässt vermuten, dass die geringe Expression dieser beiden miRNAs über die fehlende negative Regulation der genannten Gene in die Pathogenese des ALK-positiven ALCL involviert ist. Auch wenn anhand dieses Experiments keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob das niedrige Expressionslevel der miRNAs 29c und 146a Auswirkungen auf das biologische Verhalten der Tumorzellen hat, so deuten doch die in der Literatur beschriebenen Funktionen der direkt regulierten Gene deutlich darauf hin. Diese Vermutung sollte jedoch experimentell validiert werden. Zunächst sollten funktionelle Analysen mit und ohne Überexpression der miRNAs bzw. der einzelnen Gene in den ALK-positiven Tumorzellen Aufschluss über ihren Einfluss auf Invasivität, Migration oder Proliferation geben.

Sollte eine tumorprotektive Wirkung dieser miRNAs im ALK-positiven ALCL *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden, so könnte die Wiederherstellung ihrer Aktivität ein mögliches, künftiges Therapieziel darstellen. Eine höhere Expression der miR-29c wurde bereits in anderen Publikationen mit einer tumorprotektiven Wirkung in Verbindung gebracht. Yang et al. beobachteten, dass die miR-29c *in vitro* einen hemmenden Einfluss auf Proliferation und Migration einer Kolonkarzinomzelllinie ausübte. Die Überexpression der miR-29c resultierte *in vivo* in einer Unterdrückung des Tumorwachstums (145). In Lungenkarzinomzelllinien führte ein höheres miR-29c-Level zu einer Inhibierung von Zellproliferation, Adhäsion, Invasion und Migration. Im Lungenkarzinommodell in Nacktmäusen unterdrückte eine höhere Expression der miR-29c die Metastasierung (71). Ähnliche Effekte konnten auch für die miR-146a beobachtet werden. Die Transfektion der miR-146a führte *in vitro* bei

Prostatakarzinomzellen zu einer Hemmung der Proliferation, in Magenkarzinom- und Mammakarzinomzellen zu einer Reduktion der Migration. In allen Zelllinien konnte eine verminderte Invasivität beobachtet werden (141, 146, 147).

Derzeit existiert bislang ein einziges, in eine klinische Studie eingetretenes Therapeutikum, das über die Antagonisierung einer miRNA wirkt. Miravirsen dient der Behandlung einer HCV-Infektion (148). Das gezielte Einschleusen von miRNA-Mimics und die damit verbundene Wiederherstellung der miRNA-Aktivität hingegen sind bisher nur experimentell möglich; eine miRNA-basierte Therapie des ALK-positiven ALCL könnte jedoch zukünftig eine zusätzliche Behandlungsmöglichkeit dieses Lymphoms darstellen.

5. Zusammenfassung

Das ALK-positive großzellig anaplastische T-Zell-Lymphom (ALCL) ist ein peripheres T-Zell-Lymphom und gehört somit zu den Non-Hodgkin-Lymphomen. Es ist in 80% der Fälle durch eine Translokation zwischen den Chromosomen 2 und 5 charakterisiert. Die dadurch bedingte Bildung des onkogenen Fusionsproteins NPM-ALK führt zur konstitutiven Aktivierung der ALK-Kinase-Domäne. Dies resultiert über die Aktivierung verschiedener Signalwege unter anderem in Veränderungen der Zellzyklusprogression, des Überlebens und der Migration der Tumorzellen.

miRNAs sind nichtkodierende, ca. 22 Nukleotide lange RNAs, die durch Bindung an ihre Ziel-mRNAs an der posttranskriptionellen Regulation zahlreicher Gene beteiligt sind. Sie spielen eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Die Deregulation von miRNAs, die beispielsweise epigenetische Mechanismen, Tumorsuppressor- oder Onkogene kontrollieren, kann einen Teil zur Kanzerogenese beitragen.

Im ALK-positiven ALCL sind unter anderem die miRNAs 29c und 146a charakteristisch gering exprimiert. Nach Überexpression dieser miRNAs in ALK-positiven ALCL-Zellen ergab eine Transkriptomanalyse mit anschließender RT-qPCR-Validierung potentielle Zielgene für die miRNAs. Als Kandidatengene für die miR-29c wurden *ADAM19*, *CCNA2*, *CCNF*, *COL6A3*, *DOT1L*, *GGCT*, *LMNB1*, *RCC2* und *TDG*, für die miR-146a *BSG* und *SRPRB* identifiziert. Viele dieser Gene zeigen in anderen Tumorentitäten eine erhöhte Expression und sind zum Teil mit tumorrelevanten Funktionen assoziiert.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer potentiell direkten Interaktion zwischen den miRNAs 29c und 146a und der Ziel-mRNA der identifizierten Kandidatengene mittels Reporterassay. Hierfür wurde ein Teil der 3'-UTR der mRNA potentieller Zielgene in einen Luciferase-exprimierenden Vektor kloniert. Dieser Abschnitt enthielt jeweils die vom Zielgen-Vorhersage-

Programm miRanda ermittelten möglichen Bindungsstellen für die miR-29c bzw. miR-146a. Nach Transfektion der Konstrukte und der miRNAs in HEK293T-Zellen und deren Lyse wurde die Luciferaseaktivität in An- und Abwesenheit der miRNAs 29c oder 146a gemessen. Mit diesem Experiment ist es gelungen, *ADAM19*, *CCNA2*, *COL6A3*, *GGCT*, *LMNB1*, *RCC2* und *TDG* als direkte Zielgene für die miR-29c im ALK-positiven ALCL zu bestätigen. Des Weiteren konnte *SRPRB* als direktes Zielgen der miR-146a ermittelt werden. Eine direkte Regulation von *CCNF* und *DOT1L* durch die miR-29c sowie von *BSG* durch die miR-146a konnte nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse können Hinweise auf die Art des Einflusses der miRNAs 29c und 146a auf die Biologie des ALK-positiven ALCLs geben. Die Expression der direkten Zielgene ist bereits in anderen Tumorerkrankungen untersucht worden und eine hohe Expression konnte in vielen Entitäten mit einer geringeren Differenzierung sowie einer gesteigerten Proliferation, Invasivität oder Metastasierung in Verbindung gebracht werden. Dies lässt vermuten, dass die geringe Expression der miRNAs 29c und 146a über die fehlende negative Regulation der genannten Gene in die Pathogenese des ALK-positiven ALCL involviert ist. Eine funktionelle Analyse des biologischen Verhaltens der Tumorzellen mit und ohne Überexpression der miRNAs 29c und 146a könnte ein nächster Schritt sein, um weitere Hinweise auf die Funktion dieser miRNAs in dieser Tumorentität zu erhalten.

Sollte sich die tumorprotektive Wirkung der miRNAs 146a und 29c bestätigen, so könnte die Wiederherstellung ihrer Funktion im ALK-positiven ALCL eine zukünftige therapeutische Möglichkeit darstellen.

6. Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADAM19	a disintegrin and metalloproteinase 19
AICD	activation induced cell death
AKT	Proteinkinase B
ALCL	anaplastic large cell lymphoma Großzellig anaplastisches T-Zell-Lymphom
ALK	anaplastic lymphoma kinase
ALO17	ALK lymphoma oligomerization partner on chromosome 17
ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
bp	Basenpaare
BSG	Basigin
BV	Brentuximab Vedotin
bzw.	beziehungsweise
CCL-8	chemokine (C-C motif) ligand 8
CCNA2	Cyclin A2
CCNF	Cyclin F
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CLASH	crosslinking, ligation and sequencing of hybrids
CLIP	crosslinking and immunoprecipitation
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CLTC	clathrin heavy chain 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

COL6A3	collagen, type VI, alpha-3
Ct	cycle threshold
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleotide
DOT1	disruptor of telomeric silencing 1
DOT1L	DOT1-like histone H3K79 methyltransferase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	epithelial membrane antigen
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
FCS	Fetales Kälberserum
FADD	Fas-associated death domain protein
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GGCT	gamma-glutamyl cyclotransferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
Hrsg.	Herausgeber
IL	Interleukin
IPI	Internationaler Prognostischer Index
IRAK	interleukin-1 receptor-associated kinase
JAK	Januskinase
kb	Kilobase
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LMNB1	Lamin B1
LPS	Lipopolysaccharid

M	Molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
min	Minute
miR	microRNA
miRISC	miRNA-induced silencing complex
miRNA	microRNA
MLC1	myeloid cell leukemia 1
MLL	mixed lineage leukemia
MMAE	Monomethylauristatin E
mRNA	messenger RNA
MSN	moesin
MYH 9	myosin, heavy chain 9
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NPC	Nasopharynxkarzinom
NPM	Nucleophosmin
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PLC γ	phospholipase C γ
pmirGlo	pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor
P/S	Penicillin/Streptomycin
Ran	Ras-related nuclear protein
RCC2	regulator of chromosome condensation 2
RISC	RNA-induced silencing complex
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid
RNU6B	RNA, U6 small nuclear 2
rpm	rounds per minute
RT-qPCR	real-time quantitative PCR

s	Sekunde
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SRP	signal recognition particle
SRPRB	signal recognition particle receptor subunit β
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBP	TATA-box binding protein
TDG	thymine-DNA glycosylase
TE	TRIS-EDTA
TFG	TRK-fused gene
TIA	T-cell intracytoplasmic antigen
TPM	tropomyosin
TRAF	TNF receptor associated factor
U	unit
UTR	untranslated region
VEGF	vascular endothelial growth factor
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZKFD	Zentrum für Krebsregisterdaten

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (RKI und GEKID (Hrsg.), 2013)	2
Abbildung 2:	MicroRNAs können als Tumorsuppressoren und Onkogene fungieren. (Esquela-Kerscher, 2006)	10
Abbildung 3:	Gelelektrophoretische Auftrennung der per PCR amplifizierten Inserts	47
Abbildung 4:	Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der Screening-PCR am Beispiel des pmirGLO-Konstrukts nach Integration der 3`-UTR der TDG-mRNA	48
Abbildung 5:	Durch das Zielgen-Vorhersage-Programm miRanda vorhergesagte Bindungsstellen für die miR-146a (verändert nach Steinhilber, 2014)	49
Abbildung 6:	Durch das Zielgen-Vorhersage-Programm miRanda vorhergesagte Bindungsstellen für die miR-29c (verändert nach Steinhilber, 2014)	50
Abbildung 7:	Basale Expression der miR-29c und miR-146a in HEK293T-Zellen, HeLa-Zellen und SUDHL-1-Zellen	51
Abbildung 8:	GAPDH-Expression nach Transfektion der HEK293T-Zellen mit der miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2 unter Verwendung unterschiedlicher Volumina Lipofectamine 2000	53
Abbildung 9:	Firefly-Luciferase-Aktivität nach Transfektion in den Kontrollen	54
Abbildung 10:	Relative Firefly-Luciferase-Aktivität nach Transfektion der pmirGLO-Konstrukte mit und ohne Überexpression der miR-29c	55
Abbildung 11:	Relative Firefly-Luciferase-Aktivität nach Transfektion der pmirGLO-Konstrukte mit und ohne Überexpression der miR-146a	56

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Linearisierung des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektors mit SacI	30
Tabelle 2	PCR zur Amplifikation der Inserts	31
Tabelle 3	Klonierung der Inserts in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor	32
Tabelle 4	PCR zur Überprüfung der Klonierung	33
Tabelle 5	Sequenzierreaktion mit dem GenomeLab DTCS Quick Start Kit	34
Tabelle 6	Reverse Transkription von miRNA in cDNA mit dem miScript II RT Kit	37
Tabelle 7	Relative Quantifizierung der miR-146a und miR-29c mittels RT-qPCR	38
Tabelle 8	Etablierung der Transfektionsbedingungen	39
Tabelle 9	DNA-Quantifizierung nach Transfektion	40
Tabelle 10	Primer-Anlagerung an RNA	41
Tabelle 11	cDNA-Synthese mit Superscript II Reverse Transcriptase	41
Tabelle 12	RT-qPCR mit TaqMan-Sonden zur Ermittlung der GAPDH-mRNA-Level	42
Tabelle 13	Transfektion der HEK293T-Zellen	43
Tabelle 14	Programm des TriStar LB941 von Berthold Technologies	45
Tabelle 15	Produktgrößen der amplifizierten Inserts	47
Tabelle 16	Größe der PCR-Produkte in Abhängigkeit von der Integration der verschiedenen 3'-UTR-Abschnitte in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor	48
Tabelle 17	Mittels LightCycler 480 ermittelte Ct-Werte der qPCR der verschiedenen Transfektionsansätze	52

6.4 Literaturverzeichnis

1. Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985;66(4):848-858.
2. Rimokh R, Magaud JP, Berger F, Samarut J, Coiffier B, Germain D, Mason DY. A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ('Ki-1 lymphoma'). *British journal of haematology*. 1989;71(1):31-36.
3. Bitter MA, Franklin WA, Larson RA, McKeithan TW, Rubin CM, Le Beau MM, Stephens JK, Vardiman JW. Morphology in Ki-1(CD30)-positive non-Hodgkin's lymphoma is correlated with clinical features and the presence of a unique chromosomal abnormality, t(2;5)(p23;q35). *The American journal of surgical pathology*. 1990;14(4):305-316.
4. Kaneko Y, Frizzera G, Edamura S, Maseki N, Sakurai M, Komada Y, Sakurai M, Tanaka H, Sasaki M, Suchi T, et al. A novel translocation, t(2;5)(p23;q35), in childhood phagocytic large T-cell lymphoma mimicking malignant histiocytosis. *Blood*. 1989;73(3):806-813.
5. Mason DY, Bastard C, Rimokh R, Dastugue N, Huret JL, Kristoffersson U, Magaud JP, Nezelof C, Tilly H, Vannier JP, et al. CD30-positive large cell lymphomas ('Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *British journal of haematology*. 1990;74(2):161-168.
6. Le Beau MM, Bitter MA, Larson RA, Doane LA, Ellis ED, Franklin WA, Rubin CM, Kadin ME, Vardiman JW. The t(2;5)(p23;q35): a recurring chromosomal abnormality in Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*. 1989;3(12):866-870.
7. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263(5151):1281-1284.
8. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-1392.
9. Phillips AA, Owens C, Lee S, Bhagat G. An update on the management of peripheral T-cell lymphoma and emerging treatment options. *Journal of blood medicine*. 2011;2:119-129.

10. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-5032.
11. Krebs in Deutschland 2009/2010. In: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., editor. 9 ed. Berlin 2013.
12. Robert Koch-Institut. [24.05.2015]. Available from: http://www.rki.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe2_form.html.
13. Vose J, Armitage J, Weisenburger D, International TCLP. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(25):4124-4130.
14. Falini B, Pileri S, Zinzani PL, Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peeters C, Verhoef G, Menestrina F, Todeschini G, Paulli M, Lazzarino M, Giardini R, Aiello A, Foss HD, Araujo I, Fizzotti M, Pelicci PG, Flenghi L, Martelli MF, Santucci A. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood*. 1999;93(8):2697-2706.
15. Savage KJ, Harris NL, Vose JM, Ullrich F, Jaffe ES, Connors JM, Rimsza L, Pileri SA, Chhanabhai M, Gascoyne RD, Armitage JO, Weisenburger DD, International Peripheral TCLP. ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood*. 2008;111(12):5496-5504.
16. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, Amin C, Brugieres L, Terrier-Lacombe MJ, Haralambieva E, Pulford K, Pileri S, Morris SW, Mason DY, Delsol G. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998;91(6):2076-2084.
17. Kinney MC, Higgins RA, Medina EA. Anaplastic large cell lymphoma: twenty-five years of discovery. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(1):19-43.
18. Stein H, Foss HD, Durkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford K, Pileri S, Falini B. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*. 2000;96(12):3681-3695.
19. Bonzheim I, Geissinger E, Roth S, Zettl A, Marx A, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Rudiger T. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood*. 2004;104(10):3358-3360.

20. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer research*. 1971;31(11):1860-1861.
21. Fornari A, Piva R, Chiarle R, Novero D, Inghirami G. Anaplastic large cell lymphoma: one or more entities among T-cell lymphoma? *Hematological oncology*. 2009;27(4):161-170.
22. Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, Delsol G, Mason DY. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood*. 1997;89(4):1394-1404.
23. Li R, Morris SW. Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) small-molecule inhibitors for cancer therapy. *Medicinal research reviews*. 2008;28(3):372-412.
24. Weiss JB, Xue C, Benice T, Xue L, Morris SW, Raber J. Anaplastic lymphoma kinase and leukocyte tyrosine kinase: functions and genetic interactions in learning, memory and adult neurogenesis. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2012;100(3):566-574.
25. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, Yamamoto T. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14(4):439-449.
26. Suzuki R, Kagami Y, Takeuchi K, Kami M, Okamoto M, Ichinohasama R, Mori N, Kojima M, Yoshino T, Yamabe H, Shiota M, Mori S, Ogura M, Hamajima N, Seto M, Suchi T, Morishima Y, Nakamura S. Prognostic significance of CD56 expression for ALK-positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype. *Blood*. 2000;96(9):2993-3000.
27. Schlette EJ, Medeiros LJ, Goy A, Lai R, Rassidakis GZ. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(9):1682-1688.
28. Rassidakis GZ, Goy A, Medeiros LJ, Jiang Y, Thomaidis A, Remache Y, Cabanillas F, Sarris AH, Gilles F. Prognostic significance of MUC-1 expression in systemic anaplastic large cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(6):2213-2220.
29. Falini B. Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. *British journal of haematology*. 2001;114(4):741-760.
30. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *The New England journal of medicine*. 1993;329(14):987-994.

31. Pro B, Advani R, Brice P, Bartlett NL, Rosenblatt JD, Illidge T, Matous J, Ramchandren R, Fanale M, Connors JM, Yang Y, Sievers EL, Kennedy DA, Shustov A. Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(18):2190-2196.
32. Wan W, Albom MS, Lu L, Quail MR, Becknell NC, Weinberg LR, Reddy DR, Holskin BP, Angeles TS, Underiner TL, Meyer SL, Hudkins RL, Dorsey BD, Ator MA, Ruggeri BA, Cheng M. Anaplastic lymphoma kinase activity is essential for the proliferation and survival of anaplastic large-cell lymphoma cells. *Blood*. 2006;107(4):1617-1623.
33. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(1):11-23.
34. Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, Oikawa N, Tsukuda T, Ishii N, Aoki Y. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer cell*. 2011;19(5):679-690.
35. Sabbatini P, Korenchuk S, Rowand JL, Groy A, Liu Q, Leperi D, Atkins C, Dumble M, Yang J, Anderson K, Kruger RG, Gontarek RR, Maksimchuk KR, Suravajjala S, Lapierre RR, Shotwell JB, Wilson JW, Chamberlain SD, Rabindran SK, Kumar R. GSK1838705A inhibits the insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase and shows antitumor activity in experimental models of human cancers. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(10):2811-2820.
36. Galkin AV, Melnick JS, Kim S, Hood TL, Li N, Li L, Xia G, Steensma R, Chopiuk G, Jiang J, Wan Y, Ding P, Liu Y, Sun F, Schultz PG, Gray NS, Warmuth M. Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(1):270-275.
37. Gambacorti Passerini C, Farina F, Stasia A, Redaelli S, Ceccon M, Mologni L, Messa C, Guerra L, Giudici G, Sala E, Mussolin L, Deeren D, King MH, Steurer M, Ordemann R, Cohen AM, Grube M, Bernard L, Chiriano G, Antolini L, Piazza R. Crizotinib in advanced, chemoresistant anaplastic lymphoma kinase-positive lymphoma patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(2):djt378.
38. Zdzalik D, Dymek B, Grygielewicz P, Gunerka P, Bujak A, Lamparska-Przybysz M, Wieczorek M, Dzwonek K. Activating mutations in ALK kinase domain confer resistance to structurally unrelated ALK inhibitors in NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2014;140(4):589-598.

39. Merkel O, Hamacher F, Sift E, Kenner L, Greil R. Novel therapeutic options in anaplastic large cell lymphoma: molecular targets and immunological tools. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(7):1127-1136.
40. Ait-Tahar K, Damm-Welk C, Burkhardt B, Zimmermann M, Klapper W, Reiter A, Pulford K, Woessmann W. Correlation of the autoantibody response to the ALK oncoantigen in pediatric anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma with tumor dissemination and relapse risk. *Blood*. 2010;115(16):3314-3319.
41. Pulford K, Falini B, Banham AH, Codrington D, Robertson H, Hatton C, Mason DY. Immune response to the ALK oncogenic tyrosine kinase in patients with anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 2000;96(4):1605-1607.
42. Chiarle R, Martinengo C, Mastini C, Ambrogio C, D'Escamard V, Forni G, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase is an effective oncoantigen for lymphoma vaccination. *Nature medicine*. 2008;14(6):676-680.
43. Lee D, Shin C. MicroRNA-target interactions: new insights from genome-wide approaches. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1271:118-128.
44. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
45. miRBase. [02.10.2015]. Available from: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>.
46. Wilczynska A, Bushell M. The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell death and differentiation*. 2014.
47. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews Genetics*. 2008;9(2):102-114.
48. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(10):704-714.
49. 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. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(24):15524-15529.
50. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-*miR155* transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(18):7024-7029.

51. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(4):259-269.
52. Costa PM, Pedroso de Lima MC. MicroRNAs as Molecular Targets for Cancer Therapy: On the Modulation of MicroRNA Expression. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 2013;6(10):1195-1220.
53. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine*. 2012;4(3):143-159.
54. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England journal of medicine*. 2013;368(18):1685-1694.
55. Merkel O, Hamacher F, Laimer D, Sift E, Trajanoski Z, Scheideler M, Egger G, Hassler MR, Thallinger C, Schmatz A, Turner SD, Greil R, Kenner L. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(37):16228-16233.
56. Lawrie CH, Saunders NJ, Soneji S, Palazzo S, Dunlop HM, Cooper CD, Brown PJ, Troussard X, Mossafa H, Enver T, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS. MicroRNA expression in lymphocyte development and malignancy. *Leukemia*. 2008;22(7):1440-1446.
57. Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K. miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2011;118(26):6881-6892.
58. Dejean E, Renalier MH, Foisseau M, Agirre X, Joseph N, de Paiva GR, Al Saati T, Soulier J, Desjobert C, Lamant L, Prosper F, Felsher DW, Cavaille J, Prats H, Delsol G, Giuriato S, Meggetto F. Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas. *Leukemia*. 2011;25(12):1882-1890.
59. Liu C, Iqbal J, Teruya-Feldstein J, Shen Y, Dabrowska MJ, Dybkaer K, Lim MS, Piva R, Barreca A, Pellegrino E, Spaccarotella E, Lachel CM, Kucuk C, Jiang CS, Hu X, Bhagavathi S, Greiner TC, Weisenburger DD, Aoun P, Perkins SL, McKeithan TW, Inghirami G, Chan WC. MicroRNA expression profiling identifies molecular signatures associated with anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2013;122(12):2083-2092.

60. Spaccarotella E, Pellegrino E, Ferracin M, Ferreri C, Cuccuru G, Liu C, Iqbal J, Cantarella D, Taulli R, Provero P, Di Cunto F, Medico E, Negrini M, Chan WC, Inghirami G, Piva R. STAT3-mediated activation of microRNA cluster 17~92 promotes proliferation and survival of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica*. 2014;99(1):116-124.
61. Desjobert C, Renalier MH, Bergalet J, Dejean E, Joseph N, Kruczynski A, Soulier J, Espinos E, Meggetto F, Cavaille J, Delsol G, Lamant L. MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression. *Blood*. 2011;117(24):6627-6637.
62. Steinhilber J, Bonin M, Walter M, Fend F, Bonzheim I, Quintanilla-Martinez L. Next-generation sequencing identifies deregulation of microRNAs involved in both innate and adaptive immune response in ALK+ ALCL. *PLoS one*. 2015;10(2):e0117780.
63. Steinhilber J. Charakterisierung der miRNA-Expression im großzellig anaplastischen T-Zell-Lymphom [naturwissenschaftliche Dissertation]: Tübingen; 2014.
64. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiological genomics*. 2012;44(4):237-244.
65. Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer research*. 2009;69(3):1135-1142.
66. Han TS, Hur K. MicroRNA-29c mediates initiation of gastric carcinogenesis by directly targeting ITGB1. 2014.
67. Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Saussoy P, Van Den Neste E, Michaux L, Heimann P, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*. 2009;113(21):5237-5245.
68. Pass HI, Goparaju C, Ivanov S, Donington J, Carbone M, Hoshen M, Cohen D, Chajut A, Rosenwald S, Dan H, Benjamin S, Aharonov R. hsa-miR-29c* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer research*. 2010;70(5):1916-1924.
69. Nguyen T, Kuo C, Nicholl MB, Sim MS, Turner RR, Morton DL, Hoon DS. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2011;6(3):388-394.

70. Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, Chen CJ, Hildesheim A, Sugden B, Ahlquist P. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(15):5874-5878.
71. Wang H, Zhu Y, Zhao M, Wu C, Zhang P, Tang L, Zhang H, Chen X, Yang Y, Liu G. miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin beta1 and matrix metalloproteinase2 (MMP2). *PLoS one*. 2013;8(8):e70192.
72. Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2012;5:13.
73. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(33):12481-12486.
74. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006;25(51):6758-6780.
75. Curtale G, Citarella F, Carissimi C, Goldoni M, Carucci N, Fulci V, Franceschini D, Meloni F, Barnaba V, Macino G. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood*. 2010;115(2):265-273.
76. Zhang J, Xu X, Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cellular & molecular immunology*. 2004;1(3):186-192.
77. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(6):3183-3189.
78. Visone R, Rassenti LZ, Veronese A, Taccioli C, Costinean S, Aguda BD, Volinia S, Ferracin M, Palatini J, Balatti V, Alder H, Negrini M, Kipps TJ, Croce CM. Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114(18):3872-3879.
79. Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O'Connell RM, Baltimore D. NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(22):9184-9189.

80. Brocker CN, Vasiliou V, Nebert DW. Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Human genomics*. 2009;4(1):43-55.
81. Zhou HM, Weskamp G, Chesneau V, Sahin U, Vortkamp A, Horiuchi K, Chiusaroli R, Hahn R, Wilkes D, Fisher P, Baron R, Manova K, Basson CT, Hempstead B, Blobel CP. Essential role for ADAM19 in cardiovascular morphogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(1):96-104.
82. Ramdas V, McBride M, Denby L, Baker AH. Canonical transforming growth factor-beta signaling regulates disintegrin metalloprotease expression in experimental renal fibrosis via miR-29. *The American journal of pathology*. 2013;183(6):1885-1896.
83. Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer science*. 2007;98(5):621-628.
84. Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2002;59(8):1317-1326.
85. Gopinathan L, Tan SL, Padmakumar VC, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Loss of Cdk2 and cyclin A2 impairs cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer research*. 2014.
86. Wolowiec D, Berger F, Ffrench P, Bryon PA, Ffrench M. CDK1 and cyclin A expression is linked to cell proliferation and associated with prognosis in non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia & lymphoma*. 1999;35(1-2):147-157.
87. Yasmeen A, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert review of molecular diagnostics*. 2003;3(5):617-633.
88. D'Angiolella V, Esencay M, Pagano M. A cyclin without cyclin-dependent kinases: cyclin F controls genome stability through ubiquitin-mediated proteolysis. *Trends in cell biology*. 2013;23(3):135-140.
89. Singhal S, Amin KM, Kruklitis R, DeLong P, Friscia ME, Litzky LA, Putt ME, Kaiser LR, Albelda SM. Alterations in cell cycle genes in early stage lung adenocarcinoma identified by expression profiling. *Cancer biology & therapy*. 2003;2(3):291-298.
90. Fu J, Qiu H, Cai M, Pan Y, Cao Y, Liu L, Yun J, Zhang CZ. Low cyclin F expression in hepatocellular carcinoma associates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Cancer science*. 2013;104(4):508-515.
91. Bonnemann CG. The collagen VI-related myopathies Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Handbook of clinical neurology*. 2011;101:81-96.

92. Pfaff M, Aumailley M, Specks U, Knolle J, Zerwes HG, Timpl R. Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. *Experimental cell research*. 1993;206(1):167-176.
93. Demir E, Sabatelli P, Allamand V, Ferreira A, Moghadaszadeh B, Makrelouf M, Topaloglu H, Echenne B, Merlini L, Guicheney P. Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. *American journal of human genetics*. 2002;70(6):1446-1458.
94. Jobsis GJ, Keizers H, Vreijling JP, de Visser M, Speer MC, Wolterman RA, Baas F, Bolhuis PA. Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. *Nature genetics*. 1996;14(1):113-115.
95. Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J, Ravussin E, Bray GA, Smith SR. Adipose tissue collagen VI in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(12):5155-5162.
96. Ismail RS, Baldwin RL, Fang J, Browning D, Karlan BY, Gasson JC, Chang DD. Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer research*. 2000;60(23):6744-6749.
97. Thorsen K, Sorensen KD, Brems-Eskildsen AS, Modin C, Gaustadnes M, Hein AM, Kruhoffer M, Laurberg S, Borre M, Wang K, Brunak S, Krainer AR, Topping N, Dyrskjot L, Andersen CL, Orntoft TF. Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2008;7(7):1214-1224.
98. Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T, Morin PJ. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer cell*. 2003;3(4):377-386.
99. McLean CM, Karemaker ID, van Leeuwen F. The emerging roles of DOT1L in leukemia and normal development. *Leukemia*. 2014.
100. Nguyen AT, Zhang Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes & development*. 2011;25(13):1345-1358.
101. Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, Vempati S, Faber J, Krivtsov AV, Feng Z, Punt N, Daigle A, Bullinger L, Pollock RM, Richon VM, Kung AL, Armstrong SA. MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer cell*. 2011;20(1):66-78.
102. Oakley AJ, Yamada T, Liu D, Coggan M, Clark AG, Board PG. The identification and structural characterization of C7orf24 as gamma-glutamyl cyclotransferase. An essential enzyme in the gamma-glutamyl cycle. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(32):22031-22042.

103. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Annual review of biochemistry. 1983;52:711-760.
104. Amano T, Eishi Y, Yamada T, Uchida K, Minegishi K, Tamura T, Kobayashi D, Hiroshi K, Suzuki T, Board PG. Widespread expression of gamma-glutamyl cyclotransferase suggests it is not a general tumor marker. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2012;60(1):76-86.
105. Li L, Du Y, Kong X, Li Z, Jia Z, Cui J, Gao J, Wang G, Xie K. Lamin B1 is a novel therapeutic target of betulinic acid in pancreatic cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2013;19(17):4651-4661.
106. Moir RD, Spann TP, Goldman RD. The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. International review of cytology. 1995;162b:141-182.
107. Zuela N, Bar DZ, Gruenbaum Y. Lamins in development, tissue maintenance and stress. EMBO reports. 2012;13(12):1070-1078.
108. Dreesen O, Ong PF, Chojnowski A, Colman A. The contrasting roles of lamin B1 in cellular aging and human disease. Nucleus (Austin, Tex). 2013;4(4):283-290.
109. Sun S, Xu MZ, Poon RT, Day PJ, Luk JM. Circulating Lamin B1 (LMNB1) biomarker detects early stages of liver cancer in patients. Journal of proteome research. 2010;9(1):70-78.
110. Yenjerla M, Panopoulos A, Reynaud C, Fotedar R, Margolis RL. TD-60 is required for interphase cell cycle progression. Cell cycle. 2013;12(5):837-841.
111. Matsuo M, Nakada C, Tsukamoto Y, Noguchi T, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Moriyama M. MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2. Molecular cancer. 2013;12:15.
112. Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. Cell. 2011;146(1):67-79.
113. Morita S, Horii T, Kimura M, Ochiya T, Tajima S, Hatada I. miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. International journal of molecular sciences. 2013;14(7):14647-14658.
114. Yao H, Teng Y, Sun Q, Xu J, Chen YT, Hou N, Cheng X, Yang X, Chen ZN. Important functional roles of basigin in thymocyte development and T cell activation. International journal of biological sciences. 2013;10(1):43-52.

115. Huet E, Gabison EE, Mourah S, Menashi S. Role of emmprin/CD147 in tissue remodeling. *Connective tissue research*. 2008;49(3):175-179.
116. Nabeshima K, Iwasaki H, Koga K, Hojo H, Suzumiya J, Kikuchi M. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathology international*. 2006;56(7):359-367.
117. Nabeshima K, Suzumiya J, Nagano M, Ohshima K, Toole BP, Tamura K, Iwasaki H, Kikuchi M. Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas. *The Journal of pathology*. 2004;202(3):341-351.
118. Yan W, Wang WL, Zhu F, Chen SQ, Li QL, Wang L. Isolation of a novel member of small G protein superfamily and its expression in colon cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2003;9(8):1719-1724.
119. Zhang Y, Li Q, Zhu F, Cui J, Li K, Li Q, Wang R, Wang W, Wang W, Yan W. Subcellular localization of APMCF1 and its biological significance of expression pattern in normal and malignant human tissues. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2009;28:111.
120. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*. 2009;460(7254):479-486.
121. Yoon S, De Micheli G. Computational identification of microRNAs and their targets. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2006;78(2):118-128.
122. Hausser J, Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(9):599-612.
123. Vinther J, Hedegaard MM, Gardner PP, Andersen JS, Arctander P. Identification of miRNA targets with stable isotope labeling by amino acids in cell culture. *Nucleic acids research*. 2006;34(16):e107.
124. Kain SR, Ganguly S. Overview of genetic reporter systems. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al]*. 2001;Chapter 9:Unit9.6.
125. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(2):143-153.
126. Takemura K, Kawachi H, Eishi Y, Kitagaki K, Negi M, Kobayashi M, Uchida K, Inoue J, Inazawa J, Kawano T, Board PG. gamma-Glutamylcyclotransferase as a novel immunohistochemical biomarker for the malignancy of esophageal squamous tumors. *Human pathology*. 2014;45(2):331-341.

127. Hama S, Arata M, Nakamura I, Kasetani T, Itakura S, Tsuchiya H, Yoshiki T, Kogure K. Prevention of tumor growth by needle-free jet injection of anti-C7orf24 siRNA. *Cancer gene therapy*. 2012;19(8):553-557.
128. Mollinari C, Reynaud C, Martineau-Thuillier S, Monier S, Kieffer S, Garin J, Andreassen PR, Boulet A, Goud B, Kleman JP, Margolis RL. The mammalian passenger protein TD-60 is an RCC1 family member with an essential role in prometaphase to metaphase progression. *Developmental cell*. 2003;5(2):295-307.
129. Hutchison CJ. B-type lamins in health and disease. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014;29:158-163.
130. Lamande SR, Morgelin M, Adams NE, Selan C, Allen JM. The C5 domain of the collagen VI alpha3(VI) chain is critical for extracellular microfibril formation and is present in the extracellular matrix of cultured cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(24):16607-16614.
131. Xie X, Liu X, Zhang Q, Yu J. Overexpression of collagen VI alpha3 in gastric cancer. *Oncology letters*. 2014;7(5):1537-1543.
132. Arafat H, Lazar M, Salem K, Chipitsyna G, Gong Q, Pan TC, Zhang RZ, Yeo CJ, Chu ML. Tumor-specific expression and alternative splicing of the COL6A3 gene in pancreatic cancer. *Surgery*. 2011;150(2):306-315.
133. Kang CY, Wang J, Axell-House D, Soni P, Chu ML, Chipitsyna G, Sarosiek K, Sendeki J, Hyslop T, Al-Zoubi M, Yeo CJ, Arafat HA. Clinical significance of serum COL6A3 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2014;18(1):7-15.
134. Brummer A, Hausser J. MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2014;36(6):617-626.
135. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome research*. 2009;19(7):1175-1183.
136. Tarang S, Weston MD. Macros in microRNA target identification: a comparative analysis of in silico, in vitro, and in vivo approaches to microRNA target identification. *RNA biology*. 2014;11(4):324-333.
137. Eulalio A, Mano M. MicroRNA Screening and the Quest for Biologically Relevant Targets. *Journal of biomolecular screening*. 2015.

138. Fiszer-Kierzkowska A, Vydra N, Wysocka-Wycisk A, Kronekova Z, Jarzab M, Lisowska KM, Krawczyk Z. Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC molecular biology*. 2011;12:27.
139. Williams AE, Perry MM, Moschos SA, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 6):1211-1215.
140. Rong M, He R, Dang Y, Chen G. Expression and clinicopathological significance of miR-146a in hepatocellular carcinoma tissues. *Uppsala journal of medical sciences*. 2014;119(1):19-24.
141. Kogo R, Mimori K, Tanaka F, Komune S, Mori M. Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(13):4277-4284.
142. Hung PS, Liu CJ, Chou CS, Kao SY, Yang CC, Chang KW, Chiu TH, Lin SC. miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes. *PloS one*. 2013;8(11):e79926.
143. Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng ZM. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PloS one*. 2008;3(7):e2557.
144. Li Q, Yan W, Cheng S, Guo S, Wang W, Zhang Z, Wang L, Zhang J, Wang W. Introduction of G1 phase arrest in Human Hepatocellular carcinoma cells (HHCC) by APMCF1 gene transfection through the down-regulation of TIMP3 and up-regulation of the CDK inhibitors p21. *Molecular biology reports*. 2006;33(4):257-263.
145. Yang IP, Tsai HL, Huang CW, Huang MY, Hou MF, Juo SH, Wang JY. The functional significance of microRNA-29c in patients with colorectal cancer: a potential circulating biomarker for predicting early relapse. *PloS one*. 2013;8(6):e66842.
146. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA (New York, NY)*. 2008;14(3):417-424.
147. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*. 2008;27(42):5643-5647.
148. Gebert LF, Rebhan MA, Crivelli SE, Denzler R, Stoffel M, Hall J. Miravirsen (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic acids research*. 2014;42(1):609-621.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen universitären Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich habe an keiner anderen Hochschule ein Promotionsverfahren oder entsprechendes Prüfungsverfahren beantragt.

Tübingen, den 09.10.2015

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen meinen Dank aussprechen, die zu der Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend für die Vergabe dieses interessanten und vielseitigen Themas.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Falko Fend, der mir die Durchführung der Doktorarbeit unter ausgezeichneten Bedingungen am Institut für Pathologie der Universität Tübingen ermöglicht hat.

Für die außerordentlich gute Betreuung gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Irina Bonzheim und Frau Dr. Julia Steinhilber. Ihre kompetente Unterstützung und freundliche Hilfsbereitschaft haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Sema Colak danke ich für die Hilfe bei der DNA-Sequenzierung.

Darüber hinaus möchte ich Frau Janine Schmidt und Frau Sieglinde Baisch sowie den anderen Doktoranden für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe danken.