

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Georg Sczakiel

Mechanistische Analysen zu Krankheits-korrelierten SNPs in microRNA-regulierten Sequenzbereichen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
– Dr. rer. nat. –
der Universität zu Lübeck
Aus der Sektion Naturwissenschaften



vorgelegt von
Ulrike Haas
aus Bad Salzungen

Lübeck, 2012

Erstberichterstatter : Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel
Zweitberichterstatter : Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann
Drittberichterstatter : Prof. Dr. rer. nat. Julius Brennecke
:
Prüfungsvorsitzender : Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

Tag der mündlichen Prüfung : 01.10.2012

Zum Druck genehmigt : Lübeck, den 04.11.2013

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Genexpression	3
2.2 Genetische Variationen	4
2.3 Identifikation genetischer Variation mittels genomweiter Assoziationsstudien	5
2.4 <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> - SNPs	6
2.5 SNPs und Erkrankungen	7
2.6 SNPs und Therapie	7
2.7 RNA-Interferenz vermittelte Regulation der Genexpression	8
2.7.1 Modulation der miRNA-Funktion	10
2.8 SNPs in miRNA-regulierten Systemen	11
2.8.1 SNPs in miRNA kodierenden Regionen	13
2.8.2 SNPs in miRNA Ziel-mRNAs	13
2.8.3 SNPs in miRNA prozessierenden Proteinen	14
2.9 Mechanismen der miRNA-vermittelten Regulation	14
2.10 Ziel dieser Arbeit	15
3 Material	17
3.1 Allgemeines	17
3.2 Geräte	17
3.3 Verbrauchsmaterialien	19
3.4 Chemikalien	19
3.5 Nukleinsäuren	21
3.5.1 DNA Oligonukleotide	21
3.5.2 miRNAs	22
3.5.3 siRNAs	23
3.5.4 Primer	24
3.5.5 Plasmide	27
3.6 Kits	28
3.7 Enzyme	29
3.8 Größenmarker	29

3.9	Zellkulturmedien	30
3.10	<i>E.coli</i> Stämme	30
3.11	Puffer und Lösungen	30
4	Methoden	33
4.1	Molekularbiologische Methoden	33
4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	33
4.1.2	Sequenzierung	37
4.1.3	Reverse Transkription	38
4.1.4	Klonierung	39
4.1.5	Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i>	40
4.1.6	Kryokonservierung von <i>E.coli</i>	41
4.2	Nukleinsäureanalytische Methoden	41
4.2.1	Konzentrationsbestimmung	41
4.2.2	Elektrophoretische Auftrennung	42
4.2.3	Detektion von Nukleinsäuren im Gel	43
4.2.4	Isolation von Plasmid-DNA	43
4.2.5	Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten	44
4.2.6	RNA-Isolation	45
4.2.7	Fällung von Nukleinsäuren	45
4.2.8	Gelextraktion	46
4.2.9	Aufreinigung von PCR-Produkten	46
4.2.10	Einengen von Nukleinsäuren	46
4.2.11	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	46
4.2.12	Radioaktive Endmarkierung	46
4.2.13	Hybridisierung	47
4.2.14	<i>in vitro</i> Transkription	47
4.2.15	RNA-Strukturprobing	48
4.2.16	RNA-RNA-Annealing	49
4.3	Zellbiologische Methoden	52
4.3.1	Kultivierung von Säugerzellen	52
4.3.2	Kryokonservierung von Säugerzellen	53
4.3.3	Transfektion von Säugerzellen	53
4.3.4	Lyse von Säugerzellen	53
4.3.5	Dual Luciferase-Assay	54
4.4	Computergestützte Methoden und Auswertungen	54
4.4.1	RNA-Strukturvorhersage mittels mfold	54
4.4.2	Online-Tools	55
4.4.3	Programme	56

5	Ergebnisse	57
5.1	Erste methodische Analysen	57
5.2	Vorarbeiten	58
5.2.1	SNPs aus Literatur-Recherche	58
5.2.2	SNPs aus der MKII	58
5.3	Untersuchungen im AGTR1-System	59
5.3.1	Einführung	59
5.3.2	Bindungsenergien	60
5.3.3	Verwendete AGTR1 Reporter-gen-Konstrukte	61
5.3.4	Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die miRNA-vermittelte Regulation von AGTR1	62
5.3.5	Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die siRNA-vermittelte Regulation von AGTR1	65
5.3.6	Sekundärstrukturvorhersage	67
5.3.7	RNA-Strukturprobing	69
5.3.8	Kinetik der Bindung von miRNAs an AGTR1 RNA <i>in vitro</i> Transkripte	70
5.3.9	Kinetik der Bindung von siRNAs an AGTR1 RNA <i>in vitro</i> Transkripte	71
5.3.10	Zusammenfassung und Fazit der AGTR1-Analysen	74
5.4	Untersuchungen im ESR1-System	76
5.4.1	Einführung	76
5.4.2	Bindungsenergien	76
5.4.3	Verwendete ESR1 Reporter-gen-Konstrukte	77
5.4.4	Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die miRNA-vermittelte Regulation von ESR1	78
5.4.5	Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die siRNA-vermittelte Regulation von ESR1	79
5.4.6	Sekundärstrukturvorhersage	81
5.4.7	RNA-Strukturprobing	82
5.4.8	Zusammenfassung und Fazit der ESR1-Analysen	83
5.5	Untersuchungen weiterer polymorpher Ziel-Gene	85
5.5.1	Einführung	85
5.5.2	Vorauswahl	85
5.5.3	Analyse auf miRNA Bindestellen mit kardiovaskulärem Bezug	85
5.5.4	Sekundärstrukturvorhersage	86
5.5.5	Zusammenfassung und Fazit der Untersuchungen weiterer polymorpher Ziel-Gene	88
5.6	Untersuchungen im MRAS-System	90
5.6.1	Einführung	90

5.6.2	Bindungsenergien	91
5.6.3	Sekundärstrukturvorhersage	92
5.6.4	Klonierung von MRAS Reporter-Gen-Konstrukten	93
5.6.5	Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die miRNA-vermittelte Regulation von MRAS	94
5.6.6	RNA-Strukturprobing	95
5.6.7	Kinetik der Bindung von miRNAs an MRAS RNA <i>in vitro</i> Transkripte	97
5.6.8	Zusammenfassung und Fazit der MRAS-Analysen	99
5.7	Untersuchungen im DHFR-System	100
5.7.1	Einführung	100
5.7.2	miR-24 Bindestellen in der DHFR 3'-UTR	100
5.7.3	Sekundärstrukturvorhersage	101
5.7.4	Sequenzanalyse der DHFR 3'-UTR	102
5.7.5	Zusammenfassung und Fazit der DHFR-Analysen	103
5.8	Untersuchungen im TCF21-System	105
5.8.1	Einführung	105
5.8.2	Bindungsenergien	106
5.8.3	Sekundärstrukturvorhersage	107
5.8.4	Klonierung von TCF21 Reporter-Gen-Konstrukten	109
5.8.5	Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die miRNA-vermittelte Regulation von TCF21	110
5.8.6	Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die siRNA-vermittelte Regulation von TCF21	117
5.8.7	RNA-Strukturprobing	118
5.8.8	Kinetik der Bindung von miRNAs an TCF21 RNA <i>in vitro</i> Transkripte	121
5.8.9	Annealing von miRNAs an TCF21 mit anschließendem Strukturprobing	130
5.8.10	Kinetik der Bindung von siRNAs an TCF21 RNA <i>in vitro</i> Transkripte	131
5.8.11	Zusammenfassung und Fazit der TCF21-Analysen	135
5.9	Tabellarische Übersicht ausgewählter Ergebnisse	136
6	Diskussion	137
6.1	Verfügbare Online-Tools zur Analyse von miR-SNPs	137
6.1.1	Einführung	137
6.1.2	miRNA-Sequenzen und Vorhersage von miRNA Bindestellen	137
6.1.3	miR-SNP Datenbanken	138
6.1.4	SNP Informationen	139
6.1.5	Konsequenzen für funktionelle Analysen von miR-SNPs	139
6.2	Einfluss SNP-induzierter RNA-Strukturänderungen auf die miRNA-Regulation	140
6.3	Beeinflussung der miRNA-Regulation durch RNA-bindende Proteine	142

6.4	Detektion von RNA-RNA-Komplexen	143
6.4.1	miRNA-RNA-Komplexe als Modell des Annealings partiell komplementärer RNAs	144
6.4.2	siRNA-RNA-Komplexe als Modell des Annealings komplementärer RNAs	145
6.5	siRNA-vermittelte Regulation polymorpher Ziel-Gene	145
6.6	Erkenntnisse für zukünftige Analysen von miR-SNPs	146
6.6.1	RNA-Strukturvorhersage als <i>pre-screening</i>	146
6.6.2	Auswahl von Sequenzen für Reporter-gen-Konstrukte	147
6.6.3	Verwendung modifizierter miRNA <i>mimics</i>	148
6.7	Weitere funktionelle Analysen der untersuchten Risiko-Gene	149
6.8	Gen-spezifische RNAi-vermittelte Therapie	150
6.8.1	Beispiele für klinischen Studien von RNAi-Therapeutika	150
6.8.2	Allel-spezifische siRNA-vermittelte Therapieansätze	150
6.8.3	miR-SNPs und Therapieansätze	151
7	Literaturverzeichnis	153
A	Anhang	165
A.1	PCR-Details	165
A.1.1	PCRs zur 3'-UTR Amplifikation	165
A.1.2	Mutagenese-PCRs	166
A.1.3	PCRs zum Anfügen der T7 Promotor-Erkennungssequenz	168
A.1.4	Kolonie-PCRs	169
A.2	Geräte- und Materialhersteller	170
A.3	Abkürzungsverzeichnis	170
A.4	Verzeichnis gebräuchlicher, fremdspachiger Begriffe	173
A.5	Abbildungsverzeichnis	174
A.6	Tabellenverzeichnis	176
A.7	Publikationsliste	179
A.8	Danksagung	180

1 Zusammenfassung

Das Auftreten genetischer Variationen beim Menschen kann ursächlich verantwortlich für natürliche Unterschiede und gleichfalls an der Entstehung pathologischer Prozesse beteiligt sein. Den quantitativ größten Anteil an genetischen Variationen machen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) aus. Die Identifizierung von SNPs und deren Korrelation mit Erkrankungen des Menschen ist Gegenstand vieler aktueller Studien in den Feldern der Human-genetik und molekularen Medizin.

Bei einer Vielzahl biologischer Prozesse nimmt die RNA-Interferenz, die Sequenz-spezifische Repression der Genexpression, eine entscheidende regulatorische Rolle ein. Über die Bindung einer miRNA an eine teilweise komplementäre Ziel-RNA kommt es post-transkriptionell zur Suppression der Expression des Ziel-Gens. Das Auftreten von SNPs sowohl in miRNAs als auch miRNA Ziel-Genen kann zu einer veränderten miRNA-Regulation führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Analysen zum Einfluss von pathologisch relevanten SNPs auf die miRNA-vermittelte Regulation durchgeführt, um mechanistische Einsichten in zugrunde liegende molekulare Mechanismen einer möglicherweise durch den SNP verursachten veränderten miRNA-Ziel-RNA-Interaktion näher zu untersuchen.

Dazu wurden zunächst Analysen mit dem AGTR1 SNP rs5186, der direkt in der Bindestelle für miR-155 lokalisiert ist, durchgeführt. Die miR-155-vermittelte Regulation der beiden AGTR1-Varianten wurde im Luciferase Reporter-Assay mit unterschiedlichen Längen an AGTR1 Reportern und verschiedenen miRNA-Varianten analysiert. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass die AGTR1 RNA-Sekundärstruktur einen entscheidenden Einfluss auf die differentielle miR-155-vermittelte Regulation beider AGTR1 SNP-Varianten hat. Mittels Computer-basierter Vorhersagen sowie *in vitro* Strukturprobing-Experimenten wurden SNP-korrelierte strukturelle Änderungen der AGTR1 RNA-Struktur detektiert. Anhand der aus diesen Ergebnissen entwickelten Arbeitshypothese, dass SNP-korrelierte Änderungen der Sekundärstruktur zur SNP-induzierten Dysregulation der miRNA-Regulation beitragen, wurden weitere miR-SNPs, z.B. ESR1 SNP rs9341070, untersucht.

Beeinflusst ein SNP die RNA-Struktur derart, dass auch weiter entfernt liegende miRNA Bindestellen von der Strukturänderung betroffen sind, so ist es denkbar, dass ein SNP über seine unmittelbare Position hinausgehend Auswirkungen auf die miRNA-Regulation einer mRNA haben kann. Dies wurde mittels Analysen des außerhalb mehrerer miRNA Bindestellen lokalisierten MRAS SNP rs9818870 untersucht. Die Ergebnisse aus Reporter-Assays unter Verwendung von miR-195 und Strukturprobing-Experimenten bestätigen zum einen

das Modell der Beeinflussung der miRNA-Regulation durch SNP-induzierte strukturelle Änderungen der RNA-Struktur. Zum anderen verdeutlichen sie, dass dieses Modell auch auf SNPs außerhalb von miRNA Bindestellen anwendbar ist.

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung der RNA-Struktur an einer durch einen SNP induzierten veränderten RNA-RNA-Interaktion lieferten Untersuchungen des TCF21 SNPs rs9341070, der innerhalb einer miR-224 Bindestelle positioniert ist. Mittels *in vitro* RNA-RNA-Annealing-Versuchen von TCF21 RNA-Varianten und miR-224-Varianten konnten Unterschiede in der zeitabhängigen Komplexbildung zwischen Ziel-RNA und miRNA beobachtet werden. Diese Ergebnisse spiegelten sich in der miRNA-vermittelten Regulation im Zellkulturversuch wider und weisen auf eine mit einer Strukturänderung einhergehende, veränderte Wechselwirkung zwischen miRNA und Ziel-RNA hin.

Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse kann eine Erweiterung des Mechanismus der miR-SNP-induzierten Beeinflussbarkeit der miRNA-Regulation beschrieben werden. Zusätzlich zu Auswirkungen eines SNPs auf die Basenpaarung zwischen miRNA und Ziel-RNA steht ein Modell, in dem ein SNP durch Veränderung der lokalen RNA-Sekundärstruktur die Zugänglichkeit für miRNAs verändern und somit die miRNA-Regulation einer Ziel-RNA beeinflussen kann. Das hat zur Folge, dass auch SNPs außerhalb von miRNA Bindestellen die miRNA-Regulation nachhaltig beeinflussen können. Damit führen die Untersuchungen zu weitreichenden mechanistischen Erkenntnissen, die die funktionelle Rolle von 3'-UTR lokalisierten SNPs bei der Pathogenese diverser zellulärer Prozesse unterstreichen.

2 Einleitung

Zellen, die kleinsten lebenden Einheiten und notwendigen Bausteine für die Entstehung eines Organismus, steuern auf der Grundlage ihres genetischen Materials biologische Prozesse. So führt etwa ihr Zusammenschluss zur Entwicklung spezieller Gewebe und Organe, deren Funktionen zum Aufbau und zur Aufrechterhaltung eines funktionellen Organismus unerlässlich sind. Die Entschlüsselung von zellulären Unterschieden zwischen einem gesunden und einem durch Auftreten von Krankheiten geprägten Organismus ist wesentlicher Bestandteil der biomedizinischen Forschung. Das detaillierte Verständnis biologischer Prozesse eröffnet vielfältige Möglichkeiten zur Entwicklung neuartiger molekularer Therapieansätze und -strategien.

2.1 Genexpression

Als Genexpression wird der biologische Prozess bezeichnet, bei dem die genetische Information in Form von DNA zunächst über die Transkription in RNA und anschließend durch Translation in ein Protein übersetzt wird. Als Endprodukt entsteht ein biologisch wirksames Makro-Molekül, das entsprechend seiner Funktion zur Ausführung oder Kontrolle zellulärer Prozesse beiträgt.

Wie in der Abb. 2.1 schematisch gezeigt, wird zunächst ein DNA-Abschnitt in einen *messenger* RNA (mRNA, Boten-RNA) - Vorläufer (prä-mRNA), der aus Introns und Exons besteht, transkribiert. Durch *Splicing* der Introns und Anfügen eines 5'-Caps und eines 3'-Poly-A-Schwanzes (Polyadenylierung) wird die prä-mRNA in die reife mRNA prozessiert. Diese wird aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert und dort durch Translation der Basensequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz das Protein gebildet. Durch alternatives RNA *Splicing* können aus einer prä-mRNA verschiedene mRNAs und damit aus einem einzelnen Gen unterschiedliche Protein-Varianten hervorgehen.

Neben den sogenannten *house keeping* Genen, die konstitutiv exprimiert werden, unterliegt die Expression anderer Gene wiederum einer strengen Regulation. So wird beispielsweise die Expression spezifischer Gene als Reaktion auf Zellstress, wie etwa Hitze oder UV-Strahlung, induziert. Es existieren weitere Ebenen der Genregulation, z.B. die Signalweitergabe zwischen Zellen, Chromatin-Modifikationen, mRNA-Splicing, -Polyadenylierung sowie -Lokalisation und Mechanismen der Protein-Lokalisation, -Modifikation und -Degradation [1].

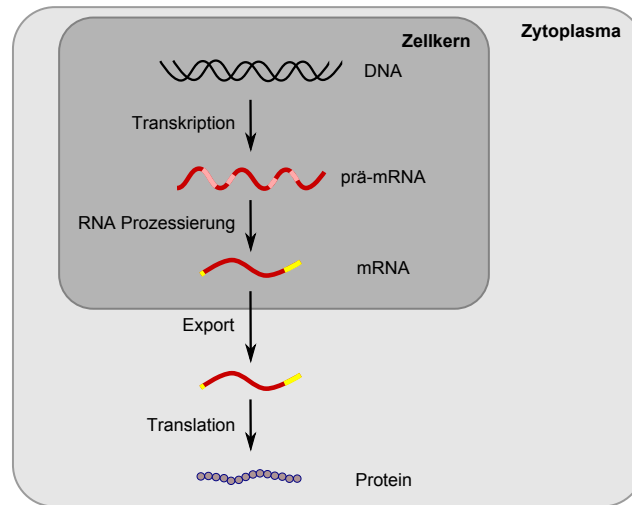


Abbildung 2.1: Fluss der Genexpression. Im Zellkern wird die DNA in die prä-mRNA transkribiert. Es folgt die Prozessierung zur mRNA, die aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert und dort in ein Protein translatiert wird. verändert nach [2]

2.2 Genetische Variationen

Genetische Variationen sind für die Entstehung der Artenvielfalt und der Variabilität innerhalb einer Spezies verantwortlich [3]. Humane Populationen sind auf der Ebene des genetischen Codes schätzungsweise zu 99 % identisch [4]. Somit führen letztendlich die verbleibenden Variationen zur Entstehung der Diversität zwischen den Menschen. Genetische Variationen sind an der Beeinflussung diverser zellulärer Prozesse beteiligt. Daher wird ihnen eine entscheidende Rolle an der Entwicklung pathologischer Mechanismen zugeschrieben.

Genetischen Variationen schließen Insertionen, Deletionen sowie Basenaustausche in der DNA ein. Befindet sich ein Basenaustausch innerhalb eines Protein-kodierenden Bereiches, so differenziert man unterschiedliche Mutationsarten. Beeinflusst der DNA-Basenaustausch die Aminosäuresequenz eines Proteins nicht, so spricht man von einer stillen Mutation. Eine *missense* Mutation hingegen führt zu einer Veränderung der Protein-Aminosäuresequenz, eine *nonsense* Mutation durch Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons zu einem trun-kierten Protein. Durch Insertionen oder Deletionen von Basen, deren Anzahl kein Vielfaches von drei ergibt, kann es zu einer Veränderung des Leserahmens und damit zur Translation eines Proteins mit einer völlig unterschiedlichen Aminosäuresequenz kommen.

Weitere Veränderungen im Genom, die zu genetischen Variationen führen, stellen die *copy number variations* (CNV) dar. Normalerweise liegt jedes Gen in zweifacher Kopie im Genom (eine je Chromosom) vor. Existiert also ein Genabschnitt häufiger oder seltener innerhalb des Genoms, so spricht man von einer CNV. Diese machen einen signifikant hohen Anteil aller genetischen Variationen aus, die Auswirkungen auf zahlreiche Krankheiten und Merk-

male haben [5].

Besonders bedeutsam ist das Auftreten genetischer Variationen in regulatorischen Regionen, wie z.B. Enhancern und Promotoren, in Bindungsregionen etwa für Transkriptionsfaktoren aber auch anderen regulatorischen Elementen, wie den untranslatierten Regionen (UTRs) von mRNAs. Die Identifikation genetischer Variationen als Ursache von Erkrankungen stellt einen wichtigen Anteil gegenwärtiger Forschungsbemühungen in der Genomforschung und molekularen Medizin dar. Auf der einen Seite existieren monogenetische Erkrankungen, die durch Variationen in einem einzelnen Gen verursacht werden. Als Beispiele seien Chorea Huntington, zystische Fibrose, Typ-1-Diabetes, Marfan Syndrom und erblich bedingter Brustkrebs genannt. Auf der anderen Seite stehen komplexe Erkrankungen, die eher durch „weiche“ Formen genetischer Variationen, wie z.B. in nicht-kodierenden Bereichen oder der Kopienzahl, beeinflussbar sind, da diese die Gendosis verändern und nicht zu einem Verlust oder einer Veränderung der Genfunktion führen [6].

2.3 Identifikation genetischer Variation mittels genomweiter Assoziationsstudien

Bereits vor über zwei Jahrzehnten begannen die Bestrebungen, das gesamte Humangenom zu entschlüsseln. Der Start des „*Human Genome Project*“ der USA geht auf einen Bericht des *National Research Council* im Jahr 1988 zurück [7]. Das Projekt wurde offiziell 1990 begonnen, und die vollständige Entschlüsselung des humanen Genoms war im Jahr 2003 abgeschlossen. Das Wissen um die Gesamtheit der Erbinformation stellt ein fundamentales Gerüst zur Aufklärung biologischer Prozesse dar. Ein Vergleich von Genomen untereinander bietet die Möglichkeiten, genetisch bedingte Erkrankungen zu erforschen und neue Therapieansätze zu entwickeln.

Zur Identifizierung genetischer Variationen, die an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind, werden sogenannte genomweite Assoziationsstudien (*genome-wide association studies*, GWAS) durchgeführt. Dabei erfolgt mit Hilfe einer vergleichenden Analyse des Genoms von Erkrankten mit dem von Kontroll-Gruppen eine Identifizierung genetischer Variationen, die mit der entsprechenden Krankheit potentiell assoziiert sind (siehe Abb. 2.2). Mit dem Wissen über die betroffenen Genabschnitte können an der Krankheitsentstehung beteiligte Prozesse besser aufgeklärt werden. Die Durchführung und Auswertung von GWAS bedarf also einer interdisziplinären Zusammenarbeit einer Vielzahl von Wissenschaftlern wie Mediziner, Biologen, Statistiker und Bioinformatiker, die sich häufig zu speziellen Konsortien zusammenschließen.

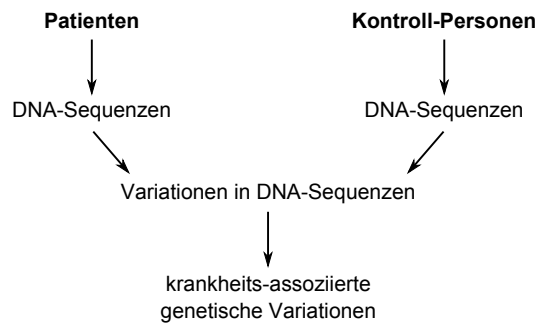


Abbildung 2.2: GWAS-Prinzip.

Die sich ständig weiterentwickelnde Technologie des *Next Generation Sequencing* ermöglicht die dafür notwendigen Hochdurchsatz-Sequenzierungen, die in zunehmend kürzerer Zeit und mit deutlich geringerem finanziellen Aufwand durchgeführt werden können [8]. Derzeit ist bei kompletter Sequenzierung von >10 Humangenomenen über Anbieter wie *Complete Genomics* oder *Illumina* mit Kosten von etwa 5.000 € pro Genom und einer Bearbeitungszeit von 8-12 Wochen zu rechnen¹. Anschließend erfolgt die Auswertung unter Verwendung bioinformatischer und statistischer Methoden. Nach der Identifikation einer Region als Risiko-Lokus sind detaillierte Analysen aller genetischen Varianten zur Ermittlung der entsprechend kausalen Variante(n) notwendig, um deren Beitrag zur Krankheitsprädisposition zu bestimmen und deren Rolle in funktionellen Signalwegen aufzuklären [9].

2.4 *Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs

Mit etwa 90 % der humanen DNA-Polymorphismen stellen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) den quantitativ größten Anteil der Variationen im menschlichen Genom dar [10, 11]. Sie treten durchschnittlich alle 100-300 Basen auf (*dbNCBI*). Ihr Auftreten steht jedoch scheinbar unter strenger evolutionärer Kontrolle, da die Anzahl an SNPs in funktionellen Regionen niedriger als in Regionen mit geringerer genomischer Sequenz-Konservierung ist [12, 13].

Für die funktionellen Auswirkungen von SNPs sind verschiedenste Szenarien denkbar, etwa durch Änderungen der Aminosäuresequenz, die zu einer Einschränkung oder Verstärkung von Bindungseigenschaften und Funktionsweisen führen können. SNPs außerhalb der kodierenden Region können einen entscheidenden Einfluss auf regulatorischer Ebene der Genexpression ausüben. Eine Lokalisation in Introns kann z.B. zu einem veränderten Splicing führen. SNPs in 3'-UTRs können durch Veränderung der Polyadenylierung oder regulatorischen Protein-RNA bzw. RNA-RNA-Interaktionen mit der mRNA-Stabilität und Translation interferieren [14].

¹persönliche Mitteilung von Herrn Gradel, Kundendienstmitarbeiter der Eurofins MWG GmbH, am 06.06.2012

2.5 SNPs und Erkrankungen

Wie auch für andere genetische Variationen wird die Existenz von SNPs mit dem Auftreten und der Entstehung verschiedenster pathologischer Prozesse assoziiert. Beispiele aus dem kardiovaskulären System stellen eine Assoziation von SNPs in Mitgliedern der Thrombospondin-Genfamilie mit familiärer, frühzeitiger koronarer Herzerkrankung und Herzinfarkt sowie die eines Polymorphismus in einem Kalium-Kanal mit einer Suszeptibilität für Herzrhythmusstörungen dar [15, 16]. Für entzündliche Darmerkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn, wurde eine Assoziation von SNPs im *Multidrug* Resistenz Protein 1 detektiert [17, 18]. Variationen im Gen für die Matrix Metalloproteinase 1 werden mit Lungenkrebs in Verbindung gebracht [19, 20].

In jüngster Vergangenheit sind anhand von in GWAS identifizierten SNPs sogenannte Risiko-Gene für diverse Pathologien, wie etwa für verschiedene Krebsarten und kardiovaskulären Erkrankungen, detektiert worden [21–25]. Eine nähere funktionelle Analyse dieser soll zur weiteren Aufklärung pathologischer Prozesse beitragen. Ein weiteres bedeutsames Ziel der Identifizierung und Validierung von SNPs, die zur Krankheits-Prädisposition beitragen, ist in der Möglichkeit einer frühen Diagnose, die zu einer Verbesserung der Vorsorge sowie Intervention im Krankheitsfall beitragen kann, zu sehen.

2.6 SNPs und Therapie

SNPs können nicht nur die Entstehung von Krankheiten sondern auch deren Therapie beeinflussen, denn genetische Variationen bieten einen Erklärungsansatz dafür, dass Medikamente unterschiedliche Wirkungen auf Individuen oder gar ganze Populationen entfalten. Dieser Aspekt hat zur Entstehung der Pharmakogenetik als Forschungsfeld geführt. Der Begriff Pharmakogenetik wurde bereits Ende der 1950er Jahre von dem Heidelberger Humangenetiker Friedrich Vogel geprägt [26]. Seitdem wurden eine Reihe von Beispielen, deren Fokus hauptsächlich auf SNPs, Insertionen und Deletionen, CNV und *missense* Mutationen lag, beschrieben [27].

Gegenstand zahlreicher Studien ist z.B. die genetische Variabilität innerhalb der Genfamilie des Cytochrom P450 Enzyms. Deren Auftreten wurde mehrfach mit Unterschieden in der Metabolisierung von Medikamenten zur Behandlung verschiedener Pathologien, wie Krebs, rheumatoider Arthritis und kardiovaskuläre Erkrankungen, beschrieben [28–30]. Der Einfluss von Polymorphismen im *CYP2C9* Gen auf die Behandlung mit dem Antikoagulant *Warfarin* wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen analysiert [31–33]. Oner Ozgon *et al.* [32] z.B. untersuchten den Einfluss eines *CYP2C9* SNPs, der einen Aminosäureaustausch verursacht und zu einer veränderten Metabolisierung von *Warfarin* führt. Die Studie zeigte, dass Patienten mit einer *CYP2C9*-Variante eine um 40 % niedrigere wöchentliche *Warfarin* Dosis

benötigten.

Das detaillierte Wissen über den Einfluss von SNPs auf spezielle therapeutische Ansätze kann somit zu einer verbesserten, individualisierten Behandlung beitragen.

2.7 RNA-Interferenz vermittelte Regulation der Genexpression

Als RNA-Interferenz (RNAi) wird die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression durch kleine, nicht-kodierende ganz oder teilweise Sequenz-komplementäre RNAs bezeichnet. Die Sequenz-spezifischen Wechselwirkungen zwischen der kurzen RNA und einer Ziel-mRNA führen dabei zur Suppression der Genexpression. Neben short interfering RNAs (siRNAs) und microRNAs (miRNAs) wurde mit den PIWI-interacting RNAs (piRNAs) eine weitere Klasse kleiner regulatorischer RNAs identifiziert. Letztere sind mit etwa 30 nt länger als die etwa 22 nt langen siRNAs und miRNAs und agieren ausschließlich in Geschlechtszellen [34, 35]. Während miRNAs im humanen Genom kodiert sind, wird die siRNA-vermittelte Regulation der Genexpression im humanen System nur über exogen zugeführte dsRNAs erreicht.

Als Regulator von Entwicklung und Differenzierung wurde 1993 *lin-4* in *C. elegans* als erste miRNA beschrieben [36], die Einführung des Begriffes miRNA erfolgte jedoch erst im Jahr 2001 [37, 38]. Seitdem wurden miRNAs in vielen Organismen und deren wichtige Rolle in der Entwicklung sowie in weiteren zellulären Prozessen, wie Differenzierung, Wachstum und Zelltod, identifiziert [39, 40]. Mittlerweile sind bereits mehr als 1.500 humane miRNA-Sequenzen in der miRBase-Datenbank aufgeführt (www.miRBase.org, aktueller *Release*: November 2011). Während die meisten miRNA-kodierenden Regionen isoliert im Genom kodiert sind, kommen andere miRNAs in Clustern vor, die als lange Vorläufer exprimiert und in die einzelnen miRNAs prozessiert werden [38, 41]. Obwohl miRNAs nur etwa 1 % des Genoms ausmachen [42], kontrollieren sie Schätzungen zufolge die Aktivität von mindestens 30 % aller Protein-kodierenden Gene [43, 44].

Die Abb. 2.3 zeigt schematisch die im Folgenden beschriebene miRNA- und siRNA-vermittelte Regulation der Genexpression. Mittels RNA-Polymerase II (Pol II) wird zunächst die endogen kodierte *primary* miRNA (*pri-miRNA*) transkribiert [45]. Diese wird von Drosha, einem RNase III Enzym, in die etwa 70 nt lange *precursor* miRNA (*pre-miRNA*) prozessiert und Ran-GTP-abhängig mittels Exportin-5 aus dem Kern in das Zytoplasma exportiert [46, 47]. Dort erfolgt mittels Dicer, ebenfalls einem RNase III Enzym, die Prozessierung zum miRNA-miRNA*-Duplex. Die siRNA-Duplexe werden aus langen dsRNAs gebildet [48]. Nur einer der beiden Stränge wird jeweils in den *RNA induced Silencing Complex* (RISC) geladen und führt durch Bindung an die Ziel-mRNA zur Sequenz-spezifischen Repression der Expression des Ziel-Gens. Die vollständige Komplementarität zwischen Ziel-RNA und siRNA induziert, ausgehend vom 5'-Ende des siRNA *guide* Stranges, eine Argonaute2-vermittelte Spaltung

der mRNA komplementär zu den Positionen 10-11 der siRNA [49, 50]. Die miRNA-vermittelte Hemmung führt vorwiegend zur Inhibition der Translation oder über Deadenylierung zu einer Destabilisierung bzw. Degradation der mRNA und nur perfekt bzw. nahezu perfekt komplementäre Ziel-mRNAs werden gespalten [39, 51–54]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand weiterer Untersuchungen [44, 55, 56].

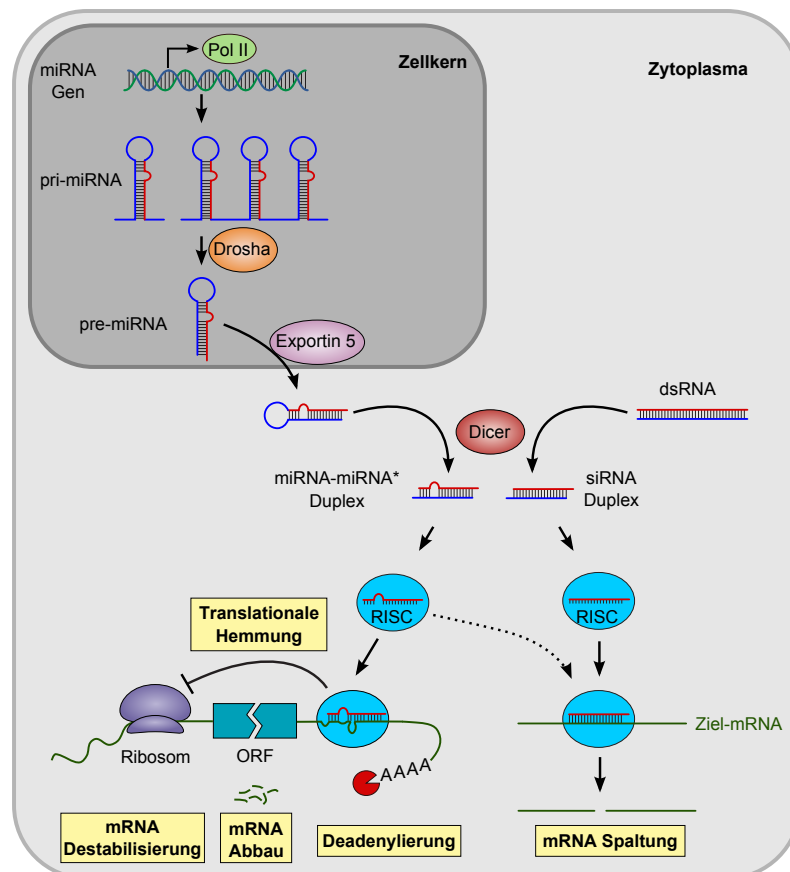


Abbildung 2.3: Schema der miRNA- und siRNA-vermittelten Regulation der Genexpression. Nähere Erläuterungen befinden sich im Text. verändert nach [39]

Die Interaktion zwischen miRNA und Ziel-mRNA erfolgt hauptsächlich über die 3'-UTR der mRNA und das Vorhandensein mehrerer miRNA Bindestellen geht mit einer stärkeren Regulation einher [57]. Analysen von Forman *et al.* [58] bestätigten, dass auch kodierende Regionen evolutionär konservierte funktionelle miRNA Bindestellen enthalten, diese jedoch weniger effektiv als 3'-UTR lokalisierte Bindestellen sind.

Änderungen der miRNA Expression sind an der Entstehung diverser pathologischer Prozesse, wie etwa der Entwicklung von Krebs oder kardiovaskulärer Phänotypen beteiligt [59–66]. Zudem können miRNAs in funktioneller Hinsicht ebenfalls als Onkogene und Tumor-

suppressorgene agieren [67–70]. Dies hat dazu geführt, dass miRNAs vermehrt sowohl als diagnostische Marker als auch therapeutische Ziele diskutiert werden [71–74].

2.7.1 Modulation der miRNA-Funktion

Zur Analyse der Rolle spezifischer miRNAs bzw. der Regulation bestimmter Gene werden verschiedene miRNA-Modulatoren eingesetzt, die entweder die endogene Menge an miRNAs erhöhen oder die Funktion von miRNAs inhibieren sollen. Die Abb. 2.4 zeigt schematisch den Einfluss beider Modulatoren: durch die Zugabe von miRNA *mimics* kommt es zu einer gesteigerten miRNA-vermittelten Repression der Proteinexpression; der miRNA Inhibitor hingegen hemmt die endogene miRNA-vermittelte Regulation und führt somit zu einer gesteigerten Proteinexpression.

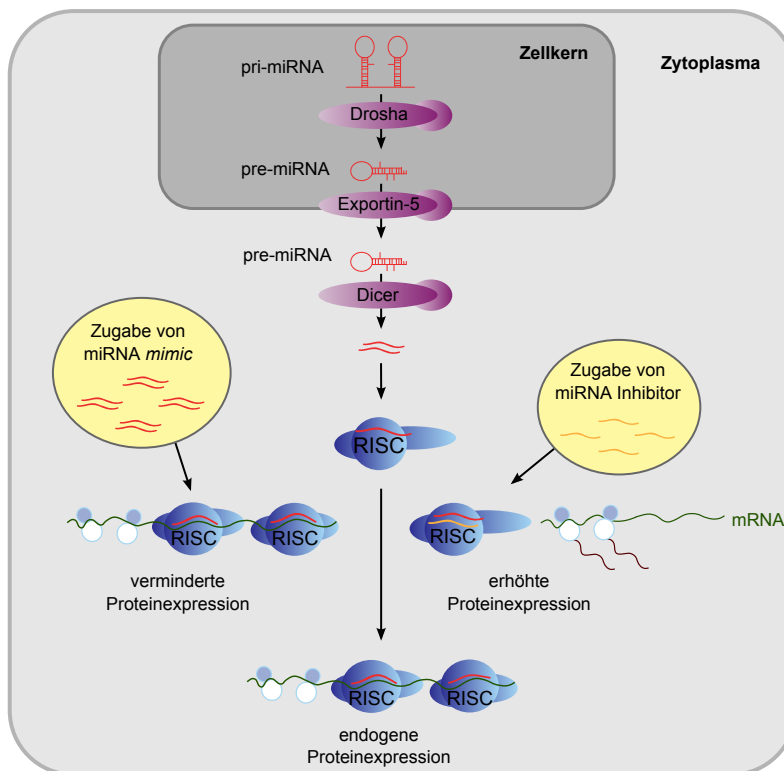


Abbildung 2.4: Modulation der miRNA-Regulation durch miRNA *mimics* und Inhibitoren. Nähere Erläuterungen befinden sich im Text. verändert nach [75]

MiRNA *mimics* sind kommerziell erhältliche doppelsträngige, chemisch modifizierte RNAs, die die endogene miRNA imitieren sollen. Durch chemische Modifikation wird eine korrekte RISC-Beladung durch Inaktivierung des miRNA*-Stranges erzielt. (Informationsblätter von:

Dharmacon *miRIDIAN*¹, Life Technologies *mirVana*^{TM 2)}

Die Inhibition von miRNAs ist eine bedeutsamer Ansatz zur Untersuchung der miRNA Biologie und erfolgt hauptsächlich über eine Antisense-Blockade [76–78]. Derartige Inhibitoren sind kurze, einzelsträngige, chemisch modifizierte Oligonukleotide, die komplementär zur miRNA sind, diese binden und dadurch die Bindung der miRNA an ihre Ziel-mRNA verhindern. Eine eigene Klasse der miRNA-Inhibitoren stellen die *Antagomirs* dar, deren Verwendung erstmals von Krützfeld *et al.* [76] beschrieben wurde. *Antagomirs* sind einzelsträngige RNA-ähnliche Oligonukleotide mit diversen Modifikationen: einer 2'-O Methylierung des Zuckers und einem Phosphorothioat-Rückgrat zum Schutz vor RNasen sowie einem Cholesterol-Rest am 3'-Ende zur Änderung pharmakologischer Eigenschaften zur verbesserten Aufnahme ins Gewebe [76, 79].

Notwendig für die Bestimmung der Spezifität der Hemmung von miRNAs ist das Testen der Inhibitoren auf Kreuzreaktivität mit anderen, sequenzähnlichen miRNAs. Eine Kreuzreaktivität kann aber auch von Vorteil sein, etwa wenn die Inhibition mehrere Mitglieder einer miRNA-Familie gleichzeitig gewünscht ist [80]. Als weiteres kritisches Element der Funktionalität von miRNA Inhibitoren identifizierten Vermeulen *et al.* [81] den Einfluss von Sekundärstrukturelementen. Eine gesteigerte Inhibitor-Funktion wurde durch eine Konversion der flankierenden Region von einzel- zu doppelsträngigem Design erzielt. In diesem Zusammenhang diskutiert wurden durch die Sekundärstruktur induzierter Schutz des Inhibitors vor RNasen sowie eine gesteigerte miRNA-RISC Interaktion.

Zur Inhibierung der miRNA-Funktion wurden weitere molekulare Ansätze, wie etwa der Einsatz von sogenannten „miRNA sponges“, analysiert [82]. Diese werden unter der Regulation starker Promotoren als Transgene mit multiplen miRNA Bindestellen in Zellen exprimiert und fungieren in Form von zusätzlicher Ziel-mRNA als kompetitive Inhibitoren für die entsprechende miRNA [73].

2.8 SNPs in miRNA-regulierten Systemen

Eine eigene Klasse funktioneller Polymorphismen, die mit der Funktion von miRNAs interferieren, wird als miR-SNPs bezeichnet [83]. Die Abb. 2.5 zeigt schematisch eine Unterteilung und mögliche Auswirkungen der verschiedenen Arten von miR-SNPs. SNPs in miRNA-kodierenden Bereichen können je nach Anzahl der vorhandenen Ziel-mRNAs die Regulation nur einer oder vieler Ziel-mRNAs beeinflussen. SNPs, die zu einer veränderten Prozessierung von miRNAs führen, beeinflussen vermutlich die Expression einer Reihe von Genen. Ein SNP in einem miRNA Ziel-Gen kann mit dessen Regulation durch eine oder mehrere miRNAs interagieren.

¹<http://www.dharmacon.com/product/productlandingtemplate.aspx?id=276>

²<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/epigenetics-noncoding-rna-research/miRNA-Profilng-/mirvana-mimics-inhibitors.html.html>

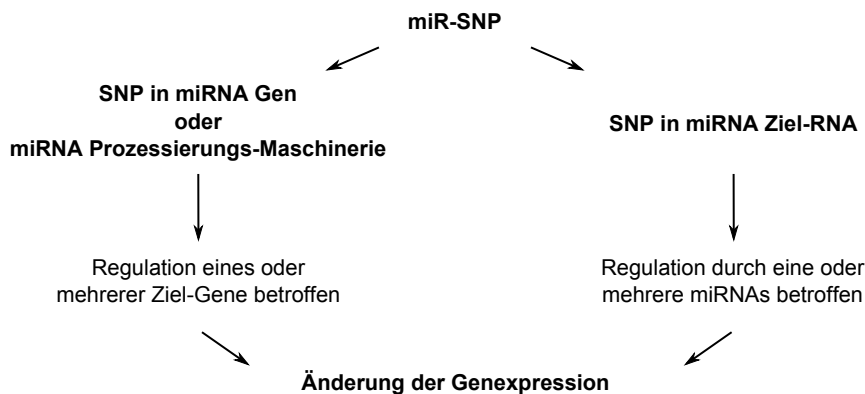


Abbildung 2.5: Mögliche Änderungen der Genexpression durch miR-SNPs.

Ein bedeutendes Merkmal der Interaktion zwischen miRNA und der Ziel-mRNA stellt die unvollständige Basenpaarung beider dar. Dabei spielt die Basenpaarung innerhalb der *seed* Region der miRNA (Position 2-8 ausgehend vom 5'-Ende) eine entscheidende Rolle [43, 84]. Brennecke *et al.* [85] evaluierten die minimalen Voraussetzungen für einen funktionellen miRNA-Ziel-mRNA-Duplex. Dabei wurden zwei Kategorien von miRNA Bindestellen identifiziert: 5'-dominante und 3'-kompensatorische. Erstere sind durch eine starke Basenpaarung am 5'-Ende der miRNA gekennzeichnet. Letztere weisen eine schwache 5'-Basenpaarung auf und benötigen daher eine zusätzliche kompensatorische Paarung am 3'-Ende. In einigen Fällen scheint sogar nur ein *seed-match* ausreichend zu sein [86], andererseits gewährt *seed* Komplementarität nicht immer eine Repression [87]. Die vorstehenden Erläuterungen heben den bedeutenden Einfluss der RNA-RNA-Wechselwirkung für die miRNA-vermittelte Suppression der Genexpression hervor. Die Diversität der miRNA-Ziel-mRNA Interaktionen verdeutlicht zudem die Komplexität der beteiligten Erkennungs- und Regulationsmechanismen und legt nahe, dass diese Mechanismen durch miR-SNPs sichtlich beeinflussbar sind.

Saunders *et al.* [88] führten *in silico* Analysen zum Auftreten von SNPs in miRNAs und miRNA Bindestellen durch. Etwa 90 % der untersuchten pre-miRNA Sequenzen waren frei von Polymorphismen, und die größte Anzahl an SNPs war außerhalb der *seed* Region des miRNA *guide* Stranges lokalisiert. Weiterhin wurde eine geringere SNP-Dichte in vorhergesagten miRNA Bindestellen als in selbige flankierenden Bereichen detektiert. Unter Einbezug der Daten einer vergleichbaren Studie von Chen *et al.* [89] demonstriert dies die starke negative Selektion von SNPs innerhalb von miRNA-kodierenden Bereichen sowie miRNA Bindestellen.

Einhergehend mit einer Reihe von Untersuchungen zur biologischen Relevanz für Krankheitsentstehung, -verlauf und -therapie erfolgt zunehmend die Bestätigung einer entscheidenden patho-mechanistischen Rolle von miR-SNPs [90–97].

2.8.1 SNPs in miRNA kodierenden Regionen

SNPs in miRNA Genen können die Biogenese und damit die Funktion von miRNAs durch Auswirkungen auf die Transkription der pri-miRNA, die Prozessierung zur pre-miRNA bzw. reifen miRNA sowie auf die miRNA-Ziel-mRNA Interaktion beeinflussen [4, 98].

Duan *et al.* [99] konnten anhand einer Reihe von *in vivo* Analysen zeigen, dass ein SNP an Position 8 der reifen miR-125a die Prozessierung der pri-miRNA in die pre-miRNA hemmt und infolge dessen die miR-125a-vermittelte Suppression eines Lin-28 Ziel-RNA Reportergens hemmt. Der CC Genotyp des SNPs rs11614913 ist mit einer geringeren Überlebensrate für Lungenkrebs-Patienten [100] und einem signifikant erhöhten Risiko für angeborene Herzfehler [101] assoziiert. Der SNP ist im *passenger* Strang der miR-196a-2 lokalisiert, und die Menge an reifer miR-196a-2 ist für den CC gegenüber dem TT Genotyp signifikant erhöht [102]. Da dieser Zusammenhang für die pre-miRNA nicht zutreffend ist, wird von einer SNP-induzierten gesteigerten Reifung der miRNA ausgegangen [100, 102]. Lee *et al.* [103] untersuchten den Einfluss eines Einzelbasenaustausches in der pre-miR-155 am 3'-Ende der reifen miR-155. Diese Mutation führte zu einer veränderten miRNA Strangselektion, sodass ein Anstieg der miR-155* und eine Abnahme der miR-155 zu verzeichnen waren und dies mit einer Änderung der Genexpression einer Vielzahl an untersuchten Genen einherging.

Eine miRNA kann mehrere Ziel-Gene aufweisen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die biologischen Effekte von SNPs in miRNA Genen weitreichender als in miRNA Ziel-Genen sind. Bisherige Analysen weisen darauf hin, dass die Mehrzahl der untersuchten SNPs eher die miRNA Generierung beeinträchtigen als zu ihrer gesteigerten Bildung führen [98].

2.8.2 SNPs in miRNA Ziel-mRNAs

Eine Assoziation zwischen SNPs in miRNA Ziel-Genen mit der Entwicklung, dem Verlauf oder der Behandlung diverser Pathologien war und ist das Ergebnis vieler Studien [14, 83, 104]. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der SNP-induzierten Dysregulation sind gegenwärtig noch unzureichend verstanden.

Es sind verschiedene Szenarien denkbar, wie SNPs in miRNA Ziel-mRNAs die miRNA-vermittelte Regulation nachhaltig beeinflussen können. Ein SNP kann die Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA durch einen Basenaustausch innerhalb der miRNA Bindestelle schwächen (Einführung eines *mismatches* zwischen miRNA und Ziel-RNA) oder verstärken (Einführung eines weiteren *matches*). Andererseits kann ein Basenaustausch in der Ziel-RNA dazu führen, dass Bindestellen für weitere miRNAs entstehen. Somit kann die RNA unter der Regulation anderer miRNAs stehen.

Abelson *et al.* [105] analysierten genetische Variationen von SLITRK1 (Slit and NTRK-like 1). Ein innerhalb der 3'-UTR in einer Bindestelle für die miR-189 lokalisierter SLITRK1 SNP ist über eine gesteigerte Repression von SLITRK1 mit dem Tourette Syndrom assoziiert. Der SNP rs12720208 (C/T Polymorphismus) ist in der 3'-UTR des *Fibroblast Growth Factor 20* (FGF20) innerhalb einer Bindestelle für die miR-433 lokalisiert, und die T-Variante weist eine verminderte miR-433 vermittelte Regulation auf [106]. Die damit verbundene gesteigerte FGF20 Expression stellt einen Risiko-Faktor für die Parkinson-Krankheit dar [106]. Ein Beispiel für einen SNP, der zu einer gesteigerten miRNA-Regulation führt, wurde von Clop *et al.* [107] untersucht. Eine G>A Transition in der 3'-UTR des Myostatin Gens von Texelschafen führt zur Bildung von Bindestellen für die miR-1 und miR-206, die beide stark im skeletalen Muskel der Schafe exprimiert sind. Diese zusätzliche Regulation über die miRNA-vermittelte translationelle Inhibition des Myostatin Gens trägt zur Entstehung von muskulärer Hypertrophie in Texelschafen bei.

Die Daten einer genom-weiten Studie zur Rolle von SNPs in 3'-UTRs von Hu *et al.* [108] zeigen, dass sowohl die miRNA Bindestelle selbst als auch die restliche 3'-UTR Sequenz von miRNA Ziel-Genen im Vergleich zu nicht unter miRNA-Regulation stehenden Genen eine signifikant stärkere negative Selektion aufweisen. Dies hebt die biologische Relevanz von SNPs in miRNA Ziel-Genen hervor.

2.8.3 SNPs in miRNA prozessierenden Proteinen

Einen weiteren Einfluss auf die miRNA-vermittelte Regulation der Genexpression können SNPs ausüben, die in an der RNA-Interferenz beteiligten Proteinen auftreten. Derartige Polymorphismen können eine Veränderung der miRNA-Gesamtheit (auch „miRNAome“) bewirken und somit mit einem veränderten Risiko, dem erfolgreichen Ansprechen auf Therapieansätze sowie der Prognose im Zusammenhang mit Krebserkrankungen assoziiert sein [4].

Ein SNP in dem für den nukleären Export der pre-miRNAs verantwortlichen Exportin-5 ist mit einem erhöhten Risiko für Speiseröhrenkrebs assoziiert [109]. SNPs in Dicer und Drosha sind mit der Überlebensdauer von Patienten und dem Wiederauftreten bei Nierenzellkarzinomen verbunden [110]. Kim *et al.* [111] identifizierten die Assoziation der Argonaute1 rs636832 G-Variante mit einem signifikant niedrigeren Lungenkrebsrisiko.

2.9 Mechanismen der miRNA-vermittelten Regulation

Die Tatsache, dass eine miRNA mehrere Ziel-mRNAs hemmen kann und dies jedoch nicht für jede RNA im selben Maße stattfindet, bedeutet, dass neben der partiellen Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA weitere Mechanismen über das Ausmaß der miRNA-vermittelten Regulation der Genexpression entscheiden. Die Positionierung der miRNA Bindestelle innerhalb der 3'-UTR sowie deren lokaler Sequenzkontext wurden als wichtige Fak-

toren identifiziert, die über die Stärke der miRNA-Regulation bestimmen [87]. Ebenso wurde die mRNA Umsatz-Rate als wichtiger Faktor für die Regulierbarkeit von mRNAs durch siRNAs bzw. miRNAs identifiziert. Transkripte mit einem hohen mRNA Umsatz sind weniger durch miRNA-Überexpression beeinflusst und schwieriger durch siRNAs zu hemmen [112]. Der Einfluss der Ziel-mRNA Menge wurde von Arvey *et al.* [113] analysiert. Die Daten zeigen Variationen in der Regulation von einzelnen Genen durch miRNAs und siRNAs in Abhängigkeit der Konzentration vorhandener Ziel-Transkripte. Neben der *seed* Komplementarität spielt die Zugänglichkeit einer miRNA Bindestelle eine entscheidende Rolle für die Erkennung der Ziel-RNA, und die Positionierung von miRNA Bindestellen in mRNA Regionen mit einer hohen Zugänglichkeit scheint ein konserviertes Merkmal in Genomen zu sein [114, 115]. Der Einfluss der RNA-Sekundärstruktur auf die RNA-RNA-Wechselwirkungen und damit auf die Effizienz der Wirksamkeit von antisense Oligonukleotiden, Ribozymen und siRNAs wurde bereits mehrfach nachgewiesen [116–121] und scheint möglicherweise ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur funktionellen miRNA-Ziel-mRNA Interaktion und damit zur miRNA-vermittelten Regulation der Genexpression zu leisten.

2.10 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Korrelation zwischen miR-SNPs und Erkrankungen auf mechanistischer Ebene, d.h. bezüglich SNP-beeinflusster RNA-RNA-Wechselwirkungen zwischen der miRNA und der Ziel-RNA zu untersuchen.

3 Material

3.1 Allgemeines

Im Anhang (A.2) sind die Firmensitze der im Folgenden mit aufgeführten Geräte- und Materialhersteller zusammenfassend aufgelistet. Diese werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr angegeben.

3.2 Geräte

Tabelle 3.1: Geräte

Name	Hersteller
Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments
Cryo Freezing Container	NALGENE™
CO ₂ Water Jacketed Inkubator	Forma Scientific
Dampfsterilisator 3850 ELV	Systec
Dampfsterilisator Varioklav®	H + P Labortechnik
Elektroporationsapparatur Gene Amp II	Biorad
Feinwaage ALJ 220-5 DNM	Kern & Sohn GmbH
Flockeneismaschine AF 100	Scotsman
Fluoreszenz-/Lumineszenz-Messgerät anthos Lucy3	anthos Mikrosysteme GmbH
Flüssigszintillationszähler Wallac 1409	Perkin-Elmer
Gefrierschrank – 20 °C	Liebherr
Gefrierschrank – 80 °C	Forma Scientific
Geldokumentationsanlage Variocam	Phase
Geltrocknungsanlage 583	Biorad
GeneAmp 5700 qPCR Thermocycler	Applied Biosystems
Heizblock DRI-Block® DB 2D	Techne
Kühlfalle RVT-100	Savant
Kühlschrank 4 °C	Bosch
Kühltruhe Colora Modell 328	CISCO
Laborzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Laborzentrifuge Microfuge® R	Beckman Coulter
Lichttisch (Image Eraser)	Amersham
Magnetrührer IKA COMBIMAG® - RCH	Jahnke & Kunkel
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss

3 Material

Mikrowelle (Modell: HMT846K/01)	Bosch
Mikro Zentrifuge	Roth
Multigel-Long Elektrophorese System für Polyacrylamid-Gele (Typ: G47)	Biometra
Multikanalpipette (10-200 µl)	Eppendorf
Multikanalpipette (30-300 µl)	Brand
Netzgerät Electrophoresis Power Supply - EPS 600/3500	Pharmacia Biotech
Netzgerät: Power Pac 300 und Power Pac HV	Biorad
PCR-Block: UNO II und T Professional Basic Gradient	Biometra
pH-Meter Lab 850	Schott
PhosphorImager Typhoon™ 8600	Amersham
Pipette (20 µl)	Eppendorf
Pipettensatz (2, 10, 100, 200 und 1000 µl)	Gilson
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann
Repeater Pipette	Eppendorf
Rotor SW50.1	Beckman Coulter
Scanner CanoScan N670U	Canon
Schüttelinkubator HT	Infors AG
Schüttelinkubator Thermoshake	Gerhardt
Schüttler Celloshaker Variospeed	Renner GmbH
Schüttler IKA VIBRAX-VXR electronic	Janke & Kunkel
Sealboy 235	Audion Elektro
Sequi-Gen® GT Elektrophorese System	Biometra
Spektralphotometer DU® 640	Beckmann Coulter
Spektrophotometer Nanodrop	Peqlab
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus Instruments
Storage Phosphor Screen	Fuji, Amersham
Sub-Cell® Elektrophorese Systeme(Mini,Wide-Mini,Sub)	Biorad
Thermomixer: 5436 und compact	Eppendorf
Ultraschallbad Sonorex super RK510	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima L-70	Beckman Coulter
UV Tisch TFX-35M 312 nm	Vilber Lourmat
Vakuum-Pumpe Laboport®	KnF Neuberger
Vakuum-Zentrifuge Speed Vac® Plus SC100A	Savant
Vortexer Vibrofix VF1 electronic	Jahnke & Kunkel
Waage SBA 41	ScalTec
Waage 2354	Sartorius
Wasserbad W22	Sörk-Tronik
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore
Wipper Polymax 1040	Heidolph
Zentrifuge Avanti™ J-25	Beckman Coulter
Zentrifuge für Mikrotiterplatten Universal 32	Hettich
Zentrifuge Rotixa 120 R	Hettich
Zentrifuge / Vortex Combi-Spin FVL-2400	peqlab

3.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Blottingpapier (580 x 600 x 0,36 mm)	Roth
Combitips (5 ml, 12,5 ml)	Eppendorf
Einmalinjektionskanülen	B. Braun Melsungen AG
Einmalküvetten (1,5 ml)	Brand
Einmalpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner
Einmalreaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Einmalspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml)	Becton Dickinson
Elektroporationsküvetten (2 mm gap)	Biorad
Filterpapier GB003 (3 mm)	Whatman
Filtermembran (0,2 µm, 0,45 µm)	Whatman
Filtrationseinheit zur Sterilisation von Lösungen (0,2 µm)	Thermo Fisher Scientific
Gelfiltrationssäulen Sephadex G50	GE Healthcare
Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner
Gewebekulturplatten (6, 12, 24, 96 well)	Greiner
Kryo-Röhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Greiner
Mikroplatten (96 well, Polystyren, für Lumineszenzmessung)	Greiner
Neubauer Zählkammer	Brandt
Parafilm M (100 x 38 mm)	Roth
PCR-Platten Multiply® (96 well)	Sarstedt
PCR-Tube 8er-Stripes (200 µl)	Sarstedt
Petrischalen (∅ 10 cm)	Sarstedt
PP-Tubes Cellstar (15 ml, 50 ml)	Greiner
Polypropylen Zentrifugenbecher (50 ml, 500 ml)	Beckman Coulter
Schlauchfolie aus Polyethylen (300 mm x 2 mm x 100 m)	neoLab
Skalpell	Feather
Sterilfiltrationseinheiten	Schleicher & Schüll
Szintillationsgefäße (5 ml)	Perkin-Elmer

3.4 Chemikalien

Tabelle 3.3: Chemikalien

Name	Hersteller
Agar	Sigma-Aldrich
Agarose	Cambrex, Biozym
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Geyer

3 Material

Bactotrypton	Roth
Blei(II)-acetat	Fluka
Borsäure	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Serva
Chloroform	Merck
Desoxyribonukleosid-Triphosphat (dNTP)	Fermentas
Didesoxyribonukleosid-Triphosphat (ddNTP)	Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol (EtOH)	Merck
Ethidiumbromid	Gibco
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ficoll® 400	Fluka
Formamid (entionisiert)	Sigma-Aldrich
Glycerin	Sigma-Aldrich
Harnstoff	Roth
Hefextrakt	Roth
HEPES	Roth
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
HEPES	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Nonidet P40 (NP40)	LKB
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Rotiphorese® Gel 40 Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Roth
Salzsäure	Merck
Sigmacote®	Sigma-Aldrich
SYBR® Gold	Invitrogen
Szintillationslösung Rotiszint® eco plus	Roth
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
tRNA aus Hefe (10 mg/µl)	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Invitrogen
Xylencyanol (XC)	Sigma-Aldrich
α, α, α-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
[γ- ³² P]-ATP (5000 Ci/mmol)	Hartmann

3.5 Nukleinsäuren

Sofern nicht anders angegeben, wurden die während dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide von der Firma Biomers GmbH synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Nach einer Resuspension in Nuklease-freiem H₂O wurde deren Konzentration bestimmt (siehe 4.2.1) und die Integrität mittels gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe 4.2.2) überprüft. Im Folgenden sind die verwendeten DNA-Oligonukleotide in Großbuchstaben und die RNA-Oligonukleotide in Kleinbuchstaben angegeben.

Die folgende Tabelle zeigt die zur Generierung der notwendigen Oligonukleotide und Primer verwendeten *NCBI Nucleotide*¹ Referenz-Sequenzen. Entsprechend dieser wurden die im folgenden Abschnitt angegebenen mRNA-Positionen der jeweiligen Oligonukleotide bestimmt.

Tabelle 3.4: *NCBI* mRNA Referenz-Sequenzen

Gen	Referenz-Sequenz	Link
AGTR1	NM_031850.2	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_031850.2
ESR1	NM_001122742.1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001122742.1
MRAS	NM_001085049.1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001085049.1
TCF21	NM_198392.2	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_198392.2
GAPDH	NM_002046.4	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002046.4

3.5.1 DNA Oligonukleotide

Die Klonierung der Reporter-gen-Konstrukte der AGTR1 miR-155 bzw. ESR1 miR-122 Bindestellen erfolgte mit folgenden Oligonukleotiden. Unterstrichen sind jeweils die Nukleotide (nt), die nicht Gen-spezifisch sind sondern den Restriktions-Schnittstellen entsprechen.

Tabelle 3.5: DNA Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	mRNA Positionen
AGTR1 A sense	<u>CTAGTAGCAC</u> TTCACTACCA AATGAGCATT AGCTACGCTC <u>AGCA</u>	1590-1620
AGTR1 A antisense	<u>AGCTTGCTGA</u> <u>GCGTAGCTAA</u> TGCTCATTG GTAGTGAAGT <u>GCTA</u>	

¹National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

AGTR1 C sense	CTAGTAGCAC TTCACTACCA AATGAGCCTT AGCTACGCTC <u>AGCA</u>	1590-1620
AGTR1 C antisense	<u>AGCTTGCTGA</u> GCGTAGCTAA GGCTCATTG GTAGTGAAGT GCTA	
ESR1 C sense	CTAGTCAAAT TCTGTCTCCT GCATACACTC CGGCATGCTC <u>AGCA</u>	2229-2259
ESR1 C antisense	<u>AGCTTGCTGA</u> GCATGCCGGA GTGTATGCAG GAGACAGAAT TTGA	
ESR1 T sense	CTAGTCAAAT TCTGTCTCCT GCATACACTC TGGCATGCTC <u>AGCA</u>	2229-2259
ESR1 T antisense	<u>AGCTTGCTGA</u> GCATGCCAGA GTGTATGCAG GAGACAGAAT TTGA	

3.5.2 miRNAs

Entsprechend der in der *miRBase* Datenbank² aufgeführten Sequenzen wurden die verwendeten microRNA (miRNA) *guide* und *passenger* Stränge synthetisch hergestellt. Für die analysierten SNPs, die innerhalb einer miRNA Bindestelle lokalisiert sind (AGTR1, ESR1, TCF21), wurde neben dem authentischen *guide* Strang auch ein sogenannter „SNP *guide*“ Strang synthetisiert. Dieser paart an der SNP-Position mit der jeweils anderen SNP-Variante. Die betroffenen Positionen im miRNA *guide* Strang sind unterstrichen.

Tabelle 3.6: miRNAs

Name	Sequenz (5' → 3')	Ziel-mRNA (Position)
miR-155 guide	uua <u>aug</u> cuaa ucgugauagg ggu	AGTR1 (1594-1616)
miR-155_SNP guide	uuaaggcuaa ucgugauagg ggu	
miR-155 passenger	cuccuacaua uuagcauuaa ca	AGTR1 (1594-1613)
miR-155 guide 3' del	uua <u>aug</u> cuaa ucgugauagg	
miR-155_SNP guide 3' del	uuaaggcuaa ucgugauagg	
miR-122 guide	uggaguguga caaugguguu ug	ESR1 (2233-2255)
miR-122_SNP guide	uagaguguga caaugguguu ug	
miR-122 passenger	aacgccauua ucacacuaaa ua	
miR-195 guide	uagcagcaca gaaauauugg c	MRAS (1720-1742 [#] , 2115-2137 ^{##})
miR-195 passenger	ccaauauugg cugugcugcu cc	
miR-135a guide	uauggcuuuu uauuccuaug uga	MRAS (1097-1119 [#] , 1863-1885 ^{##})
miR-135a passenger	uauagggauu ggagccgugg cg	

²<http://www.mirbase.org/>

miR-224 guide	caagucacua gugguuccgu u	TCF21 (1042-1061)
miR-224_SNP guide	caacucacua gugguuccgu u	
miR-224 passenger	aaaauaggugc ccuagugacu aca	
miR-24 guide	uggcucaguu cagcaggaac ag	
Pre-miR TM -155*	unbekannt	AGTR1 (1594-1616)
Pre-miR TM -122*	unbekannt	ESR1 (2233-2255)

* chemisch synthetisierte und modifizierte Oligonukleotide, partielle Doppelstränge; Sequenz und Modifikationen werden vom Hersteller Ambion[®] ³ nicht benannt
Bindestelle 1, ## Bindestelle 2

3.5.3 siRNAs

In folgender Tabelle sind die während dieser Arbeit verwendeten small interfering RNAs (siRNAs) aufgeführt. Die Sequenzen der siAGTR1, siESR1 bzw. siTCF21 *guide* Stränge wurden so gewählt, dass diese komplementär zur entsprechenden miR-155, miR-122 bzw. miR-224 Bindestelle sind.

Tabelle 3.7: siRNAs

Name	Sequenz (5' → 3')	Ziel-mRNA (Position)
siAGTR1 A guide	cuaaugcuca uuugguagug aTT	AGTR1 (1596-1618)
siAGTR1 A passenger	ucacuaccaa augagcauua gTT	
siAGTR1 C guide	cuaaggcuca uuugguagug aTT	AGTR1 (1596-1618)
siAGTR1 C passenger	ucacuaccaa augagccuua gTT	
siESR1 C guide	cggaguguau gcaggagaca gTT	ESR1 (2235-2255)
siESR1 C passenger	cugucuccug cauacacucc gTT	
siESR1 U guide	cugucuccug cauacacucu gTT	ESR1 (2235-2255)
siESR1 U passenger	cagaguguau gcaggagaca gTT	
siTCF21 C guide	gaagucaccg aaguucucag cTT	TCF21 (1041-1061)
siTCF21 C passenger	gcugagaacu ucggugacuu cTT	
siTCF21 G guide	gaacucaccg aaguucucag cTT	TCF21 (1041-1061)
siTCF21 G passenger	gcugagaacu ucggugaguu cTT	

³<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/epigenetics-noncoding-rna-research/miRNA-Profilng-/ambion-pre-mir-precursors.html>

siR206 guide [122]	uuuguauuca gcccauauCT T	firefly Luciferase
siR206 passenger [122]	gauaugggcu gaauacaaaT T	(206-224)

3.5.4 Primer

Klonierungs-Primer

Die folgende Übersicht zeigt alle zur Amplifikation der 3'-UTR Sequenzen verwendeten Primer. Unter Verwendung spezieller *forward* (FW) Primer wurden Restriktion-Schnittstellen am 5'-Ende des Inserts und mittels *reverse* (RV) Primer Restriktion-Schnittstellen an das 3'-Ende des jeweiligen Inserts angefügt. Unterstrichen sind jeweils die nt, die nicht Gen-spezifisch sind sondern den Restriktion-Schnittstellen und zusätzlichen nt entsprechen. Die mit (*) markierten Primer dienen bei der Klonierung der MRAS und TCF21 3'-UTR zur Amplifikation von Teilfragmenten, aus denen das Gesamtlänge-Amplifikat gewonnen wurde.

Tabelle 3.8: Klonierungs-Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	mRNA Position ¹
AGTR1 FW SpeI 2	<u>AGAGACTAGT</u> CATGTTTCGAA ACCTGTCCAT AAAG	1527-1550
AGTR1 RV SacI 2	<u>TCAGGAGCTC</u> GCAATAAAAT TATTTTATTT TAAAGTAAAT ATAACTTTG	2374-2412
ESR1 FW SpeI	<u>ATTATAACTA</u> GTGAGCTCCC TGGCTCCAC	2159-2176
ESR1 RV MluI	<u>CGTCAGACGC</u> GTGCAGCTGT GACAGCTGCT	3409-3426
MRAS FW SacI	<u>AGAGGAGCTC</u> CAGGCCTGAG GCCCTGG	748-764
MRAS RV Sall	<u>TCAGGTCGAC</u> CGTGTTTCTC TTCTTTATTA ATCAGTC	3985-4011
MRAS Seq FW1*	TTTTATTAAA GGGGTCTGGG C	1206-1226
MRAS Seq RV*	CCCAGCCTTC CTTACTTCTC A	2023-2043
MRAS FW XhoI*	<u>AGAGCTCGAG</u> CAGGCCTGAG GCCCTGG	748-764
MRAS RV XhoI*	<u>TCAGCTCGAG</u> CGTGTTTCTC TTCTTTATTA ATCAGTC	3958-4011
TCF21 FW DraI	<u>AGAGTTTAAA</u> CTTGGAGTT TGGTACCTGG	818-837
TCF21 RV Sall	<u>TCAGGTCGAC</u> TTGGTGAAC AAATCTTTTA TTTTC	3186-3210
TCF21 F 2-22*	CTTGGAGTTT GGTACCTGGA G	819-839
TCF21 RV 2030*	CTCCTTGGTC AGTGCTTTCC	2847-2866
TCF21 Seq FW1*	ACCAGAGGGA TAGAGCCAT	1214-1233
TCF21 200 FW DraI	<u>AGAGTTTAAA</u> AGAAGCTGCT CTGCCAGGTG	942-961
TCF21 200 RV Sall	<u>TCAGGTCGAC</u> GTTGGGGTGG CGGTGGTG	1124-1141

¹ des Gen-spezifischer Primer-Anteils

Sequenzier-Primer

Zur Überprüfung der klonierten Reporter-gen-Konstrukte wurden die verschiedenen Inserts über ihre gesamte Länge unter Verwendung der folgenden Primer sequenziert (siehe 4.1.2).

Tabelle 3.9: Sequenzier-Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	Insert-Position
pMIR-Luci FW	AGGCGATTAA GTTGGGTA	- (Vektor)
pMIR-Luci RV	TTCCAGGGAT ACGACAAGG	- (Vektor)
AGTR1 Seq FW	GCAAGTGTAG CACAGTTGC	452-470
ESR1 Seq FW	CAACTTGCTG CTCTCCATAG G	734-751
pmirGLO FW	GGTTACAACC GCCAAGAAG	- (Vektor)
MRAS Seq FW1	TTTTATTAAA GGGGTCTGGG C	459-479
MRAS Seq FW2	CAGATCTGTC TCTTGCTGCG	953-972
MRAS Seq FW3	GCTGCACCAA AGAAAAGGTC	1453-1472
MRAS Seq FW4	AGGTGAGGCG GAGGAAAG	1958-1975
MRAS Seq FW5	GGTAGCTTCC AGATAGGCCA	2450-2469
MRAS Seq FW6	GACCCACTAA CGTGGCAACT	2957-2976
MRAS Seq RV	CCCAGCCTTC CTTACTTCTC A	1276-1296
TCF21 Seq FW1	ACCAGAGGGA TAGAGCCCAT	397-416
TCF21 Seq FW2	CAGGAAGTTC CAAGGGATGT	995-1014
TCF21 Seq FW3	AAGAATGGGG AACTCCCTTG	1601-1620
TCF21 Seq FW4	CACTACTTAA TGCAGTGGGA AAGA	2206-2229
TCF21 Seq RV	ATTGGA ^u AAAT TTGCGAAACG	480-499
TCF21 Kolonie PCR RV	ATGAAGTCAC CGAAGTTCTC AG	225-2246

Mutagenese-Primer

Folgende Primer wurden verwendet, um mittels Mutagenese-PCR (siehe 4.1.1) den Basenaustausch an der SNP-Position des jeweiligen 3'-UTR Inserts durchzuführen. Die SNP-Positionen sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Tabelle 3.10: Mutagenese-Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	mRNA Position
AGTR1 FW SNP	CCAAATGAGC <u>CT</u> TAGCTACT TTTC	1602-1625
ESR1 FW SNP	GCATACACTC <u>TG</u> GCATGCAT C	2244-2264
MRAS FW SNP	GGTGCCCTCTC TGATATGAAT A <u>CA</u> CTG	1743-1758
TCF21 FW SNP	CGGTGAG <u>T</u> TTC ATCCACC	1052-1068

T7 Promotorsite-Primer

Zur Durchführung einer *in vitro* Transkription der Ziel-Gen 3'-UTRs wurde mittels PCR unter Verwendung der folgenden FW- und der in Abschnitt 3.5.4 aufgeführten RV-Primer die Promotorsequenz der T7 RNA-Polymerase an das 5'-Ende der 3'-UTR-Sequenz angefügt. Unterstrichen sind die nicht Gen-spezifischen nt.

Tabelle 3.11: T7 Promotorsite-Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	mRNA-Position ¹
AGTR1 T7 FW	<u>GAAATTAATA</u> <u>CGACTCACTA</u> <u>TAGGGCATGT</u> TCGAAACCTG TCCATAAAG	2374-2412
MRAS T7 FW	<u>GAAATTAATA</u> <u>CGACTCACTA</u> <u>TAGGGCAGGC</u> CTGAGGCCCT GG	748-764
TCF21 T7 FW	<u>GAAATTAATA</u> <u>CGACTCACTA</u> <u>TAGGGCCTTG</u> GAGTTTGTA CCTGG	818-837
TCF21 200 T7 FW	<u>GAAATTAATA</u> <u>CGACTCACTA</u> <u>TAGGGAGAAG</u> CTGCTCTGCC AGGTG	942-961

¹ des Gen-spezifischer Primer-Anteils

Probing-Primer

Zur Analyse der Spaltprodukte des RNA-Strukturprobings (siehe 4.2.15) wurden folgende Primer an ihrem 5'-Ende ³²P-markiert und zur Primer-Extension eingesetzt (siehe 4.1.3).

Tabelle 3.12: Probing-Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	mRNA-Position
AGTR1 P_32	CGGTTTCAGTC CACATAATGC	1644-1663
ESR1 P_11	CTAGAAAGCC ATTGGTGTG	2265-2284
MRAS P_400	ATCCAAGCTC AGACATTGTG G	1147-1167
MRAS P_1035	TGGATGGTGT CCACATTAGG T	1782-1802
MRAS P_1160	CATTGACTAG GCTTATAGAG GTGGT	1907-1930
MRAS P_1428	TCCTGTTGTC TCTCCACTCC	2175-2194
TCF21 P_37	AGGGCATCCT GACATCTGA	1094-1113

cDNA-Synthese-Primer

Zur cDNA-Synthese wurden *random Hexamer* oder *oligo-dT* Primer, die Bestandteile des *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits* sind, eingesetzt.

qRT-PCR Primer

Tabelle 3.13: qRT-PCR-Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	mRNA-Position
TCF21 RT FW	CCTTGGAGTT TGGTACCTGG	818-837
TCF21 RT RV C	GCAAATAGAC AGGTGGATGA AG	1058-1079
TCF21 RT RV G	GCAAATAGAC AGGTGGATGA AC	1058-1079
TCF21 RT RV C MM20G	GCAAATAGAC AGGTGGATGG AG	1058-1079
TCF21 RT RV G MM20G	GCAAATAGAC AGGTGGATGG AC	1058-1079
GAPDH FW	AACAGCGACA CCCACTCCTC	1033-1052
GAPDH RV	GGAGGGGAGA TTCAGTGTGG T	1270-1290

3.5.5 Plasmide

Tabelle 3.14: Plasmide

Name	Herkunft	Hersteller
pMIR-REPORT™ Luciferase	während dieser Arbeit kommerziell erworben	Ambion® / Applied Biosystems
pmirGLO Dual-Luciferase	zur Verfügung gestellt von Animesh Bhattacharya	Promega
pRL-CMV Renilla Luciferase Control	IMM Laborbestand	Promega
Humane Prostata <i>Matchmaker</i> cDNA- Bibliothek	IMM Laborbestand	Clontech
pGEM3Z3-ICAM-1	IMM Laborbestand	Promega

Der pMIR-REPORT und der pmirGLO Vektor wurden zur Klonierung der Ziel-Gen Reporter-konstrukte verwendet. Beide Vektoren sind dadurch gekennzeichnet, dass sich deren *Multiple Cloning Site* (MCS) hinter der für die firefly Luciferase (FL) kodierenden Sequenz anschließt. Steht der eingefügte Sequenzabschnitt unter einer miRNA- bzw. siRNA-vermittelten Regulation, so führt dies zu einer Abnahme der firefly Luciferase Reporter-Aktivität. Als Transfektions-Kontrolle wurden zusätzlich *Renilla* Luciferase (RL) Reporter eingesetzt. Bei der Transfektion des pMIR-REPORT Vektors wurde ein zusätzliches Plasmid ko-transfiziert, das für die *Renilla* Luciferase kodiert (pRL-CMV). Bei Einsatz des pmirGLO Vektors war dies

3 Material

nicht nötig, da dieser Vektor auch die kodierende Sequenz für die *Renilla* Luciferase enthält.

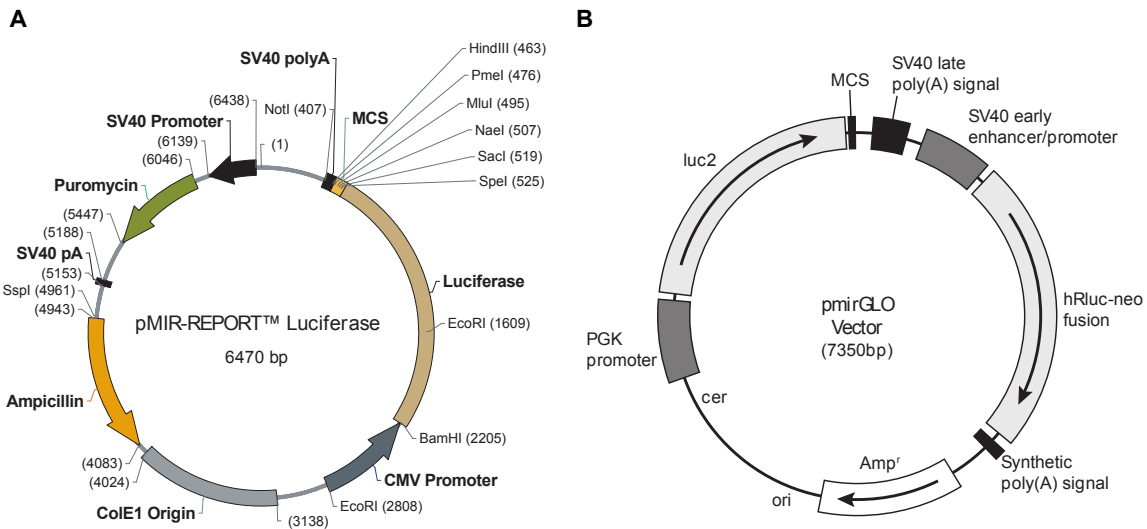


Abbildung 3.1: Verwendete Luciferase Reporter-Gen-Vektoren. **(A)** pMIR-REPORT™ Luciferase (aus Applied Biosystems Informationsblatt für Katalog-Nr: AM5795) **(B)** pmirGLO Dual-Luciferase (aus Promega Informationsblatt für Katalog-Nr: E1330)

3.6 Kits

Tabelle 3.15: Kits

Name	Hersteller
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Dual Luciferase® Reporter Assay System	Promega
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin® RNA II - Kit	Macherey-Nagel
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System	Promega
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit	Promega

3.7 Enzyme

Tabelle 3.16: Enzyme

Name	u ¹ /μl	Hersteller
Alkalische Phosphatase	1	Roche
AMV Reverse Transkriptase	10	Promega
<i>BspI</i>	10	New England Biolabs (NEB)
<i>DraI</i>	10	Fermentas
<i>DraIII</i> (Fast Digest)		Fermentas
<i>EcoRI</i>	10	Fermentas
<i>HindIII</i>	10	Fermentas
<i>MluI</i>	10	Gibco
M-MuLV Reverse Transkriptase	20	Fermentas
<i>NdeI</i> (Fast Digest)		Fermentas
<i>NotI</i> (Fast Digest)		Fermentas
Phusion [®] High Fidelity DNA-Polymerase	2	Finnzymes
Precisor High Fidelity DNA-Polymerase	2	Biocat
RiboLock [™] RNase Inhibitor	40	Fermentas
RNase A (10 mg/μl)		Fermentas
RNase T1	1000	Fermentas
<i>SacI</i> (Fast Digest)		Fermentas
<i>SalI</i>	10	Fermentas
<i>SpeI</i>	10	NEB
T4 DNA Ligase	5	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	10	Fermentas
Taq DNA-Polymerase	5000	NEB
Velocity High-Fidelity DNA-Polymerase	2	Bioline

¹ enzymatische Aktivität in units (u)

3.8 Größenmarker

Tabelle 3.17: Größenmarker

Name	Hersteller
Gene Ruler [™] DNA Ladder Mix	Fermentas
Quick-Load [®] 100 bp DNA Ladder	NEB
Quick-Load [®] 1 kb DNA Ladder	NEB
RiboRuler [™] High / Low Range RNA Ladder	Fermentas
100 bp Ladder ready-to-load	Fermentas
100 bp Ladder	Invitrogen
ssDNA Ladder (6, 12, 18, 30, 36, 43, 63 und 78 b)	zur Verfügung gestellt von W. Wünsche

3.9 Zellkulturmedien

Tabelle 3.18: Zellkulturmedien

Name	Hersteller
DMEM	PAA
RPMI	PAA
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco
opti-MEM®	Gibco
Trypsin/EDTA Gebrauchslösung (10x)	PAA

3.10 *E.coli* Stämme

Tabelle 3.19: *E.coli* Stämme

Name	Genotyp
XL-1 Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

3.11 Puffer und Lösungen

Anmerkung: Die für Enzyme (siehe 3.7) und in Kits (siehe 3.15) mit gelieferten Reaktionspuffer sind im Folgenden nicht mit angegeben.

Tabelle 3.20: Puffer und Lösungen

Name	Bestandteile
DNA-Annealing-Puffer	30 mM HEPES (pH 7,4) 100 mM K-acetat 2 mM Mg-acetat
RNA-Annealing-Puffer (5×)	30 mM Tris/HCl (pH 7,4) 100 mM KCl 2 mM MgCl ₂

RNA-Faltungspuffer (10×)	200 mM 1 M 10 mM	Tris/HCl (pH 7,4) NaCl EDTA
Reaktionspuffer für Bleiacetat-spaltung (10×)	200 mM 1 M 100 mM	HEPES (pH 7,4) K-acetat Mg-acetat
Annealing-Faltungspuffer (2×)	20 mM 200 mM	Tris/HCl (pH 7,4) NaCl
Annealing-Hybridisierungspuffer (10×)	200 mM 1 M 100 mM	Tris/HCl (pH 7,4) NaCl MgCl ₂
Annealing-Stopp-Puffer	20 mM 10 mM 2 % (v/v) 8 M 0,025 % v/v	Tris/HCl (pH 7,4) EDTA SDS Urea Bromphenolblau (BPB)
Reaktions-Puffer für Annealing/ Probing (10×)	200 mM 0,5 M 100 mM	Tris/HCl (pH 7,4) NaCl MgCl ₂
Ladepuffer für native PAA-Gele (6×)	25 % (w/v) 0,1 % (w/v) 0,05 % (w/v)	Ficoll® 400 BPB XC in 1×TAE (pH 8,5)
Formamid RNA-Ladelösung (2×)	95 % 10 mM 0,025 % (w/v) 0,025 % (w/v) 0,025 % (w/v)	Formamid (entionisiert) EDTA SDS BPB XC
<i>phosphate-buffered saline</i> (PBS, 1×) (pH 7,4)	0,14 mM 2,7 mM 10 mM 2 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
SYBR® Gold-Färbelösung	0,01 % (v/v)	SYBR® Gold in 1×TBE
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 50×)	2 M 2 M 50 mM	Tris-HCl (pH 8,5) Essigsäure EDTA

3 Material

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE, 10×)	890 mM 890 mM 20 mM	Tris (pH 8,3) Borsäure EDTA
Elektrophorese-Puffer für Agarosegele	1×	TAE (pH 8,5)
Elektrophorese-Puffer für PAA-Gele	1×	TBE (pH 8,3)
LB-Medium pro Liter	10 g 10 g 5 g	Bactotrypton NaCl Hefeextrakt

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden beschrieben, bei denen eine Amplifikation nach dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) erfolgte. Weitere detaillierte Angaben zu den verwendeten PCR-Ansätzen und -Programmen sind im Anhang A.1 aufgeführt.

PCR zur Amplifikation von 3'-UTR Sequenzen

Zur Amplifikation der 3'-UTR Sequenz des jeweiligen Ziel-Gens wurde die cDNA-Bibliothek von *Clontech* bzw. die mittels reverser Transkription aus zellulärer Gesamt-RNA gewonnene cDNA als Template eingesetzt und die in Abschnitt 3.5.4 aufgeführten Primer verwendet. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen einschließlich deren Ursprungs sind in Abschnitt 4.1.4 aufgeführt. Zur Gewährleistung einer möglichst fehlerfreien Amplifikation der Zielsequenzen wurden für diese PCRs High Fidelity DNA-Polymerasen verwendet (Phusion[®], Precisor und Velocity).

Mutagenese-PCR

Der Einzelbasenaustausch innerhalb einer Template DNA erfolgte mittels einer nach Picard *et al.* [123] angelehnten Mutagenese-PCR unter Verwendung der Phusion[®] High Fidelity DNA-Polymerase. Das Prinzip ist in Abb. 4.1 schematisch dargestellt. Es wurden drei Primer verwendet: FW, RV und Mutagenese (im Folgenden als M bezeichnet). Die FW- und RV-Primer entsprechen den zur Amplifikation der 3'-UTR Sequenzen verwendeten Primern (siehe 3.5.4). Der M-Primer wurde so gewählt, dass er Sequenz-komplementär zur SNP-Region verläuft und zentral die einzufügende Base enthält. Die PCR selbst erfolgte in drei separaten Amplifikationsschritten unter der Verwendung des in Tab. 4.1 aufgeführten PCR-Programms. In der ersten PCR über zehn Zyklen (siehe Abb. 4.1 I) werden M- und RV-Primer eingesetzt, um mit der Ausgangssequenz als Template einen Teil der mutierten Zielsequenz zu amplifizieren. Anschließend wird der FW-Primer hinzugefügt und in weiteren zehn Zyklen (siehe Abb. 4.1 II) das mutierte PCR-Fragment in seiner Gesamtlänge hergestellt. Nach

erneuter Zugabe von RV-Primer wird in einem abschließenden Schritt (ebenfalls 10 Zyklen siehe Abb. 4.1 III) eine Vervielfältigung der gesamten punkt-mutierten Zielsequenz erreicht.

Tabelle 4.1: Programm der Mutagenese-PCR

Schritt	Zyklen	Vorgang	Temperatur	Zeit
1.	1	Denaturierung	98 °C	180 s
2.	10	Denaturierung	98 °C	10 s
		Annealing	63 - 68 °C	20 s
		Extension	72 °C	20 - 130 s
3.	1	finale Extension	72 °C	450 s

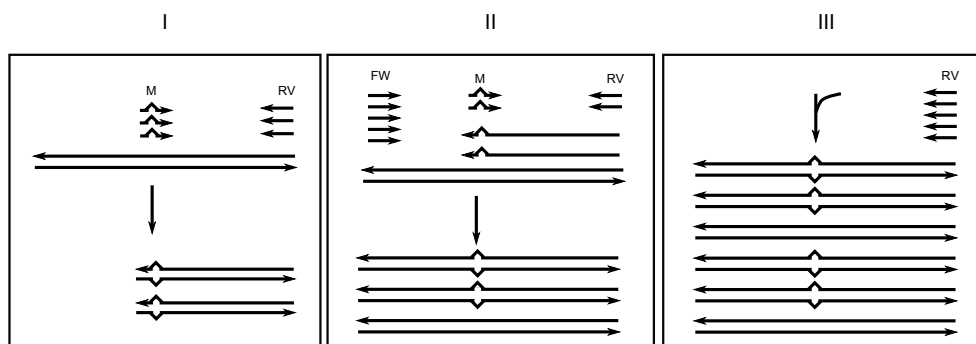


Abbildung 4.1: Schematischer Ablauf der Mutagenese-PCR. (I) Zunächst wird aus dem Template mittels RV- und M-Primer ein punkt-mutiertes Zwischen-Produkt amplifiziert. (II) Nach Zugabe von FW-Primer wird das punkt-mutierte PCR-Produkt der Gesamtlänge hergestellt. (III) Abschließend wird nach Zugabe von weiterem RV-Primer das PCR-Produkt der Gesamt-Länge vervielfältigt. (verändert nach [123])

Die durch die Mutagenese gewonnenen PCR-Produkte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung aufgereinigt (siehe 4.2.8), mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 4.2.5) und anschließend in die Ligationsreaktion eingesetzt (siehe 4.1.4).

Anfügen der T7 Promotor Erkennungssequenz

Zur *in vitro* Transkription der 3'-UTR eines Ziel-Gens wird ein Template benötigt, das die T7 Promotor Erkennungssequenz (TAATACGACT CACTATAGGG) enthält. Plasmid-Konstrukte des pMIR-Report Vektors enthalten vor Beginn des firefly Luciferase Reportergens eine derartige Erkennungsstelle, sodass *in vitro* Transkripte hergestellt werden konnten, bei denen die Sequenz der firefly Luciferase der 3'-UTR Sequenz des Ziel-Gens voransteht. Dies erfolgte für die ESR1 *in vitro* Transkripte. Die AGTR1 3'-UTR *in vitro* Transkripte hingegen wurden ohne die vorangehende Luciferase-Sequenz hergestellt. Dazu wurde die pMIR-Report AGTR1

3'-UTR Plasmid-DNA als Template verwendet, um ein PCR-Produkt mit einer am 5'-Ende angefügten T7 Promotorsequenz zu amplifizieren. Dieses wurde anschließend in die *in vitro* Transkriptions-Reaktion eingesetzt. Selbige Vorgehensweise erfolgte für MRAS und TCF21 3'-UTR *in vitro* Transkripte, die in den pmirGLO Vektor kloniert wurden, der keine T7 Erkennungssequenz enthält. Für diese PCRs wurde die Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase und das in Tab. 4.2 dargestellte PCR-Programm verwendet.

Tabelle 4.2: PCR-Programm zum Anfügen der T7 Promotorsite

Schritt	Zyklen	Vorgang	Temperatur	Zeit
1.	1	Denaturierung	98 °C	180 s
2.	5	Denaturierung	98 °C	10 s
		Annealing	63 - 68 °C	20 s
		Extension	72 °C	20 - 132 s
3.	30	Denaturierung	98 °C	10 s
		Annealing / Extension	72 °C	30 - 152 s
4.	1	finale Extension	72 °C	450 s

Kolonie-PCR

Nach der Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA (siehe 4.1.4) wurde untersucht, ob die erhaltenen Klone das gewünschte Insert tragen. Dazu erfolgte eine sogenannte Kolonie-PCR unter Verwendung der Taq-DNA-Polymerase. Die eingesetzten Primer wurden so gewählt, dass je einer im Vektor und im Insert bindet. So ist es nur bei Klonen, die ein Insert tragen, möglich, ein PCR-Produkt zu amplifizieren. Der zu untersuchende Klon wurde mit einer Pipettenspitze angepickt und in den vorbereiteten PCR-Master-Mix eingebracht (Details siehe Anhang A.1.4). Nach dem in Tab. 4.3 durchlaufenen PCR-Programm wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.2.2) untersucht.

Tabelle 4.3: Programm der Kolonie-PCR

Schritt	Zyklen	Vorgang	Temperatur	Zeit
1.	1	Denaturierung	95 °C	180 s
2.	35	Denaturierung	95 °C	15 s
		Annealing	55 - 57 °C	30 s
		Extension	72 °C	45 - 105 s
3.	1	finale Extension	72 °C	300 s

Quantitative PCR

Zur Untersuchung der Allel-spezifischen Hemmung der TCF21-Transkripte wurde die Spezifität der Primer zunächst in einer konventionellen PCR getestet. Dafür wurden jeweils 10 pg pmirGLO TCF21 3'-UTR C- oder G-Plasmid-DNA bzw. ein 1:1 Gemisch aus beiden als Template in den in Tab. 4.4 aufgeführten Reaktionsansatz eingesetzt. Anschließend kam das ebenfalls in Tab. 4.4 angegebene PCR-Programm mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (57 °C für G- und 67 °C für C-Primer) zur Anwendung.

Tabelle 4.4: qPCR: Reaktionsansatz und PCR-Programm

PCR-Ansatz	f.c. ¹	PCR-Programm				
pmirGLO TCF21 3'-UTR	10 pg	1.	1 ×	Denaturierung	95 °C	180 s
10×Taq Puffer	1 ×	2.	30 ×	Denaturierung	95 °C	15 s
dNTPs	375 µM			Annealing	57/67 °C	30 s
FW Primer	0,625 µM			Extension	72 °C	30 s
RV Primer	0,625 µM	3.	1 ×	finale Extension	72 °C	300 s
Taq-DNA-Polymerase	400 u					
	f.v. ² 20 µl					

Unter Verwendung des *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG Kits* und des *GeneAmp 5700 Thermocyclers* wurde die Allel-spezifische Hemmung der TCF21 Transkripte mittels quantitativer PCR (qPCR) analysiert. Dazu wurden HeLa-Zellen mit TCF21 Reporter-konstrukten und miR-224 bzw. miR-224_SNP transfiziert, die Zellen nach 24 h geerntet und deren Gesamt-RNA extrahiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription von 400 ng RNA (siehe 4.1.3). Die cDNA wurde 1:10 in H₂O verdünnt und in die sich wie folgt zusammengesetzte qPCR eingesetzt:

	f.c.
cDNA (1:10 verdünnt)	10 ng
2×SYBR [®] Green Mix	1 ×
TCF21 RT FW Primer	0,625 µM
TCF21 RT RV C MM20G bzw. G MM20G Primer	0,625 µM
	f.v. 25 µl

Anschließend kam das in Tab. 4.4 dargestellte PCR-Programm zur Anwendung. Abweichend davon wurden jedoch 40 Zyklen durchlaufen und kein finaler Extensionsschritt durchgeführt. Zur Berechnung der TCF21 Transkript-Menge wurde anstelle der cDNA Verdünnungen bekannte Ausgangsmengen der pmirGLO TCF21 3'-UTR Plasmid DNA (10³-10⁶ Kopien) als Template eingesetzt, und durch Auftragen der Kopienanzahl gegen die ct-Werte

¹final concentration

²final volume

entsprechende Standardkurven ermittelt.

4.1.2 Sequenzierung

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Überprüfung der Sequenz der klonierten Reporter-gen-Konstrukte erfolgte durch Sequenzierung der Plasmid-DNA über den gesamten Insert-Bereich. Die dazu verwendeten Sequenzier-Primer sind im Abschnitt 3.5.4 aufgeführt. Die Sequenzierung der klonierten pMIR-REPORT Konstrukte erfolgte für jeden Primer unter Verwendung des *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits*. Die nachstehende Tab. 4.5 zeigt die Komponenten des Reaktionsansatzes sowie das verwendete PCR-Programm.

Tabelle 4.5: Sequenzier-PCR: Reaktionsansatz und PCR-Programm

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
Plasmid-DNA	1000 ng	1.	1 ×	Denaturierung	96 °C	180 s
5×BigDye-Puffer	1 ×	2.	24 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
Sequenzier-Primer	1 µM			Annealing	60 °C	90 s
2,5×BigDye	1 ×			Extension	50 °C	90 s
	f.v. 20 µl					

Nach anschließender EtOH-Fällung erfolgte die weitere Sequenzierung durch die AG Hiort (Kinderklinik, UKSH Campus Lübeck).

Zur Überprüfung der klonierten pmirGLO Konstrukte wurde die Plasmid-DNA (50 ng/µl, 15 µl je Reaktion) sowie die jeweiligen Sequenzier-Primer (2 µM, 15 µl je Reaktion) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert, versendet und von der Eurofins MWG GmbH sequenziert.

Sequenzierung von RNA *in vitro* Transkripten

Ergänzend zu den in Abschnitt 4.2.15 beschriebenen Strukturprobing-Experimenten wurden Sequenzier-Reaktionen mit den zu analysierenden *in vitro* Transkripten durchgeführt. Für jede der vier Basen (A, C, G, T) erfolgte eine Reaktion nach dem Abbruchprinzip von Sanger [124]. Zunächst wurde 1 µl unmarkiertes *in vitro* Transkript (0,5 bzw. 1 pmol) mit 1,85 µl H₂O und 1 µl (= 1 fmol) ³²P-markierter Primer-Extension-Sonde versetzt und 2 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden je 2 µl 5×AMV RT Puffer, 10 u RiboLock™ und 1,5 u AMV Reverse Transkriptase, 1,25 µl des jeweiligen 10×dNTP Mix (siehe Tabelle 4.6) und 2,5 µl des jeweiligen ddNTPs zupipettiert (verändert nach [125]). Die reverse Transkription erfolgte für 45 min bei 42 °C. Im Anschluss wurden 0,5 µl dNTPs (10 mM) zugesetzt und weitere 5 min bei 42 °C inkubiert. Dies ermöglichte die Verlängerung der nicht durch den

Einbau von ddNTPs entstandenen Transkriptabbrüche.

Tabelle 4.6: 10×dNTP-Mix Zusammensetzungen

	10×NTP-Mix A	10×NTP-Mix C	10×NTP-Mix G	10×NTP-Mix T
dATP 10 mM	2,5 µl	10 µl	10 µl	10 µl
dCTP 10 mM	10 µl	2,5 µl	10 µl	10 µl
dGTP 10 mM	10 µl	10 µl	2,5 µl	10 µl
dTTP 10 mM	10 µl	10 µl	10 µl	2,5 µl

4.1.3 Reverse Transkription

cDNA-Synthese

Durch die reverse Transkription von RNA wird komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) hergestellt. Dieser Prozess wird im Folgenden als cDNA-Synthese bezeichnet. Zum einen diente die cDNA-Synthese der Amplifikation der 3'-UTR-Sequenzen der Ziel-Gene für die Klonierung der Reporter-gen-Konstrukte. Zum anderen wurde sie für anschließende qPCR-Analysen (siehe 4.1.1) eingesetzt. Unter Verwendung des *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits* wurde die eingesetzte RNA zunächst mit dem verwendeten Primer (oligo-dT oder random Hexamer) in einer 12 µl Reaktion für 10 min bei 70 °C denaturiert und anschließend die weiteren Reaktionskomponenten hinzugefügt .

	f.c.
Gesamtzell-RNA	200-1000 ng
oligo-dT- oder random Hexamer-Primer	5 µM
5×Reaktionspuffer	1×
dNTP-Mix	1 mM
<i>RiboLock™</i>	20 u
M-MuLV Reverse Transkriptase	200 u
	f.v. 20 µl

Es erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 25 °C (nur bei Verwendung der random Hexamer-Primer), 60 min bei 42 °C und abschließend 5 min bei 70 °C. Die cDNA wurde ggf. in H₂O verdünnt und dann bei -80 °C gelagert.

Primer-Extension

Die Spaltprodukte des RNA-Strukturprobings (siehe 4.2.15) wurden durch eine sogenannte Primer-Extension Reaktion in cDNA Fragmente umgeschrieben. Dazu wurden ³²P-markierte

Sonden verwendet, die komplementär zu einem vom SNP stromabwärts gelegenen Sequenzabschnitt sind. Die Sonde bindet an dem jeweiligen RNA-Fragment und wird bis zum 5'-Ende des Spaltungsfragmentes verlängert. Somit erhält man cDNA-Fragmente, die Spaltstellen in der RNA anzeigen (siehe auch Abb. 4.2). In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, dass die *AMV Reverse Transkriptase* ein Nukleotid vor der RNase T1-Spaltstelle stoppt, sodass die durch RNase T1 gespaltenen, in cDNA umgeschriebenen Fragmente im Vergleich zur Sequenzier-Reaktion um ein Nukleotid verkürzt sind.

Die durch Spaltung und anschließende EtOH-Fällung gewonnenen Spaltprodukte (siehe 4.2.15) wurden zunächst mit 1 fmol Sonde denaturiert und dann in 10 µl Gesamt-Volumen mit 1 mM der vier dNTPs, 10 u *RiboLock™* und 1,5 u *AMV Reverse Transkriptase* für 45 min bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl 2×Formamid-Ladelösung wurden die cDNA-Fragmente 3 min bei 95 °C denaturiert und auf einem 10 %-igen, denaturierenden PAA-Sequenziergel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Phosphorimaging detektiert.

4.1.4 Klonierung

Ziel-Gene

Im Folgenden ist eine Übersicht aller klonierten Reporter-gen-Konstrukte dargestellt, die Informationen zum verwendeten Vektor, zur Herkunft des Inserts, zur Insertlänge sowie zu verwendeten Restriktions-Schnittstellen beinhaltet. Nähere Erläuterungen zu den Ziel-Gen-Sequenzen sowie miRNA Bindestellen sind im jeweiligen Ergebnis-Teil aufgeführt. Die Längenangabe der kurzen AGTR1- und ESR1-Inserts (= nur miRNA Bindestelle) bezieht sich auf die entsprechenden AGTR1- bzw. ESR1-Sequenzabschnitte. Die synthetischen DNA-Oligonukleotide enthielten zusätzlich eine *BspI*-Schnittstelle sowie *SpeI* und *HindIII* Schnittstellen zur gerichteten Klonierung. Damit betrug die Gesamtlänge der synthetisch hergestellten Oligonukleotide 44 nt (siehe Tab. 3.5).

Tabelle 4.7: Übersicht klonierter Inserts.

Insert-Name	Vektor	Spender	Insertlänge (bp)	5'	3'
AGTR1 kurz	pMIR-Report	synthetische DNA	31	<i>SpeI</i>	<i>HindIII</i>
ESR1 kurz	pMIR-Report	synthetische DNA	31	<i>SpeI</i>	<i>HindIII</i>
AGTR1 3'-UTR	pMIR-Report	cDNA-Bibliothek	886	<i>SpeI</i>	<i>SacI</i>
ESR1 3'-UTR	pMIR-Report	MCF-7	1268	<i>SpeI</i>	<i>MluI</i>
MRAS 3'-UTR	pmirGLO	cDNA-Bibliothek, Hec1A	3264	<i>SacI</i>	<i>Sall</i>
TCF21 3'-UTR	pmirGLO	Hec1A	2393	<i>DraI</i>	<i>Sall</i>

Präparation von Vektor und Insert

Die Leervektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert und ggf. dephosphoryliert (siehe 4.2.5 und 4.2.11). Die synthetischen kurzen Inserts wurden, wie in Abschnitt 4.2.13 beschrieben, hergestellt und direkt in die Ligationsreaktion eingesetzt. Die durch PCR gewonnenen Inserts (siehe 4.1.1) wurden entsprechend ihrer Restriktions-Schnittstellen mit den jeweiligen Enzymen restringiert (siehe 4.2.5) und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe 4.2.8).

Ligation

Zur Ligation des gewünschten Ziel-Gen mRNA-Abschnitts wurden 20-100 ng Vektor (pMIR-REPORT bzw. pmirGLO, siehe 3.5.5) mit dem 5-fachen molaren Überschuss an Insert unter Verwendung von 1 u T4 DNA Polymerase in die Ligationsreaktion (f.v. 15 µl) eingesetzt. Die Ligation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur gefolgt von einer abschließenden Inkubation bei 70 °C für 5 min zur Deaktivierung der Ligase.

Transformation in *E.coli*

Eine Transformation von elektrokompententen *E.coli* Bakterien mit 1 µl des in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Ligationsansatzes erfolgte mittels Elektroporation (200 Ω, 25 µF, 2,5 kV, $\tau = 4-6$ ms). Die elektroporierten Bakterien wurden für 1 h bei 37 °C schüttelnd in LB Medium inkubiert und anschließend auf LB-Platten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert (50-400 µl) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Klonierungskontrollen

Die synthetischen Inserts der kurzen AGTR1 und ESR1 Reporter-Gen-Konstrukte (= nur miRNA Bindestelle) enthielten zusätzlich eine *BspI* Schnittstelle, sodass nach Plasmid-DNA Extraktion durch Restriktion mit *BspI* das Vorhandensein des Inserts bestätigt werden konnte. Bei der Klonierung der langen 3'-UTR-Reporter-Gen-Konstrukte wurden zunächst Kolonie-PCRs durchgeführt (siehe 4.1.1) und von den Klonen, bei denen ein PCR-Fragment amplifiziert wurde, Plasmid-DNA isoliert (siehe 4.2.4) und diese durch Restriktion (siehe 4.2.5) analysiert. Zur Überprüfung aller Inserts erfolgte eine Sequenzierung der Plasmid-DNA (siehe 4.1.2).

4.1.5 Herstellung elektrokompententer *E.coli*

Vor dem Einbringen von Nukleinsäuren in *E. coli* wurden die Bakterien durch mehrfaches Waschen von Salzen befreit und somit in einen als elektrokompentent bezeichneten Zustand

versetzt. Dazu wurden zunächst DH5 α oder BL21-DE3 Bakterien in 1 l LB Medium bei 37 °C bis zu einer OD von ca. 0,6 kultiviert, auf vier 250 ml Zentrifugationsröhrchen verteilt und anschließend 20 min bei 5.000 \times g und 2 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und jedes Bakterienpellet in 250 ml Eiswasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Je zwei der vier Bakterienpellets wurden dann in 40 ml 10 %-igem Glycerin vereint, 10 min bei 5.000 \times g und 2 °C zentrifugiert, in 1 ml 10 %-igem Glycerin resuspendiert und abschließend in 90 μ l Aliquots abgefüllt. Die elektrokompetenten *E. coli* Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

4.1.6 Kryokonservierung von *E.coli*

Zur Kryokonservierung von Bakterien-Stämmen oder -Klonen wurden 500 μ l einer Übernachtskultur mit 500 μ l Glycerin (87 %) gemischt und bei -80 °C gelagert.

4.2 Nukleinsäureanalytische Methoden

4.2.1 Konzentrationsbestimmung

Synthetisierte Oligonukleotide sowie während dieser Arbeit hergestellte Nukleinsäuren (PCR-Produkte, Plasmid-DNA, *in vitro* Transkripte) wurden, soweit nicht anders angegeben, in Nuklease-freiem H₂O gelöst und deren Konzentration mittels Spektralphotometer bestimmt. Die Berechnung der Konzentration c erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm (A_{260}) gemäß des Lambert-Beerschen Gesetzes:

$$A_{260} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{A_{260}}{\varepsilon \cdot d} \quad (4.1)$$

ε = molarer Extinktionskoeffizient in $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

d = Schichtdicke in cm

Der Extinktionskoeffizient ist abhängig von Länge und GC-Gehalt des Oligonukleotids. Der Wert für ein 20-mer DNA-Oligonukleotid liegt bei etwa 20.000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Für Plasmid-DNA und langkettige RNA wurde die Konzentration durch folgende Näherung bestimmt: eine A_{260} von 1 entsprechen 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Die Konzentration c (in μM) der kurzen, einzelsträngigen Oligonukleotide (Primer, siRNA- und miRNA-Einzelstränge) wurde mittels folgender Formel bestimmt:

$$c = \frac{A_{260}}{\varepsilon} \cdot 10^6 \quad (4.2)$$

Zusätzlich zur Konzentration wurde die Reinheit der Nukleinsäuren durch Messung des Quotienten A_{260}/A_{280} bestimmt.

4.2.2 Elektrophoretische Auftrennung

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurden die im Folgenden beschriebenen elektrophoretischen Methoden angewandt. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte gemäß den Ausführungen im Abschnitt 4.2.3.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese allgemein

Zur Auftrennung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurden Gele mit dem gewünschten Polyacrylamid (PAA)-Gehalt in 1×TBE aus Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, v/v) hergestellt. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von APS (0,1 % (w/v)) und TEMED (0,1 % (v/v)). Als Laufpuffer wurde 1×TBE verwendet.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung kurzer Oligonukleotide wurde eine denaturierende PAGE unter Verwendung harnstoffhaltiger PAA-Gellösungen (7 M oder 8 M Urea) durchgeführt. In Abhängigkeit des Anwendungsbereiches kamen sowohl Multigele (0,1×11×12 cm) als auch Sequenziergele (0,04×21×40 cm) zum Einsatz. Für erstgenannte erfolgte ein Gelvorlauf bei 300 V für 30 bis 45 min. Die Proben wurden anschließend bei 300 V für 45 bis 75 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Sequenziergele hingegen wurden bei 80 W auf 52 °C vorgeheizt und die Proben anschließend für 60 bis 70 min bei 80 W und 52 °C elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die Sequenziergele auf Blotting-Papier übertragen, mit Frischhaltefolie abgedeckt und dann unter Vakuum bei 80 °C getrocknet.

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Oligonukleotid-Komplexe, z.B. doppelsträngige siRNAs und miRNAs oder Komplexe aus *in vitro* Transkript und siRNA bzw. miRNA, erfolgte mittels nativer PAGE, um eine Dissoziation der (partiellen) Doppelstränge zu verhindern. Dazu kamen Gele der Größe 0,1×11×12 cm zur Anwendung. Der Gelvorlauf wurde bei 100 V und 4 °C für 30 bis 45 min durchgeführt, die Proben anschließend bei 4 °C und 150 V für ca. 2 h elektrophoretisch aufgetrennt.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von länger-kettigen DNAs und RNAs (≥ 100 bp bzw. nt) wurden, in Abhängigkeit der Länge der zu untersuchenden Nukleinsäuren, Agaroselösungen unterschiedlicher Agarosekonzentrationen (0,7 bis 1,5 %) in 1×TAE-Puffer hergestellt. Ethidiumbromid (siehe 4.2.3) wurde auf dem Gelschlitten vorgelegt und mit der aufgekochten Agaroselösung

vermengt, um die Nukleinsäuren mit Hilfe von UV-Licht detektieren zu können. Die Probenauffrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 60 bis 120 V für 20 bis 70 min unter Verwendung von 1×TAE als Laufpuffer.

4.2.3 Detektion von Nukleinsäuren im Gel

SYBR Gold-Färbung

Für die Detektion von Nukleinsäuren im PAA-Gel kam der Fluoreszenz Farbstoff *SYBR[®] - Gold* zur Anwendung. Dieser interkaliert in einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren und ermöglicht durch die Messung des Fluoreszenzsignals die Detektion von DNA und RNA. Das PAA-Gel wurde für 10 min in einer 1:10.000 Verdünnung der *SYBR[®] Gold*-Lösung in 1×TBE-Puffer geschwenkt, einmal mit H₂O gewaschen und die Signale anschließend am *Typhoon*-Scanner detektiert.

Ethidiumbromid-Färbung

Zur Detektion der Nukleinsäuren im Agarosegel erfolgte eine Zugabe von 1,5 µg/ml Ethidiumbromid ins Gel. Die Banden wurden mittels UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert.

Autoradiographie

Der Einsatz von radioaktiv markierten Sonden ermöglicht eine Detektion der Signale mittels sogenannter Storage Phosphor-Screens. Diese wandeln die beim radioaktiven Zerfall entstehende ionisierende Strahlung in Signale um. Durch Laser-induzierte Anregung kommt es zur Emission von Licht, dessen detektierte Signalstärke sich proportional zur Menge an Radioaktivität in der Probe verhält. Die Screens wurden für 1 - 24 h Stunden auf die in Polyethylen-Folie eingeschweißten bzw. getrockneten PAA-Gele aufgelegt und anschließend am *Typhoon*-Scanner ausgelesen.

4.2.4 Isolation von Plasmid-DNA

Mini-Präparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde eine 3 bis 5 ml ÜN-Kultur angesetzt. Dazu wurde das LB-Medium entweder mit einem Bakterienkolonie-Abstrich oder aber mit einer bereits vorhandenen Glycerinkultur angeimpft und für etwa 15 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-Präparation erfolgte mit dem *GenElute[™] Kit* nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 bis 100 µl Nuklease-freiem H₂O eluiert und die Konzentration, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, bestimmt.

Maxi-Präparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurden zunächst 3 ml Kulturmedium (LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) mit einer Glycerinkultur angeimpft und diese Vorkultur für 8 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde diese 1:1.000 in 250 bis 300 ml Kulturmedium verdünnt und für etwa 15 h über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-Präparation erfolgte unter Verwendung des *NucleoBond® Xtra Maxi Kits*. Eine Re-suspension der Isopropanol-gefällten Plasmid-DNA (siehe 4.2.7) erfolgte mit 400 bis 600 µl Nuklease-freiem H₂O. Die Konzentration wurde gemäß Abschnitt 4.2.1 bestimmt.

4.2.5 Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Die Restriktion von Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkten erfolgte je nach verwendetem Enzym in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei 37 °C für 30 bis 120 min. Gegebenenfalls erfolgte eine Inaktivierung der Enzyme bei 65 bzw. 80 °C für 5 bis 10 min. Die folgende Übersicht zeigt die detaillierte Anwendung der einzelnen Restriktionsenzyme.

Tabelle 4.8: Übersicht verwendeter Restriktionsenzyme.

Enzym	Anwendung
<i>Bpl</i>	Restriktionskontrolle: kurze AGTR1 und ESR1 Inserts, AGTR1 3'-UTR
<i>Dra</i>	Klonierung: TCF21 3'-UTR
	Restriktionskontrolle: TCF21 3'-UTR
<i>Dra</i> III	Linearisierung für IVT ¹ : AGTR1 und ESR1 3'-UTR
<i>Eco</i> RI	Restriktionskontrolle: AGTR1 und ESR1 3'-UTR
<i>Hind</i> III	Klonierung: kurze AGTR1 und ESR1 Inserts
<i>Mlu</i> I	Klonierung: ESR1 3'-UTR
<i>Nde</i> I	Restriktionskontrolle: MRAS 3'-UTR
<i>Not</i> I	Linearisierung für IVT: AGTR1 und ESR1 3'-UTR
<i>Sac</i> I	Klonierung: AGTR1 3'-UTR
	Restriktionskontrolle: ESR1 und MRAS 3'-UTR
<i>Sal</i> I	Klonierung: TCF21 und MRAS 3'-UTR
<i>Spe</i> I	Klonierung: AGTR1 und ESR1: kurze und 3'-UTR Inserts

¹ *in vitro* Transkription

4.2.6 RNA-Isolation

Isolation durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung von RNA nach *in vitro* Transkription (siehe 4.2.14) und RNA-Strukturprobing (siehe 4.2.15) wurde das zu extrahierende Probenvolumen mit H₂O auf 100 µl expandiert und anschließend 100 µl Phenol-Chloroform (pH = 4,5) hinzupipettiert. Bei der RNA-Extraktion aus Zellen wurde das Zellpellet mit 200 µl 1 % NP40 resuspendiert und anschließend mit 200 µl Phenol-Chloroform (pH = 4,5) versehen. Es folgten 2 min Schütteln und Zentrifugation für mind. 5 min (45 min für Zell-RNA) bei 4 °C und 20.000×g. Die wässrige Phase wurde mit 100 µl (bzw. 200 µl für Zell-RNA) Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt, 2 min geschüttelt und für mind. 5 min bei 4 °C und 20.000×g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Abschließend erfolgte eine EtOH-Fällung der wässrigen Phase (siehe 4.2.7).

Isolation mittels RNA-Extraktions-Kit

Aus MCF-7 und Hec1A-Zellen wurde unter Verwendung des *NucleoSpin[®] RNA II - Kits* RNA extrahiert, um daraus die zur Amplifikation der 3'-UTR Sequenzen eingesetzte cDNA zu generieren. Dazu wurden zunächst Aliquots aus 1 - 4 · 10⁶ Zellen mittels 350 µl RA1 Lyse-puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol lysiert. Anschließend erfolgte ein Homogenisieren durch mehrfaches Aufziehen und Ablassen des Lysats durch eine 0,9 mm Kanüle. Es wurde weiter nach Herstellerangaben verfahren und die RNA schließlich mit 40 µl H₂O eluiert.

4.2.7 Fällung von Nukleinsäuren

Ethanol-Fällung

Die zu fällende, wässrige Probe wurde mit dem 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) angesäuert, dann mit dem 2,5-fachen Volumen EtOH (100 %) versetzt und kräftig gemischt. Nach der Lagerung für 30 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C wurde die gefällte Nukleinsäure für mindestens 30 min bei 20.000×g und 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde zweimal mit 200 µl EtOH (70 %) gewaschen, luftgetrocknet und in Nuklease-freiem H₂O resuspendiert.

Isopropanol-Fällung

Die bei der Maxi-Präparation (siehe 4.2.4) eluierte Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol ausgefällt. Das mit dem 0,7-fachen Volumen an Isopropanol versetzte Eluat wurde kräftig gemischt und 2 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend erfolgte eine 45 minütige Zentrifugation bei 12.000×g und 4 °C gefolgt von zweimaligem Waschen mit 70 %-igem

EtOH. Die gefällte DNA wurde luftgetrocknet, in Nuklease-freiem H₂O resuspendiert und deren Konzentration bestimmt (siehe 4.2.1).

4.2.8 Gelextraktion

Die zu extrahierende Nukleinsäure (restringierte Plasmid-DNA oder PCR-Produkte) wurde auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.2.2), das gewünschte Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Nukleinsäure mit dem *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up Kit* nach Herstellerangaben isoliert.

4.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up Kit* gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Produkte wurden direkt aufgereinigt oder zunächst mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.2.2) aufgetrennt, das gewünschte Gel-fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und dann nach Herstellerangaben aufgereinigt.

4.2.10 Einengen von Nukleinsäuren

Das Konzentrieren von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte durch Vakuumzentrifugation mittels *Speed Vac[®]*.

4.2.11 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Die linearisierte Plasmid-DNA wurde dephosphoryliert, um eine Selbstligation des Vektors während der Klonierung zu unterbinden. Dazu wurde ca. 1 µg des Vektors in einer 20-µl-Reaktion in 1×Reaktionspuffer mit 1 u Alkalischer Phosphatase für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe 4.2.8).

4.2.12 Radioaktive Endmarkierung

Zur radioaktiven Markierung des 5'-Endes eines Oligonukleotides wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

	f.c.
zu markierendes Oligonukleotid	0,5 µM
10×PNK Reaktionspuffer A	1×
T4 PNK	10 u
[γ- ³² P]-ATP	50 µCi
	f.v. 20 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über einen Zeitraum von 45 min. Der Reaktionsansatz wurde auf eine Sephadex G50-Säule aufgetragen und die radioaktiv markierten Oligonukleotide mit 400 µl H₂O eluiert. Dies ermöglicht die Trennung des Eluats von den nicht eingebauten Nukleotiden. Zur Überprüfung der Markierung wurde jeweils 1 µl Probe (= 1 fmol) mittels denaturierender PAGE (siehe 4.2.2) aufgetrennt sowie eine Aktivitätsbestimmung (in cpm) von jeweils 1 µl Probe in 3 ml Szintillationslösung durch Dreifachbestimmung am Wallac Counter durchgeführt.

4.2.13 Hybridisierung

DNA-Annealing

Zur Klonierung der kurzen Reporter-Konstrukte (= nur miRNA Bindestelle) im AGTR1- bzw. ESR1-System wurden die sense und antisense Stränge (siehe 3.5.1) zunächst hybridisiert. Dazu wurden je 2 µl einer 1-µg/µl-Lösung der Einzelstränge mit 46 µl DNA Annealing-Puffer gemischt, 3 min bei 90 °C denaturiert und anschließend 1 h bei 37 °C inkubiert. Eine Überprüfung des Annealings erfolgte durch native PAGE (siehe 4.2.2).

RNA-Annealing

Zum Hybridisieren von siRNA bzw. miRNA *guide* und *passenger* Strängen wurden die jeweiligen Einzelstränge äquimolar in RNA Annealing-Puffer gemischt, 3 min bei 95 °C erhitzt und anschließend über einen Zeitraum von 2 h im Heizblock abgekühlt. Mittels nativer PAGE (siehe 4.2.2) wurde die Bildung doppelsträngiger RNAs kontrolliert.

4.2.14 *in vitro* Transkription

Zur Herstellung von *in vitro* Transkripten wurde 800 bis 1000 ng linearisierte Plasmid-DNA oder aufgereinigtes PCR-Produkt, das am 5'-Ende mit der T7 Promotor Erkennungssequenz verlängert wurde, als Template eingesetzt. Die *in vitro* Transkription wurde unter Verwendung des *T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems* durchgeführt. Die reverse Transkription erfolgte in Abhängigkeit der Transkriptlänge für 30 bis 60 min bei 37 °C. Nach Zugabe von 1 u der im Kit enthaltenen DNase erfolgte eine weitere 15-minütige Inkubation bei 37 °C. Danach wurde der Reaktionsansatz mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und die RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert (siehe 4.2.6). Zur Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide wurde das Isolat mittels Sephadex G50 Säule gefiltert und das Eluat EtOH-gefällt (siehe 4.2.7). Im Anschluss erfolgten die Resuspension der *in vitro* Transkripte in H₂O, deren photometrische Konzentrationsbestimmung (siehe 4.2.1) sowie eine Analyse der Integrität mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.2.2).

4.2.15 RNA-Strukturprobung

Allgemeines

Das im folgenden Abschnitt beschriebene RNA-Strukturprobung dient zur vergleichenden Strukturanalyse von RNAs mit polymorphen Sequenzen. In Tab. 4.9 sind die dazu verwendeten Agenzien aufgeführt. Neben der enzymatischen Spaltung der RNA durch die RNase T1 wurde auch eine chemische Hydrolyse mit Blei(II)acetat (im Folgenden mit Pb^{2+} bezeichnet) durchgeführt.

Tabelle 4.9: Spezifität verwendeter Probing-Agenzien.

Hydrolyse-Art	Agens	Spezifität
enzymatisch	RNase T1	ss G
chemisch	Pb^{2+}	ss A, C, G, U

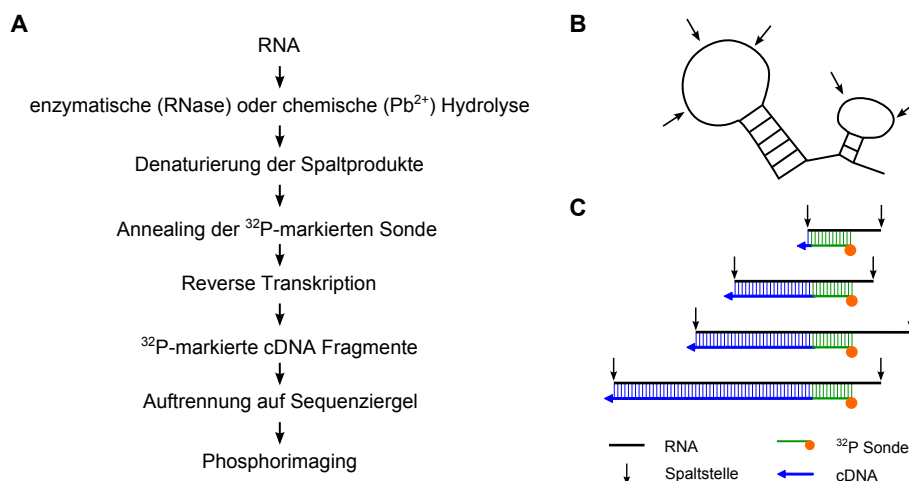


Abbildung 4.2: Schematischer Ablauf des RNA-Strukturprobings. (A) zeigt die lineare Versuchsabfolge während des Probings. Wie in (B) durch die Pfeile angedeutet, werden einzelsträngige Bereiche der RNA durch enzymatische oder chemische Hydrolyse gespalten. (C) zeigt das schematische Prinzip der Primer-Extension der radioaktiv markierten Sonde. Die RNA-Spaltprodukte sind durch schwarze horizontale Linien und die Spaltstellen durch vertikale Pfeile angedeutet. Die Sonde bindet an den komplementären Bereich der RNA und wird durch reverse Transkription bis zur Spaltstelle verlängert. Die so gebildeten unterschiedlichen cDNA-Fragmente geben Aufschluss über die Spaltstellen und somit über die für Hydrolyse zugängliche Bereiche in der RNA.

Die Abb. 4.2 zeigt den schematischen Versuchsaufbau des Strukturprobings. Zunächst wurden *in vitro* Transkripte hergestellt (siehe 4.2.14), diese mit H_2O auf eine Konzentration von $1 \mu M$ verdünnt und dann mit RNase T1 oder Pb^{2+} hydrolysiert. Die Spaltprodukte wurden mittels EtOH-Fällung isoliert und anschließend durch Primer-Extension mit ^{32}P -markierten

Sonden (siehe 3.5.4), die stromabwärts vom SNP bzw. der miRNA Erkennungsstelle binden, in cDNA umgeschrieben (siehe 4.1.3). Im Anschluss erfolgte deren gelelektrophoretische Auftrennung durch denaturierende PAGE auf einem Sequenziergel (siehe 4.2.2) sowie deren Detektion mittels Phosphorimaging (siehe Abb. 4.2). Im Folgenden werden die Reaktionen der einzelnen RNA-Spaltungen im Detail beschrieben.

RNase T1-Spaltung

Die Endoribonuklease RNase T1 spaltet RNA spezifisch an ungepaarten Guaninen. In einer 5 µl Reaktion wurde zunächst jeweils 1 pmol *in vitro* Transkript in 1×Faltungspuffer für 10 min bei 70 °C denaturiert und im Heizblock langsam bei Raumtemperatur renaturiert. Nach Zugabe von 1 µg tRNA, 0,5 µl 10×Faltungspuffer und 2,5 µl H₂O wurde 1 µl vorverdünnte RNase T1 zugegeben, sodass die *in vitro* Transkripte mit 0, 0,25, 1 oder 2 units RNase T1 für jeweils 4 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach Expansion des Volumens auf 100 µl mit H₂O wurde die gespaltene RNA mittels Phenol-Chloroform extrahiert (siehe 4.2.6) und anschließend durch EtOH-Fällung (siehe 4.2.7) unter Zugabe von 1 µg tRNA als Fällhilfe gewonnen.

Bleiacetat-Spaltung

Blei(II)acetat erzeugt im Gegensatz zu der verwendeten RNase eine Spaltung der RNA in ungepaarten Bereichen ohne eine Präferenz für eine bestimmte Base. In einem 5 µl Reaktionsvolumen wurde zunächst jeweils 1 pmol *in vitro* Transkript in 1×Faltungspuffer für 10 min bei 70 °C denaturiert und im Heizblock langsam bei Raumtemperatur renaturiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 1 µl 10×Pb-Puffer und 4 µl H₂O expandiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 µg tRNA wurde Pb²⁺ zupipettiert, sodass in einem 15 µl Volumen Endkonzentration von 0, 10, 20 oder 40 mM vorlagen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Reaktion durch 5 µl EDTA (0,1 M) und 60 µl EtOH (100 %) gestoppt und die gespaltene RNA mittels EtOH-Fällung (siehe 4.2.7) unter Zugabe von 1 µg tRNA als Fällhilfe gewonnen (adaptiert nach [126]).

4.2.16 RNA-RNA-Annealing

Annealing

Durch RNA-RNA-Annealing Experimente wurde das Bindungsverhalten zwischen einem *in vitro* Transkript und einer miRNA bzw. siRNA untersucht. Dabei wurde analysiert, ob kurze RNAs (miRNA bzw. siRNA *guide*-Stränge) unterschiedlich stark bzw. schnell an Ziel-RNAs, die sich nur in einem nt unterscheiden, binden (schematisch siehe Abb. 4.3).

Als Beschleuniger des RNA-RNA-Annealings wurde das quaternäre Ammoniumsalz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) eingesetzt. CTAB beschleunigt die Kinetik von RNA-RNA-Interaktionen unter Bedingungen, die weder die RNA-Struktur noch die sich ergebende Struktur-Funktions-Beziehung beeinflussen [127–130].

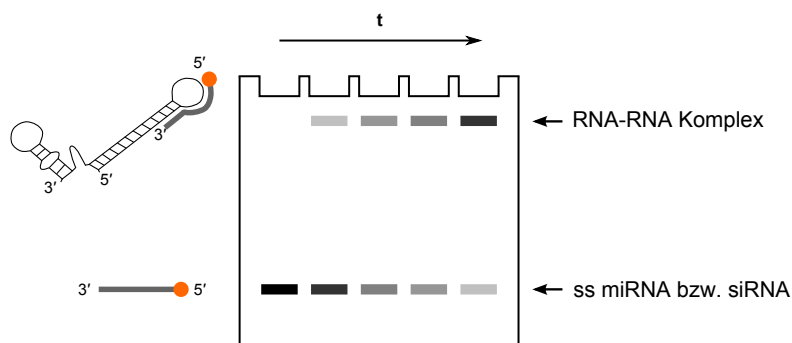


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des RNA-RNA-Annealings. Renaturierte *in vitro* Transkripte wurden mit radioaktiv markierten miRNA bzw. siRNA *guide* Strängen inkubiert, um die Bindung der kurzen RNA an die *in vitro* Transkripte zu analysieren. Die Komplexbildung konnte elektrophoretisch detektiert werden, da der RNA-RNA-Komplex größer als der markierte Einzelstrang ist und damit nicht so weit in das Gel einläuft. Bindet die kurze RNA an das *in vitro* Transkript, so kommt es zeitabhängig zur Abnahme des Signals der einzelsträngigen kurzen RNA und gleichzeitig zum Anstieg des Signals des Komplexes aus si/miRNA und *in vitro* Transkript.

Zunächst wurden, wie in Abschnitt 4.2.14 beschrieben, *in vitro* Transkripte hergestellt, danach in H₂O vorverdünnt und 1:1 mit 2×Annealing-Faltungspuffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Über einen Zeitraum von 10 min bei 65 °C erfolgte die Denaturierung der *in vitro* Transkripte und anschließend deren Renaturierung durch langsames Abkühlen. Die am 5'-Ende ³²P-markierten miRNA bzw. siRNA *guide* Stränge (siehe 4.2.12) wurden mit H₂O auf 10 nM verdünnt. Die *in vitro* Transkripte (5-50 nM Endkonzentration) wurden in 200 µl PCR-Tubes mit Hybridisierungspuffer und ggf. mit 10 mM CTAB auf Eis vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des markierten Einzelstranges (0,5 nM Endkonzentration) gestartet und, soweit nicht anders angegeben, bei 37 °C im PCR-Block inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, diese 1:1 mit Stopp-Puffer versetzt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden kurz auf Eis angetaut und dann auf einem nativen, 8 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, die Gele anschließend in Folie eingeschweißt und nach Auflegen eines Phosphor-Storage-Screens bis zur Detektion der Signale bei -20 °C gelagert.

Die Auswertung der Komplexbildung erfolgte unter Verwendung der *ImageQuant*-Software. Dabei wurde der prozentuale Anteil des Komplexes bezogen auf die Gesamtmenge an Signal in der gesamten Bahn bestimmt.

Für die Berechnung kinetischer Parameter wurden folgende Formeln zugrunde gelegt:

$$V = \frac{d_{\text{Komplex}}}{dt} = k \cdot [\text{RNA}] \cdot [\text{asRNA}] \quad (4.3)$$

$$[\text{RNA}] \approx \text{konstant} \Rightarrow k^* = k \cdot [\text{RNA}] \Leftrightarrow k = \frac{k^*}{[\text{RNA}]} \quad (4.4)$$

$$k^* = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad (4.5)$$

k^* = gemessene Ratenkonstante aus pseudo-erster Ordnung

k = Ratenkonstante

$[\text{RNA}]$ = Konzentration der Ziel-RNA

$[\text{asRNA}]$ = Konzentration der antisense RNA (miRNA bzw. siRNA *guide* Strang)

Annealing mit anschließender RNase-Hydrolyse

Nach der Komplexbildung von *in vitro* Transkript und der kurzen RNA (siehe 4.2.16) wurden diese mit den RNasen T1 und A inkubiert. Diese spalten spezifisch an ungepaarten Bereichen der RNA (RNase T1: Guaninen, RNase A: Cytosinen und Uracilen). Dieses Vorgehen soll zeigen, dass die gebildeten partiellen Doppelstränge vor RNase-Abbau geschützt und somit die beobachteten Komplexe spezifisch für die Bindung der (partiell) komplementären RNAs sind. Dazu wurden die RNAs wie in Abschnitt 4.2.16 beschrieben hybridisiert, dann mit verschiedenen Mengen RNase für jeweils 4 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 1:1 mit Stopp-Puffer versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und wie zuvor beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert.

Annealing mit anschließendem Strukturprobing

Es wurde eine weitere experimentelle Vorgehensweise gewählt, um die Spezifität der Bindung der miR-224 an die beiden TCF21 *in vitro* Transkripte zu verdeutlichen. Dabei wurde untersucht, welchen Einfluss die Bindung der miR-224 an das TCF21 *in vitro* C bzw. G Transkript auf das Strukturprobing hat. Dazu wurden vier verschiedene Reaktionen mit bzw. ohne miR-224 sowie mit bzw. ohne CTAB (siehe Tab. 4.10) in jeweils vierfacher Ausführung parallel in einem 5 µl Reaktionsvolumen mit dem entsprechenden Reaktionspuffer angesetzt. Die anschließende Denaturierung erfolgte für 10 min bei 70 °C gefolgt von einer langsamen Renaturierung im Heizblock. Nach Zugabe von 5 µg tRNA erfolgte dann je Reaktionsvariante eine Blei-Spaltung der RNA mit 0, 10, 20 oder 40 mM Pb^{2+} für 10 min bei Raumtemperatur (f.v. 10 µl). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl EDTA (0,1 M) und 60 µl EtOH (100 %) gestoppt und die gespaltene RNA mittels EtOH-Fällung (siehe 4.2.7) unter Zugabe von 1 µg tRNA als Fällhilfe gewonnen.

Tabelle 4.10: Übersicht der Reaktionsansätze des Annealings mit anschließendem Strukturprobing. In vier verschiedenen Reaktionsansätzen wurde der Einfluss der Bindung von miR-224 an die TCF21 *in vitro* Transkripte in An- und Abwesenheit von CTAB auf die Pb²⁺-induzierte RNA-Spaltung analysiert.

Reaktion	IVT	miR-224	CTAB
1	1 pmol	10 pmol	10 mM
2	1 pmol	10 pmol	-
3	1 pmol	-	10 mM
4	1 pmol	-	-

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die folgende Übersicht zeigt die während dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Kulturmedium sowie den im Vollmedium enthaltenen Anteil an FKS.

Tabelle 4.11: Übersicht verwendeter Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung	Vollmedium
HeLa	Zervixkarzinom	DMEM, 10 % FKS
Hec1A	Endometriumepithelzellkarzinom	RPMI, 10 % FKS
MCF-7	Brustzellkarzinom	DMEM, 5 % FKS

Die Säugerzellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, die Zellen mit Trypsin/EDTA benetzt und bis zum Ablösen bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Vollmedium wurden die Zellen für 3 min bei 1.000 rpm zentrifugiert, anschließend in Vollmedium resuspendiert und neu ausgebracht.

Zur Aussaat von Zellen für Transfektionsexperimente wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und anschließend die gewünschte Anzahl an Zellen in Vollmedium in den für das jeweilige Experiment vorgesehenen Zellkultur-Platten ausgebracht (12, 24 oder 96 well).

4.3.2 Kryokonservierung von Säugerzellen

Zur Kryokonservierung von Säugerzellen wurden Aliquots von etwa 10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (70 % Medium, 20 % FKS und 10 % DMSO) zunächst langsam bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren und nach zwei Tagen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

4.3.3 Transfektion von Säugerzellen

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag in Vollmedium ausgebracht und wiesen zum Zeitpunkt der Transfektion eine 80-90 %-ige Konfluenz auf. Die Transfektions-Mixe wurden in *Opti-MEM*[®] angesetzt. Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion. Dazu wurde die Konzentration an *Lipofectamine*[™] 2000 in Abhängigkeit der Menge und Konzentration der zu transfizierenden Nukleinsäuren gemäß Herstellerangaben berechnet: für die Plasmid-DNA wurde die 3-fache Menge und für die RNA 1 μg *Lipofectamine*[™] 2000 pro 20 pmol RNA eingesetzt. Die entsprechende Menge an *Lipofectamine*[™] 2000 wurde zunächst für 5 min in *Opti-MEM*[®] inkubiert und anschließend im Verhältnis 1:1 mit den ebenfalls in *Opti-MEM*[®] verdünnten, zu transfizierenden Nukleinsäuren durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann mit dem Nukleinsäure/*Lipofectamine*[™] 2000-Gemisch in Dreifach-Bestimmung transfiziert. Nach 4 h wurde der Transfektions-Mix abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und Vollmedium hinzugegeben.

4.3.4 Lyse von Säugerzellen

Lyse für anschließende RNA-Extraktion

Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion $1\times$ mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in Vollmedium aufgenommen. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei $800\times g$, einmaliges Waschen des Zellpellets mit PBS und eine erneute Zentrifugation. Das Zellpellet wurde dann in 200 μl 1% NP40 in PBS resuspendiert, 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend die RNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert (siehe 4.2.6).

Lyse für anschließenden Luciferase-Assay

Für die Analyse der firefly und *Renilla* Luciferase-Aktivitäten mittels Dual-Luciferase-Assay wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte dann in $1\times$ PLB (passive lysis buffer) auf einem Wippen für 30 min bei Raumtemperatur. Die Lysate wurden bis zur Durchführung des Dual-Luciferase Assays (siehe 4.3.5) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.3.5 Dual Luciferase-Assay

Die Lysate der transfizierten Zellen (siehe 4.3.4) wurden unter Verwendung des *Dual Luciferase[®] Reporter Assay Systems* auf ihre firefly und *Renilla* Luciferase-Aktivität hin analysiert. Dazu wurden die Lysate zuvor in 96 well Mikroplatten übertragen. Die entsprechende Messung erfolgte am *anthos Lucy3* Luminometer.

4.4 Computergestützte Methoden und Auswertungen

4.4.1 RNA-Strukturvorhersage mittels mfold

Zur Vorhersage der RNA-Struktur diverser mRNAs bzw. 3'-UTRs wurde die mfold Software [131, 132] verwendet. Dabei wurde eine RNA-Sequenz eingelesen und die fünf energieärmsten Strukturen berechnet. Die Anwendung von mfold wurde freundlicherweise von Herrn S. Dornseifer modifiziert, um mit der Software der *Accelrys Genetics Computer Group* arbeiten zu können. Dies ermöglichte eine Automatisierung der Strukturberechnung. Nach Eingabe der RNA-Struktur und der gewünschten Fenstergröße sowie Schrittweite (siehe Abb. 4.4) konnten so sich alle hieraus ergebenden Strukturen automatisch bestimmt werden.

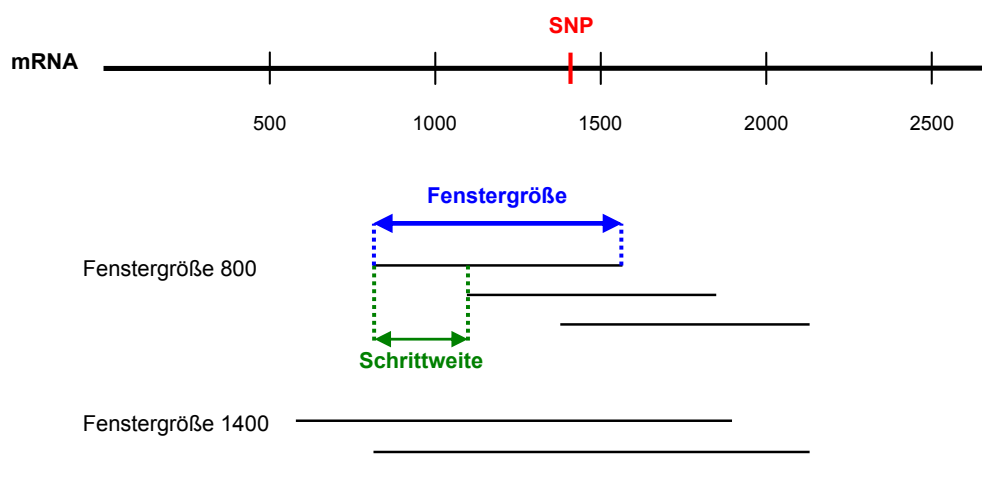


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der systematischen RNA-Sekundärstrukturanalyse mittels mfold. Ausgehend von der Ziel-Gen mRNA-Sequenz und der Position des SNPs wurden systematisch für Ausschnitte der RNA die fünf energieärmsten, d.h. thermodynamisch stabilsten Strukturen berechnet. Die automatisierten Strukturberechnungen wurden durch zwei Parameter bestimmt: (I) die Fenstergröße, d.h. der Größe des Sequenz-Ausschnittes und (II) die Schrittweite mit der sukzessive die Ausschnitte über den SNP-Bereich laufen.

Es wurden Fenstergrößen von 100, 200, 400, 800 und 1400 nt und Schrittweiten von 20 bis 100 nt gewählt. Die vergleichende Auswertung der berechneten Sekundärstrukturen erfolgte visuell.

Es ist wichtig, zu betonen, dass diese Methode die Berechnung und Analyse vieler Sequenzabschnitte und damit vieler Strukturen für eine bestimmte RNA beinhaltet, und somit zu biologisch relevanten Strukturmodellen verhelfen kann [121].

4.4.2 Online-Tools

Im Zeitraum von April 2009 bis Juni 2012 wurden die folgenden, kostenlos zur Verfügung stehenden Online-Tools verwendet.

Tabelle 4.12: Übersicht verwendeter Online-Tools.

Funktion	Internet-Adresse	Referenz
miRNA Sequenzen	http://www.miRBase.org	[133]
miRNA Expression	http://www.microrna.org	[134]
Vorhersage von miRNA Bindestellen	http://www.targetscan.org http://www.microRNA.org	[43] [134]
mRNA Sequenzinformationen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore	
Geninformationen	http://www.genecards.org	[135]
Gen- und Protein-Funktionen	http://biogps.org	[136]
Genexpressionsdaten	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest	
SNP Informationen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp http://mutdb.org	[137] [138]
SNPs in miRNA Bindestellen	http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/ http://www.bioguo.org/miRNASNP/	[139, 140] [141]
Multiples Sequenz-Alignment	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	[142]
RNA Hybridisierung	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html	[143]
Primer Design	http://www.genscript.com http://frodo.wi.mit.edu/	
Molekulargewicht, Extinktionskoeffizient ³	http://www.ambion.com/techlib/Documents.html?fkResSxn=10&fkSubSxn=28	
Berechnung PCR-Produkte ³	http://www.ebioinfogen.com/biotools/pcr-product-calculator.htm	
Tm Berechnung für Phusion [®] Sequenz-Edition	http://www.finnzymes.fi http://www.fr33.net/seqedit.php http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html	[144]

³zum Zeitpunkt des Verfassens der Dissertation nicht mehr verfügbar

4.4.3 Programme

Des Weiteren wurden während dieser Arbeit neben den gängigen MS-Office Anwendungen folgende Programme verwendet:

Tabelle 4.13: Übersicht verwendeter Programme.

Funktion	Programm	kostenloser <i>Download</i>
Klonierungsplanung	pDRAW	http://www.acaclone.com/
Auswertung Plasmid-Sequenzierung	Chromas	
Quantifizierung von Gelbanden	ImageQuant 5.2	
Statistik Transfektionsexperimente ⁴	GraphPadPrism	
Auswertung qPCR-Experimente	GeneAmp SDS 5700	
Literaturverwaltung	EndNote	
	JabRef	http://jabref.sourceforge.net/
Grafiken erstellen/bearbeiten	Inkscape	http://inkscape.org/

⁴ANOVA, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$

5 Ergebnisse

5.1 Erste methodische Analysen

Ein methodisches Ziel des Dissertationsprojektes war vorerst die Etablierung eines zellulären Reportersystems zur Analyse des Einflusses von SNPs in miRNA Bindestellen auf die miRNA-vermittelte Regulation. Dazu wurden DNA-Oligonukleotide, die der miRNA Bindestelle des jeweiligen Ziel-mRNA Abschnittes entsprechen, synthetisch hergestellt und anschließend in einen Luciferase Reporter-Vektor kloniert. Durch anschließende Ko-Transfektion mit synthetisch hergestellten miRNAs und nachfolgender Messung der Reportergenaktivität sollte der Einfluss des SNPs auf die Interaktion zwischen Ziel-RNA und miRNA analysiert werden. Diese Vorgehensweise versprach ein einfaches und schnelles Screening einer Vielzahl verschiedener Kombinationen aus Ziel-mRNAs und miRNAs.

Zum Testen des Reportersystems wurde anfangs nach bereits publizierten Daten zu einer entsprechenden Ziel-RNA-miRNA-Interaktion gesucht, für die das Vorhandensein eines SNPs innerhalb der Ziel-mRNA mit einer Dysregulation der miRNA-Regulation einhergeht. Nach umfassender Literatur-Recherche wurde sich für die AGTR1-miR-155-Interaktion entschieden, die durch den SNP rs5186 (A/C-Polymorphismus) beeinflusst wird. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Arbeitsgruppen [145–147] hatten gezeigt, dass das Vorliegen der AGTR1 C-Variante zu einer verminderten Hemmung durch die miR-155 und damit zu einem Anstieg der AGTR1 Protein-Menge führt. In diesen Studien wurden bereits Reportergen-Experimente durchgeführt, jedoch enthielten die verwendeten Reporter-Plasmide jeweils die gesamte 3'-UTR Sequenz. Im Ergebnis vorgenannter Ausführungen erschien der AGTR1 rs5186 SNP als geeigneter Modell-SNP, um mit der Etablierung eines Zellkultur-Reportersystems zu beginnen.

5.2 Vorarbeiten

5.2.1 SNPs aus Literatur-Recherche

Die in dieser Arbeit analysierten SNPs, die sich aus der Literatur-Recherche ergaben, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 5.1: Übersicht der analysierten SNPs aus der Literatur.

Gen	SNP-ID	Varianten	Referenz
AGTR1	rs5186	A/C	[145–147]
ESR1	rs9341070	C/T	[148]
DHFR	rs34764978	G/A bzw. C/T ¹	[149]

5.2.2 SNPs aus der MKII

Im Rahmen regelmäßiger Treffen des Forschungsschwerpunktes „Kardiovaskuläre Genomforschung“ der Universität zu Lübeck wurde über funktionelle Analysen sogenannter Herzinfarkt-Gene diskutiert. Für diese Gene wurde eine Assoziation mit kardiovaskulären Phänotypen durch GWAS identifiziert [22, 23] sowie unpublizierte Daten. Die in Tab. 5.2 aufgeführten SNPs wurden aus der AG Kardiovaskuläre Genomik (Universität zu Lübeck, Medizinischen Klinik II (MKII)) bezogen und in die Analysen dieser Arbeit eingeschlossen.

Tabelle 5.2: Übersicht der analysierten SNPs aus der MKII.

Gen	SNP-ID	Varianten	Referenz
MRAS	rs9818870	C/T	[22]
TCF21	rs12190287	C/G	[23]
c17orf39	rs2955372	C/T	CARDIoGRAM ²
NT5C2	rs10786736	G/C bzw. C/G	CARDIoGRAM
SLC22A3	rs3088442	A/G	CARDIoGRAM
ADAMTS13	rs4962153	A/G	CARDIoGRAM
PHACTR1	rs7739181	A/C/G/T	CARDIoGRAM
WDR12	rs6725887	A/C/G/T	[23]
PSRC1	rs599839	A/G	[23]

¹Unterschied zwischen genomischem und mRNA-Polymorphismus, da die mRNA ausgehend vom Minus-Strang transkribiert wird

²persönliche Mitteilung von J. Erdmann

5.3 Untersuchungen im AGTR1-System

5.3.1 Einführung

Angiotensin II ist eine biologisch aktive Komponente des humanen Renin-Angiotensin-Systems und an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt [146], z.B. spielt es eine entscheidende Rolle bei der Blutdruckregulation. Die häufigsten Angiotensin II Wirkungen werden über den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AGTR1) vermittelt, der zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört [150]. Für das *AGTR1* Gen wurden bereits mehr als 600, häufig seltene, genetische Varianten [151] und mindestens 50 SNPs [150, 152] beschrieben. Einer der am meisten analysierten SNPs ist rs5186 (A>C), der in der 3'-UTR der *AGTR1* mRNA lokalisiert ist. Darüber hinaus befindet sich rs5186 direkt innerhalb der Bindestelle für die humane miR-155. Bereits zwei Arbeitsgruppen konnten anhand ihrer Analysen zeigen, dass die Expression des *AGTR1* A Allels durch diese miRNA herunterreguliert wird [145–147]. Für das *AGTR1* C Allel wurde jedoch eine verminderte miR-155 vermittelte Hemmung der AGTR1 Genexpression beobachtet. Diese Dysregulation hat eine Erhöhung des AGTR1 Proteinlevels zur Folge und legt somit eine funktionelle Assoziation dieses miR-SNPs mit der Entstehung von Bluthochdruck nahe. Diese Ergebnisse sind kongruent mit der bereits zuvor beobachteten Verbindung zwischen dem Vorhandensein des C Allels mit Bluthochdruck und anderen kardiovaskulären Phänotypen [150, 153].

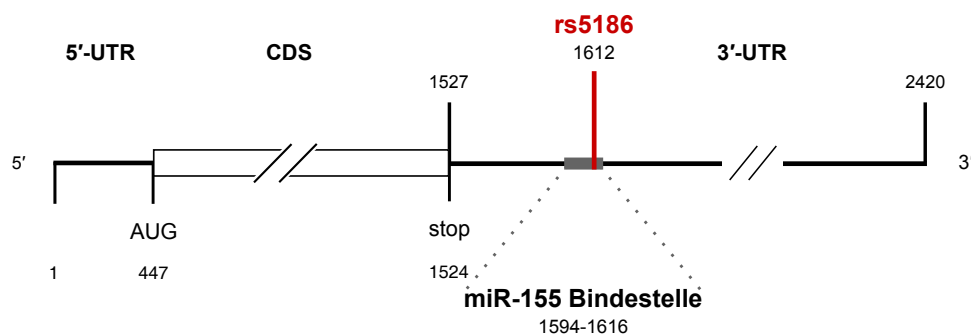


Abbildung 5.1: Lokalisation des SNPs rs5186 innerhalb der miR-155 Bindestelle in der *AGTR1* mRNA. Die *AGTR1* mRNA ist schematisch mit ihrer 5'-UTR, CDS und 3'-UTR dargestellt. Der SNP befindet sich an der mRNA Position 1612; die miR-155 Bindestelle umfasst die mRNA Positionen 1594 - 1616.

Die *AGTR1* mRNA ist schematisch in Abb. 5.1 dargestellt. Der SNP rs5186 ist an mRNA Position 1612 lokalisiert (entspricht Position 86 in der 3'-UTR) und liegt damit genau innerhalb der Bindestelle für die humane miR-155. Wie im folgenden Abschnitt 5.3.2 im Detail gezeigt, weist die *AGTR1* A-Variante einen *seed-match* zur miR-155 auf, während die *AGTR1* C-Variante durch einen *mismatch* zwischen mRNA und miR-155 an Position 5 aus-

gehend vom 5'-Ende der miRNA gekennzeichnet ist. Dies lässt eine verminderte Regulation der AGTR1 C-Variante durch miR-155 vermuten, da die Paarung zwischen Ziel-RNA und miRNA in der *seed* Region eine bekanntlich entscheidende Rolle für die miRNA-vermittelte Suppression der Genexpression spielt.

5.3.2 Bindungsenergien

Mittels des online verfügbaren RNAHybrid-Tools [143] wurden die thermodynamischen Stabilitäten der lokalen AGTR1-miRNA Interaktionen bestimmt. Neben der authentischen miR-155 wurde auch die sogenannte miR-155_SNP in die Analysen einbezogen. Letztere existiert nicht in der lebenden Zelle und wurde hier nur als Kontroll-miRNA zu mechanistischen Zwecken eingesetzt. Die miR-155_SNP ist durch einen U>G Basenaustausch an der Position der miRNA, die mit der SNP-Position der AGTR1 mRNA paart, gekennzeichnet. Dieser Austausch führt im *seed* Bereich zu einer vollständigen Komplementarität der miR-155_SNP und der AGTR1 C-Variante. Die Abb. 5.2 zeigt die berechneten Werte der minimalen freien Energie (mfe, ΔG) aller Kombinationen aus Ziel-RNA und miRNA.

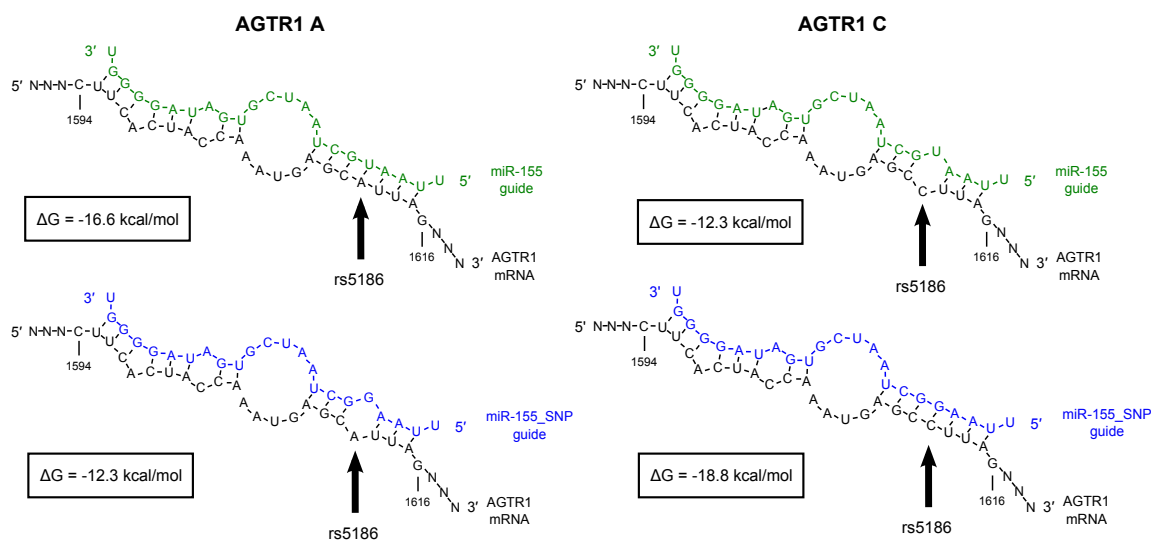


Abbildung 5.2: Lokale Bindungsenergien zwischen AGTR1 rs5186- und miR-155-Varianten. Spaltenweise Darstellung der Ergebnisse für die AGTR1-Varianten (A links, C rechts) und zeilenweise die Unterteilung nach den miR-155-Varianten (oben: miR-155, unten: miR-155_SNP).

Vergleicht man die Bindungsenergien der AGTR1 A-miR-155- und AGTR1 C-miR-155_SNP-Interaktionen, so weist letztere eine größere thermodynamische Stabilität auf (-18,8 kcal/mol vs. -16,6 kcal/mol). Diese lässt sich durch das Vorliegen eines G-C vs. A-U Basenpaares an der SNP-Position erklären. Der Verlust der *seed* Komplementarität geht für beide miR-155 Bindestellen mit einer Reduktion der Bindungsenergie einher, jedoch unterscheiden sich die berechneten ΔG -Werte der instabileren RNA-RNA-Interaktion nicht (-12,3 kcal/mol).

Diese Analysen verdeutlichen den Einfluss eines *mismatches* zwischen Ziel-mRNA und miRNA auf die thermodynamische Stabilität der RNA-RNA-Wechselwirkung.

5.3.3 Verwendete AGTR1 Reportergen-Konstrukte

Zur Analyse des Einflusses des SNPs rs5186 auf die miR-155-vermittelte Hemmung von AGTR1 wurden zunächst Minimal-Reporterkonstrukte hergestellt (siehe Abb. 5.3). Diese Vorgehensweise wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und zeichnet sich durch ihre einfache Handhabung aus. Es werden dafür kurze DNA-Oligonukleotide synthetisiert, die neben der Sequenz der jeweiligen miRNA Bindestelle noch Restriktions-Schnittstellen zur gerichteten Klonierung an ihren Enden enthalten (der Generierung der notwendigen Oligonukleotide und Primer wurde die *NCBI* Referenz-Sequenz NM_031850.2³ zugrunde gelegt). Zur einfachen Überprüfung positiver Klone wurde zudem eine *BlnI* Schnittstelle eingefügt. Nach einer Hybridisierung von sense und antisense Oligonukleotid erfolgt die Ligation in den gewünschten Reporter-Gen-Vektor.

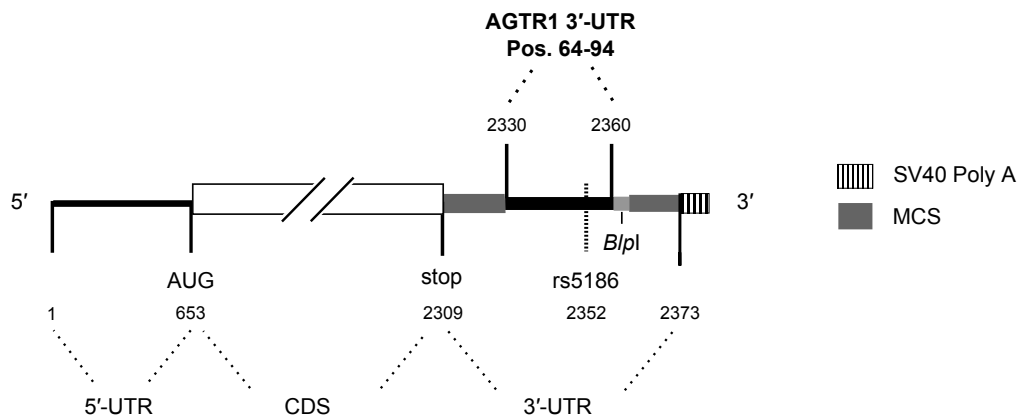


Abbildung 5.3: AGTR1 Luciferase-Reporter-Transkript der AGTR1 miR-155 Bindestelle. Die Sequenzen der AGTR1 A bzw. AGTR1 C miR-155 Bindestelle wurden in die MCS des pMIR-REPORT Vektors kloniert. Im Ergebnis dessen entstand die AGTR1 A- bzw. C-Variante des schematisch dargestellten Luciferase-Reporter-Transkripts.

Die im folgenden Abschnitt erläuterten Ergebnisse führten dazu, dass im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls Reporter-Plasmide mit der gesamten AGTR1 3'-UTR-Sequenz generiert wurden. Die so entstandenen Reporter-Transkripte sind in der Abb. 5.4 dargestellt.

³http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_031850.2

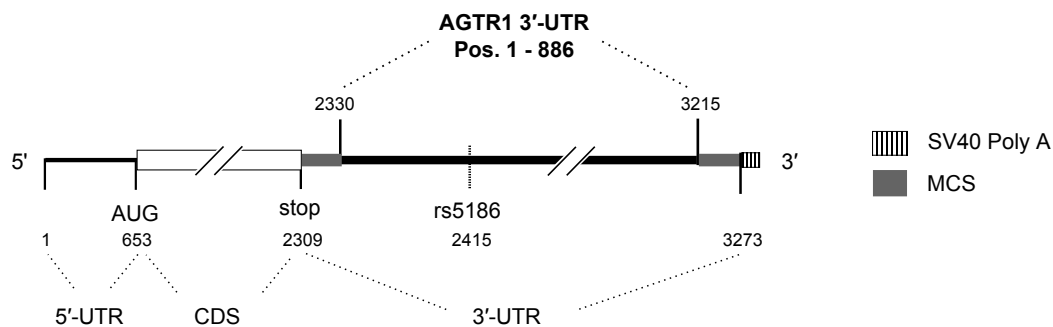


Abbildung 5.4: AGTR1 Luciferase-Reporter-Transkript der gesamten AGTR1 3'-UTR. Die 3'-UTR Sequenz wurde in die MCS des pMIR-REPORT Vektors kloniert. Im Ergebnis entstanden die Varianten A bzw. C des AGTR1 3'-UTRs des schematisch dargestellten Luciferase-Reporter-Transkripts.

5.3.4 Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die miRNA-vermittelte Regulation von AGTR1

Zur weiteren Analyse des Einflusses des SNPs innerhalb der in der AGTR1 3'-UTR gelegenen miR-155 Bindestelle auf die miRNA-vermittelte Regulation von AGTR1 wurden Zellkulturversuche mit HeLa-Zellen durchgeführt. Diese exprimieren miR-155 nicht (<http://www.microna.org>). Eine Beeinflussung der Reporter-Expression durch endogene miR-155 wird dadurch ausgeschlossen. Zunächst erfolgte die Ko-Transfektion der AGTR1 Reporter-Plasmide (kurz A und C bzw. 3'-UTR A und C) mit der pre-miR-155, einem chemisch modifizierten, partiellen Doppelstrang, dessen Sequenz und Modifikationen vom Hersteller *Ambion* nicht angegeben werden.

Zunächst wurden Untersuchungen mit den kurzen AGTR1 Reporter-Konstrukten durchgeführt. Dabei wurde für die kurzen AGTR1-Varianten eine annähernd vergleichbare Hemmung der relativen firefly Luciferase-Aktivität beobachtet (siehe Abb. 5.5, 81 vs. 83 % Restaktivität). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu bereits publizierten Daten von Martin *et al.* und Sethupathy *et al.* [146, 147], die eine differentielle Regulation der AGTR1-Varianten durch die pre-miR-155 aufzeigten. Jedoch kamen in den beiden vorgenannten Studien anstatt Minimal-Reportern Reporter-Konstrukte, die die gesamte AGTR1 3'-UTR Sequenz enthielten, zum Einsatz. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ko-Transfektionen von AGTR1 3'-UTR Reportern mit der pre-miR-155 sind im rechten Teil der Abb. 5.5 dargestellt. Diese weisen untereinander eine deutlich differenzierte pre-miR-155 vermittelte Regulation auf (72 vs. 110 % relative Luciferase-Aktivität).

Die Ergebnisse im Hinblick auf die langen AGTR1-Reporter korrespondieren mit den bereits publizierten Daten von [146, 147]. Eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse des kurzen und langen AGTR1 A-Reporters zeigt jedoch, dass die Hemmung beider differenziert ausfällt (81 vs. 72 % relative firefly Luciferase-Aktivität). Der Vergleich zwischen langem und kurzem AGTR1 C Reporter weist ebenfalls eine deutliche Differenz der Reporteraktivität auf.

Während die AGTR1 3'-UTR C-Variante faktisch keine Hemmung der Reporteraktivität durch die pre-miR-155 zeigt, steht die Restaktivität der kurzen AGTR1 C-Variante bei 83 %.

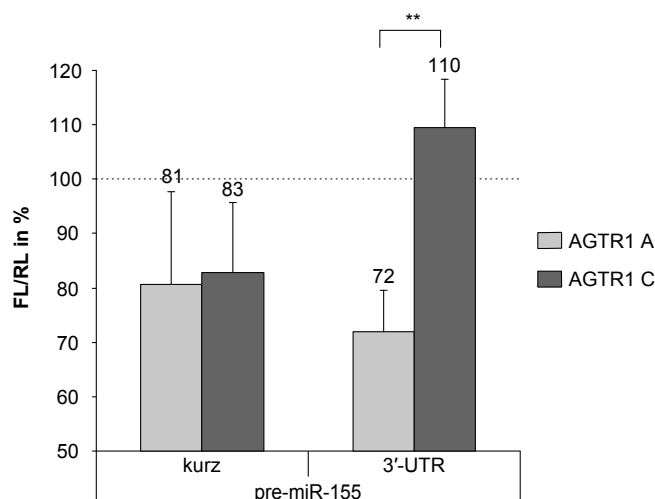


Abbildung 5.5: Hemmung der kurzen und langen AGTR1-Reporter durch pre-miR-155. HeLa Zellen wurden im 24 well Format mit je 100 ng AGTR1 Reporterplasmid (pMIR-Luci AGTR1 kurz A bzw. C oder pMIR-Luci AGTR1 3'-UTR A bzw. C), 10 ng pRL-CMV-Plasmid und 0-150 nM pre-miR-155⁴ ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und anschließend die Luciferase-Aktivität gemessen. Die relativen firefly Luciferase-Aktivitäten (FL/RL) wurden auf Ansätze ohne pre-miRNA (nur Plasmid-DNA) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten. ** $p \leq 0.001$

Im Hinblick auf die differenzierten Ergebnisse für die kurzen und langen Reporter ist zu berücksichtigen, dass die Reporter-Konstrukte große Unterschiede bezüglich der Länge des authentischen AGTR1 3'-UTR Sequenzabschnittes aufweisen. Es ist denkbar, dass sich lange Bereiche einer 3'-UTR Sequenz innerhalb rekombinanter Konstrukte ähnlich zur authentischen mRNA falten. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Ähnlichkeit wird durch Einfügen kurzer Sequenzabschnitte verringert. Das bedeutet, dass die lokale Sekundärstruktur der miR-155 Bindestelle der kurzen Reporter-Transkripte stärker durch die firefly Luciferase mRNA Sequenz beeinflusst sein könnte, und sich die miR-155 Bindestellen der langen Reporter-Transkripte mit größerer Ähnlichkeit zur authentischen *AGTR1* mRNA falten könnten. Das Vorliegen unterschiedlicher struktureller Kontexte kann des Weiteren zu Unterschieden in der Zugänglichkeit der miR-155 Bindestelle führen. Zur Untersuchung des Einflusses der Länge der authentischen Sequenz auf die miRNA-Regulation wurden daher die kurzen und langen Reporter in weiteren Transfektions-Experimenten parallel analysiert.

Das Einbringen von chemischen Modifikationen in RNA-Oligonukleotide dient zur Erhöhung der Stabilität des synthetisch hergestellten miRNA-Doppelstranges und zur Verstär-

⁴Da nicht bei allen Experimenten eine Konzentrations-abhängige Hemmung zu beobachten war, ergeben sich die Mittelwerte aus der jeweils stärksten Hemmung der relativen Luciferase-Aktivität und somit aus unterschiedlichen Konzentrationen an pre-miR-155.

kung der Bindung zwischen miRNA und Ziel-RNA. Diese Veränderungen können aber dazu führen, dass bei gleicher Zugänglichkeit der miRNA Bindestellen ein *mismatch* im *seed* Bereich keinen messbaren Einfluss auf die Bindung zur SNP-Variante hat. Dieser Zusammenhang stellt einen möglichen Erklärungsansatz für die ähnliche pre-miR-155-vermittelte Repression beider kurzer AGTR1 Transkripte dar.

Ergänzend zur pre-miR-155 kamen zwei weitere miRNA-Tools mit bekannter Sequenz und ohne chemische Modifikationen zur Anwendung (miR-155 und miR-155_SNP). Die Komplementaritäten deren *guide* Stränge mit den AGTR1-Varianten sind der Abb. 5.2 dargestellt. Die miR-155 ist durch eine Basenpaarung mit der AGTR1 A Variante an Position 5 ausgehend vom 5'-Ende der miRNA gekennzeichnet. Das AGTR1 C weist jedoch an dieser Position einen C-U *mismatch* auf. Durch Einführung eines U>G Basenaustausches innerhalb des miR-155 *guide* Stranges an der Position 5 wird die miR-155_SNP generiert. Diese bildet einen C-G *match* mit der AGTR1 C-Variante zugleich aber einen A-G *mismatch* mit der AGTR1 A-Variante.

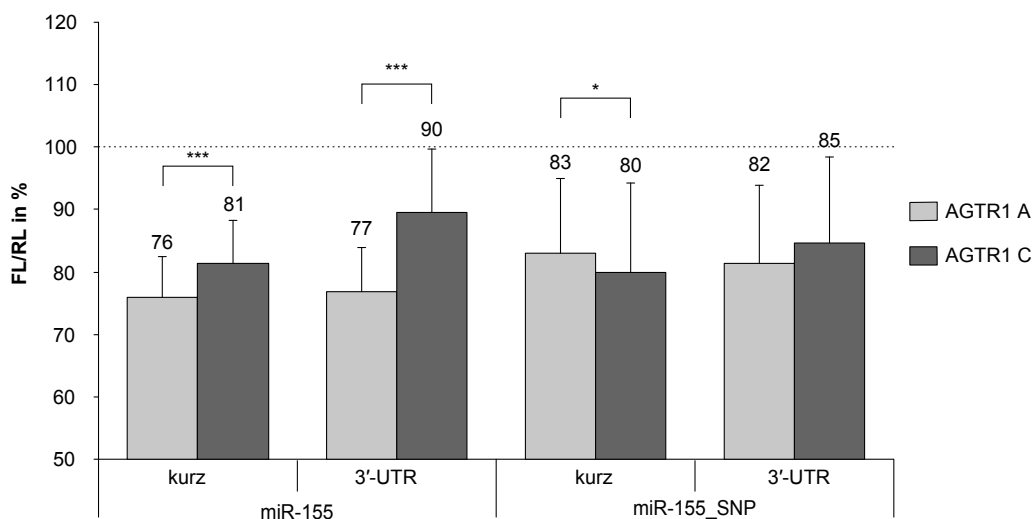


Abbildung 5.6: Hemmung der kurzen und langen AGTR1-Reporter durch die miR-155-Varianten. HeLa-Zellen wurden im 24- (bzw. 96-) well Format mit je 100 (25) ng AGTR1 Reporterplasmid (pMIR-Luci AGTR1 kurz A bzw. C oder pMIR-Luci AGTR1 3'-UTR A bzw. C) 1 (0,25) ng pRL-CMV Plasmid-DNA und 0-150 nM⁵ miR-155 oder miR-155_SNP ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und anschließend die Luciferase-Aktivität gemessen. Die relativen firefly Luciferase-Aktivitäten (FL/RL) wurden auf Ansätze ohne miRNA (nur Plasmid-DNA) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte um Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten. * p<0.05, *** p<0.0001

Die Abb. 5.6 zeigt die Ergebnisse der Transfektionen aller AGTR1 Reporter-miRNA-Kombinationen. Für beide Längen des AGTR1 A-Reporters führt die Ko-Transfektion der miR-155

⁵Da nicht bei allen Experimenten eine Konzentrations-abhängige Hemmung zu beobachten war, ergeben sich die Mittelwerte aus der jeweils stärksten Hemmung der relativen Luciferase-Aktivität und somit aus unterschiedlichen Konzentrationen an miRNA.

zu einer Repression der relativen Luciferase-Aktivität um ca. 25 %. Während das kurze AGTR1 C Reporter-Transkript zu einer etwa 20 %-igen Hemmung führt, zeigt die AGTR1 3'-UTR C-Variante nur eine schwache miR-155-vermittelte Repression (ca. 10 %). Somit ist die Aktivitätsdifferenz zwischen den beiden AGTR1-Varianten deutlicher ausgeprägt, wenn Reporter-Transkripte verwendet werden, die einen längeren AGTR1 Sequenzabschnitt enthalten ($\Delta_{\text{kurz}} = 5,5\%$ vs. $\Delta_{\text{lang}} = 12,8\%$).

Die miR-155_SNP kompensiert den zwischen der AGTR1 C-Variante und der miR-155 auftretenden C-U *mismatch* durch Einfügen eines U>G Austausches innerhalb des miRNA *guide* Stranges. Unter Verwendung der kurzen AGTR1-Reporter führt die miR-155_SNP dazu, dass nunmehr die AGTR1 C-Variante geringfügig stärker gehemmt wird. Diese Beobachtung konnte für die 3'-UTR Reporter nicht gemacht werden, denn auch die lange AGTR1 C-Variante wird minimal besser von der miR-155_SNP reprimiert.

Die vorstehend erläuterten Daten lassen den Schluss zu, dass neben der Thermodynamik der miRNA-Ziel-RNA Interaktion auch der lokale Sekundärstrukturkontext der miRNA Bindestelle eine wesentliche Rolle für die miR-155-vermittelte Regulation von AGTR1 spielt.

5.3.5 Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die siRNA-vermittelte Regulation von AGTR1

Als miRNA-analoge Wirkstoffe wurden zusätzlich sequenzhomologe siRNAs zur Untersuchung der RNAi-vermittelten Hemmung von AGTR1 eingesetzt. Konsistente Beobachtungen dieser Analysen zu den miRNA-Ergebnissen könnten das Modell des strukturellen, SNP-korrelierten Einflusses unterstützen. Die dazu verwendeten siRNAs sind komplementär zu der AGTR1 miR-155 Bindestelle. Die Abb. 5.7 zeigt eine Übersicht der Komplementaritäten zwischen den AGTR1-Varianten und den verwendeten siRNAs.

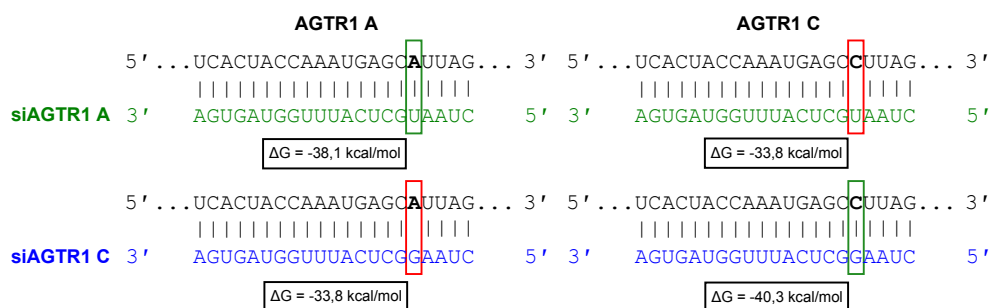


Abbildung 5.7: Komplementaritäten und Bindungsenergien der AGTR1-Varianten mit siAGTR1 A und siAGTR1 C. Die siAGTR1 C ist dadurch gekennzeichnet, dass sie 100 %-ig komplementär zur AGTR1-Variante A ist, während die AGTR1 C-Variante an Position 5 ausgehend vom 5'-Ende der siRNA ein C-U *mismatch* aufweist. Durch Einführung eines U>G Basenaustausches in dem siAGTR1 A *guide* Strang an der Position 5 wird die siAGTR1 C generiert. Diese ist vollständig komplementär zur AGTR1 C-Variante, weist jedoch einen A-G *mismatch* mit der AGTR1 A-Variante auf. Die angegebenen Bindungsenergien wurden mittels RNAHybrid bestimmt.

5 Ergebnisse

Die kurzen bzw. langen AGTR1-Reporter wurden mit steigenden Mengen an siRNA (0,1, 1 und 10 nM) ko-transfiziert. Es konnte für alle Kombinationen eine konzentrationsabhängige Repression der Reporter-Aktivität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Abb. 5.8 zeigt die Ergebnisse der Ko-Transfektion jedes AGTR1 Reporters mit 10 nM der entsprechenden siRNAs.

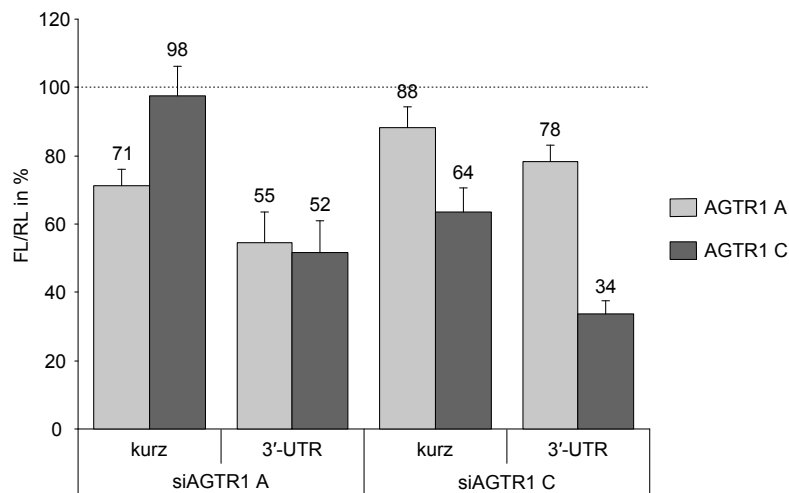


Abbildung 5.8: Unterschiedliche siRNA-vermittelte Hemmung der kurzen und langen AGTR1-Reporter. HeLa-Zellen wurden im 24-well Format mit je 100 ng AGTR1 Reporterplasmid (pMIR-Luci AGTR1 kurz A bzw. C oder pMIR-Luci AGTR1 3'-UTR A bzw. C), 1 ng pRL-CMV-Plasmid und 10 nM siAGTR1 A bzw. C ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und anschließend die Luciferase-Aktivität gemessen. Die relativen firefly Luciferase-Aktivitäten (FL/RL) wurden auf Ansätze ohne siRNA (nur Plasmid-DNA) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Es sind deutliche Unterschiede zwischen der siRNA-vermittelten Hemmung der kurzen (nur miR-155 Bindestelle) und langen (gesamte 3'-UTR) Reporter zu verzeichnen. Im Ergebnis einer vergleichenden Analyse werden die langen AGTR1-Reporter grundsätzlich besser durch die jeweils verwendeten siRNAs gehemmt (kurz A vs. 3'-UTR A bzw. kurz C vs. 3'-UTR C).

Die Versuche mit den kurzen Reportern zeigen, dass die passende siRNA, also siAGTR1 A zu AGTR1 A und siAGTR1 C zu AGTR1 C, eine ausgeprägtere Repression aufweisen als im Falle des Vorhandenseins eines *mismatches* zwischen Ziel-RNA und siRNA (siAGTR1 C-AGTR1 A und siAGTR1 A-AGTR1 C). AGTR1 A toleriert den *mismatch* zur siAGTR1 C besser als AGTR1 C einen solchen zur siAGTR1 A (88 vs. 98 % Reporteraktivität), jedoch ist die Hemmung des AGTR1 C durch die vollständig komplementäre siRNA effektiver (64 vs. 71 % Luciferase-Aktivität). Die Repression der beiden langen Reporter durch siAGTR1 A ist in etwa vergleichbar (55 und 52 % Restaktivität), wohingegen die siAGTR1 C den langen AGTR1 C Reporter selektiv stärker hemmt (78 vs. 34 %). Weiterhin kann bilanziert werden, dass die AGTR1 3'-UTR C-Variante von beiden siRNAs effizienter gehemmt wird, denn

trotz des *mismatches* zur siAGTR1 A ist die Hemmung annähernd vergleichbar ausgeprägt. Im Falle des AGTR1 3'-UTR A-Reporters bewirkt der *mismatch* zur siAGTR1 C eine deutliche Verringerung der siRNA-vermittelten Repression gegenüber der 100 % komplementären siAGTR1 A (55 vs. 78 %).

Die unterschiedlichen Repressions-Niveaus können nicht mit den Bindungsenergien zwischen Ziel-RNA und siRNA (siehe Abb. 5.7) erklärt werden. Ferner kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass die siAGTR1 Erkennungsstelle (= identisch zur Lage der miR-155 Bindestelle) der AGTR1 C-Variante zugänglicher für siRNAs ist.

Die diskutierten Unterschiede zwischen den kurzen und langen Konstrukten zeigen, dass die lokale Sekundärstruktur auch für die siRNA-vermittelte Hemmung von AGTR1 eine bedeutende Rolle spielt, und in diesem Fall die längere, authentischere AGTR1 3'-UTR Sequenz zu einer gesteigerten Repression führt. Somit unterstützen diese Daten die Hypothese, dass der SNP mit einer relevanten Änderung der Sekundärstruktur der *AGTR1* mRNA korreliert sein kann, und dies zu Unterschieden in der miRNA- und siRNA-vermittelten Regulation der beiden AGTR1-Varianten beiträgt.

5.3.6 Sekundärstrukturvorhersage

Die Untersuchungen zur miRNA- und siRNA-vermittelten Hemmung der kurzen und langen AGTR1 Reporter-Konstrukte zeigen Unterschiede auf, die auf eine regulatorische Bedeutung der AGTR1 Sekundärstruktur schließen lassen. Daher wurde eine systematische Vorhersage der allelischen AGTR1 Sekundärstrukturen mittels mfold durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.1). Es wurden Strukturen aus 400, 800 oder 1400 nt langen AGTR1 Sequenzabschnitten berechnet und insgesamt 200 Strukturen ausgewertet (siehe Tab. 5.3).

Tabelle 5.3: Ergebnisse der AGTR1 Sekundärstrukturvorhersage.

SNP-Position	AGTR1 A	AGTR1 C
gepaart	195	0
ungepaart	5	200
Summe analysierter Strukturen	200	200
Strukturkontext des SNP		
Stem	195	0
Loop	5	163
Bulge	0	37

In 97,5 % der 200 für die AGTR1 rs5186 A-Variante analysierten Strukturen lag das Adenin an der SNP-Position (1612) gepaart vor. Dem gegenüber konnte in keiner der für die AGTR1

rs5186 C-Variante vorhergesagten Strukturen eine Basenpaarung an der SNP-Position beobachtet werden. In 81,5 % der C Strukturen wurde die SNP-Position in einem wie in der Abb. 5.9 veranschaulichten Loop lokalisiert. In den verbleibenden C Strukturen konnte die SNP-Position in einem Bulge lokalisiert werden. Die Positionierung innerhalb eines Loops wurde nur für 2,5 % der AGTR1 A Strukturen und diese nur unter Verwendung einer Fenstergröße von ausschließlich 400 vorhergesagt. Der Betrag der vorhergesagten freien Energie aller untersuchten Strukturen fiel für die A Variante geringer aus ($\Delta\Delta G = 0,5 - 3,5$ kcal/mol). Dies lässt vermuten, dass das AGTR1 A Transkript im gefalteten Zustand eine energetisch stabilere Konformation einnimmt.

Die Abb. 5.9 zeigt beispielhaft für die AGTR1 rs5186 Varianten A und C einen Ausschnitt der vorhergesagten Sekundärstrukturen von mRNA Position 1525 bis 1800. Beide weisen global ähnliche Strukturen zwischen den Positionen 1525-1597 und 1754-1800 auf. Dennoch werden lokale Unterschiede zwischen den AGTR1 A und AGTR1 C Strukturen deutlich. Die SNP-Position der AGTR1 A Variante ist in einer intramolekularen Doppel-Helix lokalisiert, die der C-Variante dagegen wurde in einem kleinen Hairpin-Loop vorhergesagt.

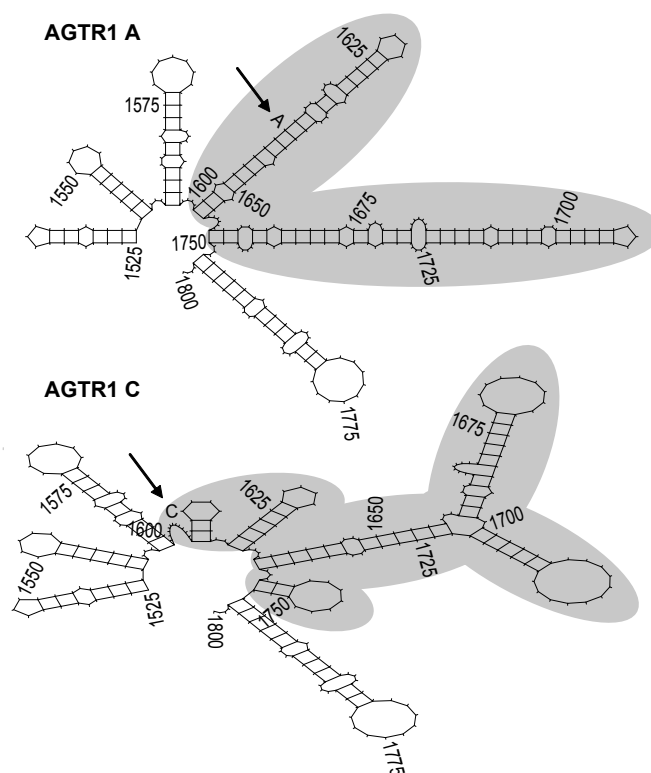


Abbildung 5.9: Die AGTR1 Strukturvorhersage weist auf Unterschiede zwischen den SNP-Varianten hin. Für die beiden rs5186 AGTR1-Varianten wurde mittels mfold die Sekundärstruktur vorhergesagt. Die Grafik zeigt beispielhaft die Strukturvorhersage der AGTR1 A (oben) und AGTR1 C (unten) mRNA von Position 1525-1800. Die SNP-Position ist durch Pfeile markiert. Es zeigen sich global ähnliche Strukturen jedoch lokale Unterschiede in der SNP-Region (grau hinterlegt).

5.3.7 RNA-Strukturprobing

Die bei der theoretischen mfold-Analyse beobachtete SNP-korrelierte Änderung der AGTR1 Sekundärstruktur wurde mittels Strukturprobing-Experimenten weiterführend untersucht (siehe 4.2.15). Dazu wurden AGTR1 3'-UTR A und C *in vitro* Transkripte hergestellt und enzymatisch mit RNase T1 und chemisch mit Pb^{2+} hydrolysiert und die Spaltprodukte durch Primer-Extension (siehe 4.1.3) sowie anschließende gelelektrophoretische Auftrennung (siehe 4.2.2) analysiert. Die Ergebnisse sind in folgender Abb. 5.10 dargestellt.

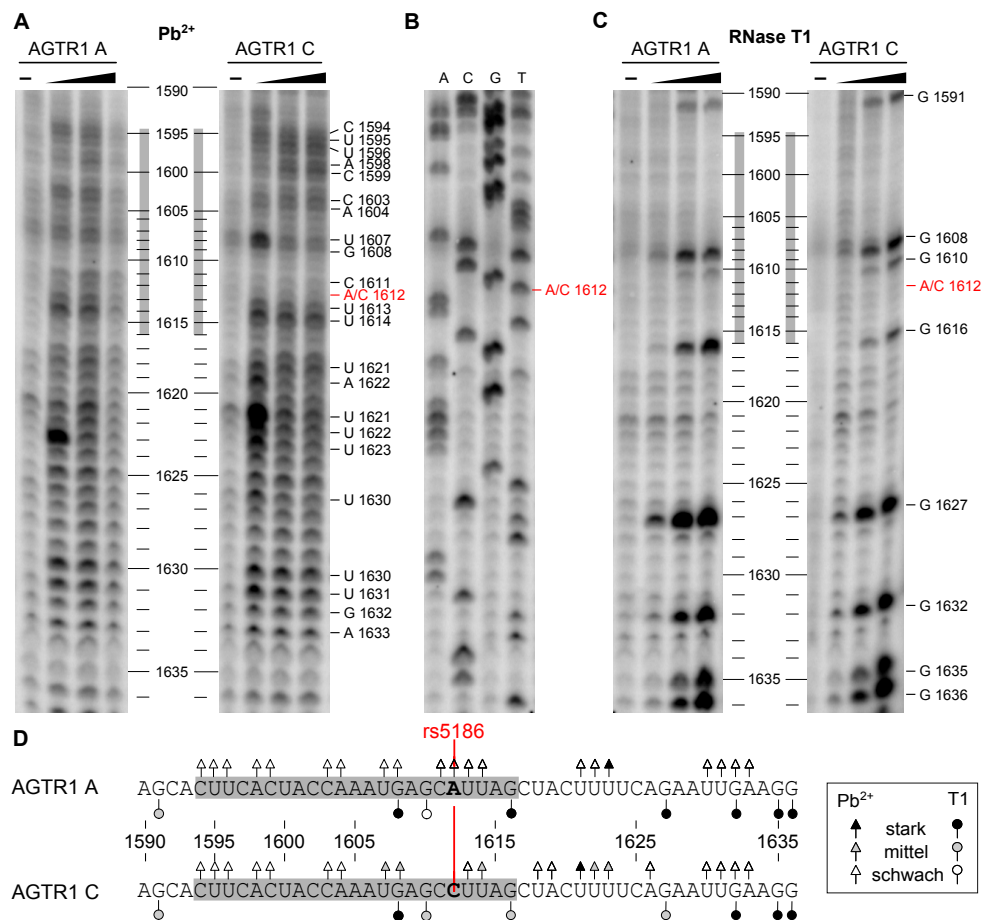


Abbildung 5.10: Strukturprobing der AGTR1 *in vitro* Transkript-Varianten zeigt unterschiedliche Spaltmuster. Die AGTR1 3'-UTR *in vitro* Transkripte A bzw. C wurden durch Pb^{2+} oder RNase T1 hydrolysiert und die Spaltprodukte durch Primer-Extension und denaturierende PAGE und Phosphorimaging detektiert. In (A) sind die Ergebnisse des Pb^{2+} , in (B) die der Sequenzier-Reaktion des A *in vitro* Transkripts und in (C) die der RNase T1-Hydrolyse gezeigt. Die SNP-Position ist durch „A/C 1612“ gekennzeichnet und die Lokalisation der miR-155 Bindestelle durch graue Balken angedeutet. In (D) sind die AGTR1 RNA-Sequenzen mit den beobachteten Spaltstellen annotiert. Oberhalb der jeweiligen Sequenz sind die Pb^{2+} -Spaltstellen (Dreiecke) und unterhalb der Sequenz die RNase T1-Spaltstellen (Kreise) gezeigt. Die Stärke der Hydrolyse ist durch die Farbtiefe der entsprechenden Symbole angedeutet (weiß = schwach, grau = mittel und schwarz = stark). Die SNP-Position ist fett dargestellt und durch rs5186 gekennzeichnet. Die miR-155 Bindestelle ist grau hinterlegt.

Der Gelausschnitt spiegelt die Spaltprodukte für die mRNA Positionen 1590-1635 wider. Im Teil A der Abbildung sind die Pb^{2+} -, im Teil C die RNase T1 -Spaltprodukte dargestellt. Zur Orientierung ist im Abbildungsteil B die Sequenzier-Reaktion des AGTR1 A *in vitro* Transkripts gezeigt. Ein Vergleich der Spaltprodukte beider AGTR1 *in vitro* Transkript-Varianten (in linearer Form im Abbildungsteil D gezeigt) weist auf unterschiedliche Spaltprodukte in der unmittelbaren Umgebung des SNPs hin. Das Pb^{2+} -Spaltpattern zeigt deutliche Unterschiede an den Positionen 1607/08 und 1621-1623. Die Position 1623 der A im Vergleich zur C-Variante wird zunächst stärker hydrolysiert. Dann jedoch verringert sich mit steigender Pb^{2+} -Konzentration die Signalstärke sichtbar schneller. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die lokale Struktur der A Variante an der Position 1623 zugänglicher, das initiale Spaltprodukt hingegen mit zunehmender Pb^{2+} -Menge schneller einer weiteren Hydrolyse ausgesetzt ist. Diese konzentrationsabhängige Abnahme ist auch für das Spaltprodukt an der Position 1614 detektierbar. Darüber hinaus weist das AGTR1 C Transkript mehr Hydrolyseprodukte und zusätzliche Spaltstellen auf, z.B. durch RNase T1 an der Position 1610 und durch Pb^{2+} an den Positionen 1614-1622. Im Gegensatz dazu tritt für das A Transkript eine Pb^{2+} -bedingte Hydrolyse häufiger an der Position 1623 und eine RNase T1-bedingte Spaltung an den Positionen 1616 und 1627 auf.

5.3.8 Kinetik der Bindung von miRNAs an AGTR1 RNA *in vitro* Transkripte

Zur weiteren Analyse der AGTR1-miR-155-Interaktion wurde die Kinetik der RNA-Wechselwirkungen untersucht. Dazu wurden sogenannte Annealing-Versuche durchgeführt (siehe 4.2.16). Dabei wurden AGTR1 *in vitro* Transkripte und ^{32}P -markierte miR-155 bzw. miR-155_SNP *guide* Stränge auf Komplexbildung hin analysiert. Zum Einlaufen in das Gel sind die AGTR1 *in vitro* Transkripte mit einer Länge von etwa 900 Nukleotiden zu groß. Im Falle einer Komplexbildung war daher eine Signal-Detektion in den Auftragstaschen der Gele zu erwarten. Die miRNA *guide* Stränge bildeten jedoch bereits untereinander schwache Komplexe in den Taschen der Gele (= Negativkontrolle ohne *in vitro* Transkript), der sich durch Zugabe von *in vitro* Transkript nicht verstärkte. Es wurde zunächst davon ausgegangen, dass die hohe Anzahl von Guaninen am 3'-Ende des miR-155 *guide* Stranges ursächlich für die detektierten miRNA-miRNA Komplexe sind und dieser Sachverhalt zugleich die Komplexbildung mit dem *in vitro* Transkript inhibiert. Diese Annahme konnte in Versuchen mit miR-155 und miR-155_SNP *guide* Strängen, denen das 3' Ende deletiert wurde (siehe Tab. 3.6), nicht bestätigt werden. Auch die folgenden Änderungen der Versuchsbedingungen ergaben keine detektierbaren Komplexe zwischen miRNA und *in vitro* Transkript: (1) Erhöhung der Reaktions-Temperatur, (2) Testen unterschiedlicher Mg^{2+} -Konzentration (0, 1 bzw. 10 mM Endkonzentration), (3) Erhöhung der *in vitro* Transkript-Menge (von 10- auf 20- bzw. 50-fachen Überschuss), (4) Keine Denaturierung der ^{32}P -markierten *guide* Stränge vor dem Annealen (normal 2 min bei einer Temperatur von 95 °C), (5) Phenol-Chloroform-Extraktion

der ^{32}P -markierten miRNA *guide* Stränge.

Die Tatsache, dass keine Komplexe zwischen AGTR1 und miR-155 zu detektieren waren, kann auf die relativ geringen Bindungsenergien (siehe Abb. 5.2) zwischen den beiden RNAs zurückgeführt werden. Deren Werte ergeben sich aus dem Vorhandensein einer Vielzahl von A-U Basenpaaren sowie G-U Wobble-Basenpaaren innerhalb der RNA-RNA-Wechselwirkung. Im Vergleich zu G-C Basenpaaren bewirken diese aufgrund der thermodynamisch instabileren Bindung eine schwächere Wechselwirkung beider RNAs. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass derartige Komplexe unter Verwendung der angewandten Methodik nicht detektierbar sind.

5.3.9 Kinetik der Bindung von siRNAs an AGTR1 RNA *in vitro* Transkripte

Nachdem eine Detektion der Komplexbildung zwischen den AGTR1 *in vitro* Transkripten und partiell komplementären miR-155 bzw. miR-155_SNP *guide* Strängen mit Hilfe von Annealing-Experimenten nicht möglich war, wurde ein Annealing mit den entsprechenden siRNA *guide* Strängen durchgeführt. Wie in der Abb. 5.7 dargestellt, weisen die siRNAs eine erhöhte Komplementarität zu den AGTR1 *in vitro* Transkripten auf. Die damit einhergehenden deutlich erhöhten Bindungsenergien führen zu einer detektierbaren AGTR1-siRNA Komplexbildung, wie der Teil A der Abb. 5.11 zeigt. Die Quantifizierung der Komplexe ist im Teil B der Abb. 5.11 dargestellt. Diese zeigt eine annähernd identische Geschwindigkeit der Komplexbildung beider *in vitro* Transkripte mit der siAGTR1 A. Dies lässt vermuten, dass der *mismatch* zwischen AGTR1 A und siAGTR1 C die Komplexbildungsrate nicht beeinflusst. Gegensätzlich dazu zeigt sich zu jedem Zeitpunkt der Probeentnahme eine stärkere Komplexbildung der siAGTR1 C mit den AGTR1 3'-UTR C *in vitro* Transkripten. Vergleicht man die Komplexbildung des AGTR1 A *in vitro* Transkripts mit den unterschiedlichen siRNAs, so wird deutlich, dass mit beiden siRNAs nahezu identische Komplexe gebildet werden. Das AGTR1 *in vitro* Transkript C hingegen bindet die beiden siRNAs unterschiedlich stark. Die vollständig komplementäre siAGTR1 C wird im Verhältnis zur siAGTR1 A stärker gebunden.

In der Tab. 5.4 sind die Ratenkonstanten des AGTR1-siRNA-Annealings dargestellt. Die durch vollständige Komplementarität beider RNAs gekennzeichneten Interaktionen weisen jeweils die höheren Werte jedoch auch Unterschiede untereinander auf. Diese können z.B. durch das Vorliegen verschiedener Basenpaare an der SNP-Position erklärt werden (A-U vs. G-C).

Unter Verweis auf die siRNA Transfektions-Daten (siehe 5.3.5) wird deutlich, dass die siAGTR1 A die Expression beide AGTR1 3'-UTR Varianten näherungsweise identisch reprimiert. Die siAGTR1 C unterscheidet zwischen den AGTR1-Varianten derart, dass die 100 % komplementäre Ziel-mRNA am stärksten gehemmt wird. Die Ergebnisse der Komplexbildung im Verlauf des Annealing-Versuchs stellen somit eine schlüssige Erklärung der Repression der firefly Luciferase Reporter-Aktivitäten im Transfektions-Experiment dar.

5 Ergebnisse

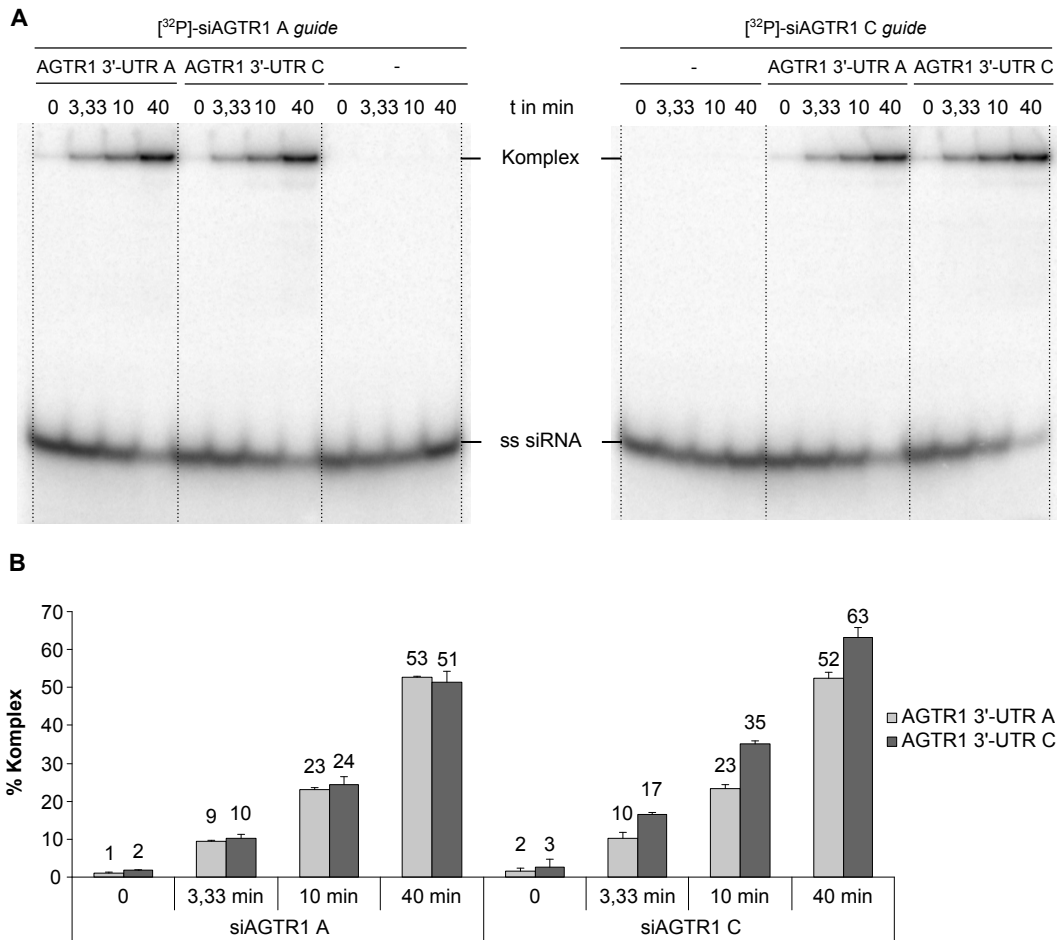


Abbildung 5.11: Komplexbildung aus AGTR1 3'-UTR und siAGTR1. AGTR1 3'-UTR A bzw. C *in vitro* Transkripte (50 nM) wurden mit siAGTR1 A bzw. C *guide* Strang (0,5 nM) ohne CTAB für 0-40 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne *in vitro* Transkripte. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Proben bei 4 °C und 150 V auf einem 8 %-igen nativen PAA-Gel aufgetrennt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

Tabelle 5.4: Ratenkonstanten des AGTR1 siRNA-Annealings.

siRNA	<i>in vitro</i> Transkript	k ($M^{-1}s^{-1}$)
siAGTR1 A	AGTR1 3'-UTR A	$3,9 \cdot 10^4 \pm 1,3 \cdot 10^3$
	AGTR1 3'-UTR C	$3,7 \cdot 10^4 \pm 2,3 \cdot 10^3$
siAGTR1 C	AGTR1 3'-UTR A	$3,7 \cdot 10^4 \pm 1,2 \cdot 10^3$
	AGTR1 3'-UTR C	$4,5 \cdot 10^4 \pm 8,3 \cdot 10^3$

RNase-Schutzexperiment

Zur Überprüfung der Bindungsspezifität der beobachteten RNA-siRNA-Komplexe wurden die AGTR1 *in vitro* Transkripte mit den siAGTR1 *guide* Strängen inkubiert und anschließend mit RNase T1 bzw. RNase A behandelt. Die verwendeten RNasen spalten die RNA nur in einzelsträngigen Bereichen. Da sich in dem Bereich des *in vitro* Transkripts, an den der siAGTR1 *guide* Strang bindet, ein partieller Doppelstrang bildet, ist dieser vor einem RNase Abbau geschützt. Die sich daraus ergebenden RNase-Schnittstellen sind in Abb. 5.12 dargestellt.

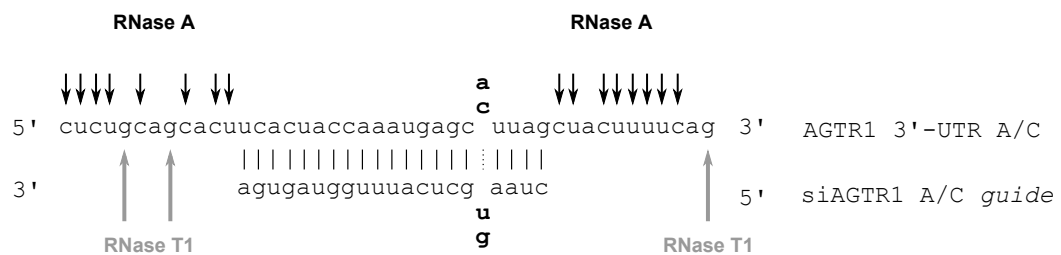


Abbildung 5.12: RNase-Schnittstellen des AGTR1-siRNA-Komplexes. Die RNasen T1 und A spalten die RNA an ungepaarten Bereichen (durch Pfeile angedeutet: RNase T1 an Guaninen, RNase A an Cytosinen und Uracilen), sodass der partieller Doppelstrang aus siRNA und AGTR1 RNA vor Hydrolyse geschützt ist.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in der Abb. 5.13 gezeigt. Wie bereits zuvor erwähnt, ist der Komplex aus *in vitro* Transkript und siRNA *guide* Strang zu groß, um in das PAA-Gel einzulaufen. Daher wurden die Komplexe zunächst in den Auftragstaschen des Gels detektiert (siehe Markierung 'Komplex unverdaut'). Nach einer RNase-Verdauung kann jedoch ein Einlaufen der Komplexe in das Gel beobachten werden. Im Ergebnis der durch RNase T1-Hydrolyse gebildete Komplexe sind im Vergleich zu den RNase A Hydrolyse Produkten geringfügig größer. Die Größe der entstehenden Komplexe spiegelt das in Abb. 5.12 gezeigte RNase-Spaltmuster wider.

Das RNase-Schutzexperiment bestätigt damit die Spezifik der beobachteten Komplexe für die RNA-RNA-Interaktion zwischen dem AGTR1 *in vitro* Transkript und dem siAGTR1 *guide* Strang. Des Weiteren zeigt dieser Versuch, dass ein *mismatch* zwischen dem *guide* Strang und dem *in vitro* Transkript (AGTR1 A mit siAGTR1 C *guide* bzw. AGTR1 C mit siAGTR1 A *guide*) den Schutz des Doppelstranges vor einem RNase-Abbau nicht beeinflusst.

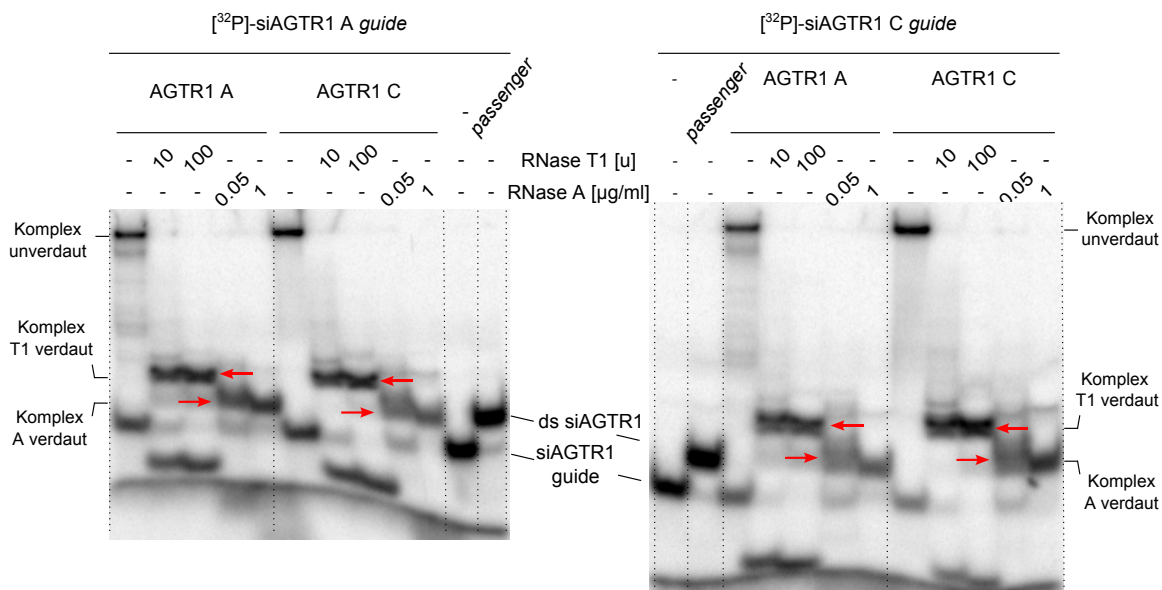


Abbildung 5.13: Komplexe aus AGTR1 3'-UTR und siAGTR1 sind vor RNase-Abbau geschützt. AGTR1 3'-UTR A bzw. C *in vitro* Transkript (50 nM) wurden mit siAGTR1 A bzw. C *guide* Strang (0,5 nM) in 1×Hybridisierungspuffer und ohne CTAB für 40 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit H₂O, RNase T1 (10 und 100 units) oder RNase A (0,05 und 1 µg/ml) für 4 min bei Raumtemperatur hydrolysiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Proben bei 4 °C und 150 V auf einem 8 %-igen nativen PAA-Gel aufgetrennt. Die vor RNase-Abbau geschützten Komplexe sind durch rote Pfeile markiert.

5.3.10 Zusammenfassung und Fazit der AGTR1-Analysen

Als Ausgangspunkt der Etablierung eines Reporter-gen-Assays zur Untersuchung des Einflusses von SNPs in Ziel-mRNAs auf die miRNA-vermittelte Regulation der Genexpression dienten bereits publizierte Daten zur differenzierten miR-155-vermittelten Regulation der AGTR1 rs5186 Varianten. Mit dem Ziel der schnellen Analyse diverser Ziel-mRNA-miRNA-Interaktionen wurde die Sequenz der miRNA Bindestelle der Ziel-mRNA in Form kurzer, synthetischer DNA-Oligonukleotide in den Reporter-Vektor kloniert. Jedoch zeigte sich bereits im Ergebnis erster Analysen, dass sich die pre-miR-155-vermittelte Regulation der beiden kurzen AGTR1-Reporter von der der langen AGTR1-Reporter unterscheidet. Auch in weiteren Analysen mit miR-155 und miR-155_SNP konnten Unterschiede in der Regulation der kurzen und langen Reporter beobachtet werden. Diese Ergebnisse ließen einerseits vermuten, dass das Maß der miR-155-vermittelten Hemmung durch den Sequenzkontext um die miR-155 Bindestelle beeinflusst wird. Zum anderen weisen die Daten auf eine differenzierte Regulation der AGTR1-Varianten infolge von Unterschieden in der Sekundärstruktur hin. Zudem zeigen auch die ergänzend durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung möglicher Auswirkungen des SNPs auf die siRNA-vermittelte Regulation von AGTR1 einen Ein-

fluss der lokalen Sekundärstruktur auf. Die im Anschluss hieran mittels mfold durchgeführte Sekundärstrukturvorhersage bestätigte deutliche Unterschiede zwischen beiden AGTR1-Varianten. Eine SNP-induzierte Veränderung der Sekundärstruktur konnte schließlich durch Strukturprobing-Experimente der AGTR1 3'-UTR A bzw. C *in vitro* Transkripte bestätigt werden.

Fazit

Auf Basis der AGTR1-Analysen lässt sich ein neues Modell der SNP-induzierten Dysregulation der miRNA-Regulation entwickeln. Nicht nur die veränderten Bindungsenergien zwischen Ziel-mRNA und miRNA sondern auch eine strukturelle Änderung der Ziel-mRNA sind dabei an Unterschieden bezüglich der Regulierbarkeit der mRNAs durch miRNAs beteiligt. Im Folgenden soll dieses Modell durch Analysen anderer mRNA-miRNA-Interaktionen untersucht werden.

5.4 Untersuchungen im ESR1-System

5.4.1 Einführung

Viele der humanen Brustkrebsarten sind durch eine Dysregulation der Estrogen Rezeptor 1 (ESR1) Expression gekennzeichnet, und in etwa 70 % aller diagnostizierten primären Brustkrebsarten ist eine Überexpression von ESR1 zu verzeichnen [148]. Der SNP rs9341070 (C/T Polymorphismus) ist innerhalb der ESR1 3'-UTR lokalisiert. Die Positionierung innerhalb einer miR-206 Bindestelle veranlasste Adams *et al.* [148], funktionelle Studien bezüglich der ESR1 Regulation durch die miR-206 durchzuführen. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass miR-206 die ESR1 Expression in ESR1-exprimierenden Brustkrebszelllinien hemmt und zum anderen, dass die rs9341070 U-Variante zu einer gesteigerten miR-206-vermittelten Repression führt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die daraus resultierende verminderte ESR1-Expression die Viabilität und Entwicklung Estrogen-abhängiger Krebszellen inhibiert [148].

Des Weiteren besteht aber auch eine Korrelation zwischen einer verminderten ESR1 Expression und Leberzirrhose bzw. Leberzell-Karzinomen [154, 155]. Der SNP rs9341070 ist zusätzlich innerhalb einer Bindestelle für die miR-122 lokalisiert. Da die miR-122 spezifisch in der Leber exprimiert wird [156, 157], soll im Folgenden untersucht werden, ob die beiden SNP-Varianten differentiell durch die miR-122 reguliert werden.

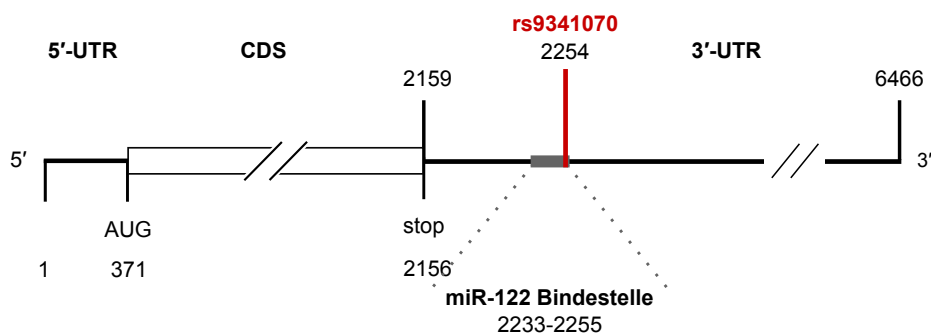


Abbildung 5.14: Lokalisation des SNPs rs9341070 innerhalb der miR-122 Bindestelle in der *ESR1* mRNA. Die *ESR1* mRNA ist schematisch mit ihrer 5'-UTR, CDS und 3'-UTR dargestellt. Der SNP befindet sich an der mRNA Position 2254, die miR-122 Bindestelle umfasst die mRNA Positionen 2233-2255.

5.4.2 Bindungsenergien

Mittels RNAHybrid wurden die Bindungsenergien der ESR1-miR-122-Interaktionen (beider ESR1-Varianten mit beiden miR-122-Varianten) berechnet und in der Abb. 5.15 dargestellt. Die höchste Bindungsenergie zeigt dabei die ESR1 C-miR-122-Interaktion auf ($\Delta G = -20,7$

kcal/mol). Die ESR1 U-Variante weist mit beiden miRNA *guide*-Strängen vergleichbare Energien auf ($\Delta G = -18,7$ bzw. $-18,8$ kcal/mol). Dies ist damit zu erklären, dass sie einen G-U Wobble *mismatch* zur miR-122 bildet. Der *mismatch* zwischen ESR1 C und miR-122_SNP hat den größten Einfluss auf die Bindungsenergie ($\Delta\Delta G = +4$ kcal/mol).

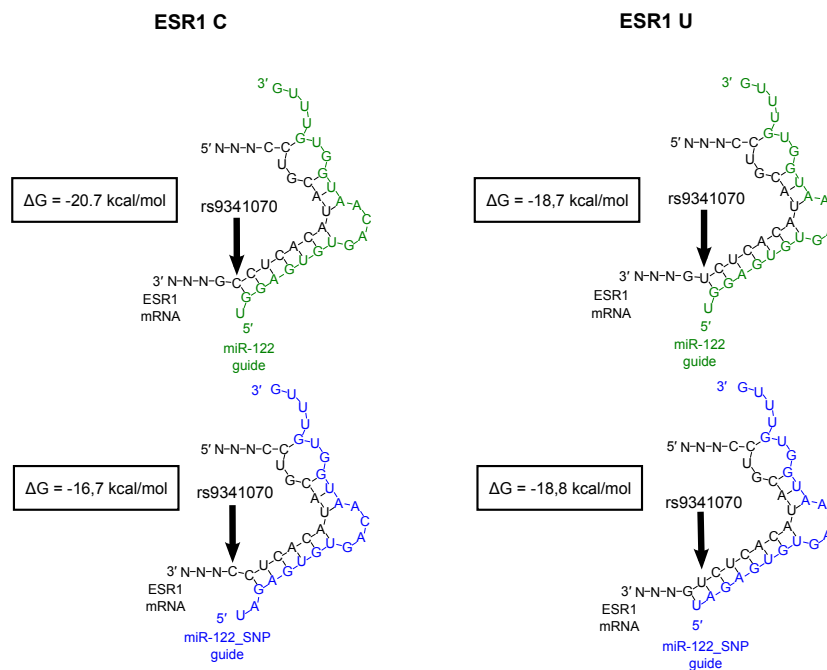


Abbildung 5.15: Lokale Bindungsenergien zwischen ESR1 rs9341070- und miR-122-Varianten. Spaltenweise Darstellung der Ergebnisse für die ESR1-Varianten (C links, U rechts) und zeilenweise die Unterteilung nach den miR-122-Varianten (oben: miR-122, unten: miR-122_SNP).

5.4.3 Verwendete ESR1 Reporter-gen-Konstrukte

Zur Klonierung der ESR1 Reporter-gen-Konstrukte wurden die notwendigen Oligonukleotide und Primer gemäß der NCBI Referenz-Sequenz NM_001122742.1⁶ generiert. Die Analysen im ESR1-System wurden zunächst zeitgleich mit den AGTR1-Analysen durchgeführt. Daher erfolgte in Analogie zur Analyse der AGTR1-miR-155-Interaktion auch für das ESR1-miR-122-System zuerst die Klonierung von Reporter-Konstrukten mit ausschließlich enthaltener miR-122 Bindestelle sowie je vier flankierende Nukleotiden. Aufgrund ihrer Länge von 4300 nt wurde zusätzlich nur ein Ausschnitt der ESR1 3'-UTR (Position 1-1268) kloniert. Die entsprechenden klonierten *ESR1* mRNA-Sequenzabschnitte innerhalb der rekombinanten firefly Luciferase-Transkripte sind in der Abb. 5.16 schematisch gezeigt.

⁶http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001122742.1

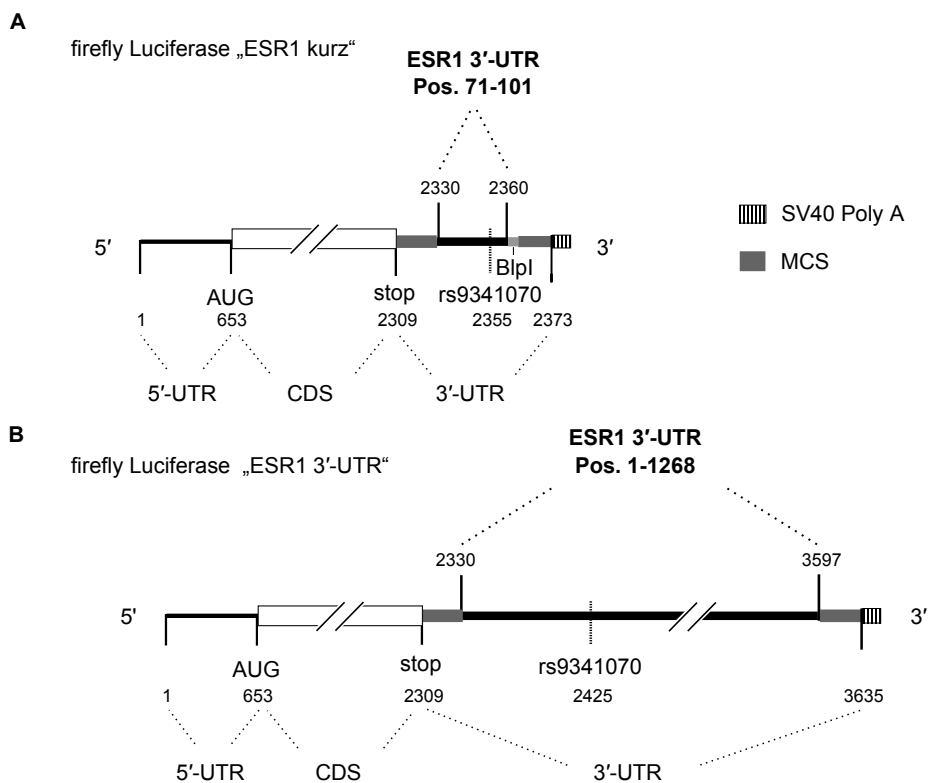


Abbildung 5.16: ESR1 Luciferase-Reportertranskripte. Schematischer Aufbau der Luciferase-Transkripte: in (A) die, die nur die Sequenz der miR-122 Bindestelle aus der ESR1 3'-UTR enthalten und in (B) die, die einen ca. 1300 nt langen Ausschnitt der ESR1 3'-UTR enthalten.

5.4.4 Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die miRNA-vermittelte Regulation von ESR1

Zur Untersuchung des Einflusses des SNPs innerhalb der miR-122 Bindestelle in der ESR1 3'-UTR auf die miRNA-vermittelte Regulation wurden die vier verschiedenen ESR1 Reporter-Plasmide (kurz C bzw. T, 3'-UTR C bzw. T) mit drei verschiedenen miRNA-Tools ko-transfiziert: pre-miR-122, miR-122 und miR-122_SNP. Die Komplementarität der *guide* Stränge beider letztgenannten mit der jeweiligen ESR1-Variante sind in der Abb. 5.15 dargestellt. Die miR-122 ist durch eine an der Position 2 vom 5'-Ende der miRNA und somit im gesamten *seed* Bereich (Position 2-8) bestehenden Komplementarität zur ESR1 C-Variante gekennzeichnet. Die ESR1 U-Variante dagegen weist ein U-G Wobble Basenpaar auf. Durch Einführung eines G>A Basenaustausches an Position 2 des miR-122 *guide* Stranges wird die miR-122_SNP generiert. Diese führt für das ESR1 U-Transkript zu einer vollständigen Komplementarität im gesamten *seed* Bereich jedoch zu einem C-A *mismatch* mit der ESR1 C-Variante. Die pre-miR-122 ist ein chemisch modifizierter, partieller Doppelstrang, dessen Sequenz und Modifikationen vom Hersteller Ambion nicht angegeben sind.

Die Ergebnisse der Ko-Transfektion aller Kombinationen aus ESR1-Reporter und miRNA-Tool sind in der Abb. 5.17 dargestellt. Das Ausmaß der Hemmung der kurzen sowie langen ESR1 Reporter unterscheidet sich kaum. Die *seed* komplementären Kombinationen aus Ziel-mRNA und miRNA zeigen im Vergleich zu den Kombinationen mit einem *mismatch* im *seed* Bereich in allen Fällen eine stärkere Hemmung der relativen Luciferase-Aktivitäten, jedoch unterscheiden sich diese nicht signifikant.

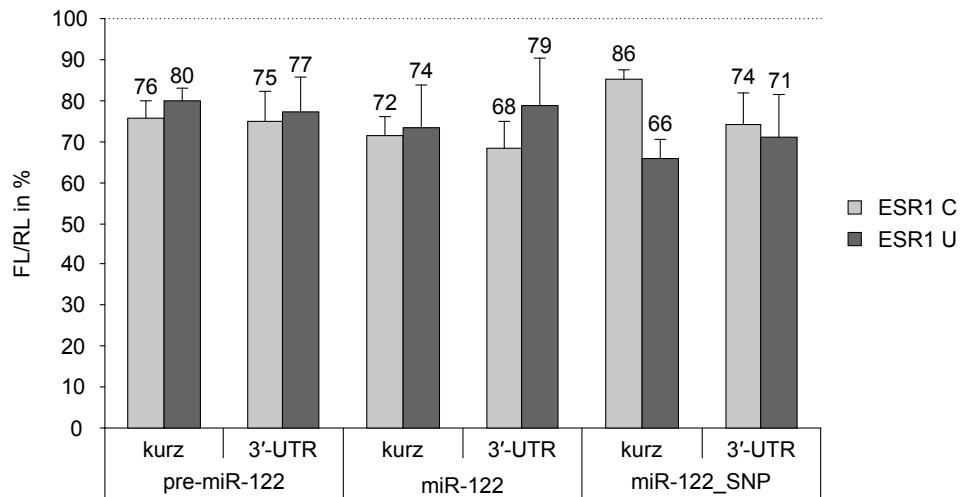


Abbildung 5.17: Hemmung der kurzen und langen ESR1 Reporter durch verschiedene miRNA Tools. HeLa-Zellen wurden im 24 well Format mit je 100 ng ESR1 Reporterplasmid (pMIR-Luci ESR1 kurz C bzw. T oder pMIR-Luci ESR1 3'-UTR C bzw. T) und 0-150⁷nM miR-122, miR-122_SNP bzw. pre-miR-122 ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und anschließend die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Die relativen firefly Luciferase-Aktivitäten (FL/RL) wurden auf Ansätze ohne miRNA (nur Plasmid-DNA) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zu den AGTR1-Daten weisen die ESR1 Transfektions-Ergebnisse nicht darauf hin, dass die Verwendung eines längeren 3'-UTR-Ausschnittes zu einer Veränderung der miRNA-vermittelten Regulation der ESR1-Reporter führt. Die Unterschiede zwischen der Regulation durch miR-122 und miR-122_SNP lassen vermuten, dass diese mRNA-miRNA-Interaktionen eher durch thermodynamische als strukturelle Faktoren beeinflusst werden.

5.4.5 Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die siRNA-vermittelte Regulation von ESR1

Neben der Untersuchung der miRNA-vermittelten Hemmung der Expression der ESR1 Luciferase Reporter-Transkripte wurde des Weiteren untersucht, ob der SNP einen Einfluss auf

⁷Da nicht bei allen Experimenten eine Konzentrations-abhängige Hemmung zu beobachten war, ergeben sich die Mittelwerte aus der jeweils stärksten Hemmung der relativen Luciferase-Aktivität und somit aus unterschiedlichen Konzentrationen an miRNA.

die siRNA-vermittelte Regulation hat. Die dazu verwendeten siRNAs sind durch Komplementarität zur ESR1 miR-122 Bindestelle gekennzeichnet. Die Abb. 5.18 zeigt eine Übersicht der Komplementarität zwischen den ESR1-Varianten und den eingesetzten siRNAs.

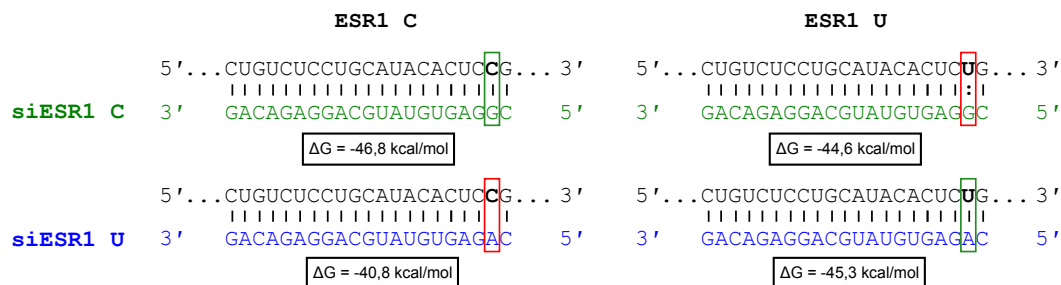


Abbildung 5.18: Komplementarität der ESR1-Varianten mit siESR1 C und siESR1 U. Die siESR1 C ist dadurch gekennzeichnet, dass sie 100 %-ig komplementär zur ESR1-Variante C ist, während die ESR1 U-Variante an Position 2 ausgehend vom 5'-Ende der siRNA ein U-G Wobble Basenpaar aufweist. Durch Einführung eines G>A Basenaustausches in dem siESR1 C *guide* Strang an der Position 2 wird die siESR1 U generiert. Diese ist vollständig komplementär zur ESR1 U-Variante weist jedoch einen C-A *mismatch* mit der ESR1 C-Variante auf.

Die Ergebnisse der Ko-Transfektion von den ESR1-Reportern mit der jeweiligen siRNA sind in der Abb. 5.19 graphisch dargestellt und zeigen, dass die Expression der ESR1-Reporter differentiell siRNA-vermittelt reguliert wird.

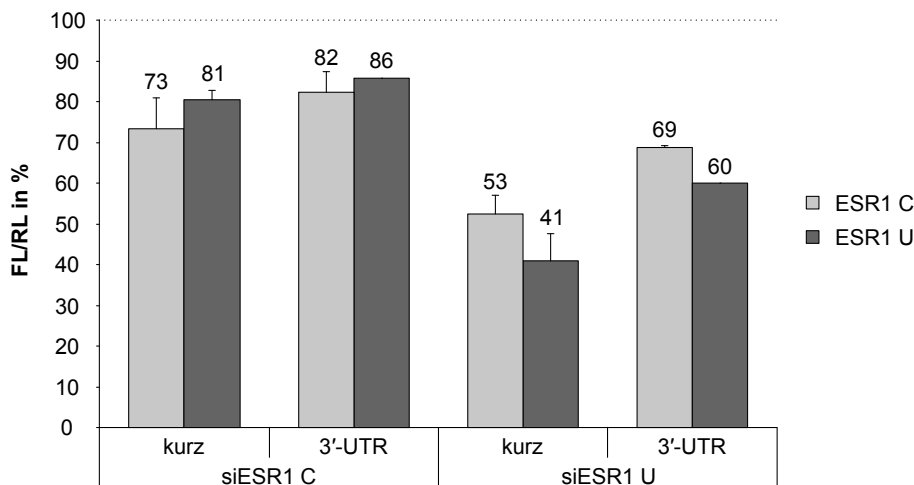


Abbildung 5.19: Unterschiedliche Hemmung der kurzen und langen ESR1-Reporter durch siRNAs. HeLa-Zellen wurden im 24 well Format mit je 100 ng ESR1 Reporter-Plasmid (pMIR-Luci ESR1 kurz C bzw. T oder pMIR-Luci ESR1 3'-UTR C bzw. T) und 10 nM siESR1 C bzw. U ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und anschließend die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Die relativen firefly Luciferase-Aktivitäten (FL/RL) wurden auf Ansätze ohne siRNA (nur Plasmid-DNA) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, für die ESR1 3'-UTR U die Werte aus einem Experiment.

Im Gegensatz zur miRNA-vermittelten Regulation der ESR1-Reporter zeigen diese hinsichtlich der Länge der authentischen ESR1-Sequenz eine differenzierte Regulation durch siRNAs. Eine stärkere siRNA-vermittelte Hemmung weisen dabei die kurzen ESR1-Reporter auf. Jede der vier ESR1-Varianten wird durch die jeweilig vollständig komplementäre siRNA besser gehemmt als durch die siRNA, die einen *mismatch* zur Ziel-RNA aufweist. Die Unterschiede zwischen *match* und *mismatch* sind jedoch für die siESR1 U ausgeprägter. Darüber hinaus wird jedes der vier ESR1-Konstrukte stärker durch die siESR1 U gehemmt.

5.4.6 Sekundärstrukturvorhersage

Für eine vergleichende RNA-Strukturvorhersage der ESR1 rs9341070 C- und U-Variante wurden insgesamt 155 Strukturen aus 400, 800 oder 1400 nt langen ESR1 Sequenzabschnitten mittels mfold berechnet und anschließend ausgewertet. Die Ergebnisse sind in der Tab. 5.5 aufgeführt.

Tabelle 5.5: Ergebnisse der ESR1 RNA Sekundärstrukturvorhersage.

SNP-Position	ESR1 C	ESR1 U
gepaart	11	114
ungepaart	144	41
Summe analysierter Strukturen	155	155
Strukturkontext des SNP		
Stem	11	114
Loop	112	14
Bulge	32	7
Junction	0	20

Die dargestellten Ergebnisse der mfold-Analyse lassen Unterschiede der Sekundärstruktur beider ESR1-Varianten vermuten. Während für die ESR1 C-Variante die SNP-Position vorwiegend in einem ungepaarten Zustand vorliegt (Loop), wurde die Lokalisation dieser innerhalb der ESR1 U-Variante größtenteils gepaart (Stem) detektiert.

Die in der Abb. 5.20 beispielhaft dargestellten Strukturen verdeutlichen jedoch, dass der SNP nur zu minimalen lokalen Unterschieden in der vorhergesagten Sekundärstruktur führt. Der Abb.-Teil A (oben) zeigt jeweils einen globalen Bereich, die Ausschnitte um die miR-122 Bindestelle sind entsprechend im Abb.-Teil B (unten) stark vergrößert dargestellt. Ein Vergleich beider ESR1-Strukturen (siehe Abb.-Teil A) zeigt, dass sich die Unterschiede auf den grau hinterlegten Bereich beschränken. Wie im Abb.-Teil B ersichtlich ist, befindet sich das C in einem ungepaarten Bereich, wohingegen das U gepaart jedoch in einem sehr ähnlichen Strukturkontext vorliegt.

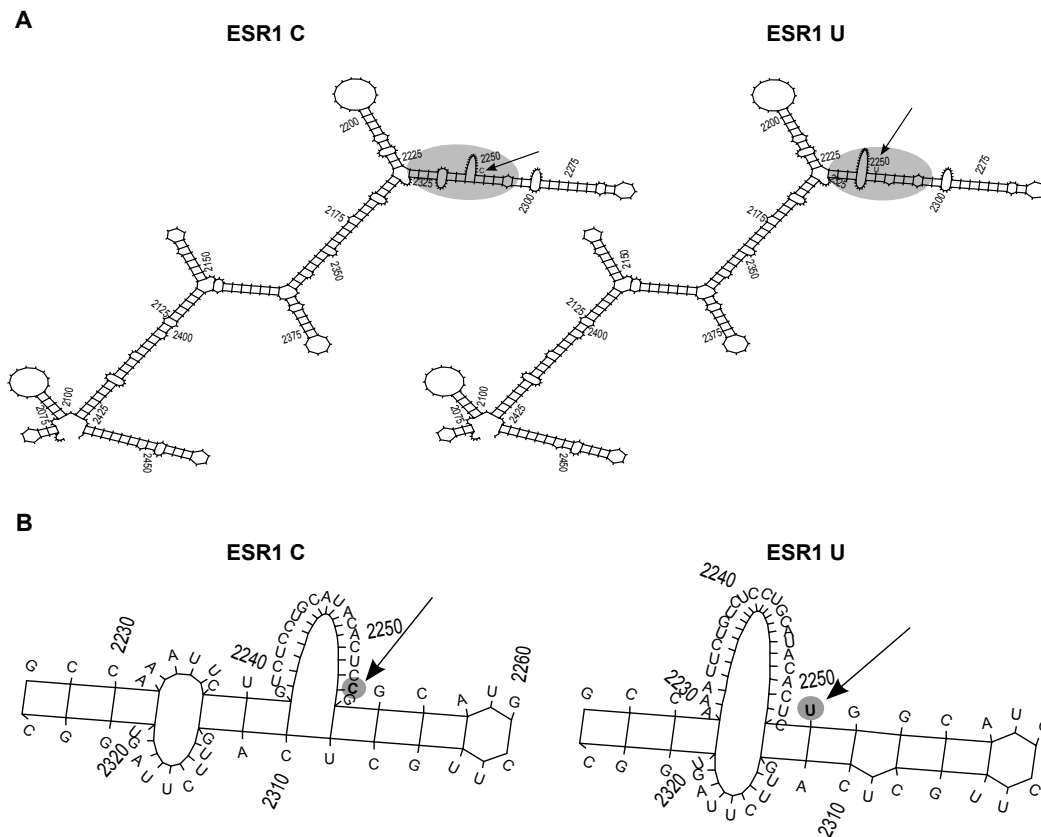


Abbildung 5.20: Minimale Unterschiede in der Strukturvorhersage der ESR1-Varianten. **(A)** zeigt beispielhaft die vorhergesagten Strukturen für ESR1 C (links) und ESR1 U (rechts). Die SNP-Position ist durch Pfeile angedeutet. Die sich unterscheidenden Strukturbereiche sind grau hinterlegt und betreffen ausschließlich die lokale Struktur. Eine entsprechende Detailvergrößerung ist in **(B)** dargestellt. Die SNP-Position ist durch Pfeile angedeutet sowie grau hinterlegt. Während sich das C ungepaart in einem Loop befindet, liegt das U gepaart in unmittelbarer Nähe zu einem Loop vor. Die sich links sowie rechts des SNPs anschließenden Bereiche weisen weitere Unterschiede auf.

5.4.7 RNA-Strukturprobung

Die Durchführung von Strukturprobung-Experimenten (siehe 4.2.15) diente einer vergleichenden RNA-Strukturanalyse der ESR1-Varianten. Dazu wurden ESR1 3'-UTR C und U *in vitro* Transkripte hergestellt und diese enzymatisch mit RNase T1 bzw. chemisch mit Pb^{2+} hydrolysiert. Die Analyse der RNA-Spaltprodukte erfolgte durch Primer-Extension (siehe 4.1.3) und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung (siehe 4.2.2). Die Ergebnisse sind in der Abb. 5.21 dargestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der in cDNA umgeschriebenen Spaltprodukte zeigt sowohl für die RNase T1-Hydrolyse als auch für die Pb^{2+} Spaltung keine Unterschiede zwischen beiden ESR1 Transkript-Varianten.

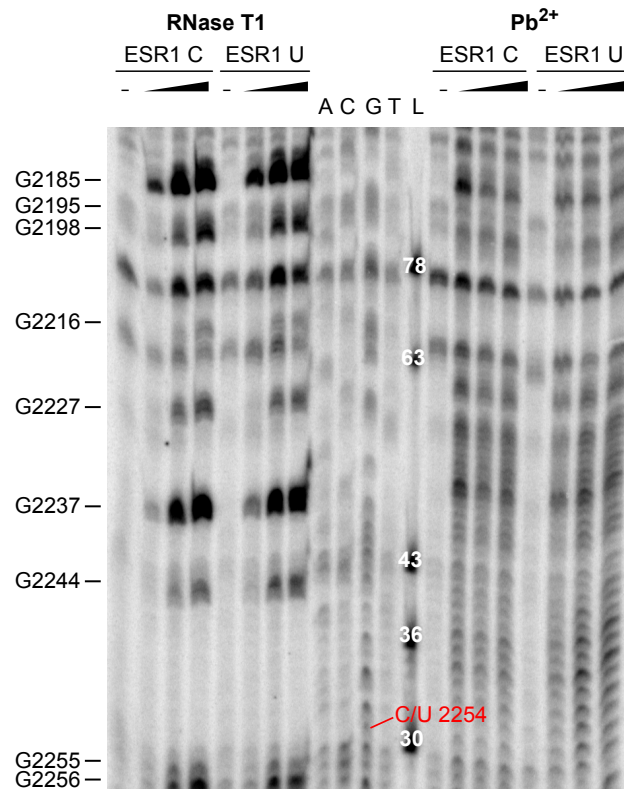


Abbildung 5.21: Strukturprobung der ESR1-Varianten deutet nicht auf strukturelle Unterschiede hin. Die ESR1 3'-UTR *in vitro* Transkripte C und U wurden mittels Pb^{2+} oder RNase T1 hydrolysiert und die Spaltprodukte durch Primer-Extension, denaturierende PAGE und Phosphorimaging detektiert. Das Gel zeigt links die Ergebnisse der RNase T1-Hydrolyse, in der Mitte die der Sequenzier-Reaktion des C *in vitro* Transkripts und rechts die der Pb^{2+} induzierten RNA-Spaltung. Die SNP-Position ist mit „C/U 2254“ bezeichnet.

Sowohl die Ergebnisse der *mfold*-Analyse als auch des Strukturprobings weisen darauf hin, dass der innerhalb der ESR1 3'-UTR lokalisierte SNP rs93410706 keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die ESR1 Sekundärstruktur hat.

5.4.8 Zusammenfassung und Fazit der ESR1-Analysen

Die Analysen im ESR1-System sollten beantworten, ob der innerhalb der ESR1 3'-UTR und gleichzeitig in der miR-122 Bindestelle lokalisierte SNP rs9341070 die miR-122-vermittelte Regulation von ESR1 beeinflusst.

Die Transfektionsexperimente zeigten, dass jeweils die ESR1-Variante stärker von der *seed-matching* miR-122-Variante gehemmt wird, jedoch keine signifikanten Unterschiede detektiert werden konnten. Des Weiteren wurden für die miRNA-Regulation keine unterschiedlichen Repressionsniveaus für die kurzen und langen ESR1-Reporter beobachtet. Die Vorhersage der ESR1 Sekundärstruktur in Abhängigkeit der rs9341070-Variante wies

auf einen geringen Einfluss des SNPs auf die den SNP umgebende lokale Struktur hin. Die anschließend durchgeführten Strukturprobing-Experimente ergaben keine Unterschiede zwischen den Spaltprodukten der RNA-Hydrolyse.

Fazit

Ein Modell zur SNP-korrelierten miRNA-Dysregulation wurde anhand der Ergebnisse des AGTR1-Systems aufgestellt, da anhand der Daten eine Struktur-Funktions-Beziehung für die miRNA-vermittelte Regulation von AGTR1 abgeleitet werden konnte. Die vorhergesagten und *in vitro* bestätigten Strukturunterschiede waren deutlich mit einem veränderten Phänotyp verbunden. Die mittels mfold-Analyse beobachteten Strukturunterschiede im ESR1-System hingegen sind nicht mit einer differenzierten miRNA-Regulation im Reporter-Assay korreliert. Folglich stellt rs9341070 ein Beispiel für einen SNP, der keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die miRNA-vermittelte Regulation einer Ziel-RNA hat, dar. Somit veranschaulichen die bisherigen Analysen im AGTR1- und ESR1-System die Komplexität der an der miRNA-Regulation beteiligten Struktur-Funktions-Beziehung.

5.5 Untersuchungen weiterer polymorpher Ziel-Gene

5.5.1 Einführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere in GWAS identifizierte SNPs untersucht, für die in Bezug auf die Krankheitsassoziation noch keine biologische Funktion beschrieben ist. Es erfolgte eine Analyse bezüglich in der Nähe des SNPs vorliegender miRNA Bindestellen und anschließend die Vorhersage der RNA-Struktur. Sollte eine SNP-induzierte Strukturänderung vorliegen, kann dies zu einer Beeinflussung der miRNA-vermittelten Regulation führen und somit eine funktionelle Rolle bei der Entstehung der mit dem SNP assoziierten Krankheit spielen.

5.5.2 Vorauswahl

In der Tab. 5.6 ist für jeden SNP dessen Lokalisation angegeben. Über diese wurde eine Vorauswahl für weitere Analysen getroffen, denn sie erfolgten ausschließlich für die Ziel-Gene, bei denen der SNP innerhalb der 3'-UTR der jeweilige mRNA lokalisiert ist, d.h. für MRAS, TCF21, c17orf39, SLC22A3 und NT5C2.

Tabelle 5.6: Übersicht der SNP-Lokalisation weiterer analysierter SNPs.

Gen	SNP-ID	SNP-Position in 3'-UTR	sonstige SNP-Lokalisation
MRAS	rs9818870	1011	
TCF21	rs12190287	241	-
c17orf39	rs2955372	1672	-
NT5C2	rs10786736	313	-
SLC22A3	rs3088442	564	-
ADAMTS13	rs4962153	-	intronisch
PHACTR1	rs7739181	-	intronisch
WDR12	rs6725887	-	intronisch
PSRC1	rs599839	-	in der Nähe des sortilin 1 Gens

In gesonderten Kapiteln (siehe Kap. 5.6 bzw. Kap. 5.8) sind die weiterführenden Analysen für den MRAS SNP rs9818870 sowie den TCF21 SNP rs12190287 aufgeführt.

5.5.3 Analyse auf miRNA Bindestellen mit kardiovaskulärem Bezug

Aufgrund der Assoziation der oben aufgeführten SNPs mit kardiovaskulären Erkrankungen wurden die entsprechenden mRNAs nach Bindestellen für miRNAs, für die bereits eine funktionelle Rolle im kardiovaskulären System publiziert wurde, unter Verwendung von Target-

Scan⁸, microRNA.org⁹ und PubMed¹⁰ sowie [158] analysiert und die Ergebnisse in der Tab. 5.7 zusammengefasst.

Die Tabelle zeigt, dass keiner der drei SNPs innerhalb einer Bindestelle für eine mit dem kardiovaskulären System in Verbindung stehenden miRNA lokalisiert ist. Für die gesamte NT5C2 3'-UTR-Sequenz wurde keine solche miRNA Bindestelle identifiziert. Innerhalb der C17orf39 3'-UTR ist etwa 120 nt stromaufwärts vom SNP rs2955372 eine miR-101 Bindestelle lokalisiert. Eine signifikante Herunterregulation der miR-101 Expression zeigte sich bei dilativer Kardiomyopathie, ischämischer Kardiomyopathie und Aortenstenose [158]. Etwa 650 nt stromabwärts vom SNPs rs3088442 ist eine miR-204/211 Bindestelle innerhalb der SLC22A3 3'-UTR zu verzeichnen. Die Expression beider miRNAs ist bei Herzversagen hochreguliert und im fötalen Herzen signifikant hochreguliert [158].

Tabelle 5.7: Übersicht der miRNA Bindestellen innerhalb der Ziel-Gen 3'-UTRs.

SNP-ID (Gen)	SNP in miRNA Bindestelle	miRNA Bindestelle in der Nähe	Entfernung miRNA Bindestelle vom SNP
rs2955372 (c17orf39)	-	miR-101	ca. 120 nt stromaufwärts
rs10786736 (NT5C2)	-	-	-
rs3088442 (SLC22A3)	-	miR-204/211	ca. 650 nt stromabwärts

5.5.4 Sekundärstrukturvorhersage

Die *in silico* Faltung der RNAs wurde mit den Fenstergrößen 800 und 1400 und einer Schrittweite von 100 durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersagen aufgeführt.

Vorhersage von c17orf39 Sekundärstrukturen

Die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage der beiden c17orf39-Varianten (siehe Tab. 5.8) weisen anhand der jeweiligen Anteile an gepaarten und ungepaarten Strukturen zunächst kaum Unterschiede auf. In dem Großteil der für beide Varianten analysierten Strukturen liegt die SNP-Position gepaart vor. Die detaillierten Angaben in der Tab. 5.8 zeigen jedoch, dass sich die SNP-Position innerhalb der U-Variante vorrangig in einem Stem (74 von 95), die der C-Variante hingegen hauptsächlich in einem Basenpaar vor einem Bulge (79 von 95) auftritt.

⁸<http://www.targetscan.org/>

⁹<http://www.microrna.org/>

¹⁰<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Die Sekundärstrukturen beider c17orf39-Varianten wurden ebenfalls an der etwa 120 nt stromaufwärts vom SNP entfernten miR-101 Erkennungsstelle verglichen. Diese Analyse ergab, dass sich die Strukturänderungen nur auf die unmittelbare SNP-Region beschränken, und die Struktur der miR-101 Bindestelle vom SNP unbeeinflusst ist.

Tabelle 5.8: Ergebnisse der c17orf39 Sekundärstrukturvorhersage.

SNP-Position	c17orf39 C	c17orf39 U
gepaart	93	82
ungepaart	2	13
Summe analysierter Strukturen	95	95
Strukturkontext des SNP		
Stem	3	74
Basenpaar vor Bulge	79	5
Basenpaar vor Junction	11	0
Basenpaar vor Loop	0	3
Loop	1	4
Bulge	1	9

Vorhersage von NT5C2 Sekundärstrukturen

Die Vorhersage der NT5C2-Sekundärstrukturen ergab keine Unterschiede für die beiden Varianten (siehe Tab. 5.9). In allen analysierten NT5C2 C- und G-Strukturen lag die SNP-Position in einem Loop und damit ungepaart vor. Die mfold-Analyse weist somit auf keine durch den SNP rs10786736 hervorgerufenen Änderung der NT5C2 Sekundärstruktur hin.

Tabelle 5.9: Ergebnisse der NT5C2 Sekundärstrukturvorhersage.

SNP-Position	NT5C2 G ¹¹	NT5C2 C ¹²
ungepaart / Loop	55	55
Summe analysierter Strukturen	55	55

¹¹DNA Variante: G -> RNA Variante: C

¹²DNA Variante: C -> RNA Variante: G

Vorhersage von SLC22A3 Sekundärstrukturen

In Abhängigkeit der vorliegenden rs3088442-Variante wurden unterschiedliche Strukturen vorhergesagt (siehe Tab. 5.10). Während die SNP-Position der SLC22A3 A-Variante eine deutliche Präferenz für den gepaarten vs. den ungepaarten Zustand aufweist (45 vs. 10), liegt die SLC22A3 G-Variante zu etwa gleichen Anteilen gepaart bzw. ungepaart vor (28 vs. 27). Die detaillierten Ergebnisse der Tab. 5.10 zeigen weiterhin, dass einige Strukturelemente spezifisch für eine jeweilige SLC22A3-Variante sind. So ist die Lokalisation des SNPs in einem Basenpaar vor einem Loop nur für die A-Variante, die Positionierung in einem Bulge hingegen nur für die G-Varianten beobachtet worden.

Tabelle 5.10: Ergebnisse der SLC22A3 Sekundärstrukturvorhersage.

SNP-Position	SLC22A3 A	SLC22A3 G
gepaart	45	28
ungepaart	10	27
Summe analysierter Strukturen	55	55
Strukturkontext des SNP		
Stem	32	5
Basenpaar vor Bulge	2	23
Basenpaar vor Loop	11	0
Loop	10	11
Bulge	0	16

Eine vergleichende Analyse der ca. 650 nt vom SNP entfernt lokalisierten miR-204/211 Bindestelle in Abhängigkeit der rs3088442-Variante wies keine strukturellen Unterschiede auf.

5.5.5 Zusammenfassung und Fazit der Untersuchungen weiterer polymorpher Ziel-Gene

Im vorangegangenen Abschnitt wurden die Analysen weiterer mit kardiovaskulären Phänotypen assoziierten SNPs hinsichtlich einer möglichen an der Krankheitsentstehung beteiligten miRNA-Dysregulation untersucht. Da nur wenige Beispiele für funktionelle miRNA Bindestellen außerhalb der 3'-UTR einer Ziel-mRNA beschrieben sind, wurden ausschließlich 3'-UTR-lokalisierte SNPs in die ausführlicheren Analysen einbezogen. Für keinen der SNPs wurden innerhalb der näheren Umgebung Bindestellen für miRNAs, für die eine regulatorische Funktion im kardiovaskulären System bekannt ist, vorhergesagt. Die Strukturen der in weiterer Entfernung lokalisierten miR-101 (c17orf39) bzw. miR-204/211 (SLC22A3) Binde-

stellen waren von etwaigen mittels mfold vorhergesagten Sekundärstrukturen unbeeinflusst. Aufgrund der erläuterten Sachverhalte wurden keine weiteren *in vitro* Analysen der in Tab. 5.6 aufgeführten SNPs durchgeführt.

Fazit

Anhand der aus den AGTR1- und ESR1-Daten gewonnenen Erkenntnisse wurde eine Arbeitshypothese für weitere miR-SNP Analysen aufgestellt. Grundlage dieser ist die Annahme, dass eine mit dem SNP korrelierte Änderung der RNA-Struktur mechanistisch an der Beeinflussung der miRNA-vermittelten Regulation des Ziel-Gens beteiligt sein kann. Entsprechend wurde in diesem Kapitel eine Voranalyse weiterer SNPs vorgenommen. Aus einer Liste von neun krankheits-assoziierten SNPs wurden über die Lokalisation in der 3'-UTR fünf SNPs ausgewählt, für die eine Vorhersage von miRNA Bindestellen sowie der RNA-Sekundärstruktur erfolgte. Schlussendlich wurde für drei SNPs von weiteren *in vitro* Analysen abgesehen. Es wurden zwei Kandidaten-SNPs ausgewählt, mit denen eine Fortsetzung detaillierter Analysen hinsichtlich der zugrunde liegenden Arbeitshypothese durchgeführt wurde (siehe Kap. 5.6 und Kap. 5.8).

5.6 Untersuchungen im MRAS-System

5.6.1 Einführung

In einer GWAS [22] wurde eine Assoziation des SNPs rs9818870 (C/T Polymorphismus, T = Risiko-Allel) mit koronarer Herzerkrankung (*coronary artery disease*, CAD) identifiziert. Der SNP ist innerhalb des muscle RAS oncogene homolog (*MRAS*) Gens in der 3'-UTR der *MRAS* mRNA lokalisiert. Das M-ras Protein ist ein Mitglied der RAS Superfamilie der GTP-bindenden Proteine und ist weitverbreitet, jedoch insbesondere im Herzen stark exprimiert (GenCards, BioGPS). Erdmann *et al.* [22] konnten zeigen, dass geschädigtes Herzgewebe der Maus eine erniedrigte *MRAS*-Expression aufweist. Bisher liegen allerdings noch keine publizierten Daten hinsichtlich molekularer Mechanismen, die die Assoziation dieses SNPs mit CAD erklären können, vor. Die Positionierung des SNPs in der 3'-UTR der *MRAS* mRNA (siehe Abb. 5.22) lässt einen Einfluss auf die miRNA-vermittelte Regulation der *MRAS*-Genexpression vermuten.

In der Abb. 5.22 sind die *MRAS* mRNA und die Positionierung des SNPs schematisch dargestellt. Die mittels online verfügbarer Vorhersage-Algorithmen durchgeführte Analyse von miRNA Bindestellen in der *MRAS* 3'-UTR ergab, dass sich der SNP nicht innerhalb einer miRNA Bindestelle befindet. Aufgrund der o.g. Assoziation dieses SNPs mit einer kardiovaskulären Erkrankung wurde im Weiteren nach Bindestellen für miRNAs, für die bereits eine entsprechende Beeinflussung des kardiovaskulären Systems bekannt ist, gesucht.

Die *MRAS* 3'-UTR verfügt sowohl für die miR-195 als auch für die miR-135 über jeweils zwei Bindestellen. Während die Herz-spezifische Überexpression der miR-195 ausreichend für die Entwicklung einer Kardiomyopathie ist [159], wird der miR-135 eine potentielle Rolle in der Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und damit eine Beteiligung an der Blutdruckregulation zugeschrieben [160].

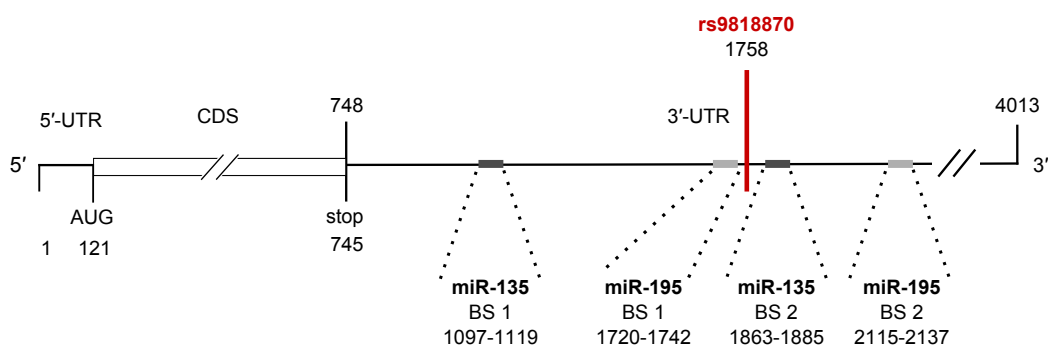


Abbildung 5.22: Schematische Darstellung der *MRAS* mRNA mit der Lage des SNPs und den miR-195 und miR-135 Bindestellen (BS). Der SNP rs9818870 liegt in der *MRAS* 3'-UTR an Position 1758 der mRNA. Die *MRAS* 3'-UTR besitzt für die miRNAs miR-195 und miR-135 jeweils zwei Bindestellen.

Die Lokalisationen der miR-195 bzw. miR-135 Bindestellen innerhalb der MRAS 3'-UTR sind in der Abb. 5.22 veranschaulicht. Je eine Bindestelle beider miRNAs ist in näherer Umgebung der SNP-Position lokalisiert. Dabei ist die miR-195 Bindestelle 1 16-38 nt stromaufwärts, die miR-135 Bindestelle 2 ca. 100 nt stromabwärts vom SNP entfernt. Die verbleibenden Bindestellen sind etwa 400 nt stromabwärts (miR-195 Bindestelle 2) bzw. 700 nt stromaufwärts (miR-135 Bindestelle 1) lokalisiert.

Im humanen System existiert neben der miR-135a auch die miR-135b, deren *guide* Strang nur an Position 11 ausgehend vom 5'-Ende einen Unterschied zum miR-135a *guide* Strang aufweist. Aufgrund der bisher publizierten Verbindung der miR-135a zum kardiovaskulären System [158, 160] werden die folgenden Analysen ausschließlich die miR-135a einschließen.

5.6.2 Bindungsenergien

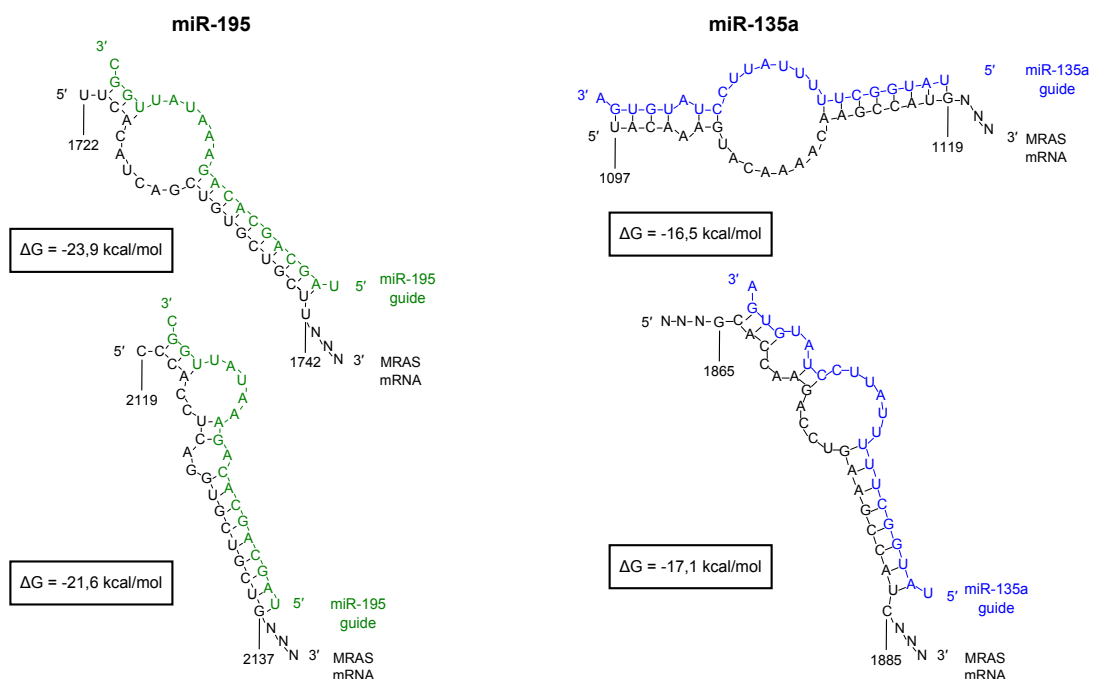


Abbildung 5.23: Lokale Bindungsenergien von MRAS 3'-UTR mit der miR-195 bzw. miR-135a. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse für die beiden miR-195 Bindestellen (1 oben, 2 unten) und auf der rechten Seite die der beiden miR-135a Bindestellen (1 oben, 2 unten) dargestellt.

Die Bindungsenergien zwischen dem jeweiligen MRAS 3'-UTR-Sequenzabschnitt und den miR-195 bzw. miR-135a *guide* Strängen wurden mittels RNAHybrid bestimmt (siehe Abb. 5.23). Die ΔG -Werte zeigen deutliche Unterschiede zwischen den RNA-RNA-Interaktionen. Durch das Vorhandensein einer größeren Anzahl an G-C Basenpaaren sind die MRAS-miR-

195-Bindungen thermodynamisch stabiler ($\Delta G_{\text{miR}-195} = -23,9 \text{ kcal/mol}$ bzw. $-21,6 \text{ kcal/mol}$ vs. $\Delta G_{\text{miR}-135a} = -16,5 \text{ kcal/mol}$ und $-17,1 \text{ kcal/mol}$).

5.6.3 Sekundärstrukturvorhersage

Für die rs9818870 MRAS 3'-UTR-Varianten C und U wurden umfangreiche Sekundärstrukturvorhersagen durchgeführt. Die mittels mfold berechneten Strukturen wurden an der SNP-Position und in den Bereichen der miRNA Bindestellen für die miR-195 und die miR-135 verglichen (siehe Abb. 5.22). In der folgenden Tabelle sind zunächst die Ergebnisse der Strukturanalyse der SNP-Region aufgeführt.

Tabelle 5.11: Ergebnisse der MRAS Sekundärstrukturvorhersage für die SNP-Position.

Struktur an SNP Position	MRAS C	MRAS U
gepaart	95	150
ungepaart	55	0
Summe analysierter Strukturen	150	150
Strukturkontext des SNP		
Stem	93	137
Loop	52	0
Bulge	3	0
Basenpaar vor Loop	0	12
Basenpaar vor Junction	0	1
Junction	2	0

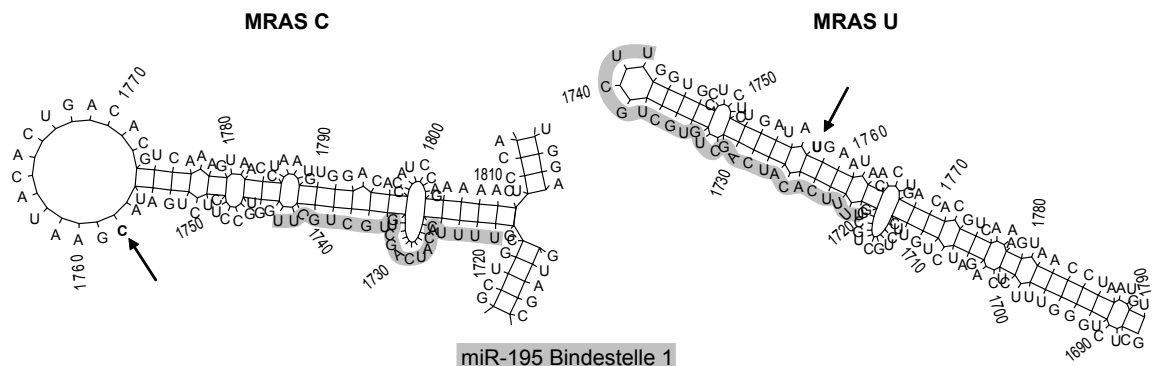
Die Sekundärstrukturvorhersage weist Unterschiede zwischen den beiden MRAS-Varianten an der SNP-Position auf. Ein Vergleich zwischen dem gepaarten und ungepaarten Auftreten der SNP-Position verdeutlicht, dass diese innerhalb der MRAS 3'-UTR U-Variante grundsätzlich gepaart vorliegt. Innerhalb der MRAS 3'-UTR C-Variante hingegen wurde die SNP-Position zu etwa einem Drittel in einem ungepaarten Strukturelement beobachtet. Die Auflistung der detaillierten Strukturelemente zeigt zudem, dass ausgenommen der Stem-Struktur alle anderen beobachteten Elemente spezifisch für jeweils eine der MRAS-Varianten sind.

Da der SNP nicht innerhalb einer miRNA Bindestelle lokalisiert ist, wurde die MRAS 3'-UTR Sekundärstruktur des Weiteren auf mögliche mit dem SNP einhergehende strukturelle Änderungen in den miR-195 und miR-135 Bindestellen untersucht. Dies erfolgte anhand einer vergleichenden Analyse von jeweils 110 Strukturen für zwei dem SNP am nächsten liegenden Bindestellen sowie von je 50 Strukturen für die verbleibenden Bindestellen. Die Ergebnisse sind in der Tab. 5.12 zusammengefasst.

Tabelle 5.12: Ergebnisse der MRAS Sekundärstrukturvorhersage für die miR-195 und miR-135 Bindestellen.

	miR-135 BS 1	miR-195 BS 1	miR-135 BS 2	miR-195 BS 2
Anzahl analysierter Strukturen	50	110	110	50
Anzahl C ≠ U	21	76	24	11
C ≠ U in %	42	69	22	22

Für die 16 nt stromaufwärts vom SNP beginnende miR-195 Bindestelle 1 wurden in 69 % aller verglichenen Sekundärstrukturen Unterschiede vorhergesagt. Die Struktur der zweiten miR-195 Bindestelle, die etwa 400 nt stromabwärts vom SNP lokalisiert ist, wies Ungleichheit in 22 % der analysierten Sekundärstrukturen auf. Es konnte ebenfalls ein Einfluss des SNPs auf die Struktur der beiden miR-135 Bindestellen detektiert werden. Für die vorhergesagten Sekundärstrukturen der MRAS 3'-UTR-Varianten wurden an der weiter vom SNP entfernten miR-135 Bindestelle 1 in 42 % und an der miR-135 Bindestelle 2 in 22 % Unterschiede beobachtet. In der Abb. 5.24 sind beispielhaft die für die beiden MRAS 3'-UTR-Varianten vorhergesagten Sekundärstrukturen gezeigt. Diese verdeutlichen die mit dem SNP einhergehende strukturellen Änderungen an der SNP-Position und der miR-195 Bindestelle 1.

**Abbildung 5.24:** MRAS Strukturvorhersage weist auf SNP-induzierte Unterschiede hin. Beispielhafte Darstellung des bei der mfold-Analyse beobachteten Einflusses des SNPs auf die Sekundärstruktur der beiden MRAS-Varianten (C links und U rechts). Die Unterschiede betreffen nicht nur die Position des SNPs (angedeutet durch Pfeile) sondern auch die miR-195 Bindestelle (grau hinterlegt).

5.6.4 Klonierung von MRAS Reporter-Gen-Konstrukten

Für weiterführende Analysen im MRAS-System wurden Reporter-Gen-Konstrukte generiert, die die gesamte MRAS 3'-UTR Sequenz (C- bzw. U-Variante) in der MCS des pmirGLO Dual Luciferase Reportervektors enthalten. Dazu wurden zunächst Primer, die an ihren Enden die entsprechenden Restriktions-Schnittstellen enthalten und zudem geeignet sind, die

MRAS 3'-UTR Sequenz zu flankieren, generiert (entsprechend der *NCBI* Referenz-Sequenz NM_001085049.1¹³). Da auch mittels verschiedener PCR-Variationen die 3'-UTR nicht als gesamtes PCR-Fragment amplifiziert werden konnte, erfolgte zunächst die Amplifikation von Teilfragmenten der MRAS 3'-UTR unter Verwendung zusätzlicher Primer. Das Einsetzen dieser Fragmente als Template ermöglichte schließlich eine erfolgreiche Generierung des kompletten MRAS 3'-UTR Inserts (siehe Abb. 5.25).

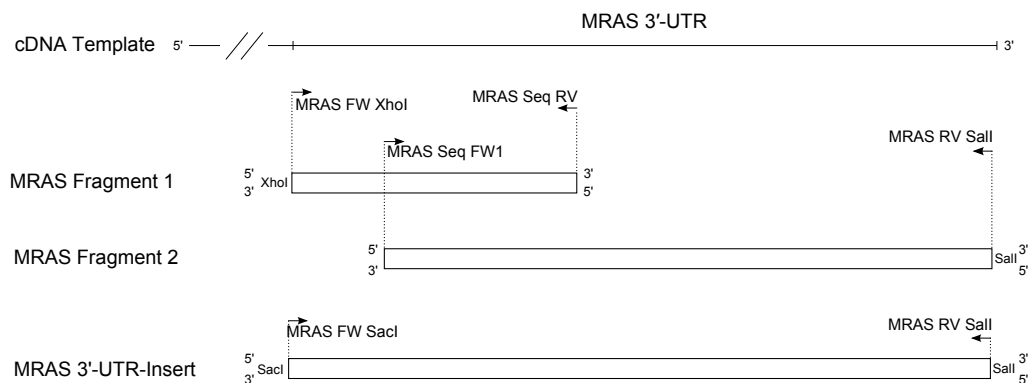


Abbildung 5.25: Generierung des Gesamtlänge MRAS 3'-UTR-Inserts über Teilfragmente. Die Amplifikation der gesamten MRAS 3'-UTR-Sequenz war nur über die Teilfragmente 1 und 2 möglich.

5.6.5 Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die miRNA-vermittelte Regulation von MRAS

Die Vorhersage der Sekundärstruktur der beiden MRAS-Varianten zeigte Unterschiede in der lokalen RNA-Struktur in der Umgebung der miR-195 und miR-135 Bindestellen auf. Daher wurde mittels Ko-Transfektions-Experimenten in HeLa-Zellen untersucht, ob diese Unterschiede einen Einfluss auf die miRNA-vermittelte Regulation der MRAS 3'-UTR Varianten haben.

Die in der Abb. 5.26 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die MRAS 3'-UTR U- in Relation zur C-Variante jeweils von beiden miRNAs stärker gehemmt wird (94 vs. 86 und 90 vs. 75 % relative Luciferase-Aktivität). Weiterhin lassen die Daten erkennen, dass jeweils beide MRAS-Varianten stärker durch die miR-135a herunterreguliert werden (94 vs. 90 bzw. 86 vs. 75 %). Diese Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass die miRNA-vermittelte Regulation von MRAS durch den SNP rs9818870 beeinflusst wird. Eine Ursache hierfür kann in einer durch den SNP-induzierten Änderung der lokalen Sekundärstruktur liegen, die dazu führt, dass beide MRAS-Varianten eine unterschiedliche Zugänglichkeit für miRNAs aufweisen. Dies soll im Weiteren näher analysiert werden.

¹³http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001085049.1

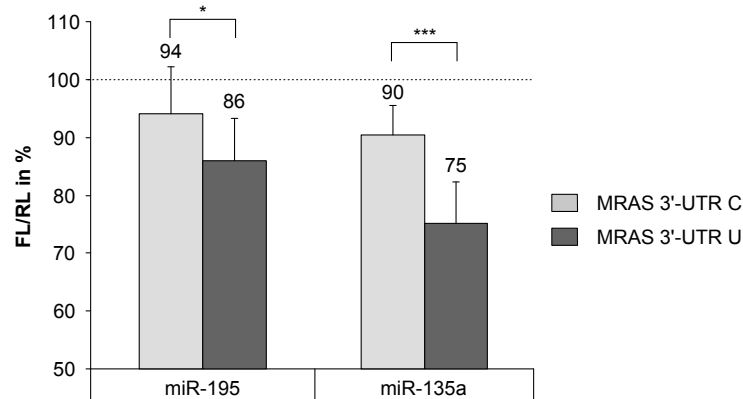


Abbildung 5.26: Differentielle Regulation der MRAS-Varianten durch miR-195 und miR-135a. HeLa-Zellen wurden im 96 well Format mit MRAS 3'-UTR Reporter-Plasmiden (10ng) und miR-195 bzw. miR-135a ko-transfiziert (0-100 nM¹⁴ miRNA). Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und anschließend die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Die relativen firefly Luciferase-Aktivitäten (FL/RL) wurden auf Ansätze ohne miRNA (nur Plasmid-DNA) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens vier Experimenten. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.0001$

5.6.6 RNA-Strukturprobing

Das RNA-Strukturprobing wurde durchgeführt, um die MRAS-Varianten auf lokale RNA-Strukturunterschiede in der näheren Umgebung des SNPs sowie der miR-195 und miR-135 Bindestellen zu untersuchen. Dazu wurden die RNA-Hydrolyseprodukte der beiden MRAS 3'-UTR *in vitro* Transkripte durch Primer-Extension mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe 4.1.3 und 4.2.2) detektiert. Da die miRNA Bindestellen einige hundert nt von einander entfernt lokalisiert sind, und auf einem Sequenzier-Gel etwa 80-100 nt aufgetrennt werden können, erfolgte die Analyse der RNA-Spaltprodukte unter Verwendung von vier in der in Abb. 5.27 schematisch dargestellten Primer.

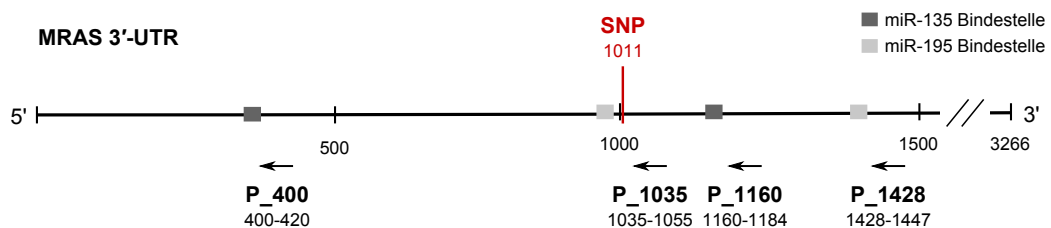


Abbildung 5.27: Schematische Darstellung der Positionierung der MRAS Probing-Primer. Zur Analyse des Strukturprobings wurden für jede der vier miRNA Bindestellen je ein Primer ausgewählt, der stromabwärts dieser bindet. Dies ermöglichte eine Untersuchung der Spaltprodukte des RNA-Probings in den unterschiedlichen Regionen der MRAS-RNA.

¹⁴Da nicht bei allen Experimenten eine Konzentrations-abhängige Hemmung zu beobachten war, ergeben sich die Mittelwerte aus der jeweils stärksten Hemmung der relativen Luciferase-Aktivität und somit aus unterschiedlichen Konzentrationen an miRNA.

5 Ergebnisse

Unterschiede zwischen den Mustern der Spaltprodukte der MRAS 3'-UTR C und U *in vitro* Transkripte konnten nur für die Auflösung der Spaltprodukte in der Nähe des SNPs und der miR-195 Bindestelle 1 beobachtet werden (siehe Abb. 5.28, für die übrigen miRNA Bindestellen: Daten nicht gezeigt).

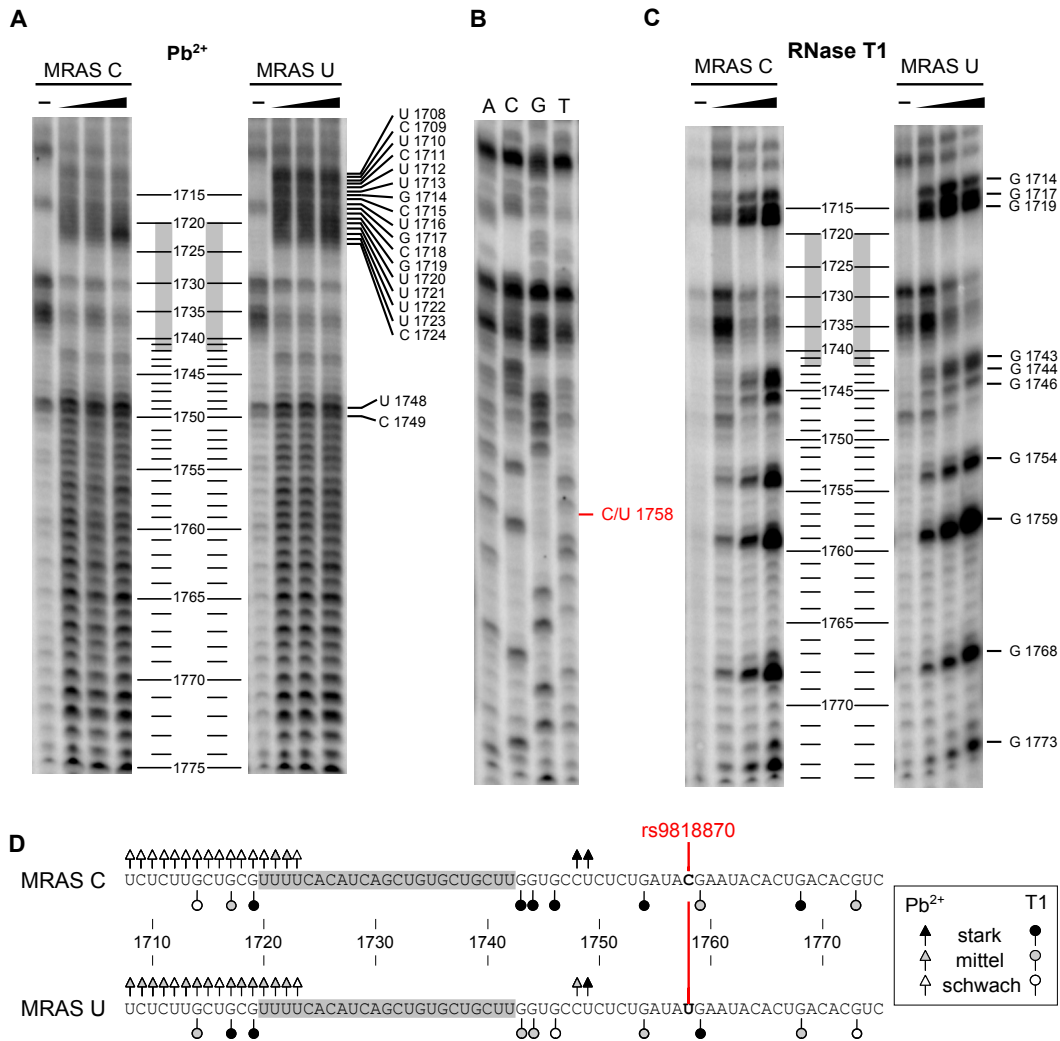


Abbildung 5.28: Strukturprobung der MRAS 3'-UTR *in vitro* Transkript-Varianten zeigt unterschiedliche Spaltmuster. Die MRAS 3'-UTR *in vitro* Transkripte C und U wurden durch Pb²⁺ oder RNase T1 hydrolysiert und die Spaltprodukte durch Primer-Extension und anschließende denaturierende PAGE detektiert. In (A) sind die Ergebnisse des Pb²⁺, in (B) die der Sequenzier-Reaktion des U *in vitro* Transkripts und in (C) die der RNase T1-Hydrolyse gezeigt. Die SNP-Position ist durch „C/U 1758“ gekennzeichnet und die Lokalisation der miR-195 Bindestelle durch graue Balken angedeutet. In (D) sind die MRAS RNA-Sequenzen mit den beobachteten Spaltstellen annotiert. Oberhalb der jeweiligen Sequenz sind die Pb²⁺-Spaltstellen (Dreiecke) und unterhalb der Sequenz die RNase T1-Spaltstellen (Kreise) gezeigt. Die Stärke der Hydrolyse ist durch die Farbtiefe der Symbole angedeutet (weiß = schwach, grau = mittel und schwarz = stark). Die SNP-Position ist fett dargestellt und durch rs9818870 gekennzeichnet. Die miR-195 Bindestelle 1 ist grau hinterlegt.

Die Muster der Bleispaltung zeigen deutliche Unterschiede an den Positionen 1708-1720, welche direkt am Übergang der miR-195 Bindestelle 1 zur stromaufwärts gelegenen Sequenz lokalisiert sind. Die RNA-Hydrolyse mittels RNase T1 zeigt, mit Ausnahme des G1759, eine erhöhte Zugänglichkeit der MRAS C-Variante stromabwärts vom SNP. Weiterhin lässt sich eine verminderte Zugänglichkeit unmittelbar stromaufwärts der miR-195 Bindestelle 1 verzeichnen. Damit wurden durch beide Probing-Verfahren (chemische und enzymatische Hydrolyse) strukturelle Unterschiede zwischen den MRAS-Varianten sowohl stromabwärts als auch stromaufwärts der miR-195 Bindestelle 1 detektiert. Diese lassen in genannter Region ebenfalls auf eine für miRNAs unterschiedliche Zugänglichkeit der beiden MRAS-Varianten schließen.

Diese Ergebnisse bestätigen die biologische Relevanz des mittels mfold-Analyse aufgestellten Modells der SNP-induzierten Strukturänderung der MRAS RNA-Struktur. Für die miRNA Bindestelle, die in den *in silico* Analysen die größte Diversität zwischen den MRAS-Varianten aufwies (miR-195 Bindestelle 1), konnten experimentell unterschiedliche Spaltprodukte beobachtet werden.

5.6.7 Kinetik der Bindung von miRNAs an MRAS RNA *in vitro* Transkripte

Im Ergebnis der mittels RNA-Strukturprobing festgestellten Unterschiede zwischen den beiden MRAS-Varianten in der Umgebung der miR-195 Erkennungsstelle wurde untersucht, ob vorgenannte Unterschiede zu einem veränderten Annealing zwischen den MRAS *in vitro* Transkripten und den miRNAs führen. Dazu wurden RNA-RNA-Annealing-Experimente (siehe 4.2.16) mit beiden MRAS 3'-UTR *in vitro* Transkript-Varianten und dem miR-195 bzw. miR-135a *guide* Strang durchgeführt.

Der Teil A der Abb. 5.29 (links) zeigt den Nachweis einer Komplexbildung beider MRAS *in vitro* Transkripte mit der miR-195. Die im Teil B der Abb. 5.29 dargestellte Quantifizierung veranschaulicht für die MRAS 3'-UTR C-Variante eine durchgängig stärkere Komplexbildung mit der miR-195. Im Falle der miR-135a konnte kein Annealing an die MRAS-RNAs detektiert werden (Teil A Abb. 5.29 rechts). Einen Erklärungsansatz dafür bieten die unterschiedlichen Bindungsenergien der RNA-miRNA-Interaktion (siehe Abb. 5.23). Beide Interaktionen zwischen dem entsprechenden MRAS 3'-UTR Sequenzabschnitt und dem miR-195 *guide* Strang weisen gegenüber der MRAS-miR-135a-Interaktion (-16,5 kcal/mol und -17,1 kcal/mol) eine deutlich erhöhte Bindungsenergie (-23,9 kcal/mol und -21,6 kcal/mol) auf.

5 Ergebnisse

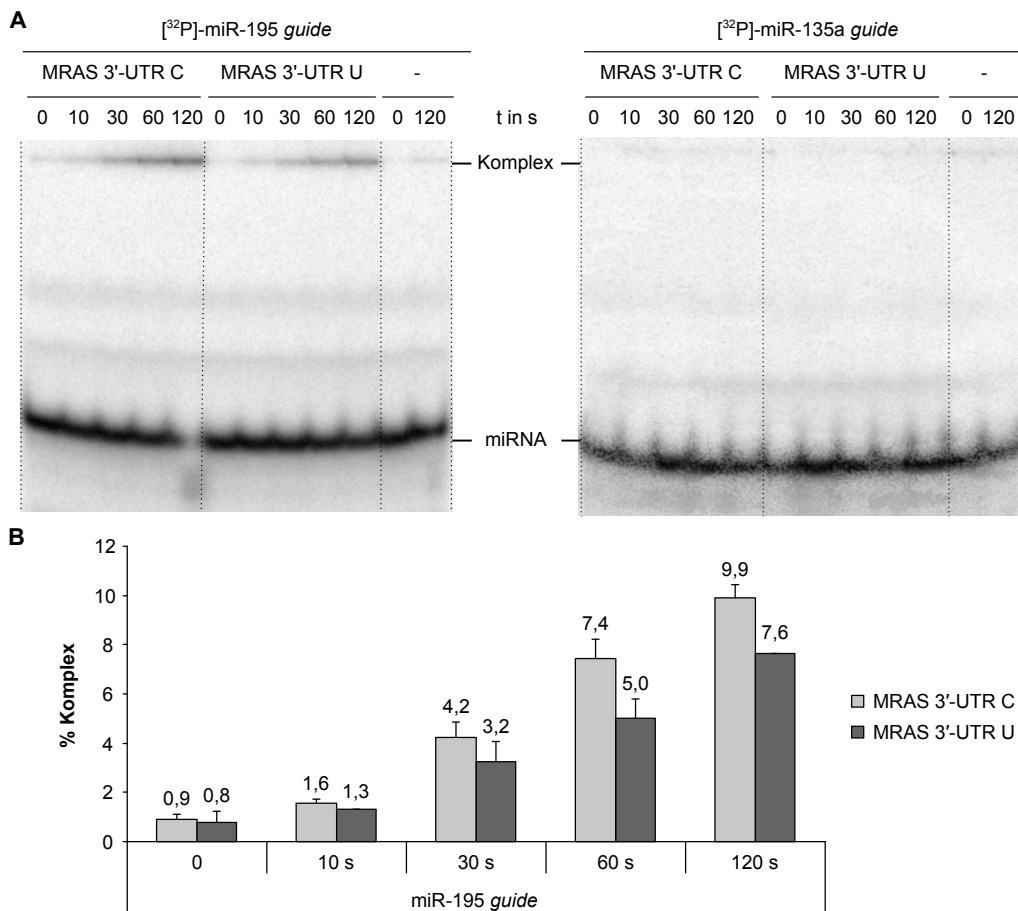


Abbildung 5.29: Untersuchung der zeitabhängigen Komplexbildung der MRAS 3'-UTR-Varianten mit miR-195 und miR-135a. MRAS 3'-UTR C bzw. U *in vitro* Transkripte (5 nM) wurden mit miR-195 bzw. miR-135a *guide* Strang (0,5 nM) in Anwesenheit von 10 mM CTAB für 0-120 s bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne *in vitro* Transkript. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Proben bei 4 °C und 150 V auf einem 8 %-igen, nativen PAA-Gel aufgetrennt. **(A)** links sind die Ergebnisse des miR-195 und rechts die des miR-135a Annealings gezeigt. **(B)** Quantifizierung der MRAS-miR-195 Komplexbildung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen zweier unabhängiger Experimente.

Die zu jedem Zeitpunkt stärkere Komplexbildung der miR-195 mit der MRAS C-Variante spiegelt sich auch in den berechneten Ratenkonstanten (siehe Tab. 5.13) wider.

Tabelle 5.13: Ratenkonstanten des Annealings von MRAS 3'-UTR und miR-195 in Anwesenheit von CTAB.

miRNA	<i>in vitro</i> Transkript	k ($M^{-1}s^{-1}$)
miR-195	MRAS 3'-UTR C	$1,8 \cdot 10^6 \pm 8,3 \cdot 10^3$
	MRAS 3'-UTR U	$1,6 \cdot 10^6 \pm 8,8 \cdot 10^4$

5.6.8 Zusammenfassung und Fazit der MRAS-Analysen

Für den MRAS SNP rs9818870 wurde mittels GWAS eine Assoziation mit CAD identifiziert. Aufgrund der Lokalisation des SNPs innerhalb der MRAS 3'-UTR erscheint die Beteiligung einer SNP-induzierten Änderung der miRNA-vermittelten Regulation von MRAS an der Entstehung von CAD möglich. Obwohl der SNP rs9818870 nicht innerhalb einer miRNA Bindestelle lokalisiert ist, wurden die vorstehenden Untersuchungsergebnisse zum AGTR1-System zum Anlass genommen, weiterführende Analysen im MRAS-System vorzunehmen. Sie dienen der Beantwortung der Frage, ob auch außerhalb von miRNA Bindestellen lokalisierte SNPs einen regulatorischen Einfluss auf die miRNA-vermittelte Genexpression haben können.

Die mittels mfold durchgeführten umfangreichen Sekundärstruktur-Analysen ergaben Unterschiede zwischen beiden MRAS-Varianten, sowohl an der SNP-Position selbst als auch an den bis zu einigen hundert nt entfernt liegenden Bindestellen für miR-195 sowie miR-135. In Folge dessen wurden *in vitro* Experimente durchgeführt. Hierbei wurden Luciferase-Reporterkonstrukte, die die gesamte MRAS 3'-UTR C- bzw. U-Sequenz enthielten, mit miR-195 bzw. miR-135a ko-transfiziert. Die Ergebnisse zeigen eine differentielle miRNA-vermittelte Regulation beider MRAS-Varianten. Dabei wurde die MRAS U-Variante von beiden miRNAs stärker gehemmt. In nachfolgend durchgeführten Strukturprobing-Analysen konnten in der Umgebung des SNPs und der miR-195 Bindestelle 1 unterschiedliche RNA-Hydrolyseprodukte detektiert werden. Die anschließenden RNA-Annealing-Experimente zeigten eine differenzierte Komplexbildung der MRAS 3'-UTR-Varianten mit dem miR-195 *guide* Strang.

Die MRAS-Transfektionsexperimente ergaben, dass die miR-195-vermittelte Hemmung der MRAS C-Variante schwächer ausgeprägt ist. Die RNA-RNA Annealing-Versuche weisen jedoch in Relation zum U *in vitro* Transkript eine stärkere und schnellere Komplexbildung des MRAS 3'-UTR C *in vitro* Transkripts mit der miR-195 hin. Die vorstehenden Ergebnisse zeigen also, dass eine stabilere Komplexbildung zwischen Ziel-mRNA und miRNA nicht zwangsläufig mit einer gesteigerten miRNA-vermittelten Hemmung einhergehen muss.

Fazit

Die Analysen im MRAS-System bestätigen zum einen das Modell der Beeinflussung der miRNA-Regulation durch SNP-induzierte strukturelle Änderungen der RNA im Bereich von miRNA Bindestellen. Zum anderen verdeutlichen die Ergebnisse, dass dieses Modell auch auf SNPs außerhalb von miRNA Bindestellen anwendbar ist. Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse der MRAS-Analysen, dass die RNA-Sekundärstrukturvorhersage als geeignete Methode zur Analyse der möglichen biologischen Bedeutung von miR-SNPs eingesetzt werden kann.

5.7 Untersuchungen im DHFR-System

5.7.1 Einführung

Mishra *et al.* [149] führten im Jahr 2007 Untersuchungen zum SNP rs34764978, der in der 3'-UTR der Dihydrofolat-Reduktase (*DHFR*) mRNA lokalisiert ist, durch. Besagter SNP ist ein genomischer G/A-Polymorphismus, der jedoch aufgrund der Lokalisation auf dem Minus-Strang einem C/U mRNA-Polymorphismus entspricht. Im Folgenden werden die DHFR C- und U-Varianten unterschieden.

Das Vorliegen der U-Variante geht mit einer gesteigerten *DHFR* mRNA Menge einher [161]. Mishra *et al.* konnten zeigen, dass der SNP an der Position 1279 der *DHFR* mRNA (entspricht der Position 223 der 3'-UTR) die miR-24-vermittelte Expression von DHFR beeinflusst. Die Dysregulation der DHFR U-Variante geht mit einer Überexpression selbiger einher. Diese führt zur Entwicklung einer Methotrexat-Resistenz [149].

Von besonderem Interesse an der beschriebenen DHFR-miR-24-Interaktion ist die Position des SNPs. Dieser ist nicht innerhalb sondern 14 nt stromabwärts von der miR-24 Bindestelle lokalisiert. Das bedeutet, dass es durch den Einzelbasenaustausch nicht zum Verlust der Komplementarität zwischen Ziel-RNA und miRNA kommt. Die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten somit einen Erklärungsansatz für die in [149] untersuchte, rs34764978-induzierte Dysregulation der miR-24-vermittelten DHFR-Expression.

5.7.2 miR-24 Bindestellen in der DHFR 3'-UTR

Im Zuge dieser Arbeit wurden zunächst computer-gestützte Analysen zur Vorhersage potentieller miRNA Bindestellen in der DHFR 3'-UTR durchgeführt. Die genutzten Algorithmen von *Targetscan*¹⁵ und *microRNA.org*¹⁶ resultierten, auch unter Bezug auf die publizierten Ergebnisse von Mishra *et al.* [149], in unterschiedlichen Ergebnissen (siehe Abb. 5.30). Mittels TargetScan wurde eine, mit Hilfe von microRNA.org hingegen drei miR-24 Bindestellen innerhalb der DHFR 3'-UTR, von denen eine der erstgenannten entsprach, vorhergesagt. Die von Mishra *et al.* in [149] beschriebene miR-24 Bindestelle (seinerzeit unter Verwendung des miRanda-Algorithmus vorhergesagt) wird jedoch von keinem der beiden benutzten Online-Tools prognostiziert (Stand: September 2011). In der Abb. 5.30 ist die *DHFR* mRNA einschließlich der vier vorab genannten miR-24 Bindestellen schematisch dargestellt.

Eine nähere Analyse der von Mishra *et al.* [149] durchgeführten Studie ergab, dass diese mit rekombinanten DHFR-Varianten durchgeführt wurden, die nicht die gesamte DHFR 3'-UTR enthielten. Der verwendete mRNA-Abschnitt, der die mRNA-Positionen 488-1429 umfasst, ist in der Abb. 5.30 blau gekennzeichnet und zeigt, dass dieser die miR-24 Bindestellen 2-4 nicht einschließt.

¹⁵<http://www.targetscan.org/>

¹⁶<http://www.microrna.org>

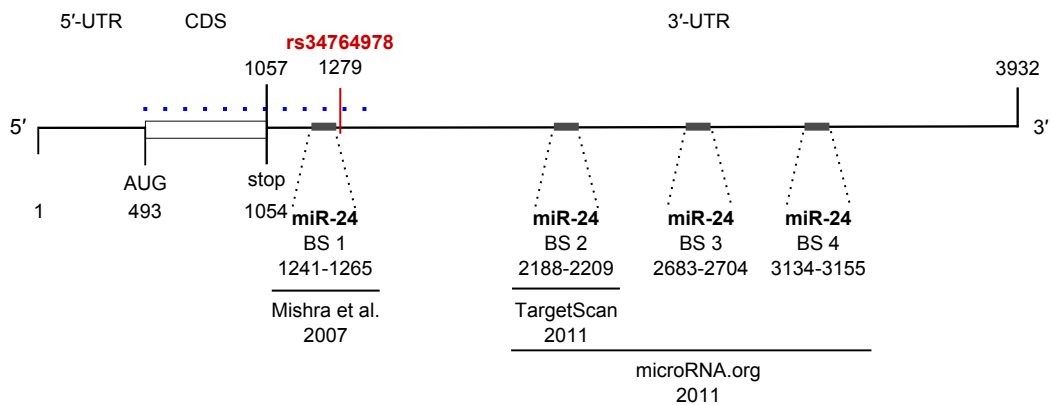


Abbildung 5.30: *DHFR* mRNA mit Lokalisation des SNPs rs34764978 und der miR-24 Bindestellen. Dargestellt ist die *DHFR* mRNA mit ihrer 5'-UTR, CDS und 3'-UTR. Die miR-24 Bindestelle (BS) 1 wurde in der Arbeit von Mishra *et al.* beschrieben. Die Bindestellen 2, 3 und 4 wurden mit Hilfe des Online-Tool microRNA.org, die 2. Bindestelle mittels TargetScan vorhergesagt. Blau gestrichelt ist der von Mishra *et al.* verwendete *DHFR* mRNA Abschnitt gekennzeichnet.

5.7.3 Sekundärstrukturvorhersage

Mittels Sekundärstrukturvorhersage wurden *in silico* Untersuchungen des Einflusses des SNPs rs34764978 auf die lokale Struktur um die miR-24 Bindestellen durchgeführt. Die Tab. 5.14 zeigt die Ergebnisse der mfold-Analyse unter Bezug auf die in Abb. 5.30 gezeigte miR-24 Bindestelle 1.

Tabelle 5.14: Ergebnisse der *DHFR* Sekundärstrukturvorhersage der miR-24 Bindestelle 1.

Strukturkontext um miR-24 Bindestelle	DHFR C	DHFR U
Loop	32	66
Junction	74	22
Stem	91	96
andere	3	16
Summe analysierter Strukturen	200	200

Mit den Vorhersage-Ergebnissen von jeweils 200 Sekundärstrukturen der miR-24 Bindestelle 1 lassen sich statistisch Ähnlichkeiten ableiten, jedoch weist ein Teil der vorgenannten Strukturen Unterschiede zwischen beiden RNA-Varianten auf. In etwa der Hälfte der jeweiligen *DHFR* C- und U-Strukturen ist die miR-24 Bindestelle 1 in einem Stem lokalisiert. Die Häufigkeit des Auftretens des besagten RNA-Abschnittes innerhalb eines Loop bzw. einer Junction ist für beide *DHFR*-Varianten unterschiedlich. So liegt die *DHFR* C-Variante häufiger innerhalb eines Loops, die U-Varianten hingegen öfter in einer Junction vor.

Die Ergebnisse der Analyse von 50 vorhergesagten Strukturen der Umgebung der miR-24 Bindestelle 2 (etwa 900 nt stromabwärts vom SNP gelegen) in Abhängigkeit der jeweiligen SNP-Variante sind in Tab. 5.15 aufgelistet. Der Großteil der berechneten Strukturen der DHFR-Varianten weisen keine strukturellen Unterschiede an den RNA-Positionen, die der der miR-24 Bindestelle 2 entsprechen, auf. Nur in vier der 50 verglichenen Strukturen weisen die DHFR-Sekundärstrukturen entsprechende Unterschiede an der miR-24 Bindestelle 2 auf.

Tabelle 5.15: Ergebnisse der DHFR Sekundärstrukturvorhersage der miR-24 Bindestelle 2.

Strukturkontext um miR-24 Bindestelle	DHFR C	DHFR U
Loop	29	25
Junction	1	5
Stem	15	15
Summe analysierter Strukturen	50	50

Aufgrund ihrer großen Entfernung vom SNP war eine Vorhersage der Struktur in der Umgebung der miR-24 Bindestellen 3 und 4 in Abhängigkeit der rs34764978-Variante mit einer maximalen mfold-Fenstergröße von 1400 nicht möglich. Die Ergebnisse der näher am SNP lokalisierten miR-24 Bindestelle 2 lassen jedoch vermuten, dass auch an den Positionen der miR-24 Bindestellen 3 und 4 die lokale Sekundärstruktur vom Auftreten des SNPs rs34764978 weitestgehend unbeeinflusst bleibt.

5.7.4 Sequenzanalyse der DHFR 3'-UTR

Eine nähere Analyse der *DHFR* mRNA-Sequenz im September 2011 ergab, dass laut *NCBI dbSNP* Datenbank¹⁷ bereits 418 SNPs für den Genabschnitt des humanen *DHFR*-Gens beschrieben sind. Im März 2012 waren es bereits 667. Die Positionen der in der DHFR 3'-UTR lokalisierten SNPs sind der Abb. 5.31 zu entnehmen. Die SNPs rs1643630 und rs11112 sind direkt innerhalb, eine Vielzahl der verbleibenden SNPs in unmittelbarer Umgebung einer der vier miR-24 Bindestellen lokalisiert.

¹⁷<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

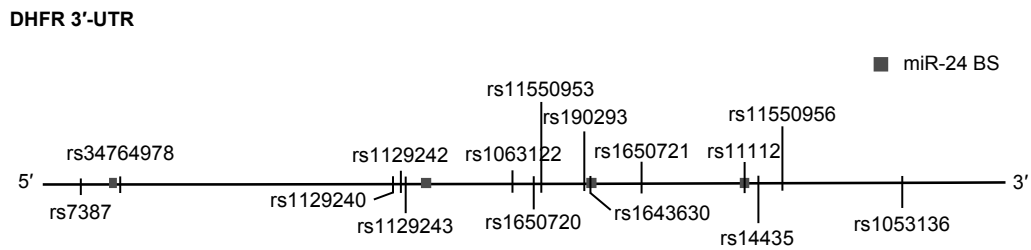


Abbildung 5.31: SNPs in der DHFR 3'-UTR. Dargestellt ist die DHFR 3'-UTR mit den bereits beschriebenen SNPs (Stand: September 2011).

5.7.5 Zusammenfassung und Fazit der DHFR-Analysen

Der SNP rs34764978 (C/T Polymorphismus) ist innerhalb der DHFR 3'-UTR 14 nt stromabwärts einer miR-24 Bindestelle lokalisiert. Die DHFR 3'-UTR ist mit fast 3 kb sehr lang und enthält stromabwärts vom SNP noch drei weitere potentielle miR-24 Bindestellen. Mishra *et al.* [149] konnten zeigen, dass das Vorhandensein der *DHFR* mRNA-Variante U zu einer verminderten miR-24 vermittelten Repression und einem damit einhergehenden Anstieg der DHFR Proteinmenge führt. Werden sowohl der SNP als auch die in unmittelbarer Nähe befindliche miR-24 Bindestelle näher betrachtet, so erscheint das mechanistische Modell der SNP-induzierten Strukturänderung vorab geeignet, um die von Mishra *et al.* beschriebenen Unterschiede der miR-24-vermittelten Regulation zwischen den DHFR-Varianten detaillierter zu erklären. Besonders vor dem Hintergrund, dass die publizierte Studie mit rekombinanten *DHFR* mRNAs durchgeführt wurde, deren 3'-UTR-Bereich nur die miR-24 Bindestelle 1 einschließt und für diese mittels mfold-Analyse strukturelle Unterschiede beobachtet wurden.

Für den Sequenzabschnitt der gesamten DHFR 3'-UTR wurden weiterhin bereits eine Vielzahl von SNPs beschrieben (NCBI dbSNP-Datenbank). Dementsprechend ergibt sich aus den Kombinationen dieser auch eine Vielzahl unterschiedlicher *DHFR* mRNA Sequenzen. Geht man davon aus, dass jeder SNP mit einer potentiellen Änderung der DHFR-Sekundärstruktur einher gehen kann, so gestaltet sich sowohl deren differenzierte *in silico* Strukturvorhersage als auch *in vitro* Strukturanalyse sehr schwierig. Es ist grundsätzlich denkbar, dass SNP-induzierte Strukturänderungen in relevanten Arealen der gesamten 3'-UTR die Zugänglichkeit für die miR-24 nachhaltig beeinflussen.

Das Vorliegen der großen Anzahl SNPs und der vier miR-24 Bindestellen über die gesamte 3'-UTR und die damit verbundene Komplexität der notwendigen Untersuchungen zur Analyse der miR-24-Interaktionen mit der gesamten DHFR 3'-UTR haben zu der Entscheidung geführt, im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren experimentellen Analysen im DHFR-System vorzunehmen.

Fazit

Die von Mishra *et al.* [149] beobachtete Assoziation des SNPs rs34764978 mit einer veränderten DHFR Regulation durch die miR-24 bot ein weiteres Beispiel einer miRNA-Dysregulation, die durch einen außerhalb der miRNA Bindestelle lokalisierten SNP verursacht wird. Die mittels mfold vorhergesagte Sekundärstruktur um den SNP und die 14 nt stromaufwärts davon lokalisierte miR-24 Bindestelle weisen auf eine mögliche mechanistische Beteiligung einer SNP-induzierten Strukturänderung hin. Die *in vitro* Daten von Mishra *et al.* wurden jedoch mit einer um 2,5 kb verkürzten DHFR 3'-UTR Sequenz erhoben. Es ist denkbar, dass diese eine im Vergleich zur endogenen DHFR 3'-UTR unterschiedliche miR-24 Regulation aufweist. Inwieweit das Vorkommen diverser weiterer SNPs innerhalb der DHFR 3'-UTR diese zusätzlich beeinflussen, bleibt offen und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher analysiert.

5.8 Untersuchungen im TCF21-System

5.8.1 Einführung

Der SNP rs12190287 (C/G Polymorphismus, C = Risiko-Allel) ist einer der bedeutendsten SNPs, für die mittels GWAS eine Assoziation mit Atherosklerose (auch CAD) detektiert wurde (p -Wert = $4,64 \cdot 10^{-11}$) (CARDIoGRAM, [23]). Der SNP ist innerhalb des Gens für den Transkriptionsfaktor 21 (TCF21¹⁸) in der 3'-UTR der *TCF21* mRNA lokalisiert.

Das *TCF21* Gen kodiert für ein Mitglied der Basic Helix-Loop-Helix Familie der Transkriptionsfaktoren (NCBI Entrez Gene), die die Entwicklung und Differenzierung einer großen Anzahl an Zelltypen regulieren [162]. Die TCF21 Expression umschließt mesenchymale Zellen sowohl an epithelial-mesenchymalen Interaktionsstellen des sich entwickelnden Respirations-, Gastrointestinal-, Urogenital- und Kardiovaskular-Systems als auch im Epikard, der äußeren Schicht des Herzens, welche die Ansätze der Koronararterien umfassen [162, 163].

Funktionelle Analysen, die eine Beteiligung von TCF21 an der Entstehung von CAD zeigen und somit eine Erklärung der Krankheitsassoziation des SNPs rs12190287 bieten, sind noch nicht publiziert. Eine durch den SNP-induzierte Veränderung der miR-224-vermittelte Regulation der TCF21 Genexpression ist denkbar, da der SNP direkt innerhalb einer Bindestelle für die miR-224 lokalisiert ist. Diese Vermutung wird dadurch verstärkt, dass für die miR-224 bereits eine Beteiligung an pathologischen Prozessen im kardiovaskulären System publiziert wurde. So ist eine Herunterregulation der miR-224 Expression bei ischämischer Kardiomyopathie [158] sowie eine erhöhte miR-224 Expression bei akutem Herzinfarkt [164] detektiert worden.

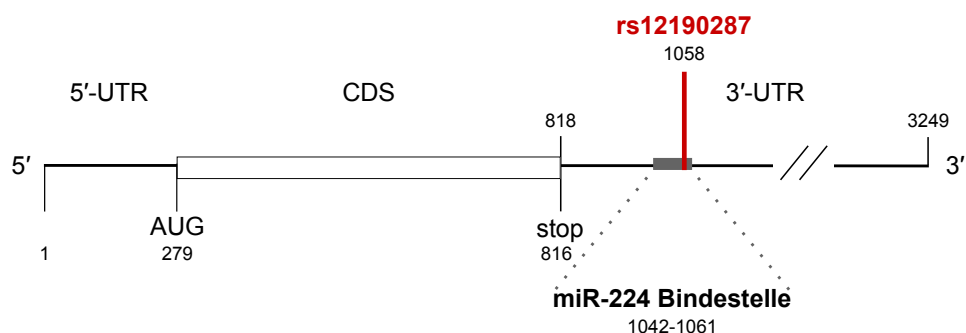


Abbildung 5.32: Lokalisation des SNPs rs12190287 innerhalb der miR-224 Bindestelle in der *TCF21* mRNA. Die *TCF21* mRNA ist schematisch mit ihrer 5'-UTR, CDS und 3'-UTR dargestellt. Der SNP befindet sich an mRNA Position 1058; die miR-224 Bindestelle umfasst die mRNA Positionen 1042-1061.

Die *TCF21* mRNA ist schematisch in der Abb. 5.32 gezeigt. Der SNP rs12190287 ist in

¹⁸auch Pod-1, Capsulin oder Epicardin

der TCF21 3'-UTR an mRNA Position 1058 und damit direkt innerhalb der Bindestelle für die miR-224 lokalisiert. Wie im Folgenden näher gezeigt, weist die TCF21 C-Variante einen C-G *match* zur miR-224 an der Position 4 ausgehend vom 5'-Ende der miRNA auf. Die TCF21 G-Variante hingegen ist an selbiger Position durch einen G-G *mismatch* gekennzeichnet.

5.8.2 Bindungsenergien

Die Bindungsenergien der TCF21-miR-224-Interaktionen (beider TCF21-Varianten mit beiden miR-224-Varianten) sind mittels RNAHybrid berechnet worden und in der Abb. 5.33 dargestellt.

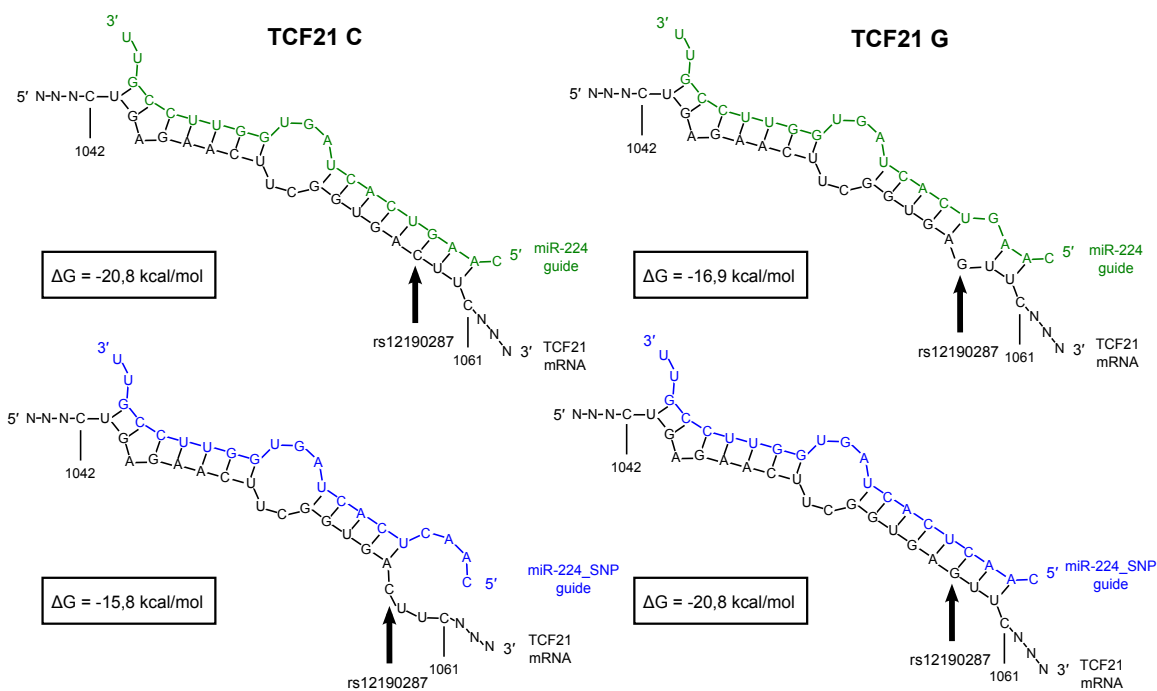


Abbildung 5.33: Lokale Bindungsenergien zwischen TCF21 rs12190287- und miR-224-Varianten. Spaltenweise Darstellung der Ergebnisse für die TCF21-Varianten (C links, G rechts) und zeilenweise die Unterteilung nach den miR-224-Varianten (oben: miR-224, unten: miR-224_SNP).

Die Bindungsenergien der TCF21 C-miR-224- sowie der TCF21 G-miR-224_SNP-Interaktion entsprechen einander ($\Delta G = -20,8$ kcal/mol). Dies lässt sich mit dem Vorhandensein eines G-C Basenpaares zwischen mRNA und miRNA an den SNP-Positionen erklären. Betrachtet man jedoch die Auswirkungen der Einführung eines *mismatches* im *seed* Bereich, sind die Bindungsenergien beider TCF21-Varianten reduziert. Dabei ist in Relation zur TCF21 G-miR-224-Interaktion für den *mismatch* zwischen TCF21 C und miR-224_SNP ein größerer Energieverlust zu verzeichnen ($\Delta\Delta G_{\text{TCF21 C}} = + 5$ kcal/mol, $\Delta\Delta G_{\text{TCF21 G}} = +3,9$ kcal/mol). Für die Bindung zwischen TCF21 C und miR-224_SNP zeigt sich zudem eine

deutliche Änderung in der berechneten Struktur der RNA-RNA-Interaktion im 5'-Bereich der miRNA. Der C-C *mismatch* an der SNP-Position führt dazu, dass in der berechneten Struktur des RNA-miRNA-Duplex sich die beiden Basenpaare an Position 2 und 3 ausgehend vom 5'-Ende der miRNA nicht mehr ausbilden.

5.8.3 Sekundärstrukturvorhersage

Für die systematische Vorhersage der Faltung der TCF21 rs12190287-Varianten wurden Sekundärstrukturen der TCF21 RNA mit verschiedenen Fenstergrößen (100, 200, 400 und 800) berechnet. Die Auswertung von insgesamt 180 analysierten Strukturen jeder TCF21-Variante ist in der nachstehenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 5.16: Ergebnisse der TCF21 Sekundärstrukturvorhersage.

SNP Position	TCF21 C	TCF21 G
gepaart	1	119
ungepaart	179	61
Summe analysierter Strukturen	180	180
Strukturkontext des SNP		
Stem	1	119
Loop	141	50
Bulge	38	11

Die vorhergesagten Strukturen der TCF21-Varianten weisen auf deutliche Unterschiede bezüglich der Lokalisation des SNPs hin. Während die SNP-Position der TCF21 C-Variante hauptsächlich ungepaart vorliegt, befindet sich das G vornehmlich in einem gepaarten Zustand. Eine detailliertere Betrachtung ergibt, dass die Umgebung des SNPs und der miR-224 Bindestelle der TCF21 C-Variante überwiegend innerhalb eines Loops vorhergesagt wird (78 %). Dem gegenüber steht die mehrheitliche Positionierung der SNP-Position der TCF21 G-Variante innerhalb eines Stems (66 % vs. 28 % Loop).

Die Abb. 5.34 zeigt nachstehend die separate Darstellung der Ergebnisse für die Vorhersage der einzelnen Fenstergrößen. Die für beide TCF21-Varianten spezifischen Strukturelemente in der Umgebung des SNPs bzw. der miR-224 Bindestelle waren mit allen vier Fenstergrößen zu beobachten. Weiterhin sind bereits für sehr kurze RNA-Ausschnitten die markanten Strukturelemente zu beobachten. Für die TCF21 C-Variante kann formuliert werden, je größer der betrachtete RNA-Ausschnitt desto höher ist auch der Anteil an Strukturen, in denen der SNP in einem Loop lokalisiert ist: Ab einer Länge von 200 Basen ergab die mfold-Analyse die mehrheitliche Vorhersage des SNPs der TCF21 C-Variante in einem Loop

(80 %); in 800 nt langen RNA-Abschnitten liegt der Loop-Anteil bei 94 %. Für die TCF21 G-Variante erfolgte die Vorhersage einer überwiegenden SNP-Positionierung in einem Stem. Dies trifft bereits für die kleinste in Anwendung gebrachte Fenstergröße (100 nt) zu.

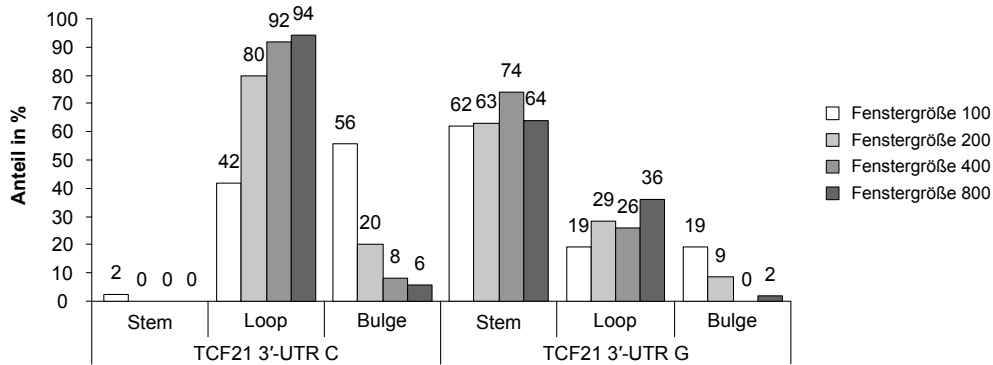


Abbildung 5.34: Prozentualer Anteil des jeweiligen Strukturkontextes der TCF21 SNP-Varianten gruppiert nach Fenstergröße dargestellt.

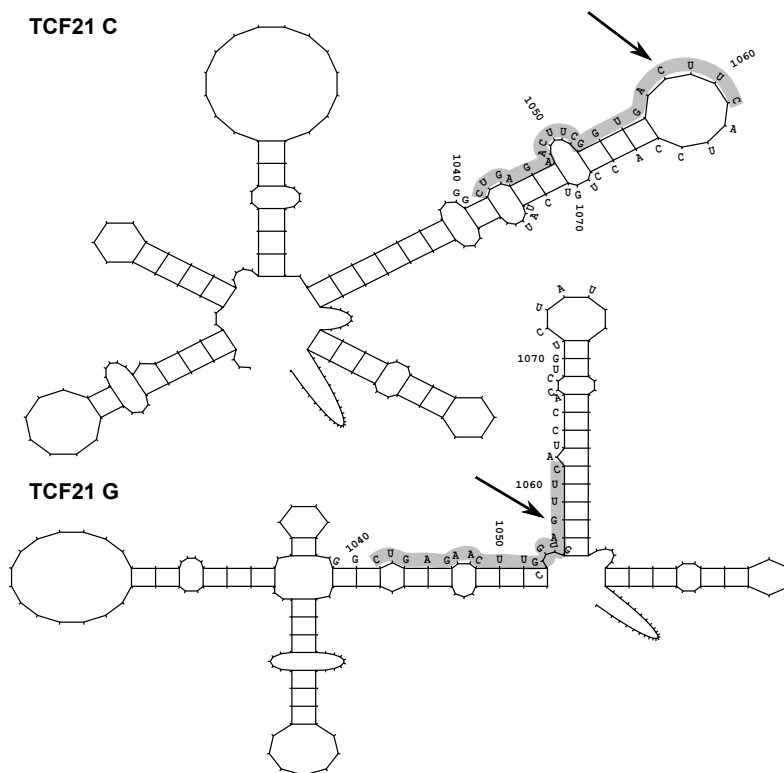


Abbildung 5.35: Vorhersage SNP-korrelierte Sekundärstrukturunterschiede zwischen den TCF21-Varianten. Die Grafik zeigt beispielhaft die Strukturvorhersage eines 200 nt Ausschnittes (mRNA Positionen 942-1141) der TCF21 C (oben) und TCF21 G (unten) Sequenz. Die SNP-Position ist durch Pfeile markiert und die miR-224 Bindestelle grau hinterlegt. Es zeigen sich deutliche Unterschiede sowohl in der globalen als auch lokalen Struktur um die SNP-Region.

Die Abb. 5.35 zeigt Beispiele der berechneten RNA-Sekundärstrukturen beider TCF21-Varianten, die die diskutierten Strukturunterschiede verdeutlichen.

5.8.4 Klonierung von TCF21 Reporter-gen-Konstrukten

Für weiterführende *in vitro* Analysen im TCF21 rs12190287-System wurden pmirGLO Reporter-gen-Konstrukte, die die gesamte TCF21 3'-UTR (C- bzw. G-Variante) enthalten, generiert. Dazu wurden zunächst Primer ausgewählt, die an ihren Enden die erforderlichen Restriktions-Schnittstellen aufweisen und die TCF21 3'-UTR-Sequenz flankieren (gemäß *NCBI* Referenz-Sequenz NM_198392.2¹⁹). Wie bereits im Zuge der Amplifikation der MRAS 3'-UTR konnte auch die TCF21 3'-UTR-Sequenz in ihrer Gesamtlänge nicht direkt mit den gewählten Primern gewonnen werden. Daher wurden über zusätzliche Primer zunächst Teilfragmente der TCF21 3'-UTR generiert. Deren Einsatz als Template ermöglichte die erfolgreiche Generierung des vollständigen TCF21 3'-UTR Inserts (siehe Abb. 5.36).

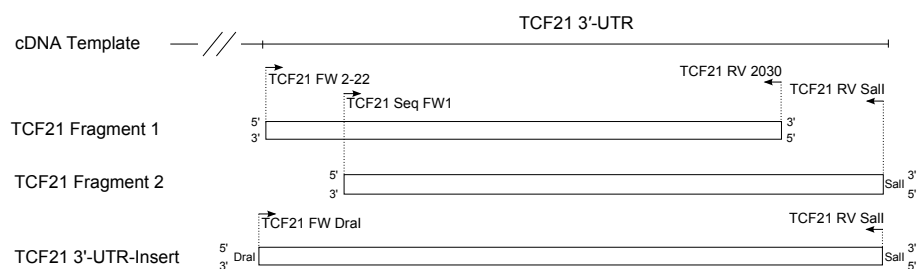


Abbildung 5.36: Generierung des Gesamtlänge TCF21 3'-UTR-Inserts über Teilfragmente. Die Amplifikation der gesamten TCF21 3'-UTR war nur über die Teilfragmente 1 und 2 möglich.

Die umfangreiche vergleichende mfold-Analyse der TCF21-Varianten ergab klare strukturelle Unterschiede. Die für die jeweilige Variante markanten Strukturelemente in der näheren SNP-Umgebung waren bei der Faltung aller, einschließlich auch sehr kurzer RNA-Abschnitte, beobachtbar. Dies lässt vermuten, dass auch kurze TCF21-Ausschnitte in der Lage sind, derartig spezifische Strukturen auszubilden und sich somit in Bezug auf die strukturelle Zugänglichkeit ähnlich zu entsprechend langen RNA-Abschnitten zu verhalten.

Zur Bestätigung dieser Annahme wurden zusätzliche TCF21 C- und G-Reporterplasmide hergestellt, die nur einen 200 nt langen Ausschnitt der 3'-UTR enthalten. Als Template für die Amplifikation der sogenannten „200er“ Inserts wurde Plasmid-DNA aus bestätigten Klonen der 3'-UTR-Inserts eingesetzt (siehe Abb. 5.37).

¹⁹http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_198392.2

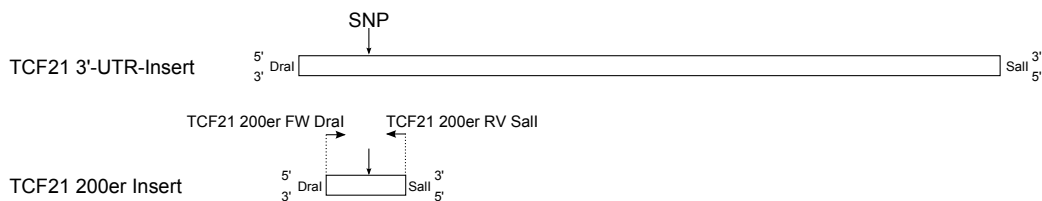


Abbildung 5.37: Generierung des verkürzten TCF21 3'-UTR-Inserts.

Als Ausschnitt wurden die 3'-UTR-Positionen 126-325 gewählt (entspricht mRNA-Positionen 942-1141). Die Faltung dieses Abschnittes ergab die in Abb. 5.35 dargestellten Strukturen. Das bedeutet, dass die vorhergesagte lokale Sekundärstruktur der SNP-Umgebung dieses kurzen RNA-Ausschnittes mit der entsprechend vorhergesagten Struktur eines 800 nt langen RNA-Ausschnittes vergleichbar ist.

5.8.5 Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die miRNA-vermittelte Regulation von TCF21

Zur Analyse der miRNA-vermittelten Repression der TCF21 rs12190287-Varianten wurden zunächst Ko-Transfektionen der TCF21 3'-UTR C- bzw. G-Reporter-Konstrukte mit der miR-224 bzw. miR-224_SNP in HeLa-Zellen durchgeführt. In der Abb. 5.33 sind die Komplementaritäten zwischen den TCF21-Sequenzen und miRNA *guide* Strängen dargestellt. Die miR-224 ist dadurch gekennzeichnet, dass sie an Position 4 ausgehend vom 5'-Ende der miRNA mit der TCF21-Variante C paart (C-G), das TCF21 G jedoch an dieser Position einen G-G *mismatch* aufweist. Durch Einführung eines G>C Basenaustausches innerhalb des miR-224 *guide* Strangs an der Position 4 wird die miR-224_SNP generiert. Diese bildet daraufhin einen G-C *match* mit der TCF21 G- jedoch einen C-C *mismatch* mit der TCF21 C-Variante an vorgenannter Position.

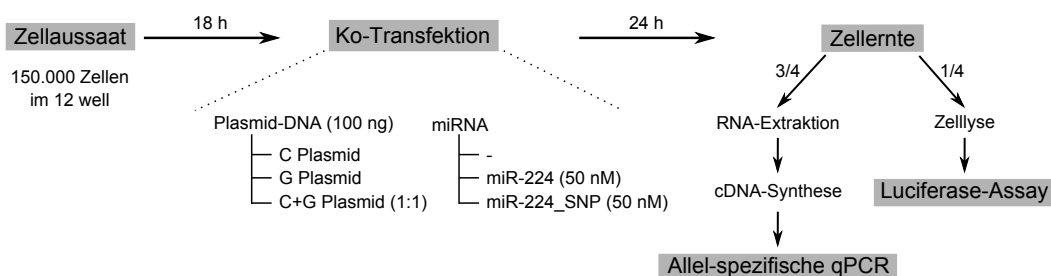


Abbildung 5.38: Versuchsablauf zur Untersuchung der miRNA-vermittelten Regulation von TCF21.

Der entsprechende Versuchsablauf ist in der Abb. 5.38 dargestellt. Die TCF21 Reporter-Plasmide wurden einzeln bzw. als 1:1 Gemisch mit miR-224 bzw. miR-224_SNP in HeLa-

Zellen transfiziert. Anschließend erfolgte eine Analyse der Hemmung der rekombinanten TCF21-Transkripte sowohl auf mRNA-Ebene mittels qPCR als auch auf Proteinebene durch Luciferase-Aktivitätsmessung.

Vorarbeiten zur Allel-spezifischen qPCR

Die Analyse der Allel-spezifischen Hemmung der TCF21-Transkripte erforderte vorab das Generieren spezifischer RV-Primer. Diese sollten in der Lage sein, zwischen den beiden, sich nur in einer Base unterscheidenden TCF21-Varianten zu diskriminieren. Das bedeutet, dass je ein Primerpaar die TCF21 C- bzw. TCF21 G-Sequenz amplifizieren soll. Da die entsprechenden Analysen mittels qPCR erfolgten, wurde eine Amplikonlänge von 262 bp gewählt.

Für beide PCRs wurde der TCF21 RT FW-Primer eingesetzt. Die RV-Primer wurden zunächst so gewählt, dass jeweils einer komplementär zum 3'-Ende der C-Variante bzw. zum 3'-Ende der G-Variante ist. Demzufolge bildet der TCF21 RT RV C-Primer am 3'-Ende einen *mismatch* zum TCF21 G-Template, der TCF21 RT RV G-Primer am 3'-Ende einen *mismatch* zum TCF21 C-Template. Jedoch verursachte der Einsatz beider RV-Primer eine Amplifikation beider Templates. Auch mit Hilfe von Modifikationen ausgewählter PCR-Bedingungen (u.a. Erhöhung der Annealing-Temperatur) ermöglichten diese Primer keine Allel-spezifische Amplifikation (Daten nicht gezeigt). Daher wurden neue RV-Primer mit einem zusätzlichen *mismatch* nahe des 3'-Endes generiert. Der Primer weist somit jeweils einen *mismatch* zum zu amplifizierenden Template, zwei *mismatches* zum anderen Template auf (siehe Abb. 5.39). Dieser zusätzlichen *mismatch* soll zu einer Destabilisierung der Bindung zum Template im 3'-Bereich und somit zu einer erhöhten Diskriminierungs-Wahrscheinlichkeit führen.

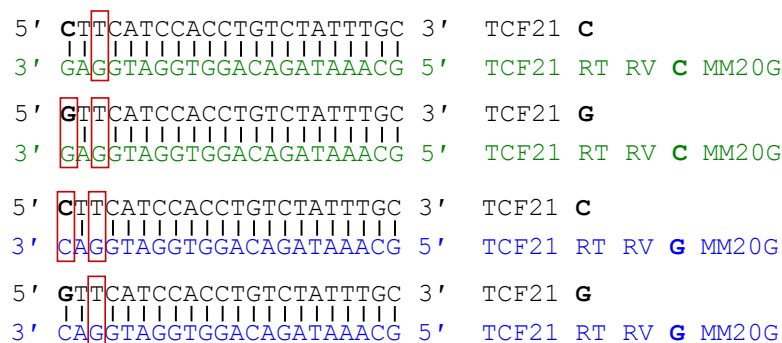


Abbildung 5.39: Primer zur Allel-spezifischen Amplifikation der TCF21-Varianten. Der TCF21 RT RV C MM20G-Primer dient zur spezifischen Amplifikation des TCF21 C- während der TCF21 RT RV G MM20G-Primer nur die G-Variante amplifizieren soll. Rot umrandet sind die *mismatches* zwischen dem TCF21 C- bzw. G-Template und dem entsprechenden Primer.

Der Einsatz der in Abb. 5.39 dargestellten Primer ermöglichte eine deutlich verbesserte Allel-spezifische Amplifikation. Die Abb. 5.40 zeigt das Ergebnis unter optimierten PCR-Bedingungen. Jeder der beiden spezifischen RV-Primer wurde zusammen mit dem FW-Primer und der pmirGLO TCF21 3'-UTR Plasmid-DNA (C- bzw. G-Variante) bzw. einem Gemisch aus beiden als Template in einer konventionellen PCR getestet.

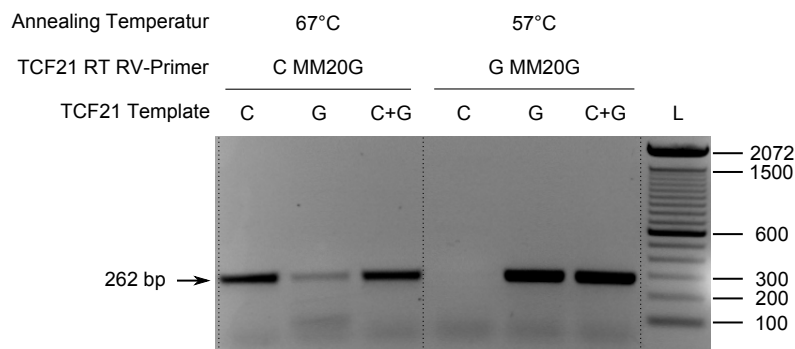


Abbildung 5.40: Allel-spezifische Amplifikation der TCF21-Varianten. Die Spezifität des TCF21 RT RV C MM20G- und TCF21 RT RV G MM20G-Primers (links bzw. rechts) wurde getestet, in dem ausschließlich 10 pg pmirGLO TCF21 3'-UTR C bzw. G Plasmid-DNA oder aber ein 1:1 Gemisch beider als Template in die PCR eingesetzt wurde. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung der Taq DNA-Polymerase. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 %-igen Agarosegel für 35 min bei 90 V aufgetrennt. Als Größenmarker diente die 100 bp Ladder von Invitrogen.

Der für das TCF21 C-Template spezifisch generierte Primer (TCF21 RT RV C MM20G) ist in der Lage, zwischen beiden Allelen zu unterscheiden, jedoch konnte im Ergebnis der Amplifikation auch ein schwaches PCR-Produkt mit dem TCF21 G als Template beobachtet werden. Die Anwendung des für die Amplifikation der TCF21 G-Variante spezifischen Primers (TCF21 RT RV G MM20G) ergab nur für die Reaktionen, in denen das G-Template vorlag, ein detektierbares PCR-Produkt. Dies kann mit dem Einführen eines C-C *mismatches* zwischen dem 3'-Ende des Primer und der C-Variante erklärt werden, denn C-C Duplexe weisen die geringste thermodynamische Stabilität auf [165]. Die Allel-Spezifität des C-Primers zeigt sich erst bei einer Annealing-Temperatur von 67 °C, wohingegen der G-Primer bereits bei 57 °C in der Lage ist, zwischen beiden Templates zu diskriminieren.

Auswertung der miRNA-vermittelten Hemmung von TCF21

Zur Berechnung der Menge an TCF21-Transkripten im Anschluss an die mit miR-224 bzw. miR-224_SNP durchgeführte Ko-Transfektion wurden definierte Mengen von TCF21-Template (pmirGLO TCF21 3'-UTR Plasmid-DNA) in die qPCR eingesetzt. Durch das graphische Auftragen der Kopienzahl gegen die gemessenen ct-Werte ergaben sich die in der Abb. 5.41 gezeigten Standardkurven (in halb-logarithmischer Darstellung). Unter Verwendung

der jeweiligen Gleichung der Regressionsgeraden wurde die Menge an TCF21 C- bzw. G-Transkripten in den Proben berechnet. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch endogene TCF21-Transkripte konnte durch Messung der untransfizierten HeLa-Zellen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde von jeder Probe die Expression des *house keeping* Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen.

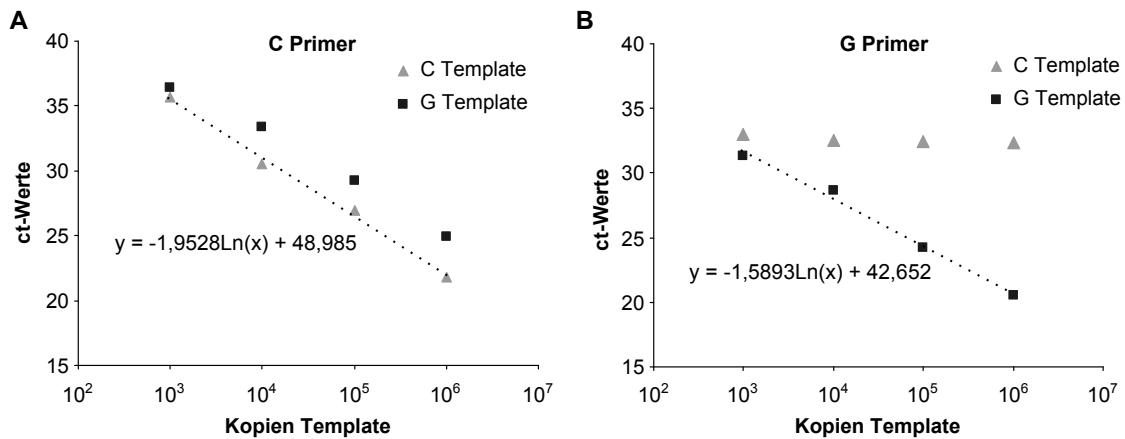


Abbildung 5.41: qPCR-Standardkurven zur Berechnung der TCF21-Transkriptmenge. Es wurden jeweils 10^3 - 10^6 Kopien Template in die qPCR eingesetzt und die ct-Werte bestimmt. (A) zeigt die Standardkurven für die Amplifikation beider TCF21-Templates mit dem TCF21 C MM20G-Primer als RV-Primer. In (B) sind die Standardkurven für die Amplifikation beider TCF21-Templates mit dem TCF21 G MM20G-Primer als RV-Primer dargestellt.

Verschiedene Faktoren können zu den im Folgenden diskutierten relative Änderung der TCF21 Transkriptmengen beigetragen haben. Die siRNA-vermittelte Regulation der Genexpression wird hauptsächlich über die Spaltung der Ziel-mRNA vermittelt. Im Gegensatz dazu induzieren miRNAs in der Regel eine translationale Hemmung, eine mRNA-Destabilisierung oder einen mRNA-Abbau und nur in seltenen Fällen eine mRNA-Spaltung (siehe Abb. 2.3). Eine Veränderung der gemessenen TCF21 Transkriptmengen kann also auf eine miRNA-vermittelte Beeinflussung der *TCF21* mRNA zurückzuführen sein. Auch Unterschiede in der Lokalisation der mRNA und damit deren Isolierbarkeit bzw. Nachweismöglichkeit ist denkbar.

Im Rahmen von Kontrollexperimenten wurde eine Kontamination der RNA-Extrakte mit Plasmid-DNA detektiert. Die Menge an gemessener Plasmid-DNA war in den unterschiedlichen Ansätzen (Transfektion der Plasmid-DNA ohne miRNA, Ko-Transfektion mit miR-224 bzw. miR-224_SNP) gleichmäßig (Daten nicht gezeigt). Die Absolutwerte der in Abb. 5.42 dargestellten Ergebnisse werden dadurch beeinflusst. Es ist jedoch anzunehmen, dass die relativen Unterschiede bestehen bleiben. Für eine Festigung der beobachteten Ergebnisse sind dennoch weitere Versuche nötig. So muss eine Beseitigung der Plasmid-DNA Kontami-

nation vorgenommen werden. Derartige Versuche wurden daher im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da aus Erfahrungen vorhergehender Projekte am IMM dies methodisch nicht als trivial anzusehen ist (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Georg Sczakiel). Unter der Annahme, dass die Befunde durch weitere Experimente erhärtet werden können, werden die im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Daten im Folgenden dargestellt und diskutiert.

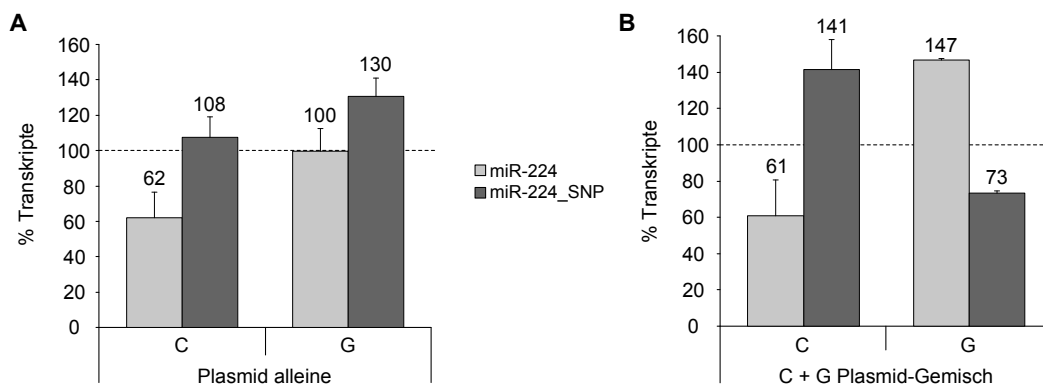


Abbildung 5.42: miRNA-vermittelte Hemmung von TCF21 auf Transkriptebene. Die TCF21 3'-UTR C- bzw. G-Reporterplasmide wurden einzeln (**A**) oder als Gemisch (**B**) in HeLa-Zellen mit 50 nM miR-224 bzw. miR-224_SNP ko-transfiziert (12-well-Format, 100 ng Plasmid-DNA). Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet, deren RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte das Einsetzen der cDNA in die qPCR. Die Anzahl der TCF21 C- bzw. G-Transkripte wurde mit Hilfe der Regressionsgeraden der Standardkurven berechnet. Die Transkript-Mengen sind in Relation zur Transfektion der Reporter-Plasmide ohne miRNA angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Diagramm-Legende gilt für beide Abbildungsteile.

Die Auswertung der Ko-Transfektion der einzeln transfizierten TCF21-Reporterplasmide mit miR-224 bzw. miR-224_SNP sind im Teil A der Abb. 5.42 gezeigt. Die Ko-Transfektion der miR-224 bewirkt eine Hemmung der TCF21 C Transkripte um ca. 40 %, die miR-224_SNP hingegen führt nicht zur Repression der TCF21 C Transkriptmenge. Die TCF21 G Transkripte werden von keiner der miR-224 Varianten gehemmt.

Die Ergebnisse der entsprechenden Ko-Transfektionen der Plasmid-Gemische sind im Teil B der Abb. 5.42 dargestellt. Auch in Anwesenheit des G Transkripts führt die miR-224 zu einer Reduktion der TCF21 C Transkriptmenge um etwa 40 %. Die Transfektion der halben Menge an TCF21 G Plasmid-DNA in Anwesenheit der identischen Menge an C Plasmid-DNA hat zur Folge, dass die miR-224_SNP einen hemmenden Einfluss auf die TCF21 G Transkriptmenge hat (Reduktion auf 73 %).

Es kann bisher nur spekuliert werden, warum eine miR-224_SNP-vermittelte Repression des TCF21 G Transkripts ausschließlich für die Transfektion des Plasmid-Gemisches detektiert werden konnte. Das Vorhandensein der halben TCF21 G Transkriptmenge und gleicher miR-224_SNP Konzentration (50 nM) lässt einen Dosis-Effekt vermuten. Bindet die miR-

224_SNP aufgrund der *seed* Komplementarität vorwiegend das TCF21 G Transkript, so ist ein verändertes stöchiometrisches mRNA-miRNA-Verhältnis, das zur beobachteten Reduktion der TCF21 G Transkripte führt, vorstellbar. Mittels weiterer Experimente, bei denen z.B. variierende Mengen an Plasmid-DNA bzw. miRNA transfiziert werden, könnten mögliche Dosis-Effekte näher untersucht werden.

Weiterhin offen ist, warum es nach miRNA-Transfektion in einigen Ansätzen zu einem relativem Anstieg der TCF21-Transkriptmenge kommt. So ist es denkbar, dass durch Variationen der Plasmid-DNA bzw. miRNA unterschiedliche intrinsische Faktoren beeinflusst werden können.

Die Ergebnisse der miRNA-vermittelten Hemmung der TCF21-Varianten auf Proteinebene sind in Abb. 5.43 dargestellt. Unabhängig davon, ob das TCF21 C-Plasmid einzeln oder als Gemischbestandteil transfiziert wurde, fällt die miR-224-vermittelte Hemmung der Luciferase-Aktivität stärker aus (18 bzw. 16 %). Die miR-224_SNP hingegen führt zu einer Repression der TCF21 C-Reporteraktivität um 3 %. Die TCF21 G-Variante zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen der miR-224- und miR-224_SNP-vermittelten Hemmung der Reporteraktivität (jeweils 92 % relative Luciferase-Aktivität).

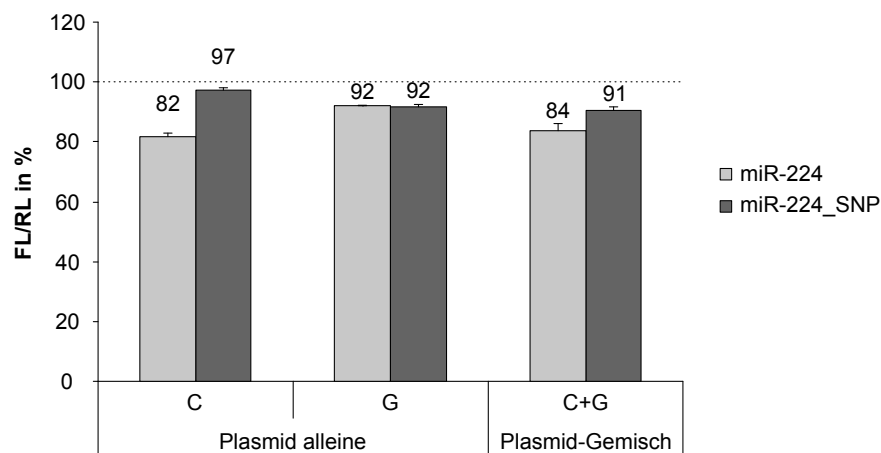


Abbildung 5.43: miRNA-vermittelte Hemmung von TCF21 auf Proteinebene. Die TCF21 3'-UTR C- bzw. G-Reporterplasmide wurden einzeln oder als Gemisch (12-well-Format, 100 ng Plasmid-DNA) in HeLa-Zellen mit 50 nM miR-224 bzw. miR-224_SNP ko-transfiziert. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Reporteraktivitäten gemessen. Die relativen firefly Luciferase-Aktivitäten (FL/RL) wurden auf Ansätze ohne miRNA (nur Plasmid-DNA) normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die vorstehenden Analysen zeigen, dass die beiden TCF21-Varianten Unterschiede in der miRNA-vermittelten Regulation aufweisen. Während die TCF21 C-Variante differentiell durch die beiden miR-224-Varianten reguliert wird, ist dies für die TCF21 G-Variante nicht zu beobachten. Im Vergleich zur miR-224_SNP wird eine deutlich stärkere Hemmung der TCF21 C-Variante, sowohl auf mRNA- als auch Protein-Ebene, durch die miR-224 vermittelt.

Die TCF21 G-Variante hingegen zeigt keine unterschiedliche Regulation durch die miR-224 bzw. miR-224_SNP. Für beide miRNAs war keine Hemmung auf Transkriptebene und eine vergleichbar schwache Hemmung auf Proteinebene zu verzeichnen.

Untersuchungen mit verkürzten TCF21 Reporter-Gen-Konstrukten

Mit Hilfe von weiteren Transfektions-Experimenten wurde analysiert, ob die für die TCF21 3'-UTR Gesamtlänge Reporter-Konstrukte erhaltenen Ergebnisse mit den verkürzten Reporter-Konstrukten reproduzierbar sind. Die Auswertung der miR-224- bzw. miR-224_SNP-vermittelten Repression der kurzen TCF21-Reporter erfolgte ausschließlich auf Proteinebene, d.h. nur mittels Luciferase-Aktivitätsmessung. Die Ergebnisse sind in der Abb. 5.44 gezeigt.

Es wird ersichtlich, dass auch die verkürzten TCF21-Varianten Unterschiede in ihrer Regulierbarkeit aufweisen. Die TCF21 C-Variante wird differentiell durch beide miRNAs gehemmt. Die TCF21 G-Variante hingegen zeigt eine nur geringfügig unterschiedliche Hemmung durch beide miRNAs.

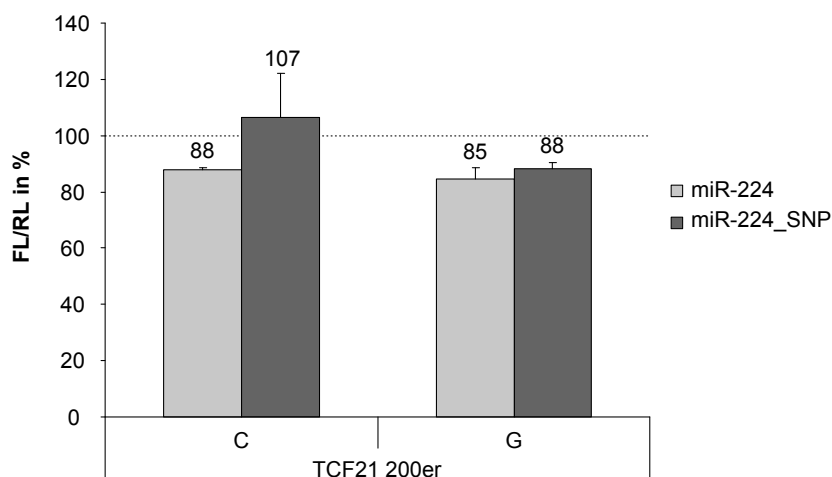


Abbildung 5.44: miRNA-vermittelte Hemmung der verkürzten TCF21-Reporter auf Proteinebene. Die verkürzten TCF21 C- und G-Reporterplasmide wurden in HeLa-Zellen (96-well Format, 10 ng Plasmid-DNA pro well) jeweils mit 50 nM miR-224 bzw. miR-224_SNP ko-transfiziert. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Reporteraktivitäten gemessen. Die relativen firefly Luciferase-Aktivitäten (FL/RL) wurden auf Ansätze ohne miRNA (nur Plasmid-DNA) normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammen mit den Ergebnissen der Gesamtlänge TCF21 Reporter-Konstrukten weisen die Analysen zur miRNA-vermittelten Regulation von TCF21 darauf hin, dass die beobachteten Unterschiede nicht ausschließlich anhand der in Abb. 5.33 gezeigten Bindungsenergien zwischen mRNA und miRNA erklärt werden können, sondern ein zusätzlicher Einfluss der

Sekundärstruktur angenommen werden kann.

5.8.6 Untersuchungen zur Rolle des SNPs auf die siRNA-vermittelte Regulation von TCF21

Zur Analyse des Einflusses des SNPs rs12190287 auf die siRNA-vermittelte Regulation von TCF21 wurden die TCF21 3'-UTR Reporterplasmide mit siRNAs ko-transfiziert. Diese Untersuchungen dienen der Fragestellung, ob für die siRNA-vermittelte Regulation der TCF21-Varianten eine differentielle Struktur-Funktions-Beziehung beobachtet werden kann.

Die Ziel-Sequenz der verwendeten siRNAs ist identisch mit der der miR-224-Erkennungsstelle. Die folgende Abbildung zeigt die Komplementaritäten zwischen TCF21- und siTCF21-Varianten.

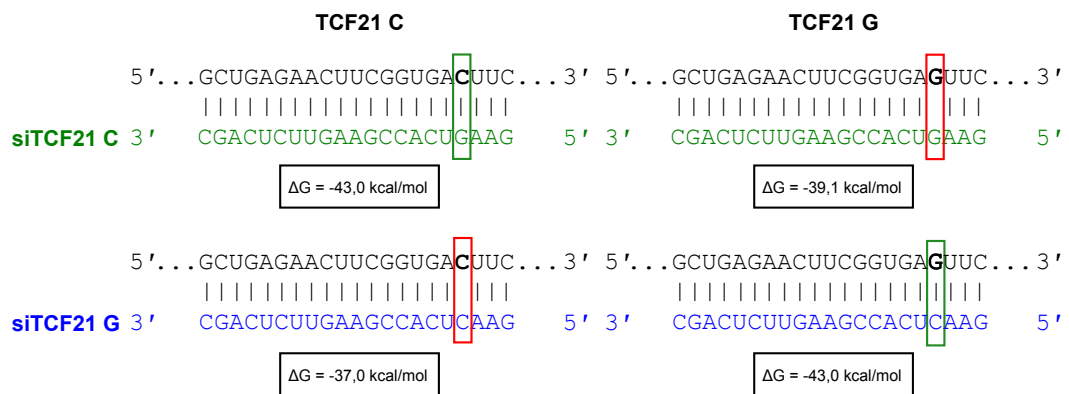


Abbildung 5.45: Komplementarität der TCF21-Varianten zur siTCF21 C und siTCF21 G. Die siTCF21 C ist durch eine zur TCF21-Variante C 100 %-ige Komplementarität gekennzeichnet. Die TCF21 G-Variante weist hingegen an Position 4 ausgehend vom 5'-Ende der siRNA einen G-G *mismatch* auf. Durch Einführung eines G>C Basenaustausches an der Position 4 innerhalb des siTCF21 C *guide* Stranges wird die siTCF21 G generiert. Diese ist vollständig komplementär zur TCF21 G-Variante, weist jedoch einen C-C *mismatch* mit der TCF21 C-Variante auf. Die angegebenen Bindungsenergien wurden mittels RNAHybrid bestimmt.

TCF21 3'-UTR-Reporter wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an siTCF21 C bzw. siTCF21 G ko-transfiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.46 dargestellt. Für alle TCF21-siRNA Kombinationen ist eine konzentrationsabhängige Hemmung der Luciferase-Aktivität zu beobachten. Beide TCF21-Varianten werden von ihrer 100 % komplementären siRNA stärker gehemmt, jedoch wird in Relation zum TCF21 G das TCF21 C in jeder siRNA-Konzentrationsstufe stärker gehemmt. Ein Vergleich der siRNA-vermittelten Hemmung des jeweiligen TCF21-Reporters, der einen *mismatch* zur entsprechenden siRNA aufweist (d.h. TCF21 G-siTCF21 C und TCF21 C-siTCF21 G), verdeutlicht, dass auch in diesem Fall die siTCF21 C eine stärkere Repression der Luciferase-Aktivität verursacht.

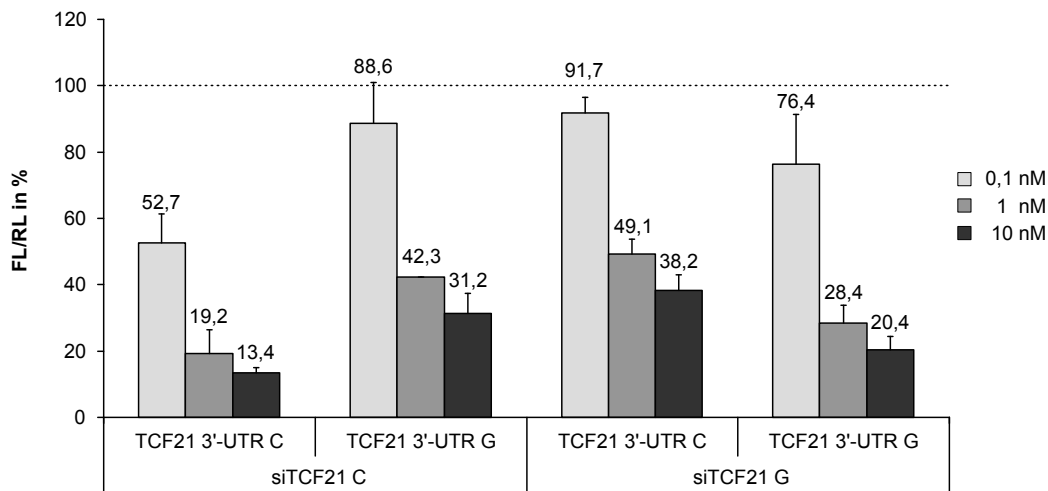


Abbildung 5.46: Hemmung der Expression von TCF21 3'-UTR Luciferase-Reportern durch siRNAs. HeLa-Zellen wurden im 96-well Format mit je 10 ng TCF21 3'-UTR Reporterplasmid (pmirGLO TCF21 3'-UTR C bzw. G) und steigenden Konzentrationen an siTCF21 C bzw. G ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und anschließend die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Die relativen firefly Luciferase-Aktivitäten (FL/RL) wurden auf Ansätze ohne siRNA (nur Plasmid-DNA) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen zweier unabhängiger Experimente.

Die Ergebnisse der siRNA-vermittelten Repression der TCF21-Varianten können nur zum Teil mit den Bindungsenergien zwischen der Ziel-RNA und dem siRNA *guide* Strang erklärt werden. Die TCF21 C-siTCF21 G-Interaktion, die durch den C-C *mismatch* den größten Energieverlust (siehe Abb. 5.45) aufweist, zeigt auch durchweg die geringste Hemmung im Reporter-Assay. Trotz gleicher Bindungsenergien für die jeweils 100 % komplementären Bindungen weisen beide TCF21-Varianten jedoch eine differenzierte Repression auf. Dies lässt vermuten, dass auch die siRNA-vermittelte Regulation von TCF21 von strukturellen Unterschieden der TCF21-Varianten geprägt ist.

5.8.7 RNA-Strukturprobung

Zur Durchführung des TCF21-Strukturprobings wurden zunächst *in vitro* Transkripte der gesamten TCF21 3'-UTR-Sequenz sowie des zuvor beschriebenen, 200 nt langen Ausschnittes generiert (siehe Abb. 5.47).

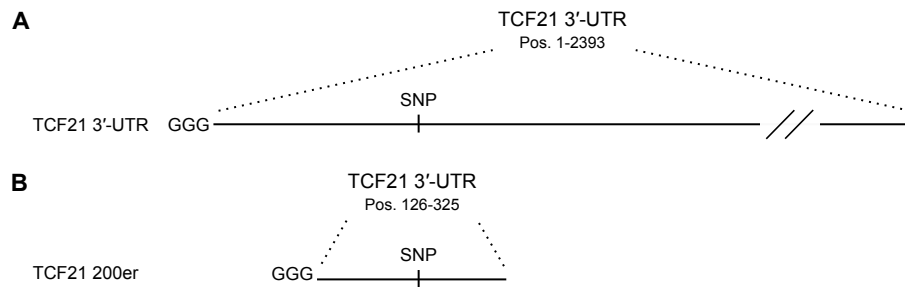


Abbildung 5.47: Schematische Darstellung der verwendeten TCF21 *in vitro* Transkripte. (A) Gesamtlänge und (B) verkürztes TCF21 *in vitro* Transkript.

Zunächst wurden die Gesamtlängen-*in vitro* Transkripte eingesetzt, um eine vergleichende RNA-Hydrolyse der TCF21 3'-UTR C- bzw. G-Variante vorzunehmen. Wie zuvor beschrieben, wurden dafür die *in vitro* Transkripte durch chemische und enzymatische Hydrolyse gespalten, die Spaltprodukte in cDNA umgeschrieben und gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.2.15). Die Ergebnisse sind in der Abb. 5.48 gezeigt.

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der Pb^{2+} -Hydrolyse (Abb.-Teil A), so sind deutliche Unterschiede zwischen den beiden TCF21-Varianten zu erkennen. Die RNA-Positionen 1068-1069 der TCF21 3'-UTR G- in Relation zur C-Variante werden sichtlich stärker gespalten. Demgegenüber ist das 3'-Ende der miR-224 Bindestelle (Positionen 1058-1064) des TCF21 3'-UTR C *in vitro* Transkripts wesentlich zugänglicher für eine Pb^{2+} -vermittelte Hydrolyse. Diese Beobachtungen bestätigen die mittels mfold erzielten Ergebnisse zu den TCF21-Sekundärstrukturen (siehe 5.35). Hier wurde dieser Abschnitt für die C-Variante innerhalb eines großen Loops, die G-Variante innerhalb eines Stems vorhergesagt. Das 5'-Ende der TCF21 G miR-224-Erkennungssequenz (Positionen 1045-1049) weist zusätzliche, schwache Pb^{2+} -induzierte Spaltprodukte auf.

Auch die RNase T1-vermittelte RNA-Hydrolyse (Abb.-Teil C) zeigte Unterschiede in den Spaltmustern beider TCF21 3'-UTR-Varianten. Die gesamte Auftrennung der Hydrolyse mit der größten eingesetzten RNase T1-Menge (2 u) zeigt für das TCF21 3'-UTR G *in vitro* Transkript deutlich schwächere Spaltprodukte. Dies lässt eine gesteigerte Hydrolyse der initialen Spaltprodukte vermuten. Daher werden im Folgenden ausschließlich die Ergebnisse der mittels geringerer RNase T1-Mengen (0,25 und 1 u) durchgeführte Hydrolyse betrachtet. Während die Positionen 1041 und 1046 noch vergleichbare Intensitäten der Spaltprodukte aufweisen, wird an Position 1053 bereits bei kleinster RNase T1-Menge (0,25 u) ein deutlich stärkeres Spaltprodukt für die TCF21 G-Variante detektiert. Die Spezifität der RNase T1, die RNA ausschließlich an Guaninen zu spalten, erklärt das Auftreten eines zusätzlichen Spaltproduktes an der SNP-Position (1058) für das TCF21 G *in vitro* Transkript. Zudem ergibt die Hydrolyse des Guanins an Position 1070 ein für die C-Variante des TCF21 *in vitro* Transkripts stärkeres Spaltprodukt.

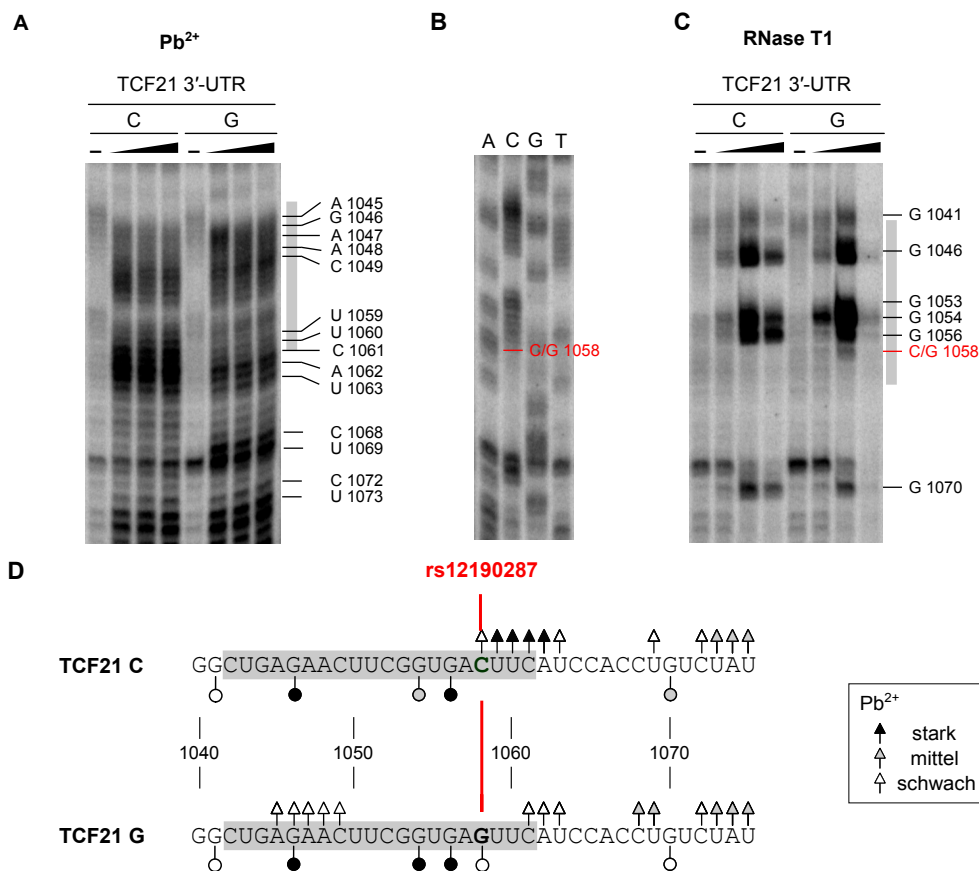


Abbildung 5.48: Strukturprobung der TCF21 3'-UTR-Varianten zeigt unterschiedliche Spaltmuster. Die TCF21 3'-UTR *in vitro* Transkripte C und G wurden durch Pb²⁺ bzw. RNase T1 hydrolysiert und die Spaltprodukte durch Primer-Extension mit anschließender denaturierende PAGE detektiert. In (A) sind die Ergebnisse der Pb²⁺-Hydrolyse, in (B) die der Sequenzier-Reaktion des G *in vitro* Transkripts sowie in (C) die der RNase T1-Hydrolyse gezeigt. Die SNP-Position ist mit „C/G 1058“ bezeichnet und die Lokalisation der miR-224 Bindestelle durch graue Balken angedeutet. In (D) sind die TCF21 RNA-Sequenzen mit den beobachteten Spaltstellen annotiert. Oberhalb der jeweiligen Sequenz sind die Pb²⁺-Spaltstellen (Dreiecke), unterhalb die RNase T1-Spaltstellen (Kreise) gezeigt. Die Stärke der Hydrolyse drückt sich in der Farbtiefe der Symbole aus (weiß = schwach, grau = mittel und schwarz = stark). Die SNP-Position ist durch rs12190287 gekennzeichnet. Die miR-224 Bindestelle ist grau hinterlegt.

Strukturprobung mit verkürzten TCF21 *in vitro* Transkripten

Der folgende Versuch diente der Beantwortung der Frage, ob die Sekundärstruktur-Unterschiede der TCF21 3'-UTR-Varianten auch unter Verwendung verkürzter TCF21 Sequenz-Ausschnitte detektiert werden können. Dies kann zudem auf eine ähnliche Faltung der RNAs in der Region um den SNP hinweisen. Das Strukturprobung mit den verkürzten *in vitro* Transkripten erfolgte in Analogie zu den Versuchen mit Gesamtlänge TCF21 3'-UTR *in vitro* Transkripten. Die Ergebnisse sind in der Abb. 5.49 gezeigt.

Bis auf wenige Ausnahmen sind alle markanten Unterschiede der Spaltmuster der TCF21 C und G Gesamtlänge *in vitro* Transkripte auch für die verkürzten Transkript-Varianten detektierbar (siehe rote Umrandung in Abb. 5.49, vgl. Abb. 5.48). Diese Resultate legen zum einen nahe, dass die Sekundärstrukturen in der SNP-Umgebung der unterschiedlich langen TCF21-RNAs einander ähneln. Andererseits bestätigen sie aber auch die bereits für sehr kleinen RNA-Ausschnitte beobachteten, wiederkehrenden Strukturelemente im Zuge der Sekundärstrukturvorhersage.

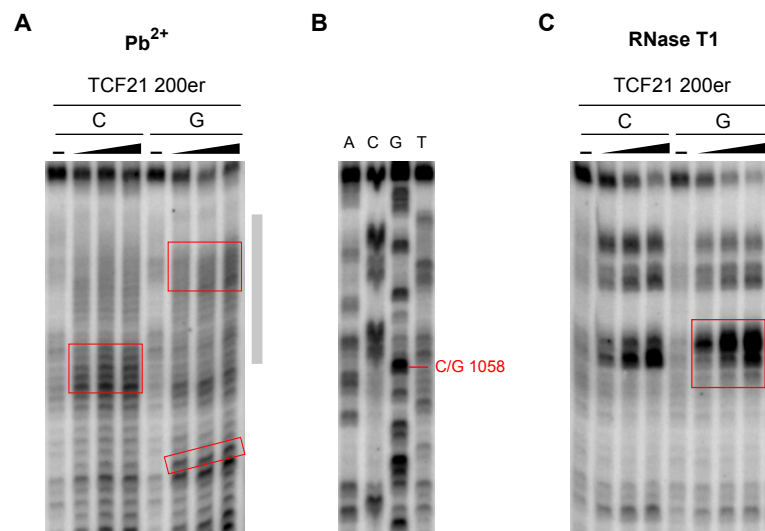


Abbildung 5.49: Strukturprobung der verkürzten TCF21 *in vitro* Transkript-Varianten zeigt ebenfalls unterschiedliche Spaltmuster. Die 200 nt langen TCF21 *in vitro* Transkripte C und G wurden durch Pb²⁺ bzw. RNase T1 hydrolysiert und die Spaltprodukte durch Primer-Extension und anschließende denaturierende PAGE detektiert. Gezeigt sind die Ergebnisse für Pb²⁺-Hydrolyse (A), für die Sequenzier-Reaktion des C *in vitro* Transkripts (B) und die der RNase T1-Hydrolyse (C). Die SNP-Position ist mit „C/G 1058“ gekennzeichnet, die Lokalisation der miR-224 Bindestelle durch graue Balken angedeutet. Rot umrandet sind die markanten Unterschiede.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vergleichenden Analysen der chemischen und enzymatischen Hydrolyse beider TCF21 3'-UTR *in vitro* Transkripte (Gesamtlänge und verkürzte Varianten) deutliche Unterschiede bezüglich der detektierten Spaltprodukte aufweisen. Diese Ergebnisse stützen die bereits mittels mfold-Analyse gemachte Beobachtung einer durch den SNP rs12190287 induzierten Veränderungen in der lokalen RNA-Struktur der TCF21 3'-UTR.

5.8.8 Kinetik der Bindung von miRNAs an TCF21 RNA *in vitro* Transkripte

Im folgenden Abschnitt werden *in vitro* Analysen von RNA-miRNA-Interaktionen im TCF21-miR-224 System näher erläutert. Diese Studien dienen der Fragestellung, ob beide TCF21-Varianten unterschiedliche Bindungsaffinitäten zur jeweiligen miR-224-Variante besitzen und

5 Ergebnisse

diese experimentell nachweisbar sind.

Zunächst wurden die TCF21 3'-UTR *in vitro* Transkripte entweder mit der miR-224 bzw. miR-224_SNP in Anwesenheit von CTAB inkubiert und in Hinblick auf die Bildung von Komplexen zwischen RNA und miRNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert (siehe Abb. 5.50).

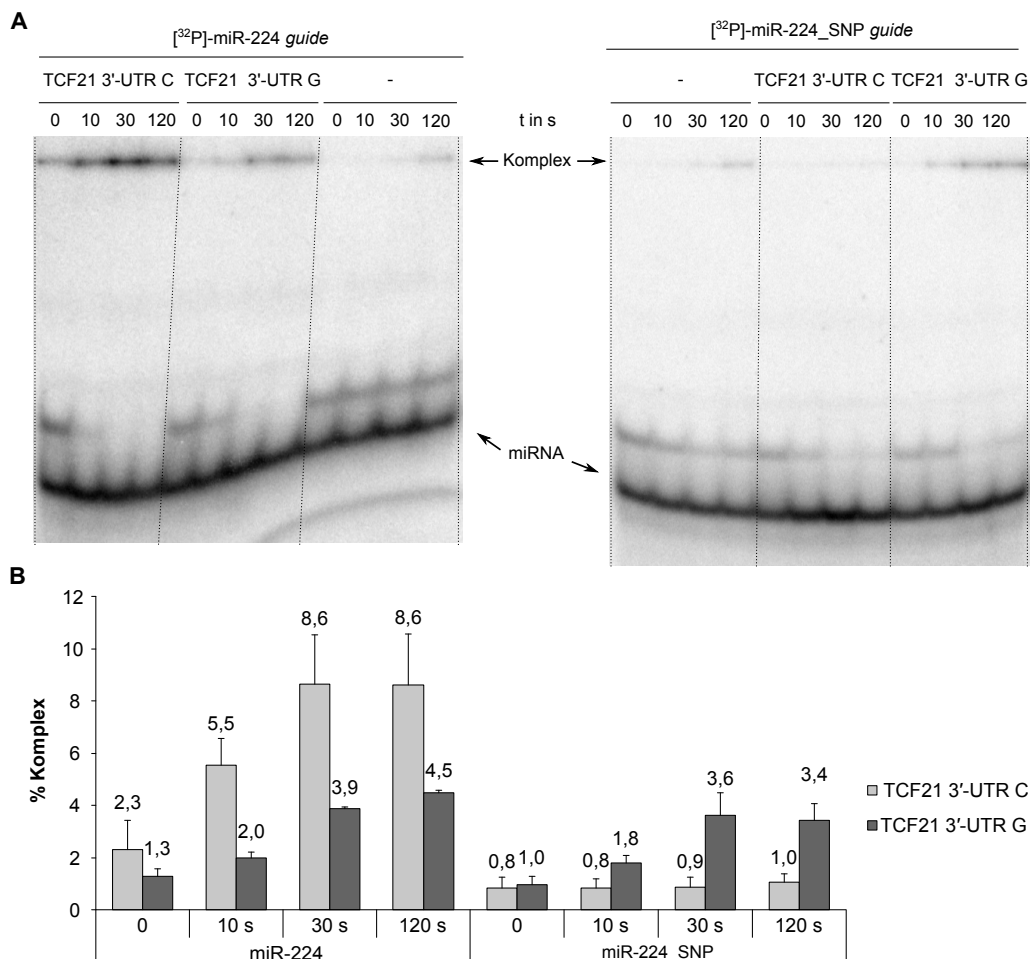


Abbildung 5.50: Unterschiedliche Kinetik der Komplexbildung der TCF21 3'-UTR-Varianten mit miR-224 und miR-224_SNP. TCF21 3'-UTR C bzw. G *in vitro* Transkripte (5 nM) wurden mit miR-224 bzw. miR-224_SNP *guide* Strang (0,5 nM) in Anwesenheit von 10 mM CTAB für 0-120 s bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne *in vitro* Transkript. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Proben bei 4 °C und 150 V auf einem 8 %-igen, nativen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. **(A)** Gele, **(B)** Quantifizierung der Komplexe. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse zeigen zeitabhängige Zunahmen an RNA-RNA-Komplexen mit deutlichen Unterschieden zwischen den beiden TCF21-Varianten. Von allen möglichen Kombinationen bildet das TCF21 C *in vitro* Transkript die stärksten Komplexe mit der miR-224. Unter Ver-

wendung der miR-224_SNP hingegen ist keinerlei Komplexbildung detektierbar. Im Gegensatz dazu bildet das TCF21 G *in vitro* Transkript mit beiden miRNA-Varianten annähernd gleich starke Komplexe. Der *mismatch* zwischen Ziel-RNA und miRNA im *seed* Bereich hat also für die TCF21 C-Variante im Umkehrschluss einen deutlich messbaren Einfluss auf die Bindung der miR-224_SNP nicht aber für die TCF21 G-miR-224-Interaktion. Die *seed-match* Interaktion des TCF21 C *in vitro* Transkripts mit der miR-224 bildet deutlich stärkere Komplexe im Vergleich zur TCF21 G-miR-224_SNP-Interaktion. Es ist vorstellbar, dass durch die offene Struktur der TCF21 C SNP-Region (siehe Abb. 5.35) der *mismatch* zur miR-224_SNP einen größeren Einfluss auf die RNA-RNA-Wechselwirkung hat. In Folge des C-C *mismatch* scheint es sterisch schwieriger, die Paarung mit den miRNA-Basen 2 und 3 ausgehend vom 5'-Ende einzugehen. Dadurch wird die Wechselwirkung beider RNAs am 5'-Ende der miRNA deutlich destabilisiert, was dazu führen kann, dass keine Komplexe detektierbar sind.

Der anschließend durchgeführten Versuch des Annealings von TCF21 und miR-224 in Abwesenheit von CTAB (siehe Abb. 5.51) ergab ähnliche Verläufe der Komplexbildung. Für die Reaktionen mit der miR-224 ist erneut eine favorisierte Komplexbildung mit der TCF21 C-Variante sichtbar. Im Vergleich zur TCF21 G-Variante ist zu jedem Zeitpunkt der Probenentnahme eine deutlich stärkere Komplexbildung zwischen dem C *in vitro* Transkript und der miR-224 detektierbar.

Die aus den Annealing-Daten berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen von TCF21 3'-UTR *in vitro* Transkript mit der entsprechenden miRNA sind in der Tab. 5.17 zusammengefasst. Die größte Ratenkonstante, sowohl mit als auch ohne CTAB, ist jeweils für die TCF21 C *in vitro* Transkript-miR-224-Interaktion zu verzeichnen. Die Ratenkonstante der TCF21 G-miR-224_SNP-Interaktion konnte nicht bestimmt werden, da ein linearer Verlauf der Komplexbildung nicht detektierbar war. Die Bildung der Komplexe des TCF21 G *in vitro* Transkripts mit beiden miR-224-Varianten ergab in Anwesenheit von CTAB nahezu identische Ratenkonstanten. Der Vergleich des Annealings in An- bzw. Abwesenheit von CTAB zeigt, dass das Annealing der miR-224 an beide TCF21-Varianten etwa um den Faktor 60 beschleunigt wird. Das miR-224_SNP Annealing an das TCF21 G *in vitro* Transkript wird durch CTAB um das ca. 170-fache beschleunigt.

Tabelle 5.17: Ratenkonstanten des miRNA-Annealings der TCF21 3'-UTR-Varianten in An- und Abwesenheit von CTAB (siehe Abb. 5.50 und 5.51). (n.d. nicht detektierbar)

<i>in vitro</i> Transkript	miRNA	CTAB		Faktor
		+	-	
		k ($M^{-1}s^{-1}$)	k ($M^{-1}s^{-1}$)	
TCF21 3'-UTR C	miR-224	$2,2 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^4$	67
	miR-224_SNP	n.d.	n.d.	n.d.
TCF21 3'-UTR G	miR-224	$1,4 \cdot 10^6 \pm 2,6 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^4$	61
	miR-224_SNP	$1,4 \cdot 10^6 \pm 3,2 \cdot 10^5$	$8,4 \cdot 10^3$	167

5 Ergebnisse

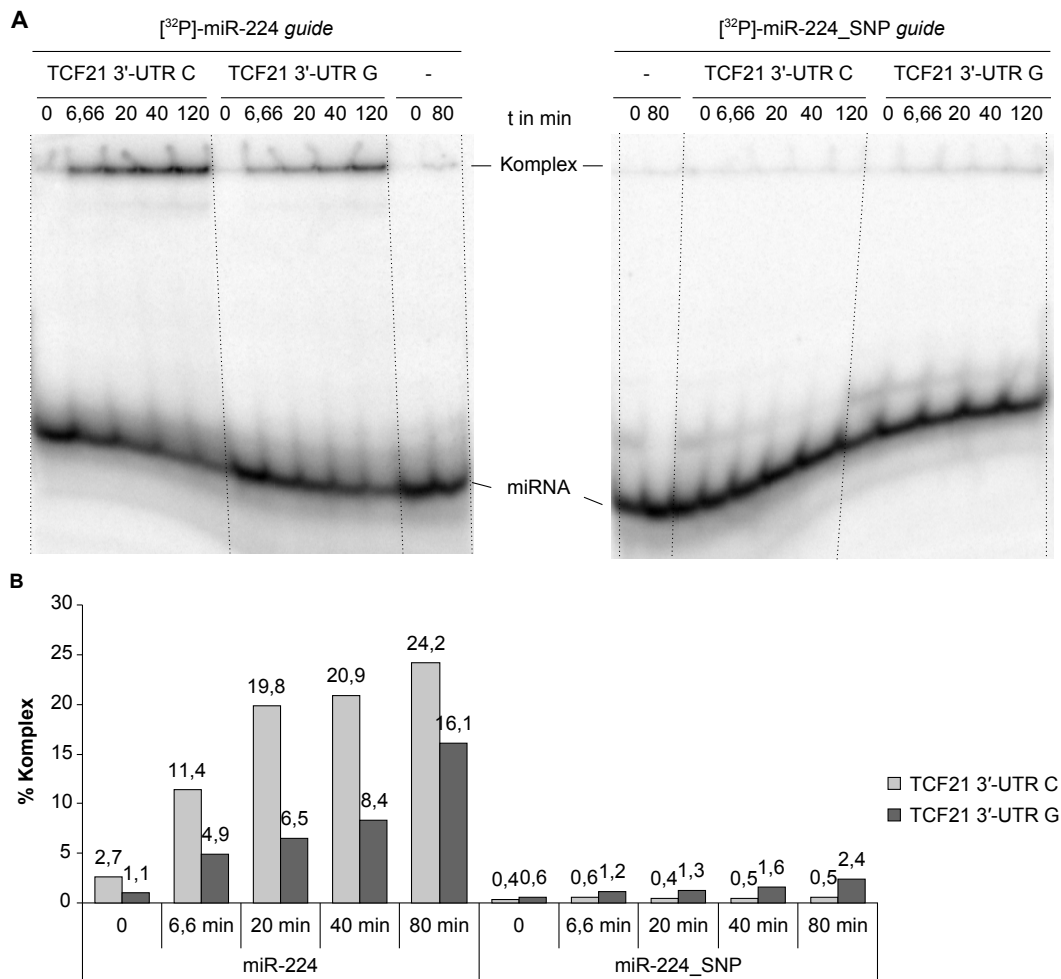


Abbildung 5.51: Unterschiedliche Kinetik der Komplexbildung der TCF21 3'UTR Varianten mit miR-224 und miR-224_SNP in Abwesenheit von CTAB. TCF21 3'-UTR C bzw. G *in vitro* Transkripte (25 nM) wurden mit miR-224 bzw. miR-224_SNP guide Strang (0,5 nM) in Abwesenheit von CTAB für 0-80 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne *in vitro* Transkript. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Proben bei 4 °C und 150 V auf einem 8 %-igen, nativen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Gele, (B) Quantifizierung der Komplexe.

Die Ergebnisse des RNA-RNA-Annealings weisen darauf hin, dass nicht nur thermodynamische (*seed-match* vs. *seed-mismatch*) sondern auch strukturelle Unterschiede eine Rolle für die differentielle miRNA-Regulation der TCF21-Varianten spielen.

Zur Überprüfung der Spezifität der zwischen der TCF21-RNA und der miR-224 beobachteten Komplexbildung wurden die miR-224 mit weiteren *in vitro* Transkripten bzw. andere miRNAs mit dem TCF21 C *in vitro* Transkript inkubiert. Die Resultate dieser Kontrollversuche sind in der Abb. 5.52 dargestellt. Im Abbildung-Teil A ist zu erkennen, dass das TCF21 *in vitro* Transkript den stärksten Komplex mit der miR-224 bildet. Im Vergleich zur Negativkontrolle (kein *in vitro* Transkript) bildet das AGTR1 *in vitro* Transkript keine Komplexe mit

der miR-224, das ICAM-1 *in vitro* Transkript hingegen zeigt eine schwache Komplexbildung.

Auch der zweite Kontrollversuch (Abbildungsteil B) bestätigt die Spezifität der TCF21-miR-224-Komplexbildung. Die miR-224 weist unter allen getesteten Kombinationen aus TCF21 und miRNA die stärksten Komplexe auf. Trotz einer nur schwachen Komplexbildung der miR-24 mit dem TCF21 *in vitro* Transkript, wird mittels microRNA.org-Algorithmus eine Erkennungsstelle für die miR-24 in der TCF21 3'-UTR vorhergesagt. Diese Vorhersage konnte durch eine TargetScan-Vorhersage nicht bestätigt werden. Trotz vergleichbarer Bindungsenergien zur TCF21 C-miR-224-Interaktion ($\Delta G_{\text{miR-224}} = -20,8 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_{\text{miR-24}} = -20,5 \text{ kcal/mol}$) ist die TCF21-miR-24-Komplexbildung deutlich schwächer ausgeprägt. Dies kann mit unterschiedlichen Zugänglichkeiten im entsprechenden RNA-Bereich der miRNA-Bindestellen erklärt werden und lässt somit den Schluss zu, dass die miR-224 Bindestelle deutlich zugänglicher ist.

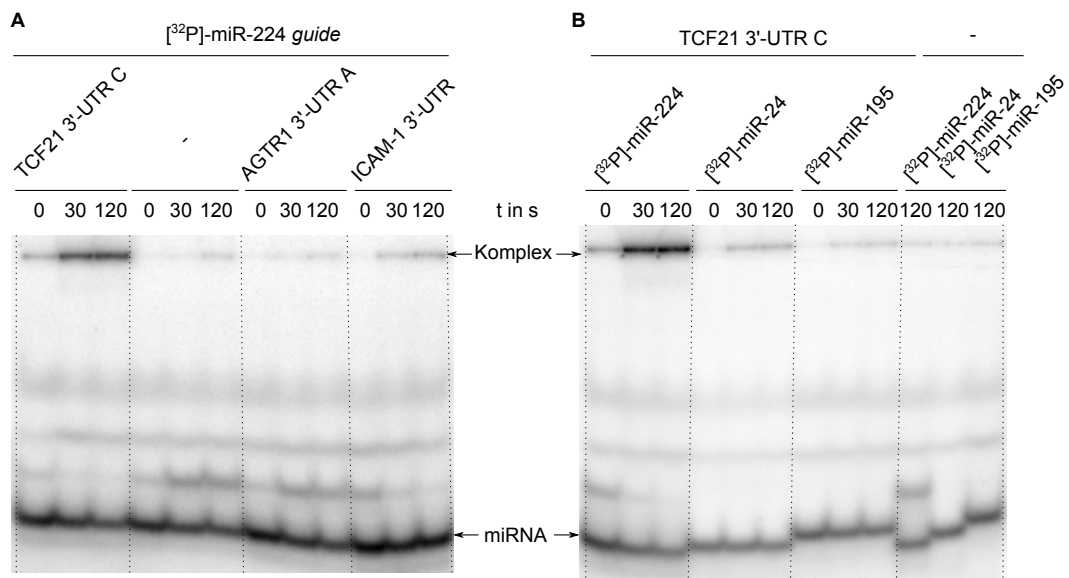


Abbildung 5.52: Kinetik der spezifische Komplexbildung zwischen TCF21 und miR-224. (A) Zur Überprüfung der Komplexbildung von miR-224 mit weiteren *in vitro* Transkripten erfolgte eine Inkubation des miR-224 *guide* Stranges (0,5 nM) parallel mit *in vitro* Transkripten von TCF21, AGTR1 oder ICAM-1 (je 5 nM) bzw. H₂O als Kontrolle in Anwesenheit von 10 mM CTAB für 0-120 s bei 37 °C. (B) Zur Kontrolle der Komplexbildung der TCF21 3'-UTR mit weiteren miRNAs wurde das TCF21 3'-UTR C *in vitro* Transkript (5 nM) parallel mit miR-224, miR-24 und miR-195 *guide* Strang (0,5 nM) in Anwesenheit von 10 mM CTAB für 0-120 s bei 37 °C inkubiert. Alle Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Proben bei 4 °C und 150 V auf einem 8 %-igen, nativen PAA-Gel aufgetrennt.

Annealing von miRNAs an verkürzte TCF21 *in vitro* Transkripte

Analog zu den Versuchen mit den Gesamtlänge TCF21 3'-UTR *in vitro* Transkripten wurden Annealing-Experimente mit verkürzten TCF21 *in vitro* Transkripten durchgeführt. Die Analy-

5 Ergebnisse

se der Komplexbildung mittels gelelektrophoretischer Auftrennung ist im Teil A der Abb. 5.53 dargestellt. Die sich bildenden Komplexe sind aufgrund der reduzierten Länge der TCF21-RNAs in der Lage, in das PAA-Gel einzulaufen.

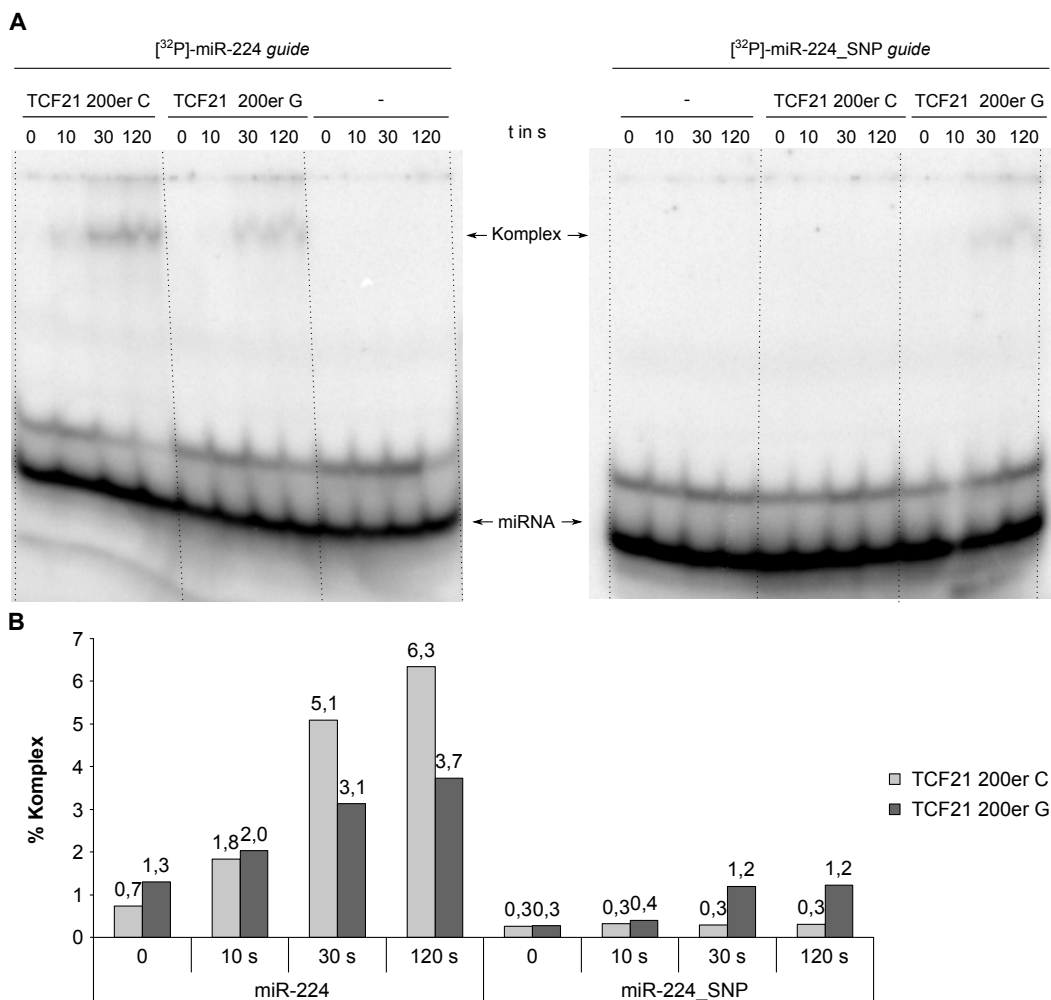


Abbildung 5.53: Unterschiedliche Kinetik der Komplexbildung der verkürzten TCF21 *in vitro* Transkripte mit miR-224 und miR-224_SNP. TCF21 200er C bzw. G *in vitro* Transkripte (5 nM) wurden mit miR-224 bzw. miR-224_SNP guide Strang (0,5 nM) in Anwesenheit von 10 mM CTAB für 0-120 s bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne *in vitro* Transkript. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Proben bei 4 °C und 150 V auf einem 8 %-igen, nativen PAA-Gel aufgetrennt. (A) Gele, (B) Quantifizierung der Komplexe.

Eine vergleichende Betrachtung der Abb. 5.50 und 5.53 zeigt ferner, dass das Annealing der unterschiedlich langen TCF21 *in vitro* Transkripte mit den miR-224-Varianten in Anwesenheit von CTAB zu tendenziell vergleichbaren Ergebnissen führt. Während auch hier das TCF21 C *in vitro* Transkript nur mit der miR-224 komplexiert, zeigt die G-Variante eine Komplexbildung mit beiden miRNAs. Jedoch bildet die miR-224_SNP deutlich schwächere Kom-

plexe mit dem TCF21 200er G *in vitro* Transkript.

Die für das miRNA Annealing der Gesamtlänge und verkürzten TCF21 *in vitro* Transkripte berechneten Ratenkonstanten sind in Tab. 5.18 vergleichend aufgeführt und weisen mit Faktoren zwischen 1,1 und 1,2 nahezu identische Werte auf.

Tabelle 5.18: Vergleich der Ratenkonstanten des TCF21 miRNA-Annealings von Gesamtlänge und verkürzten *in vitro* Transkripten in Anwesenheit von CTAB (siehe Abb. 5.50 und 5.53).

miRNA	<i>in vitro</i> Transkript	k	<i>in vitro</i> Transkript	k	Faktor
miR-224	3'-UTR C	$2,2 \cdot 10^6$	200er C	$2,1 \cdot 10^6$	1,1
	3'-UTR G	$1,4 \cdot 10^6$	200er G	$1,2 \cdot 10^6$	1,2
miR-224_SNP	3'-UTR C	n.d.	200er C	n.d.	-
	3'-UTR G	$1,4 \cdot 10^6$	200er G	$1,3 \cdot 10^6$	1,1

Im Gegensatz zu den Gesamtlänge TCF21 3'-UTR *in vitro* Transkripten war für die verkürzten Varianten in Abwesenheit von CTAB keine Komplexbildung mit miR-224 und miR-224_SNP zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung dafür bietet die von Patzel *et al.* [166] untersuchte Längenabhängigkeit des RNA-RNA-Annealings. Die in Abwesenheit von CTAB durchgeführten Analysen zeigten, dass mit zunehmender RNA-Länge eine schnelleres Annealing zu verzeichnen ist.

Temperaturabhängigkeit des Annealings von TCF21 und miR-224

Im Folgenden wurde die Komplexbildung zwischen den TCF21-Varianten und der miR-224 bei unterschiedlichen Temperaturen näher untersucht. Anhand dessen wurden weitere thermodynamische Parameter, wie z.B. die Aktivierungsenergie E_A beider Annealing-Reaktionen (TCF21 C mit miR-224 bzw. TCF21 G mit miR-224), bestimmt.

Die Analyse des Annealings der miR-224 an das TCF21 3'-UTR C bzw. G *in vitro* Transkript bei unterschiedlichen Temperaturen zeigt, dass die Erhöhung der Reaktionstemperatur mit einer gesteigerten Komplexbildung einhergeht. Für alle Temperaturen gilt, dass das TCF21 C *in vitro* Transkript deutlich stärkere Komplexe mit der miR-224 bildet.

Diese Ergebnisse zeigen im Vergleich zu den vorherigen Annealing-Experimenten (siehe 5.50) deutlich stärkeren Absolutwerte der RNA-RNA-Komplexe. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass für die Versuche unterschiedliche *in vitro* Transkript-Präparationen verwendet wurden. Diese können unterschiedliche Transkript-Isoformen enthalten und somit die Umsatzunterschiede erklären.

5 Ergebnisse

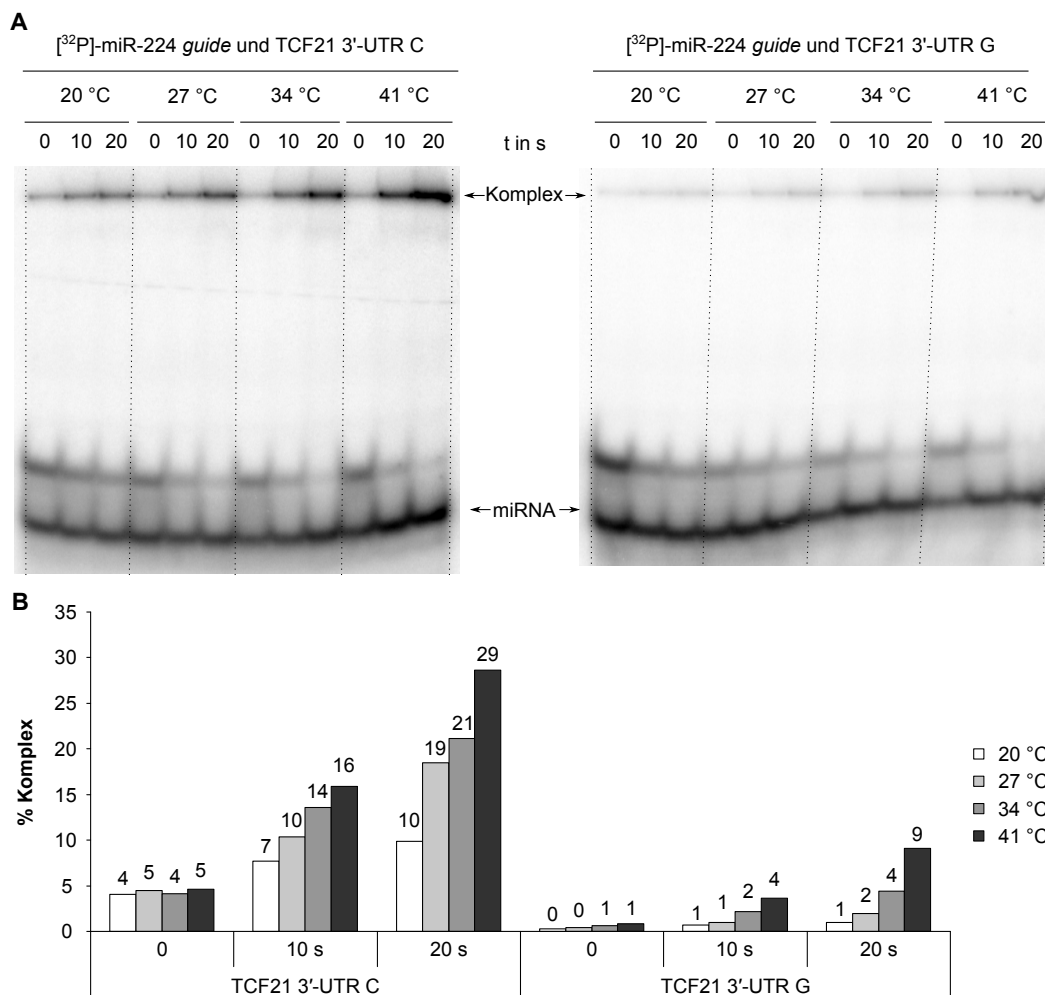


Abbildung 5.54: Temperaturabhängige Komplexbildung zwischen TCF21 3'-UTR-Varianten und miR-224. TCF21 3'-UTR C bzw. G *in vitro* Transkripte (5 nM) wurden mit dem miR-224 *guide* Strang (0,5 nM) in Anwesenheit von 10 mM CTAB für 0-20 s bei 20, 27, 34 und 41 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet. (A) zeigt die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proben (8 % natives PAA-Gel, Gellauf: 2h bei 150 V bei 4 °C). In (B) ist die Quantifizierung der RNA-miRNA-Komplexe dargestellt.

Unter Verwendung der in der Abb. 5.54 dargestellten Ergebnisse wurden zunächst die Geschwindigkeitskonstanten k der einzelnen Komplexbildungen bestimmt. Durch graphisches Auftragen von $\ln k$ gegen $1/T$ (Temperatur in Kelvin) ergeben sich die in der Abb. 5.55 gezeigten Arrhenius-Plots.

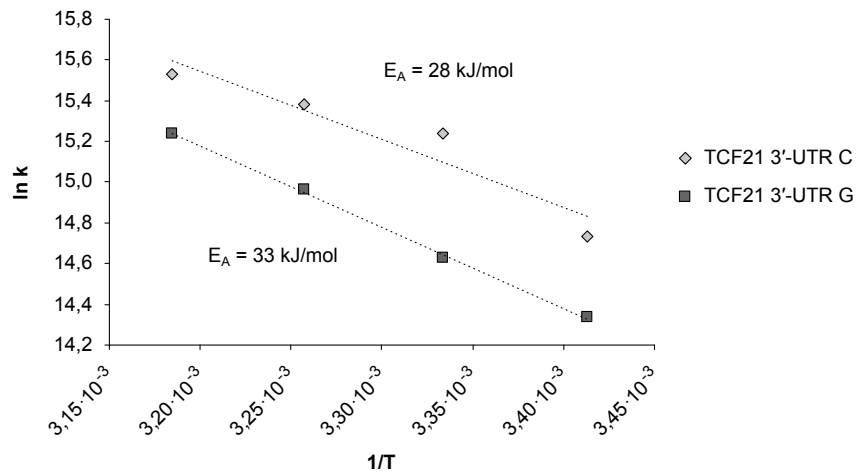


Abbildung 5.55: Arrhenius-Plots des TCF21-Annealings.

Gemäß:

$$E_A = -m \cdot R \quad (5.1)$$

wurden aus den jeweiligen Anstiegen m der Geraden und der Gaskonstante R die Aktivierungsenergien E_A der Interaktionen beider TCF21-Varianten mit der miR-224 bestimmt. Die hieraus resultierende Energiedifferenz der Aktivierungsenergien beider Reaktionen beträgt 5 kJ/mol. Anhand der folgenden Formeln wurden weitere thermodynamische Parameter bestimmt und diese in der Tab. 5.19 zusammengefasst.

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger \quad (5.2)$$

$$\Delta G^\ddagger = -RT \cdot \ln \frac{k \cdot h}{k_B \cdot T} \quad (5.3)$$

$$\Delta H^\ddagger = E_A - RT \quad (5.4)$$

ΔG^\ddagger = Gibbs's Freie Aktivierungsenergie

ΔH^\ddagger = Aktivierungsenthalpie

ΔS^\ddagger = Aktivierungsentropie

h = Planck-Konstante

k_B = Boltzmann-Konstante

Tabelle 5.19: Thermodynamische Parameter des TCF21-miR-224-Annealings bei 37 °C.

	k $M^{-1}s^{-1}$	E_A kJ/mol	ΔG^\ddagger kJ/mol	ΔH^\ddagger kJ/mol	ΔS^\ddagger kJ/mol
TCF21 C	$5,21 \cdot 10^6$	28	36	25	-0,035
TCF21 G	$3,54 \cdot 10^6$	33	37	30	-0,022

Die thermodynamischen Parameter weisen auf keine signifikanten Unterschiede in der Gibbs'schen Freien Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger und der Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger hin. Detaillierterer Aussagen zur Struktur-Funktions-Beziehung bedürfen weiteren biochemischen Analysen.

5.8.9 Annealing von miRNAs an TCF21 mit anschließendem Strukturprobing

Anhand der Ergebnisse der vorangegangenen TCF21-Analysen konnte experimentell gezeigt werden, dass die TCF21-Varianten zum einen strukturelle Unterschiede (siehe 5.8.7) und zum anderen ein differentielles Annealing an die miR-224 aufweisen. In Folge dessen sollte untersucht werden, ob die Bindung der miR-224 an das TCF21 C bzw. G *in vitro* Transkript einen Einfluss auf das Strukturprobing hat. Dazu erfolgte eine Inkubation der kurzen TCF21 *in vitro* Transkripte mit dem miR-224 *guide* Strang und anschließend eine Pb²⁺-vermittelte RNA-Hydrolyse. Zur vergleichenden Analyse wurden je TCF21 *in vitro* Transkript vier unterschiedliche Reaktionen parallel durchgeführt (mit bzw. ohne miR-224 sowie mit bzw. ohne CTAB, siehe auch Tab. 4.10) und die Ergebnisse in der Abb. 5.56 dargestellt.

Die Ergebnisse für das TCF21 C *in vitro* Transkript (Abb.-Teil A) weisen darauf hin, dass die miR-224 Bindestelle sowohl in An- als auch Abwesenheit der miR-224 die geringste Zugänglichkeit für eine Pb²⁺-induzierte Hydrolyse aufweist. Auffallend ist die gesteigerte RNA-Spaltung der die miR-224 Bindestelle unmittelbar flankierenden Bereiche sowie eine verminderte Spaltung im *seed* Bereich in Anwesenheit von CTAB und miR-224. Das lässt vermuten, dass eine durch CTAB verstärkte Bindung der miR-224 an das TCF21 C *in vitro* Transkript die Zugänglichkeit für Pb²⁺ in diesen Bereichen verändert.

Die TCF21 G-Variante dagegen weist deutlich stärkere Spaltprodukte sowohl in An- als auch Abwesenheit der miR-224 bzw. von CTAB innerhalb der miR-224 Bindestelle auf. Diese sind in Anwesenheit von CTAB und miR-224 deutlich schwächer ausgeprägt. Die Bereiche des TCF21 G-Transkripts, die die miR-224 Bindestelle unmittelbar flankieren, weisen ebenfalls in Anwesenheit von CTAB und der miR-224 eine gesteigerte Hydrolyse auf.

5 Ergebnisse

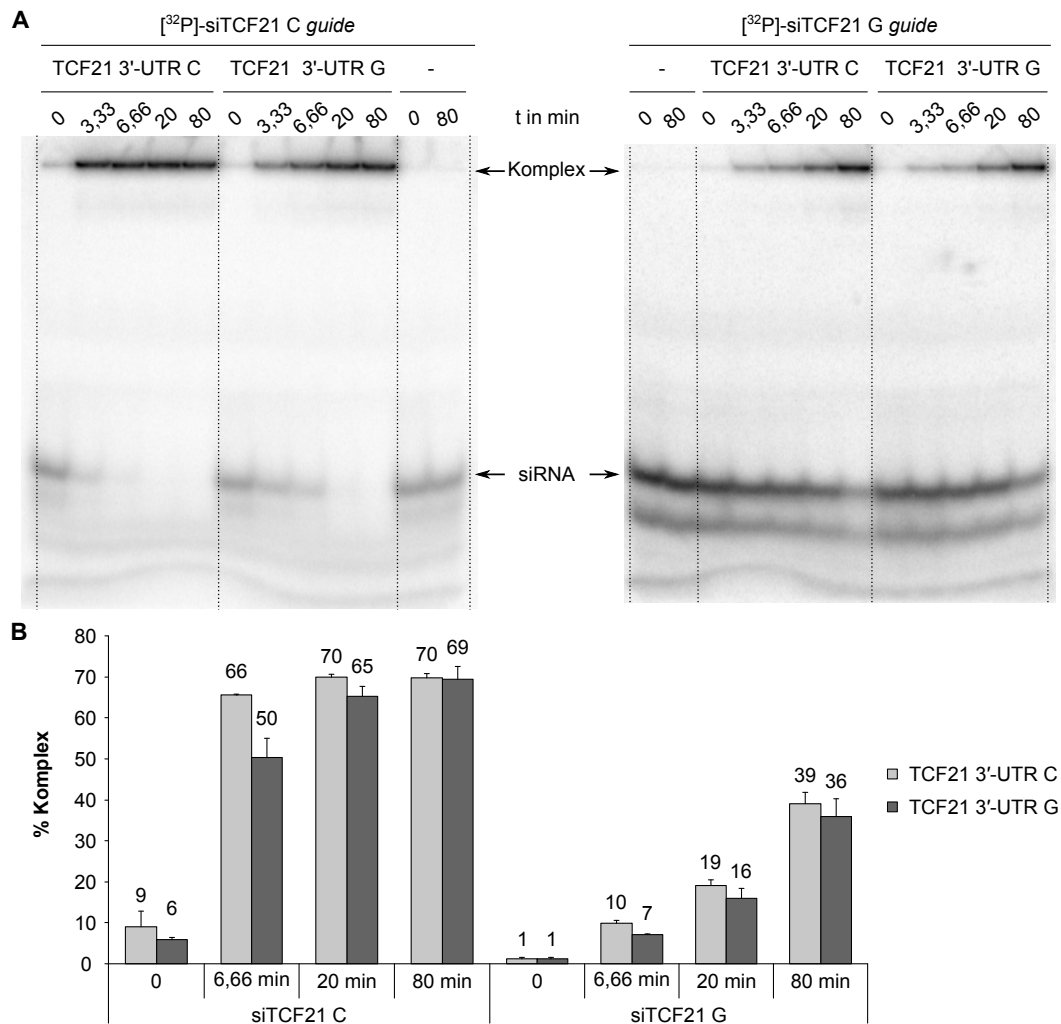


Abbildung 5.57: Kinetik des siRNA-Annealings an die TCF21 3'-UTR. TCF21 3'-UTR C bzw. G *in vitro* Transkripte (25 nM) wurden mit siTCF21 C bzw. G *guide* Strang (0,5 nM) ohne CTAB für 0-80 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne *in vitro* Transkript. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Proben bei 4 °C und 150 V auf einem 8 %-igen, nativen PAA-Gel aufgetrennt. (A) Gele, (B) Quantifizierung. Aufgeführt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen zweier unabhängiger Experimente.

Es ist zu erkennen, dass die Komplexbildung beider *in vitro* Transkripte mit der siTCF21 C deutlich stärker als mit der siTCF21 G ausfällt. Deutlich wird, dass die TCF21 *in vitro* Transkript C-siTCF21 C-Komplexe zu frühen Reaktionszeitpunkten deutlich stärker als die der TCF21 *in vitro* Transkript G-siTCF21 C-Interaktion ausgeprägt sind. Dies kann damit erklärt werden, dass letztgenannte Interaktion durch einen *mismatch* zwischen den beiden RNAs gekennzeichnet ist (siehe Abb. 5.45). Erst zum Zeitpunkt der Probennahme nach 80 min hat sich der prozentuale Anteil an Komplex für beide TCF21 *in vitro* Transkripte angeglichen. Auffallend ist, dass die Komplexbildung zwischen dem C *in vitro* Transkript und der siTCF21

G trotz *mismatch* zu jedem Zeitpunkt der Probeentnahme stärker in Bezug auf die Bindung der 100 %-ig komplementären siTCF21 G an das TCF21 G *in vitro* Transkript ist.

Wie in der Tab. 5.20 dargestellt, spiegeln sich die prozentualen Unterschiede in der Komplexbildung auch in den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der RNA-RNA-Assoziation wider. Für die Interaktion mit beiden siRNAs ist k bei Vorliegen des TCF21 C *in vitro* Transkripts größer. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das TCF21 C *in vitro* Transkript eine bessere Zugänglichkeit für die eingesetzten siRNAs aufweist.

Tabelle 5.20: Ratenkonstanten des Annealings von TCF21 3'-UTR und siTCF21.

siRNA	<i>in vitro</i> Transkript	k ($M^{-1}s^{-1}$)
siTCF21 C	TCF21 3'-UTR C	$8,0 \cdot 10^4 \pm 2,4 \cdot 10^3$
	TCF21 3'-UTR G	$7,0 \cdot 10^4 \pm 3,3 \cdot 10^3$
siTCF21 G	TCF21 3'-UTR C	$4,0 \cdot 10^4 \pm 2,1 \cdot 10^3$
	TCF21 3'-UTR G	$3,3 \cdot 10^4 \pm 2,3 \cdot 10^3$

An dieser Stelle wird auf die im Abschnitt 5.8.6 beschriebenen Transfektionsexperimente verwiesen. Die Daten der Ko-Transfektion des TCF21 3'-UTR C Reporters und der siTCF21 C wiesen aus allen Kombinationen der TCF21- und siTCF21-Varianten für jede siRNA-Konzentration die stärkste Hemmung auf. Die deutlich schwächere Komplexbildung beider *in vitro* Transkripten mit der siTCF21 G liefert somit eine Erklärung für die schwächere siTCF21 G-vermittelte Repression der Reporter-Aktivitäten.

Annealing von siRNAs an verkürzte TCF21 *in vitro* Transkripte

In Analogie zu den vorangegangenen Experimenten wurden entsprechende Versuche durchgeführt, um die RNA-RNA-Interaktion verkürzter TCF21 *in vitro* Transkripte mit den siTCF21-Varianten näher zu analysieren. In der Abb. 5.58 sind die Ergebnisse möglicher Kombinationen aus TCF21 200er *in vitro* Transkript- und siTCF21-Variante dargestellt.

Wie bereits zuvor für die Reaktionen mit den TCF21 3'-UTR *in vitro* Transkripten können auch hier deutliche Unterschiede zwischen den Komplexen mit der siTCF21 C bzw. siTCF21 G beobachtet werden. Letztere bildet auch mit den verkürzten *in vitro* Transkripten deutlich schwächere Komplexe. Zu jedem Zeitpunkt der Probenentnahme bildet das 200er C *in vitro* Transkript in Relation zur TCF21 G-Variante stärkere Komplexe mit beiden siRNAs.

Ein Vergleich der Ratenkonstanten der TCF21 *in vitro* Transkript-Längen ist in der Tab. 5.21 aufgeführt und zeigt, dass das siTCF21 C-Annealing etwa 5-fach und das siTCF21 G-Annealing sogar ca. 10-fach schneller an die Gesamtlänge *in vitro* Transkripte verläuft.

5 Ergebnisse

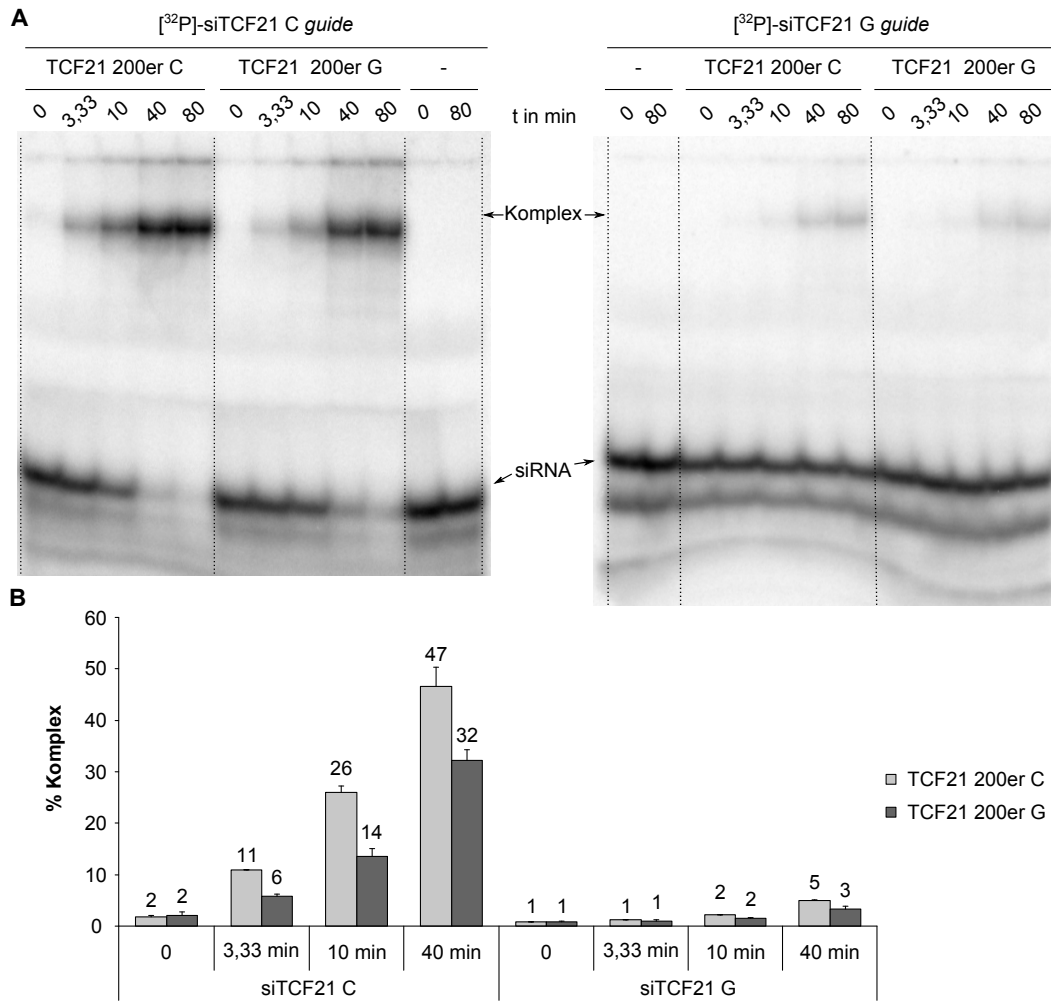


Abbildung 5.58: Kinetik des siRNA-Annealings verkürzte TCF21 *in vitro* Transkripte. TCF21 200er C bzw. G *in vitro* Transkripte (50 nM) wurden mit siTCF21 C bzw. G *guide* Strang (0,5 nM) ohne CTAB für 0-80 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne *in vitro* Transkript. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet und die Proben bei 4 °C und 150 V auf einem 8 %-igen, nativen PAA-Gel aufgetrennt. (A) Gele, (B) Quantifizierung. Aufgeführt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen zweier unabhängiger Experimente.

Tabelle 5.21: Vergleich der Ratenkonstanten des siRNA-Annealings von Gesamtlänge und verkürzten TCF21 *in vitro* Transkripten.

siRNA	<i>in vitro</i> Transkript	k	<i>in vitro</i> Transkript	k	Faktor
siTCF21 C	3'-UTR C	$8,0 \cdot 10^4$	200er C	$2,0 \cdot 10^4$	4,1
	3'-UTR G	$7,0 \cdot 10^4$	200er G	$1,1 \cdot 10^4$	6,6
siTCF21 G	3'-UTR C	$4,0 \cdot 10^4$	200er C	$4,1 \cdot 10^3$	9,8
	3'-UTR G	$3,3 \cdot 10^4$	200er G	$2,6 \cdot 10^3$	12,8

5.8.11 Zusammenfassung und Fazit der TCF21-Analysen

Die Assoziation der TCF21 C-Variante des SNPs rs12190287 mit CAD wurde mittels GWAS identifiziert [23]. Der SNP ist in der 3'-UTR der *TCF21* mRNA innerhalb einer Bindestelle für die miR-224 lokalisiert und die TCF21 C-Variante weist einen C-G *match* an Position 4 ausgehend vom 5'-Ende der miRNA auf, wohingegen die G-Variante durch einen G-G *mismatch* an selbiger Position gekennzeichnet ist.

Die systematische Vorhersage der TCF21 Sekundärstrukturen wies deutliche Unterschiede bezüglich der lokalen Struktur um den SNP bzw. die miR-224 Bindestelle auf. Die SNP-Position der TCF21 C-Variante ist fast ausschließlich in einem Loop und die der G-Variante vornehmlich in einem Stem lokalisiert. Diese Struktur-Elemente konnten in allen vier zur Faltung verwendeten Fenstergrößen (100, 200, 400 und 800 nt) beobachtet werden. Daher erfolgte eine weitestgehend parallele Analyse von TCF21 3'-UTR Gesamtlänge und auf 200 nt verkürzten TCF21-RNAs.

Eine experimentelle Bestätigung von strukturellen Unterschieden beider TCF21-Varianten in der SNP-Region lieferten die Ergebnisse der Pb²⁺- bzw. RNase T1-vermittelten RNA-Hydrolyse. Die Untersuchung der miRNA-vermittelten Repression von TCF21 Luciferase Reporterkonstrukten durch die miR-224 und die miR-224_SNP in Zellkulturversuchen ergab, dass die TCF21 G-Reporteraktivität von beiden miRNA-Varianten reprimiert wurde, während die der TCF21 C-Variante nur miR-224-vermittelt gehemmt wurde. Eine Erklärung für die differenzierte Hemmung konnten die zusätzlich durchgeführten RNA-Annealing-Experimente aufzeigen. So war eine stark verminderte RNA-RNA-Wechselwirkung zwischen TCF21 C und miR-224_SNP gegenüber den anderen RNA-miRNA-Kombinationen zu beobachten. Für die TCF21 C-Variante waren nur Komplexe mit der miR-224 für die G-Variante hingegen Komplexe mit beiden miR-224-Varianten detektierbar.

Fazit

Die Daten der TCF21-Analysen zeigen, dass der SNP rs12190287 ein weiteres Beispiel für einen miR-SNP darstellt, der mit strukturellen Änderungen der Ziel-RNA korreliert ist. Die TCF21-Versuche zeigen weiterhin, dass anhand einer systematischen RNA-Strukturvorhersage eine geeignete Auswahl von RNA-Ausschnitten erfolgen kann, sodass Strukturunterschiede und die damit einhergehenden funktionellen Unterschiede zweier RNA-Varianten auch mit verkürzten Ziel-Gen 3'-UTR Sequenzen nachgewiesen werden können. Anhand von *in vitro* Annealing-Versuchen konnten unterschiedliche RNA-RNA-Wechselwirkungen zwischen TCF21- und miR-224-Varianten detektiert werden, die ursächlich für eine differentielle miRNA-vermittelte Regulation beider TCF21-Varianten zu sein scheint. Weiterführende detaillierte mechanistische Betrachtungen sind in der Diskussion aufgeführt (siehe Kap. 6.2, 6.4.2 und 6.6.2).

5.9 Tabellarische Übersicht ausgewählter Ergebnisse

Die folgende Übersicht fasst SNP-Informationen sowie ausgewählte Ergebnisse der durchgeführten Analysen zusammen. Für die AGTR1 und ESR1 miRNA-Regulation sind jeweils die Ergebnisse der langen 3'-UTR Reporter gezeigt.

Tabelle 5.22: Tabellarische Übersicht ausgewählter Ergebnisse. (in fett jeweils das Risiko-Allel, RAF: Risiko Allel Frequenz (Quelle: dbSNP-Datenbank, Stand Mai 2012), BS: Bindestelle, o + ++ +++: aufsteigende Unterschiede zwischen den SNP-Varianten, Regulation bzw. Komplexbildungsrate einer SNP-Variante ist < kleiner, > größer, ≫ viel größer als die der anderen, k.A. keine Angabe, n.d. nicht detektierbar, / keine Analysen durchgeführt, // keine Analysen durchführbar)

SNP-ID	Gen	Voranalysen			experimentelle Daten					
		Varianten	RAF	miRNA Bindestelle (SNP Lokalisation)	Unterschiede	miRNA ²⁰		miRNA_SNP		
		A/C			mfold	Probing	Regulation ²⁰	Annealing ²¹	Regulation	Annealing
rs5186	AGTR1	A/C	15,7 %	miR-155 (innerhalb)	+++	++	A ≫ C	n.d.	A > C	n.d.
rs9341070	ESR1	C/T	k.A.	miR-122 (innerhalb)	+	o	C > T	/	C < T	/
rs9818870	MRAS	C/T	9,2 %	miR-195 (außerhalb ²²) miR-135 (außerhalb ²³)	++	++	C < T	C > T	//	//
					+	o	C < T	n.d.	//	//
rs12190287	TCF21	C/G	65,1 %	miR-224 (innerhalb)	+++	+++	C > G	C > G	C < G	C < G

²⁰ miRNA-vermittelte Hemmung im Reportergen-Assay

²¹ RNA-RNA-Komplexbildungsrate

²² miR-195 BS 1: ca. 20 nt stromaufwärts, miR-195 BS 2: ca. 400 nt stromabwärts

²³ miR-135 BS 1: ca. 700 nt stromaufwärts, miR-135 BS 2: ca. 100 nt stromabwärts

6 Diskussion

6.1 Verfügbare Online-Tools zur Analyse von miR-SNPs

6.1.1 Einführung

Die technischen Entwicklungen der vergangenen Jahre, wie z.B. die *Next Generation Sequencing* Technologie, haben zu einem enormen Anstieg der Menge an genetischen Informationen in online verfügbaren Datenbanken und zur Entwicklung bioinformatischer Tools geführt. Auch eine Vielzahl der Daten der vorliegenden Arbeit basieren auf der Verwendung von Online-Tools und Computer-basierten Methoden. Sie ermöglichen, neben experimentellen Versuchen, die Datenfülle anhand von *in silico* Analysen zu untersuchen. Dennoch ist das detaillierte Verständnis eines Molekularbiologen zu benutzten Algorithmen, statistischen Parametern und der damit verbundenen Vergleichbarkeit von Aussagen und Informationen oftmals unzureichend. Die biologische Forschung aus derzeitiger Sicht kommt kaum mehr ohne die Informatik aus. Dies verdeutlicht den hohen Stellenwert der heutigen interdisziplinären Zusammenarbeit von Biologen und (Bio-)Informatikern. Im Folgenden wird auf einige wichtige Online-Tools näher eingegangen.

6.1.2 miRNA-Sequenzen und Vorhersage von miRNA Bindestellen

Informationen bezüglich der bisher identifizierten miRNA-Sequenzen sind der *miRBase* Datenbank¹ [133] zu entnehmen. Die Vorhersage von miRNA Bindestellen innerhalb einer Ziel-RNA kann mittels verschiedener Online-Tools erfolgen. Beispielhaft seien *TargetScan*² [43] und *microRNA.org*³ [134] genannt. Beide bieten die Möglichkeit, für eine miRNA die potentiellen Ziel-Gene und für ein Ziel-Gen die entsprechenden miRNA Bindestellen vorherzusagen. Weiterhin ist unter Verwendung von *microRNA.org* die miRNA Expression in ausgewählten Geweben und Zelllinien nachzuschlagen.

Die *in silico* Vorhersage mittels verschiedener Algorithmen liefert häufig nur geringe Überschneidungen, was eine Erklärung dafür bietet, dass derartige Analysen häufig zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen führen. Daher bedarf es einer experimentellen

¹<http://www.mirbase.org/>

²<http://www.targetscan.org/>

³<http://www.microrna.org>

Validierung der jeweiligen Interaktion zwischen miRNA und Ziel-Gen. Eine Plattform für experimentell validierte miRNA Ziel-Gene bietet *TarBase*⁴ [167–169].

Neben den Algorithmen, die miRNA Bindestellen nach der „*seed-match*“ Methode vorhersagen, existieren bereits Algorithmen, die die umliegende Sekundärstruktur in die Vorhersage einbeziehen (vgl. Supplementary Information von [114]). Beispielhaft sei der *PITA* (*Probability of Interaction by Target Accessibility*) Algorithmus genannt, der von Kertesz *et al.* [114] entwickelt wurde. Unter Einbezug von jeweils 70 die miRNA Bindestelle flankierenden nt berechnet der *PITA* Algorithmus einen Energie-Score $\Delta\Delta G$, der die Differenz zwischen dem Energiegewinn durch die Bindung der miRNA an die Ziel-RNA (ΔG_{duplex}) und der notwendigen Energie für das „Zugänglichmachen“ der Bindestelle (ΔG_{open}) abbildet. Es konnte eine starke Korrelation zwischen den $\Delta\Delta G$ -Werten und der experimentellen Repressionen in Luciferase-Reporterassays beobachtet werden. Ferner zeigte die globale Berechnung von ΔG_{open} für miRNA Bindestellen diverser Spezies (Mensch, Maus, Fliege, Wurm), dass diese präferentiell in Regionen mit hoher Zugänglichkeit lokalisiert sind. Eine nähere Betrachtung von Chen *et al.* [170] hingegen zeigte, dass die guten *PITA-Scores* für hoch konservierte miRNA Bindestellen nicht auf deren Zugänglichkeit sondern auf einen gewählten *cutoff*-Wert innerhalb des Algorithmus und somit auf deren starke Bindungsenergien zurückzuführen sind. Dieser Sachverhalt verdeutlicht das Problem der Vergleichbarkeit von Ergebnissen der zur Vorhersage von miRNA Bindestellen eingesetzten mathematischen Algorithmen, da diese stark von einzelnen Parametern abhängen.

6.1.3 miR-SNP Datenbanken

Mittlerweile stehen diverse online verfügbare Datenbanken zur Verfügung, die Übersichten von SNPs in miRNA Bindestellen und miRNA Genen bieten, z.B. *PolymiRTS*⁵ [139, 140] und *miRNASNP*⁶ [141]. Die *miRNASNP* Datenbank [141] liefert dem Nutzer zusätzliche Informationen zur Position der miRNA Bindestelle innerhalb der jeweiligen 3'-UTR und gibt Auskunft über den aus dem SNP resultierenden Unterschied der jeweiligen Bindungsenergie zwischen miRNA und Ziel-RNA. Die *PolymiRTS* Datenbank hingegen enthält ergänzende Informationen zur Konservierung der jeweiligen miRNA Bindestelle und soweit vorhanden, den entsprechenden Link zur experimentellen Validierung.

Im Rahmen dieser Arbeit mittels vorgenannter miR-SNP Datenbanken durchgeführte Recherchen lieferten ausschließlich Informationen über SNPs, die direkt innerhalb einer miRNA Bindestellen lokalisiert sind. Die vorliegenden Daten des MRAS-Systems sowie die von Mishra *et al.* durchgeführten DHFR-Analysen [149] weisen darauf hin, dass auch SNPs außerhalb von miRNA Erkennungssequenzen einen Einfluss auf die miRNA-Regulation haben

⁴<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>

⁵<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>

⁶<http://www.bioguo.org/miRNASNP/>

können. Es ist daher wünschenswert, dass dies in miR-SNPs Datenbanken berücksichtigt wird und somit SNPs in der Nähe von miRNA Bindestellen mit Hilfe bioinformatischer Algorithmen einfacher und schneller detektiert werden können.

6.1.4 SNP Informationen

Die größte online verfügbare Sammlung von SNP-Daten wurde vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) in Form der *dbSNP* Datenbank⁷ aufgebaut und durch neue Einträge der *Scientific Community* stetig erweitert [137]. Von den mittlerweile über 52 Mio. in der *dbSNP* aufgeführten humanen SNPs sind etwa ein Fünftel noch nicht validiert (Stand: *dbSNP build* 135), sondern können vorerst nur als SNP-Kandidaten bezeichnet werden.

Von besonderer Bedeutung ist neben der Vollständigkeit auch die Qualität der Daten in der *dbSNP* Datenbank; anhand der Ergebnisse einer Meta-Analyse von vier Nachweisstudien wurde die falsch-positiv Rate der *dbSNP* Datenbank von Mitchell *et al.* auf 15-17 % geschätzt [171, 172]. Des Weiteren wurden sogenannte *Single Nucleotide Differences* (SND) identifiziert [173]. Die Präsenz von paralogen Sequenzen im Genom können zu Artefakten führen, sodass in der Datenbank ausgewiesene SNPs als SND bezeichnet werden können. Laut Vorhersage der anhand von Musumeci *et al.* [173] durchgeführten bioinformatischen Analyse sind etwa 8 % der bi-allelischen, kodierenden SNPs in der Datenbank als SND anzusehen. Platzer *et al.* [172] identifizierten zudem einen systematischen Sequenzier-Fehler an Splice-Akzeptor Guaninen (sogenanntes „G after A“ Problem der DNA-Polymerase) als Ursache der hohen Anzahl an ausgewiesenen SNPs an der Splice-Akzeptor Position -1. Für die innerhalb der *dbSNP* Datenbank enthaltenen SNPs wurde für die Splice-Akzeptor Position -1 somit eine falsch-positiv Rate von 82 % abgeschätzt.

Die akkurate SNP-Genotypisierung und Evaluierung der Ergebnisse ist also entscheidend für die Qualität der in der *dbSNP* Datenbank enthaltenen Informationen.

6.1.5 Konsequenzen für funktionelle Analysen von miR-SNPs

Die Vielzahl der innerhalb der vergangenen Jahre generierten Daten zu miRNAs und SNPs hat zu einer enormen Informationsmenge in Bezug auf miR-SNPs geführt. Sowohl die Anzahl der in der *miRBase* Datenbank aufgeführten miRNAs als auch die in der *dbSNP* Datenbank gelisteten SNPs sind in den vergangenen Jahren nahezu exponentiell angestiegen. Eine aktuelle genom-weite Studie von Gong *et al.* [141] zu SNPs in humanen pre-miRNAs, miRNA flankierenden Regionen und miRNA Bindestellen weist deutliche Unterschiede zu den im Jahr 2007 publizierten Ergebnissen von Saunders *et al.* [88] auf. Während in 2007 noch 90 % aller pre-miRNA Sequenzen SNP-frei waren, wurden in der aktuellen Studie,

⁷<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

die die gesamten Daten von *miRBase* und *dbSNP* abbildet, SNPs in über 40 % der pre-miRNAs identifiziert. Es ist in derartigen genom-weiten Studien jedoch schwierig, die biologisch bedeutsameren von den übrigen SNPs und miRNAs zu unterscheiden (Stichwort Konservierung und Allel-Frequenz). Es lässt sich spekulieren, dass je zeitlich früher eine miRNA identifiziert wird, desto größer ist ihre biologische Relevanz in Bezug auf entscheidende physiologischen Prozesse und deren Assoziation mit häufigen Pathologien.

6.2 Einfluss SNP-induzierter RNA-Strukturänderungen auf die miRNA-Regulation

Die Rolle der Zugänglichkeit eines mRNA-Abschnittes für die Oligonukleotid-induzierte Hemmung der Genexpression durch antisense Oligonukleotide, siRNAs oder miRNAs war Gegenstand mehrfacher Studien [114, 120, 121]. In bisher publizierten Studien, die sich mit SNPs innerhalb einer miRNA Bindestelle der Ziel-mRNA beschäftigten, werden ausschließlich die Auswirkungen auf die Thermodynamik und somit auf die Bindungsenergie der jeweiligen Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA diskutiert. Mechanistisch betrachtet führt also der SNP zu einer veränderten Basenpaarung zwischen den beiden RNAs und dadurch zu einer Ab- oder Zunahme der miRNA-vermittelten Regulation der Genexpression.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen einen weiteren Einblick in den Mechanismus, der zu SNP-induzierten Veränderungen der miRNA-Regulation führt. Die Daten zeigen, dass ein SNP in einer mRNA eine deutliche Veränderung der lokalen Struktur auslösen kann. Die sich daraus ergebenden Unterschiede in der RNA-Struktur der SNP-Varianten können zu einer unterschiedlichen Zugänglichkeit für miRNAs führen und damit die miRNA-vermittelte Suppression der Genexpression verändern. Die Daten im *MRAS*-System zeigen zudem, dass auch weiter entfernt zum SNP liegende miRNA Bindestellen von einer durch den SNP-induzierten Strukturänderung betroffen sein können. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann also ein neues Modell beschrieben werden, in dem ein SNP durch Veränderung der lokalen RNA-Sekundärstruktur die Regulierbarkeit der Ziel-RNA durch miRNAs beeinflusst und dies auch möglich ist, wenn der SNP nicht direkt innerhalb der miRNA Bindestelle lokalisiert ist.

Der siRNA oder antisense Oligonukleotid-vermittelten Hemmung der Genexpression liegen bereits bekannte Mechanismen zugrunde, jedoch ist diese Art der Genregulation durch eine perfekte Komplementarität zur Ziel-RNA gekennzeichnet. Der Mechanismus der miRNA-vermittelten Hemmung der Genexpression dagegen scheint sehr viel komplexer, und bisher ist nur wenig über die Struktur-Funktions-Beziehung bei der miRNA Ziel-Erkennung bekannt. Da funktionelle miRNA-Ziel-RNA-Interaktionen sich im Grad ihrer Basenpaarungen unterscheiden können, ist es nicht zulässig von einer Strukturvorhersage ausgehend, eine allgemeingültige mechanistische Aussage für die miRNA-vermittelte Repression zu treffen.

Die Zugänglichkeit kann für jede individuelle Paarung zwischen miRNA und Ziel-RNA eine unterschiedliche Rolle spielen. Es ist vorstellbar, dass miRNAs mit einer größeren Komplementarität weniger zugänglich sein müssen. Andererseits können besser zugängliche Ziel-RNAs von miRNAs reguliert werden, die eine geringere Komplementarität aufweisen. Das könnte z.B. auch eine Erklärung für die Existenz unterschiedlicher Arten von miRNA Bindestellen sein (z.B. 5'-dominant und 3'-kompensatorisch; vgl. [85]). Dies legt wiederum nahe, dass die unterschiedlichen Interaktionen zwischen miRNA und ihren Ziel-mRNAs auch auf unterschiedlichen Prinzipien der RNA-RNA-Wechselwirkungen beruhen können und zusätzliche Faktoren, wie die Zugänglichkeit einer Bindestelle, darüber entscheiden, welche thermodynamisch „schwachen“ Interaktionen dennoch zur miRNA-vermittelten Regulation der Ziel-mRNA führen. Im Folgenden werden die Auswirkungen von SNP-korrelierten Strukturänderungen anhand der untersuchten Systeme spezifischer diskutiert.

Die AGTR1-miR-155 Interaktion ist durch eine vergleichsweise niedrige Bindungsenergie gekennzeichnet (siehe Abb. 5.2). Es ist also denkbar, dass die Zugänglichkeit der miR-155 Bindestelle einen verstärkenden Einfluss auf RNA-RNA-Wechselwirkung ausübt. Mittels RNA-Strukturprobing konnten für beide AGTR1-Varianten unterschiedliche Spaltmuster in der *seed* Region, nicht jedoch im 3'-Bereich der miR-155 Bindestelle detektiert werden (siehe Abb. 5.10). Letzteres kann darauf hindeuten, dass die Bindung 3'-kompensatorisch gestärkt wird, und daher trotz geringer Bindungsenergien die miR-155-AGTR1-Interaktion funktionell ist. Die unterschiedlichen Zugänglichkeiten im *seed* Bereich der AGTR1 A und AGTR1 C miR-155 Bindestelle können zudem eine Erklärung dafür bieten, dass die Einführung eines SNPs zwischen Ziel-RNA und miRNA für beide AGTR1-Varianten einen unterschiedlichen Einfluss hat. So zeigten die Analysen der miRNA-vermittelten Hemmung im Reporter-Assay, dass die AGTR1 3'-UTR Variante A von der miR-155_SNP stärker gehemmt wurde als die AGTR1 3'-UTR Variante C von der miR-155 (siehe Abb. 5.6).

Eine detaillierte Betrachtung des TCF21-Systems, ausgehend von der Strukturvorhersage über das Strukturprobing sowie die miRNA-vermittelte Regulation im Reporter-Assay als auch die Annealing Experimente, lässt folgenden Schluss zu: Die miR-224 Bindestellen der beiden SNP-Varianten unterscheiden sich wesentlich in ihrer RNA-Struktur. Im Fall der TCF21 C-Variante bindet die miR-224 an deren 5'-Ende an einer offenen Struktur (Loop-Region siehe Abb. 5.35 und Spaltmuster siehe Abb. 5.48). Der 3'-Bereich der miRNA Bindestelle hingegen zeigt eine geringere Zugänglichkeit. Die miR-224 weist einen vollständigen *seed-match* zur TCF21 C-Variante auf, sodass eine starke Interaktion am 5'-Ende der miRNA entsteht. Liegt nun aber die miR-224_SNP vor, so wird diese Bindung aufgrund des *mismatches* geschwächt. Es ist zudem denkbar, dass gerade in offenen Bereichen die Einführung eines *mismatches* größere Effekte auf die RNA-RNA-Wechselwirkung hat, da die den *mismatch* flankierenden Basen sterisch weiter voneinander entfernt liegen, um eine möglichst starke Interaktion aufrecht zu erhalten. Betrachtet man hingegen sowohl die vor-

hergesagte RNA-Struktur als auch das Probing-Muster der TCF21 G-Variante (siehe Abb. 5.35 und 5.48), so zeigt sich, dass sowohl die 5'- als auch 3'-Region der miRNA Bindestelle offenen Bereiche darstellen. Somit erscheint es möglich, dass die miR-224 Bindestelle der G-Variante durch Änderung der Struktur 3'-kompensatorische Eigenschaften aufweist. Durch die 3'-kompensatorische Interaktion hat der Basenaustausch in der miRNA (miR-224_SNP) keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung von als auch die Hemmung durch beide miR-224-Varianten. Die vorläufige Auswertung der Hemmung der TCF21 Reporter auf mRNA- und Protein-Ebene lassen zudem vermuten, dass beide TCF21-Varianten eine unterschiedliche Regulierbarkeit aufweisen. Während miR-224 die Expression beider TCF21 Luciferase-Reporter hemmt, zeigt hingegen nur die C-Variante eine deutliche Reduktion der mRNA Menge. Das kann bedeuten, dass für beide SNP-Varianten unterschiedliche Mechanismen der miRNA-vermittelten Hemmung zu tragen kommen können: die Expression der TCF21 G-Variante wird scheinbar eher durch translationale Inhibition, die der C-Variante hingegen durch Destabilisierung bzw. Degradation der mRNA vermittelt. Einen weiteren Hinweis auf Unterschiede in der Regulierbarkeit der TCF21-Varianten geben die Ergebnisse der Ko-Transfektion von miRNA mit gleichzeitig beiden TCF21-Varianten, da diese eine gewisse Dynamik des Systems bezüglich der Hemmung auf Transkriptionsebene verdeutlichen. Die Expression von TCF21 ist mesenchymspezifisch und an der Entstehung kardiovaskulär bedeutender Gewebe beteiligt [163]. Es ist denkbar, dass Unterschiede in der differenzierten Regulierbarkeit der beiden SNP-Varianten zu einem wichtigen Zeitpunkt der Entwicklung, etwa des Epikards und der umliegenden Ansätze der Koronararterien, einen entscheidenden Einfluss auf den Beginn pathologischer Prozesse ausüben können.

Die vorstehenden Ausführungen verdeutlichen, dass miRNA-Ziel-RNA Interaktionen deutliche Unterschiede in Bezug auf Bindungsenergien, strukturellen Kontexten bzw. Zugänglichkeiten der miRNA Bindestelle sowie als Folge auch der miRNA-vermittelten Regulation aufweisen können. Der Einfluss SNP-korrelierter Änderungen unterstreicht somit die Relevanz von 3'-UTR lokalisierten miR-SNPs, auch außerhalb von miRNA Bindestellen, in Bezug auf die Entstehung Krankheits-assoziiertes Dysregulationen.

6.3 Beeinflussung der miRNA-Regulation durch RNA-bindende Proteine

Schon während der Transkription assoziieren Proteine mit der mRNA, sodass ein sogenannter heterogener nukleärer Ribonukleoprotein (hnRNP) -Komplex entsteht. Eine unterstützende Funktion bei Wechselwirkungen zwischen komplementären RNAs nimmt beispielsweise das hnRNP-Protein A1 ein [174, 175].

Die Wechselwirkungen zwischen RNAs und Proteinen können jedoch auch auf eine ganz andere Art die miRNA-vermittelte Regulation einer Ziel-RNA beeinflussen. Ähnlich wie

miRNAs können RNA-bindende Proteine mit der 3'-UTR einer mRNA Sequenz-spezifisch interagieren und so die Genexpression stimulieren oder inhibieren [44, 176]. So kann die Bindung eines Proteins an die Ziel-mRNA entweder die miRNA Bindestelle blockieren oder aber die Zugänglichkeit für die miRNA erhöhen. Letzteres Szenario konnte für das RNA-Bindeprotein Pumilio beobachtet werden [177, 178]. Kedde *et al.* konnten zeigen, dass es durch die Bindung von Pumilio an die 3'-UTR von p27⁸ zu einer lokalen Strukturänderung kommt [178]. Diese führt zu einer verstärkten Bindung der miRNA an die p27 mRNA und ist mit einer daraus resultierenden gesteigerten Hemmung der p27 Expression verbunden (siehe Abb.6.1). Auch die computer-basierten Analysen von Leibovich *et al.* [177] zeigten, dass Pumilio für die miRNA-Regulation von unzugänglichen Ziel-mRNAs eine Rolle spielt, indem es durch Bindung an die RNA deren Sekundärstruktur öffnet und somit die Zugänglichkeit für miRNAs erhöht.

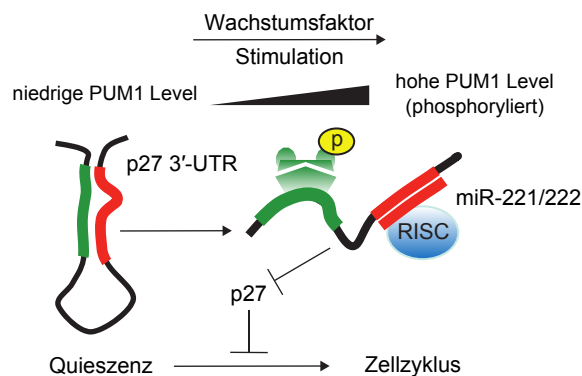


Abbildung 6.1: Modell der Funktion des RNA-Bindeproteins Pumilio bei der miRNA-vermittelten Regulation von p27. Erst nach Bindung von Pumilio an die 3'-UTR von p27 wird diese durch miR-221/222 gehemmt, sodass der Übergang von Quieszenz in den Zellzyklus erfolgt. verändert nach [178]

Interessanterweise enthält auch die AGTR1 3'-UTR eine Pumilio Erkennungs-Sequenz, die etwa 600 nt stromabwärts vom SNP rs5186 lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass auch die miRNA-Regulation der *AGTR1* mRNA durch lokale Strukturänderungen, die durch die Bindung von Pumilio hervorgerufen werden, beeinflussbar ist. Keines der anderen hier untersuchten Gene enthält jedoch eine Pumilio-Konsensussequenz in deren mRNA.

6.4 Detektion von RNA-RNA-Komplexen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kinetische RNA-RNA-Annealing-Experimente durchgeführt. Diese können Einblicke in den Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen RNAs

⁸auch Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B bzw. Kip1

gewähren. So sind bereits Zusammenhänge zwischen der Kinetik derartiger Wechselwirkung und der biologischen Aktivität von antisense RNAs in Prokaryoten [179, 180] oder siRNAs in Eukaryoten [130] beschrieben. Die Annealing-Analysen erfolgten zum Teil in Anwesenheit des quaternären Ammoniumsalzes CTAB, das ähnliche funktionelle Domänen zum hnRNP-Protein A1 aufweist [127] und somit eine Beschleunigung des RNA-RNA-Annealings bewirkt.

In allen durchgeführten Annealing-Experimenten wurden die *in vitro* Transkripte stets im Überschuss eingesetzt (mit CTAB: 10-fach, ohne CTAB: 50 bzw. 100-fach). Dennoch war keine 100 %-ige Bindung der miRNA/siRNA *guide* Stränge zu verzeichnen. Dies lässt vermuten, dass möglicherweise unterschiedliche RNA-Konformere vorliegen, die keine einheitliche Bindungskompetenz für die entsprechende miRNA bzw. siRNA aufweisen. Die Unterschiede in der Komplexbildung der verschiedenen SNP-Varianten zeigen jedoch, dass sich deren Anteil an bindungskompetenten RNA-Konformeren unterscheidet. Dies liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass strukturelle Unterschiede zwischen den Varianten bestehen.

Weiterhin zeigen die TCF21-Daten, dass unterschiedliche *in vitro* Transkript-Präparationen zu einer quantitativ differenzierten Komplexbildung führen können (vgl. Abb. 5.50 und Abb. 5.54). Es ist vorstellbar, dass minimale Unterschiede in den Versuchsbedingungen der *in vitro* Transkription die RNA-Faltung bereits während der Transkription beeinflussen können. Dies können wiederum dazu beitragen, dass unterschiedliche Anteile an bindungskompetenten RNA-Konformeren vorliegen. Derartige Unterschiede sind ebenfalls für die *in vivo* Transkription der Ziel-RNA denkbar und können so die miRNA-Ziel-RNA Interaktion beeinflussen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Versuche zum RNA-RNA-Annealing eine Möglichkeit darstellen, die mRNAs polymorpher Ziel-Gen Sequenzen auf eine differentielle RNA-RNA-Wechselwirkung mit miRNA bzw. siRNA *guide* Strängen zu untersuchen. Im Folgenden wird auf das Annealing partiell sowie vollständig komplementärer RNAs im Einzelnen näher eingegangen.

6.4.1 miRNA-RNA-Komplexe als Modell des Annealings partiell komplementärer RNAs

Die Experimente zur Annealing-Kinetik des jeweiligen miRNA *guide* Stranges an die Ziel-Gen 3'-UTR *in vitro* Transkripte ergaben differentielle Ergebnisse für die unterschiedlichen Testsysteme. Eine Komplexbildung konnte für die MRAS 3'-UTR mit der miR-195 sowie die TCF21 3'-UTR mit der miR-224, nicht jedoch für die AGTR1-miR-155 bzw. MRAS-miR-135a Interaktion detektiert werden. Eine vergleichende Betrachtung der Thermodynamik der jeweiligen Bindung, also der Bindungsenergien zwischen beiden RNAs, legt nahe, dass diese entscheidend für die Detektion derartiger Komplexe sein kann. Dennoch weisen die Ergebnisse des Annealings beider TCF21-Varianten darauf hin, dass trotz identischer Bin-

dungsenergien unterschiedliche Komplexe bzw. trotz geringer Bindungsenergien dennoch Komplexbildung nachweisbar ist. Dies bestätigt, dass auch andere Faktoren, wie z.B. die Zugänglichkeit der miRNA Bindestelle, eine entscheidende Bedeutung für die Stabilität der RNA-RNA-Wechselwirkung haben.

Die Ergebnisse der miRNA Annealing-Versuche im TCF21-System zeigen ferner eine starke Korrelation der beobachteten Komplexbildung zwischen miRNA und *in vitro* Transkript mit den Ergebnissen des Luciferase Reporter-Assays.

6.4.2 siRNA-RNA-Komplexe als Modell des Annealings komplementärer RNAs

Sowohl die siRNA Annealing-Versuche im AGTR1- als auch TCF21-System korrelieren deutlich mit der im Transfektionsexperiment gemessenen siRNA-vermittelten Repression der Luciferase Reporterexpression. Die Stärke der Komplexbildung ging mit der Hemmung im Reporter-Assay einher. Somit bestätigt sich die Beobachtung von Wünsche *et al.* [130], dass die biologische Aktivität von siRNAs mit der Kinetik der RNA-RNA-Wechselwirkung korreliert.

Auch die siRNA Transfektionsergebnisse im TCF21-System (siehe Abb. 5.46) zeigen, dass vergleichbar der miRNA-vermittelten Regulation der *mismatch* zwischen Ziel-RNA und siRNA einen größeren Einfluss auf die Repression der TCF21 C-Variante hat. Die deutlich verringerte Repression durch siTCF21 G kann zum einen auf den vorliegenden C-C *mismatch* zurückzuführen sein. Andererseits sprechen die deutlichen Unterschiede der Hemmung der TCF21 C-Variante durch die siTCF21 C im Vergleich zur siTCF21 G-induzierten Repression der TCF21 G-Variante trotz identischer Bindungsenergien für eine relevante Beteiligung der Sekundärstruktur. Derartige nicht ausschließlich durch thermodynamische Ansätze erklärbare Unterschiede wurden auch im Annealing-Experiment beobachtet (siehe Abb. 5.57).

6.5 siRNA-vermittelte Regulation polymorpher Ziel-Gene

Sowohl miRNAs als auch siRNAs sind Oligonukleotid-basierte Regulatoren der Genexpression mit verwandten Wirkmechanismen. Studien zum rationalen Entwurf von siRNAs dienen der Identifikation von Kriterien, die einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit von siRNAs ausüben. Reynolds *et al.* [122] verglichen z.B. die Hemmung zwei verschiedener mRNAs durch Analyse von je 90 siRNAs, deren Ziel-Sequenzen jeweils innerhalb einer 179 bp langen mRNA-Region liegen. Anhand der Ergebnisse wurden spezielle Kriterien aufgestellt, wie etwa zum GC-Gehalt, zum Vorhandensein von *inverted repeats* und zur Basenpräferenz an bestimmten Positionen. Die Berücksichtigung derartiger Kriterien kann für das Design biologisch wirksamer siRNAs hilfreich sein. Zusätzlich legt die Bedeutung der strukturellen Zugänglichkeit einer Ziel-RNA jedoch nahe, dass diese siRNA Sequenzmerkmale nicht

gleich bedeutsam für jede Ziel-RNA sind. Damit sind auch die Unterschiede in der Hemmung der kurzen und langen AGTR1 und ESR1 Reporter durch die entsprechenden siRNAs zu erklären. Die Reporter enthalten die identischen siRNA Erkennungsstellen jedoch in einem unterschiedlichen Sequenzkontext (kurz: firefly Luciferase, lang: AGTR1 bzw. ESR1 3'-UTR) und weisen deutliche Unterschiede in der siRNA-vermittelten Repression auf. Während die AGTR1 3'-UTR Reporter im Vergleich zu den kurzen Reportern deutlich stärker gehemmt werden, sind die kurzen im Vergleich zu den langen ESR1 Reportern besser durch siRNAs hemmbar.

Die Ergebnisse der siRNA Reporter-Assays zeigen ferner, dass ein *mismatch* zwischen Ziel-RNA und siRNA die siRNA-vermittelte Suppression z.T. sehr deutlich beeinflussen kann (siehe Abb. 5.8 und 5.46). In einer Studie von Schwarz *et al.* [181] zum Design von siRNAs, die zwischen Genen mit Einzelbasenaustauschen unterscheiden, lieferten Purin-Purin *mismatches* die größte Diskriminierung. Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls im AGTR1-System beobachtet. Der A-G *mismatch* zwischen AGTR1 A und der siAGTR1 C geht mit dem stärksten Verlust an Hemmung der 3'-UTR Reporter einher. Für die kurzen AGTR1 Reporter konnte diese Beobachtung jedoch nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz bestätigt weiterhin, dass die strukturellen Eigenschaften einer Ziel-RNA die Wirksamkeit und damit die Diskriminierung von siRNAs zwischen RNAs polymorpher Ziel-Gene beeinflussen.

Weiterhin lässt sich feststellen, dass die verschiedenen 3'-UTRs durch die jeweiligen siRNAs unterschiedlich stark gehemmt werden. So zeigte die siTCF21-vermittelte Regulation der TCF21 3'-UTR Reporter eine stärkere Hemmung als die siAGTR1-induzierte Repression der AGTR1 3'-UTR Reporter. Die ESR1 3'-UTR Reporter wiesen die geringste siRNA-vermittelte Hemmung auf. Diese unterschiedlichen Hemmwirkungen können auf Sequenz- und Strukturunterschieden der jeweiligen Erkennungsstelle aber auch der siRNA selbst beruhen.

Des Weiteren weisen die Vergleiche der Ergebnisse der siRNA und miRNA-Regulation darauf hin, dass sich die RNA-Varianten polymorpher Ziel-Gene in ihrer Zugänglichkeit für die beiden kleinen RNAs unterscheiden. So ist die AGTR1 3'-UTR C-Variante zugänglicher für siRNAs (Transfektion-Assay, siehe Abb. 5.8; Annealing, siehe Abb. 5.11), die AGTR1 3'-UTR A-Variante ist jedoch stärker durch miRNAs regulierbar (miRNA Transfektionsdaten mit beiden miR-155-Varianten, siehe Abb. 5.6).

6.6 Erkenntnisse für zukünftige Analysen von miR-SNPs

6.6.1 RNA-Strukturvorhersage als *pre-screening*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Anschluss an die ersten Analysen im AGTR1- und ESR1-System Sekundärstrukturvorhersagen für weitere potentielle miR-SNPs durchgeführt. Nur für einen der analysierten SNPs, NT5C2 rs10786736, wurden für beide SNP-Varianten

identische Sekundärstrukturen vorhergesagt (siehe Tab. 5.9) wohingegen für die Vorhersagen aller anderen analysierten SNPs eine mit dem SNP korrelierte Strukturveränderungen beobachtet werden konnten. Diese Strukturunterschiede konnten in experimentellen Analysen der näher untersuchten miR-SNPs, MRAS rs9818870 und TCF21 rs12190287, bestätigt werden (siehe Kap. 5.6 und 5.8).

Die Vorhersage der Sekundärstruktur kann somit als *pre-screening* Methode eingesetzt werden, um den Einfluss eines SNPs auf die lokale RNA-Struktur und damit seine Bedeutung für die miRNA-vermittelte Regulation zu analysieren. Eine deutliche Erleichterung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mfold-Analysen ergab sich aus der automatisierten Faltung (programmiert von Simon Dornseifer, Mitarbeiter im IMM). Nach Eingabe der RNA-Sequenz, der Fenstergröße und der Schrittweite wurden sämtliche sich daraus ergebenden Sekundärstrukturen automatisch berechnet (siehe Abb. 4.4). Am IMM existiert zudem ein Algorithmus, mit dem die Positionierung einer Base in einem gepaarten vs. ungepaarten Zustand bestimmt werden kann. Diese Art der Auswertung ist deutlich weniger zeitintensiv, kam im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht zur Anwendung. Die manuelle Auswertung erfolgte visuell, sodass jede Struktur an der SNP-Position und der miRNA Bindestelle analysiert werden konnte. Dies ermöglichte eine detaillierte Aussage zu den an den jeweiligen RNA-Positionen von Interesse vorliegenden Strukturelementen. Zur Vereinfachung dieses Vorgehens wäre die Programmierung eines entsprechenden Algorithmus, mit dem sich einzelne Strukturelemente bestimmen lassen, sehr hilfreich.

Sind für eine Ziel-RNA eine Vielzahl an SNPs beschrieben, so gestaltet sich eine vergleichende mfold-Analyse sehr schwierig (siehe Kap. 5.7). Dies gilt ebenso für weitere Analyse-Methoden, wie etwa eine vergleichende miRNA Ko-Transfektions- oder Strukturprobing-Analyse.

6.6.2 Auswahl von Sequenzen für Reporter-Gen-Konstrukte

Zur experimentellen Validierung von miRNA Bindestellen ist die Durchführung von Reporter-Gen-Assays weitverbreitet, jedoch existieren keine allgemeingültigen Vorgehensweisen für die Auswahl der klonierten Ziel-Gen Sequenzabschnitte. Im Zuge dieser Arbeit wurden Analysen im AGTR1-miR-155-System durchgeführt, bei denen zunächst Reporter-Konstrukte zur Anwendung kamen, die ausschließlich die Sequenz der miRNA Bindestelle enthalten. Anschließend erfolgten Analysen mittels Reporter-Konstrukten mit gesamter AGTR1 3'-UTR Sequenz. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der durch die miR-155 Varianten vermittelten Regulation der verschiedenen Reporter-Längen. Eine diesbezüglich mögliche Interpretation ist, dass die AGTR1-miR-155-Interaktion *in vivo* stark von der authentischen AGTR1-Sekundärstruktur abhängt. Das Einbringen einer kurzen Ziel-Sequenz in die MCS bedeutet, dass der Hauptteil der sich ausbildenden Sekundärstruktur von der Sequenz des Reportergens bestimmt ist. Dies kann zur Folge haben, dass die RNA-Struktur sehr stark

von der der authentischen Ziel-Gen mRNA abweicht. Ein SNP innerhalb der kurzen Inserts kann auch in diesem Fall einen Einfluss auf die Ausbildung der Reporter-Sekundärstrukturen haben, jedoch werden diese vermutlich nicht den authentischen Strukturen entsprechen.

Die ausführliche mfold-Analyse verschiedener TCF21 RNA-Längen sowie die durchgeführten *in vitro* Analysen mit den TCF21 200er Fragmenten haben gezeigt, dass bei kritischer Auswahl eines Ausschnittes der Ziel-Gen 3'-UTR auch mit kürzeren Inserts vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der RNA-Struktur um den SNP erzielt werden können (Sekundärstrukturvorhersage, siehe Abb. 5.34; Strukturprobing, siehe Abb. 5.49). Kann im Zuge von Strukturvorhersagen eine Positionierung des SNPs in vergleichbaren, lokalen Strukturelementen auch für unterschiedliche und bereits sehr kleine RNA-Ausschnitte beobachtet werden, so stellt die Verwendung von verkürzten 3'-UTR Abschnitten eine Option für *in vitro* Analysen dar. Die Auswahl von Fragmenten bis zu einer Länge von 200 nt ermöglicht eine synthetische Herstellung der Inserts. Dies bietet eine deutlich vereinfachte und i.d.R. weniger zeitintensive Klonierung schwer zu amplifizierender Sequenzen.

Relevante Parameter für die miRNA-vermittelte Regulation einer mRNA können sowohl die 3'-UTR Länge als auch die Anzahl an miRNA Bindestellen sein [57, 182]. Daher kann die Auswahl von verkürzten 3'-UTR Sequenzen dazu führen, dass die mit derartigen Konstrukten erfolgenden Experimente zu Phänotypen führen, die sich von denen der authentischen 3'-UTR unterscheiden. Dies scheint besonders bedeutsam für 3'-UTRs, die sehr lang sind, Bindestellen vieler miRNAs bzw. mehrere Bindestellen für eine miRNA besitzen. Beispielhaft sei an dieser Stelle auf die Analysen der Beeinflussung des SNPs rs34764978 auf die DHFR-Regulation durch miR-24 verwiesen (siehe Kap. 5.7). Der SNP liegt 14 nt stromabwärts einer miR-24 Bindestelle und Mishra *et al.* [149] führten Analysen mit verkürzten *DHFR* mRNAs durch, die zeigten, dass die beiden SNP-Varianten eine differentielle miR-24 Regulation aufweisen. Jedoch enthält die authentische *DHFR* mRNA eine um 2,5 kb längere 3'-UTR mit insgesamt vier potentiellen miR-24 Bindestellen. Das Vorhandensein von vier miR-24 Bindestellen lässt gegenwärtig Raum für Spekulation derart zu, dass diese vier Bindestellen in einer kooperativen Weise die DHFR Expression regulieren können. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die miR-24 vermittelte Regulation der verkürzten *DHFR* mRNAs von der der authentischen Gesamtlänge *DHFR* mRNA abweicht.

Die vorgenannten Erläuterungen verdeutlichen, dass eine kritische Auswahl von Ziel-Gen Sequenzen als auch Interpretation der Ergebnisse von Reporter-Assays erfolgen sollte.

6.6.3 Verwendung modifizierter miRNA *mimics*

Zur Analyse der miRNA-vermittelten Regulation einer Ziel-mRNA ist die Verwendung modifizierter, kurzer, partiell doppelsträngiger RNAs weit verbreitet. Die chemische Modifikation der Oligonukleotide kann sie vor Abbau durch extra- und intrazelluläre RNasen schützen, jedoch zur Folge haben, dass die Bindung an die Ziel-RNA verändert wird. Daher ist eine

derartige Beeinflussung der natürlichen RNA-RNA-Wechselwirkung für die mechanistische Analyse von miR-SNPs kritisch zu bewerten. Darüber hinaus ist es denkbar, dass derartige Modifikationen die Wechselwirkungen zwischen miRNA *mimic* und „schwachen“ miRNA Bindestellen verstärken können und somit die Genregulation weiterer Ziel-mRNAs beeinflussen. Ebenfalls zu berücksichtigen ist die Tatsache, dass die Hersteller kommerziell erhältlicher miRNA *mimics* weder zur Art noch zur Positionierung der chemischen Modifikationen detaillierte Angaben machen. Ferner hat die chemische Modifikation der miRNA *mimics* zur Folge, dass stets der miRNA-Strang und nicht der miRNA*-Strang in den RISC geladen wird. Dies beeinflusst somit stark die natürliche Strangselektion. Das Informationsblatt der *miRIDIAN* miRNA *mimics* von Dharmacon⁹ bewirbt überdies eine im Verhältnis zu nativer doppel-strängiger miRNA stärkere Repression. Es ist somit nicht auszuschließen, dass der Einsatz modifizierter miRNA *mimics* unterschiedliche Mechanismen im Vergleich zur authentischen miRNA-Regulation aufweist.

Dennoch muss an dieser Stelle zwischen mechanistischen Analysen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, und Untersuchungen zur Validierung von miRNA Funktion und/oder miRNA Ziel-Genen unterschieden werden.

6.7 Weitere funktionelle Analysen der untersuchten Risiko-Gene

Die vorliegende Arbeit hat sich im Wesentlichen mit mechanistischen Details der RNA-RNA-Wechselwirkungen, die an der miRNA-vermittelte Regulation der Genexpression beteiligt sind, beschäftigt. In Bezug auf die weitere Aufklärung der Beteiligung der untersuchten Gene an der jeweiligen Krankheitsentstehung sind jedoch noch weiterführende Analysen notwendig.

Eine Untersuchung der funktionellen Rolle der miRNA-Regulation eines Risiko-Gens mit Hilfe von *in vivo* Mausmodellen ist nicht immer einfach durchzuführen, z.B. wenn die Sequenzen der miRNA Bindestellen nicht zwischen Mensch und Maus konserviert sind. Dies ist sowohl für die miR-195 Bindestelle 1 innerhalb der MRAS 3'-UTR als auch für die miR-224 Bindestelle innerhalb der TCF21 3'-UTR der Fall.

Weitere funktionelle Analysen im MRAS-System werden um Frau Dr. rer. nat. Jennifer Freyer (Universität zu Lübeck, MKII, AG Kardiovaskuläre Genomik) durchgeführt. Anhand eines MRAS knock-out Mausmodells werden potentielle Pathomechanismen der Atherosklerose untersucht. Eine Assoziation des SNP rs12190287 mit der TCF21 Expression in Leberzellen und Adipozyten wurde bereits nachgewiesen (eQTL aus CARDIoGRAM¹⁰). Weitere *in vitro* Untersuchungen im TCF21-System wurden um PD Dr. med. Patrick Diemert am Universitären Herzzentrum des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf begonnen. Die Ex-

⁹<http://www.dharmacon.com/product/productlandingtemplate.aspx?id=276>

¹⁰persönliche Mitteilung von P. Diemert per email am 26.02.2012

pression der miR-224 in humanen Hepatozyten-Zelllinien (HuH7 und HepG2) wurde mittels qPCR bestätigt. Untersuchungen zum Einflusses der *Antagomir*-vermittelten Hemmung der miR-224 auf die TCF21 Expression sind in Planung.

6.8 Gen-spezifische RNAi-vermittelte Therapie

Die Möglichkeit der Sequenz-spezifischen Hemmung der Genexpression hat zum verbreiteten Einsatz der RNAi zu Gen-Funktions-Analysen geführt, weist jedoch ebenfalls ein Potenzial RNAi-basierter Wirkstoffe zu therapeutischen Zwecken auf. Im Folgenden werden Beispiele für bereits in klinischen Studien befindliche Therapeutika als auch weitere therapeutische Ansätze aufgeführt.

6.8.1 Beispiele für klinischen Studien von RNAi-Therapeutika

Zunächst seien Beispiele für siRNA-basierte Wirkstoffe, die bereits in klinischen Studien getestet werden, genannt. Die Inhibition des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) und der damit einhergehende Hemmung der okularen Neovaskularisierung unter Verwendung von siRNAs im Mausmodell wurde bereits im Jahr 2003 gezeigt [183]. Der Wirkstoff *Bevasiranib* der Firma *OPKO*, der zur Hemmung des VEGF zur Behandlung altersbedingten Makula-Degeneration eingesetzt wird, stellt das erste siRNA-Therapeutikum dar, das klinischen Studien der Phase III erreicht hat [184]. Auf dem Anfang Juni 2012 in Chicago stattfindenden Kongress der *American Society of Clinical Oncology* stellte die *Silence Therapeutics AG Berlin* Ergebnisse einer klinischen Phase I-Studie des RNAi-Therapeutikums *Atu027* vor [185]. *Atu027* wird zur Hemmung der Protein Kinase N3 bei der Behandlung von soliden Krebstumoren getestet.

Neben den siRNA-Wirkstoffen ist auch der folgende Anti-miRNA-basierte Therapieansatz in der klinischen Entwicklung. Der *Locked Nucleic Acid* (LNA)-basierte Wirkstoff *Miravirsen* (SPC3649) zur Inhibition der miR-122 in der Behandlung der Hepatitis C Virusinfektionen wurde in Primaten untersucht [186] und stellt nunmehr das erste gegen eine miRNA gerichtete Medikament dar, das in humanen klinischen Studien getestet wird [187].

6.8.2 Allel-spezifische siRNA-vermittelte Therapieansätze

Die auf Sequenz-spezifische RNA-RNA-Interaktionen beruhende RNAi ermöglicht einen Einsatz RNAi-basierter Wirkstoffe zur Allel-spezifischen Therapie. Die siRNA-vermittelte Repression der Expression des Huntingtin Gens zur Therapie der neuro-degenerativen Erkrankung Chorea Huntington stellt ein Beispiel für einen derartigen Therapieansatz dar. Ausgelöst wird Chorea Huntington durch eine Polyglutamin-Verlängerung des Huntingtin Proteins

aufgrund einer erhöhten Anzahl an CAG-*Repeats*, was zu toxischen Eigenschaften des Proteins führt [188]. Pfister *et al.* [189] untersuchten die Möglichkeit einer Hemmung von Huntingtin mittels Allel-spezifischer siRNAs. Diese sind nicht gegen die Sequenz der *Repeats*, sondern gegen Abschnitte innerhalb der Huntingtin-Sequenz, die sich zwischen den Patienten durch das Vorliegen verschiedener SNP-Varianten unterscheiden, gerichtet. Es werden also Patienten-spezifische siRNAs eingesetzt, um die mutierte Huntingtin mRNA zu hemmen. Die von drei SNPs ausgehende, unter Verwendung von fünf Allel-spezifischen siRNAs vermittelte Hemmung des krankhaft veränderten Huntingtins böte eine Therapiemöglichkeit für etwa 75 % der Chorea Huntington Patienten. Ein vergleichbarer Ansatz existiert für die Therapie von Spinocerebellärer Ataxie 7, die sich ebenfalls durch CAG-*Repeats* des Ataxin-7 manifestiert [190]. Weiterhin wurde der Einsatz von Allel-spezifischen siRNAs zur Hemmung von mutiertem Kollagen (COL3A1¹¹) zur personalisierten Therapie des vaskulären Typs des Ehlers Danlos-Syndroms, einer bisher unheilbaren Bindegewebsstörung, untersucht [191].

6.8.3 miR-SNPs und Therapieansätze

MiR-SNPs können zu einer gesteigerten oder verminderten miRNA-vermittelten Regulation der Genexpression eines Ziel-Gens führen und so an der Ausbildung eines pathologischen Phänotyps beteiligt sein. Somit ist eine Gen-spezifische, Oligonukleotid-basierte Therapie durch miRNA-Zugabe bzw. miRNA-Inhibition denkbar. Dennoch muss eine Allel-spezifische Therapie von miR-SNPs deutlich von den bisherigen Therapieansätzen mit Allel-spezifischen siRNAs (siehe Abschnitt 6.8.2) abgegrenzt werden. Die durch Expression krankhaft veränderter Gene hervorgerufene Erkrankungen sind nicht vergleichbar mit auf einer veränderten Gendosis basierenden Phänotypen. Eine weitere Erschwernis für den Einsatz von miRNA-basierten Wirkstoffen liegt darin begründet, dass miRNAs endogene Regulatoren der humanen Genexpression sind, während siRNAs als Gen-spezifische „Werkzeuge“ eingesetzt werden können.

Die artifizielle Überexpression einer miRNA kann neben der Expression des Gens von Interesse auch die weiterer Gene, die entsprechende Ziel-Gene der miRNA sind, beeinflussen. Im Fall von SNPs innerhalb einer miRNA Bindestelle kann das Einführen von SNPs in die miRNA-Sequenz zur Wiederherstellung der Basenpaarung zur SNP-Variante dazu führen, dass eine derartig modifizierte, nicht authentische miRNA zusätzliche endogene Ziel-Gene hat. Darüber hinaus haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass ein SNP innerhalb einer miRNA Bindestelle neben den thermodynamischen Eigenschaften der miRNA-Ziel-RNA Bindung ebenfalls die strukturelle Zugänglichkeit der Ziel-RNA beeinflussen kann. Möglicherweise damit im Zusammenhang stehend, war außerdem zu beobachten, dass eine *seed* Komplementarität nicht immer mit einer stärkeren miRNA-vermittelten Repression einhergeht. Dies zeigte sich sowohl im AGTR1- als auch TCF21-System. So wurde die

¹¹collagen type III alpha 1

AGTR1 C- im Vergleich zur AGTR1 A-Variante nicht stärker durch die miR-155_SNP gehemmt und die TCF21 G-Variante zeigte eine vergleichbare Hemmung durch beide verwendeten miR-224 Varianten, unabhängig davon, ob ein *seed-match* oder *seed-mismatch* vorlag.

Der Ausgleich eines *mismatches* zwischen miRNA und Ziel-RNA durch Modifikation des miRNA *guide* Stranges ist zudem nicht für die miR-SNPs geeignet, die außerhalb einer miRNA Bindestelle lokalisiert sind (z.B. MRAS rs9818870 und DHFR rs34764978). Eine Möglichkeit für Allel-spezifische Therapieansätze derartiger miR-SNPs böte die von Wang *et al.* vorgeschlagene *miRNA Mimic Technology*, auch *miR-Mimic* genannt [192, 193]. Die Sequenzen der *miR-Mimics* entsprechen nicht den authentischen miRNA-Sequenzen sondern sie sind Gen-spezifisch. Die *seed* Region sowie der 3'-Bereich des *miR-Mimics* werden entsprechend der Ziel-Gen Sequenz generiert. Von großer Bedeutung für das Design Sequenz-spezifischer *miR-Mimics* ist, vergleichbar mit der Auswahl geeigneter siRNA-Sequenzen, das Vermeiden unspezifischer, sogenannter *off target*, Effekte.

Es gibt Grund zu der Prognose, dass die Weiterentwicklung und der Einsatz miRNA-basierter Wirkstoffe in klinischen Studien langfristig ebenfalls zu Therapieansätzen für miR-SNP-induzierte molekularer Pathomechanismen führen kann.

7 Literaturverzeichnis

- [1] CHEN, K. ; RAJEWSKY, N.: The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. In: *Nat Rev Genet* 8 (2007), S. 93–103
- [2] CAMPBELL, N.A. ; REECE, J.B.: *Biologie*. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin, 2003. – S. 425
- [3] BARREIRO, L. B. ; LAVAL, G. ; QUACH, H. ; PATIN, E. ; QUINTANA-MURCI, L.: Natural selection has driven population differentiation in modern humans. In: *Nat Genet* 40 (2008), S. 340–345
- [4] RYAN, B. M. ; ROBLES, A. I. ; HARRIS, C. C.: Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. In: *Nat Rev Cancer* 10 (2010), S. 389–402
- [5] WINEINGER, N. E. ; TIWARI, H. K.: The impact of errors in copy number variation detection algorithms on association results. In: *PLoS One* 7 (2012), S. e32396
- [6] MCCARROLL, S. A. ; ALTSHULER, D. M.: Copy-number variation and association studies of human disease. In: *Nat Genet* 39 (2007), S. S37–S42
- [7] OLSON, M. V.: The human genome project. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993), S. 4338–4344
- [8] LIU, C.-K. ; CHEN, Y.-H. ; TANG, C.-Y. ; CHANG, S.-C. ; LIN, Y.-J. ; TSAI, M.-F. ; CHEN, Y.-T. ; YAO, A.: Functional analysis of novel SNPs and mutations in human and mouse genomes. In: *BMC Bioinformatics* 9 Suppl 12 (2008), S. S10
- [9] THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM: A map of human genome variation from population-scale sequencing. In: *Nature* 467 (2010), S. 1061–1073
- [10] BROOKES, A. J.: The essence of SNPs. In: *Gene* 234 (1999), S. 177–186
- [11] OLIVIER, M.: From SNPs to function: the effect of sequence variation on gene expression. Focus on “ A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression “. In: *Physiol Genomics* 16 (2004), S. 182–183
- [12] SAVAGE, S. A. ; STEWART, B. J. ; ECKERT, A. ; KILEY, M. ; LIAO, J. S. ; CHANOCK, S. J.: Genetic variation, nucleotide diversity, and linkage disequilibrium in seven telomere stability genes suggest that these genes may be under constraint. In: *Hum Mutat* 26 (2005), Oct, Nr. 4, S. 343–350
- [13] CASTLE, J. C.: SNPs occur in regions with less genomic sequence conservation. In: *PLoS One* 6 (2011), S. e20660
- [14] NICOLOSO, M. S. ; SUN, H. ; SPIZZO, R. ; KIM, H. ; WICKRAMASINGHE, P. ; SHIMIZU, M. ; WOJCIK, S. E. ; FERDIN, J. ; KUNEJ, T. ; XIAO, L. ; MANOUKIAN, S. ; SECRETO, G. ; RAVAGNANI, F. ; WANG, X. ; RADICE, P. ; CROCE, C. M. ; DAVULURI, R. V. ; CALIN, G. A.: Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility. In: *Cancer Res* 70 (2010), S. 2789–98
- [15] STENINA, O. I. ; BYZOVA, T. V. ; ADAMS, J. C. ; MCCARTHY, J. J. ; TOPOL, E. J. ; PLOW, E. F.: Coronary artery disease and the thrombospondin single nucleotide polymorphisms. In: *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2004), S. 1013–1030
- [16] KUBOTA, T. ; HORIE, M. ; TAKANO, M. ; YOSHIDA, H. ; TAKENAKA, K. ; WATANABE, E. ; TSUCHIYA, T. ; OTANI, H. ; SASAYAMA, S.: Evidence for a single nucleotide polymorphism in the KCNQ1

- potassium channel that underlies susceptibility to life-threatening arrhythmias. In: *J Cardiovasc Electrophysiol* 12 (2001), S. 1223–1229
- [17] URCELAY, E. ; MENDOZA, J. L. ; MARTÍN, M. C. ; MAS, A. ; MARTÍNEZ, A. ; TAXONERA, C. ; FERNANDEZ-ARQUERO, M. ; DÍAZ-RUBIO, M. ; DE LA CONCHA, E. G.: MDR1 gene: susceptibility in Spanish Crohn's disease and ulcerative colitis patients. In: *Inflamm Bowel Dis* 12 (2006), Jan, Nr. 1, S. 33–37
- [18] BRANT, S. R. ; PANHUYSEN, C. I. M. ; NICOLAE, D. ; REDDY, D. M. ; BONEN, D. K. ; KARALIUKAS, R. ; ZHANG, L. ; SWANSON, E. ; DATTA, L. W. ; MORAN, T. ; RAVENHILL, G. ; DUERR, R. H. ; ACHKAR, J.-P. ; KARBAN, A. S. ; CHO, J. H.: MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. In: *Am J Hum Genet* 73 (2003), S. 1282–1292
- [19] ZHU, Y. ; SPITZ, M. R. ; LEI, L. ; MILLS, G. B. ; WU, X.: A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. In: *Cancer Res* 61 (2001), S. 7825–7829
- [20] SAUTER, W. ; ROSENBERGER, A. ; BECKMANN, L. ; KROPP, S. ; MITTELSTRASS, K. ; TIMOFEEVA, M. ; WÖLKE, G. ; STEINWACHS, A. ; SCHEINER, D. ; MEESE, E. ; SYBRECHT, G. ; KRONENBERG, F. ; DIENEMANN, H. ; LUCY-Consortium ; CHANG-CLAUDE, J. ; ILLIG, T. ; WICHMANN, H.-E. ; BICKEBÖLLER, H. ; RISCH, A.: Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) is associated with early-onset lung cancer. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 (2008), S. 1127–1135
- [21] SAMANI, N. J. ET AL.: Genomewide association analysis of coronary artery disease. In: *N Engl J Med* 357 (2007), S. 443–53
- [22] ERDMANN, J. ET AL.: New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. In: *Nat Genet* 41 (2009), S. 280–2
- [23] SCHUNKERT, H. ET AL.: Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. In: *Nat Genet* 43 (2011), S. 333–8
- [24] LAMBRECHTS, D. ET AL.: 11q13 is a susceptibility locus for hormone receptor positive breast cancer. In: *Hum Mutat* 33 (2012), S. 1123–1132
- [25] GHOUSAINI, M. ET AL.: Genome-wide association analysis identifies three new breast cancer susceptibility loci. In: *Nat Genet* 44 (2012), S. 312–318
- [26] VOGEL, F.: Moderne Probleme der Humangenetik. In: *Ergebn Inn Med Kinderheilk* 12 (1959), S. 52–125
- [27] PASSETTI, F. ; FERREIRA, C. G. ; COSTA, F. F.: The impact of microRNAs and alternative splicing in pharmacogenomics. In: *Pharmacogenomics J* 9 (2009), Nr. 1, S. 1–13
- [28] WANG, J. ; PITARQUE, M. ; INGELMAN-SUNDBERG, M.: 3'-UTR polymorphism in the human CYP2A6 gene affects mRNA stability and enzyme expression. In: *Biochem Biophys Res Commun* 340 (2006), S. 491–497
- [29] RODRIGUEZ-ANTONA, C. ; INGELMAN-SUNDBERG, M.: Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. In: *Oncogene* 25 (2006), S. 1679–1691
- [30] INGELMAN-SUNDBERG, M. ; SIM, S. C. ; GOMEZ, A. ; RODRIGUEZ-ANTONA, C.: Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. In: *Pharmacol Ther* 116 (2007), S. 496–526
- [31] AITHAL, G. P. ; DAY, C. P. ; KESTEVEN, P. J. ; DALY, A. K.: Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. In: *Lancet* 353 (1999), S. 717–719
- [32] ONER OZGON, G. ; LANGAEE, T. Y. ; FENG, H. ; BUYRU, N. ; ULUTIN, T. ; HATEMI, A. C. ; SIVA, A. ; SAIP, S. ; JOHNSON, J. A.: VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms are associated

- with warfarin dose requirements in Turkish patients. In: *Eur J Clin Pharmacol* 64 (2008), S. 889–894
- [33] TAKEUCHI, F. ; MCGINNIS, R. ; BOURGEOIS, S. ; BARNES, C. ; ERIKSSON, N. ; SORANZO, N. ; WHITTAKER, P. ; RANGANATH, V. ; KUMANDURI, V. ; MCLAREN, W. ; HOLM, L. ; LINDH, J. ; RANE, A. ; WADELIUS, M. ; DELOUKAS, P.: A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. In: *PLoS Genet* 5 (2009), S. e1000433
- [34] GRIVNA, S. T. ; BEYRET, E. ; WANG, Z. ; LIN, H.: A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. In: *Genes Dev* 20 (2006), S. 1709–1714
- [35] KIM, V. N.: Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. In: *Genes Dev* 20 (2006), S. 1993–1997
- [36] LEE, R. C. ; FEINBAUM, R. L. ; AMBROS, V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* 75 (1993), S. 843–854
- [37] LEE, R. C. ; AMBROS, V.: An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. In: *Science* 294 (2001), S. 862–864
- [38] LAU, N. C. ; LIM, L. P. ; WEINSTEIN, E. G. ; BARTEL, D. P.: An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. In: *Science* 294 (2001), S. 858–862
- [39] HE, L. ; HANNON, G. J.: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. In: *Nat Rev Genet* 5 (2004), S. 522–531
- [40] CHENG, A. M. ; BYROM, M. W. ; SHELTON, J. ; FORD, L. P.: Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. In: *Nucleic Acids Res* 33 (2005), S. 1290–7
- [41] LAGOS-QUINTANA, M. ; RAUHUT, R. ; LENDECKEL, W. ; TUSCHL, T.: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. In: *Science* 294 (2001), S. 853–858
- [42] BARTEL, D. P.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *Cell* 116 (2004), S. 281–297
- [43] LEWIS, B. P. ; BURGE, C. B. ; BARTEL, D. P.: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. In: *Cell* 120 (2005), S. 15–20
- [44] FILIPOWICZ, W. ; BHATTACHARYYA, S. N. ; SONENBERG, N.: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? In: *Nat Rev Genet* 9 (2008), S. 102–114
- [45] LEE, Y. ; KIM, M. ; HAN, J. ; YEOM, K. H. ; LEE, S. ; BAEK, S. H. ; KIM, V. N.: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. In: *EMBO J* 23 (2004), S. 4051–60
- [46] YI, R. ; QIN, Y. ; MACARA, I. G. ; CULLEN, B. R.: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. In: *Genes Dev* 17 (2003), S. 3011–3016
- [47] BOHNSACK, M. T. ; CZAPLINSKI, K. ; GORLICH, D.: Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. In: *RNA* 10 (2004), S. 185–191
- [48] KIM, V. N.: Small RNAs: classification, biogenesis, and function. In: *Mol Cells* 19 (2005), S. 1–15
- [49] LIU, J. ; CARMELL, M. A. ; RIVAS, F. V. ; MARSDEN, C. G. ; THOMSON, J. M. ; SONG, J.-J. ; HAMMOND, S. M. ; JOSHUA-TOR, L. ; HANNON, G. J.: Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. In: *Science* 305 (2004), S. 1437–1441
- [50] MEISTER, G. ; LANDTHALER, M. ; PATKANIOWSKA, A. ; DORSETT, Y. ; TENG, G. ; TUSCHL, T.: Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. In: *Mol Cell* 15

- (2004), S. 185–97
- [51] JINEK, M. ; DOUDNA, J. A.: A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. In: *Nature* 457 (2009), S. 405–412
- [52] BEILHARZ, T. H. ; HUMPHREYS, D. T. ; CLANCY, J. L. ; THERMANN, R. ; MARTIN, D. I. ; HENTZE, M. W. ; PREISS, T.: microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. In: *PLoS One* 4 (2009), S. e6783
- [53] HUNTZINGER, E. ; IZAURRALDE, E.: Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. In: *Nat Rev Genet* 12 (2011), S. 99–110
- [54] HUTVÁGNER, G. ; ZAMORE, P. D.: A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. In: *Science* 297 (2002), S. 2056–2060
- [55] EULALIO, A. ; HUNTZINGER, E. ; IZAURRALDE, E.: Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. In: *Cell* 132 (2008), S. 9–14
- [56] GU, S. ; KAY, M. A.: How do miRNAs mediate translational repression? In: *Silence* 1 (2010), S. 11
- [57] FANG, Z. ; RAJEWSKY, N.: The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. In: *PLoS One* 6 (2011), S. e18067
- [58] FORMAN, J. J. ; COLLER, H. A.: The code within the code: microRNAs target coding regions. In: *Cell Cycle* 9 (2010), S. 1533–1541
- [59] CALIN, G. A. ; DUMITRU, C. D. ; 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, C. M.: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), S. 15524–15529
- [60] HE, H. ; JAZDZEWSKI, K. ; LI, W. ; LIYANARACHCHI, S. ; NAGY, R. ; VOLINIA, S. ; CALIN, G. A. ; LIU, C.-G. ; FRANSSILA, K. ; SUSTER, S. ; KLOOS, R. T. ; CROCE, C. M. ; DE LA CHAPELLE, A.: The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), S. 19075–19080
- [61] IORIO, M. V. ; FERRACIN, M. ; LIU, C.-G. ; VERONESE, A. ; SPIZZO, R. ; SABBIONI, S. ; MAGRI, E. ; PEDRIALI, M. ; FABBRI, M. ; CAMPIGLIO, M. ; MÉNARD, S. ; PALAZZO, J. P. ; ROSENBERG, A. ; MUSIANI, P. ; VOLINIA, S. ; NENCI, I. ; CALIN, G. A. ; QUERZOLI, P. ; NEGRINI, M. ; CROCE, C. M.: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. In: *Cancer Res* 65 (2005), S. 7065–7070
- [62] VOLINIA, S. ; CALIN, G. A. ; LIU, C.-G. ; AMBS, S. ; CIMMINO, A. ; PETROCCA, F. ; VISIONE, R. ; IORIO, M. ; ROLDO, C. ; FERRACIN, M. ; PRUEITT, R. L. ; YANAIHARA, N. ; LANZA, G. ; SCARPA, A. ; VECCHIONE, A. ; NEGRINI, M. ; HARRIS, C. C. ; CROCE, C. M.: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), S. 2257–2261
- [63] VOLINIA, S. ; CALIN, G. A. ; LIU, C.-G. ; AMBS, S. ; CIMMINO, A. ; PETROCCA, F. ; VISIONE, R. ; IORIO, M. ; ROLDO, C. ; FERRACIN, M. ; PRUEITT, R. L. ; YANAIHARA, N. ; LANZA, G. ; SCARPA, A. ; VECCHIONE, A. ; NEGRINI, M. ; HARRIS, C. C. ; CROCE, C. M.: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), S. 2257–2261
- [64] IKEDA, S. ; KONG, S. W. ; LU, J. ; BISPING, E. ; ZHANG, H. ; ALLEN, P. D. ; GOLUB, T. R. ; PIESKE, B. ; PU, W. T.: Altered microRNA expression in human heart disease. In: *Physiol Genomics* 31 (2007), S. 367–73
- [65] THUM, T. ; GALUPPO, P. ; WOLF, C. ; FIEDLER, J. ; KNEITZ, S. ; LAAKE, L. W. ; DOEVENDANS,

- P. A. ; MUMMERY, C. L. ; BORLAK, J. ; HAVERICH, A. ; GROSS, C. ; ENGELHARDT, S. ; ERTL, G. ; BAUERSACHS, J.: MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. In: *Circulation* 116 (2007), S. 258–67
- [66] CHENG, Y. ; JI, R. ; YUE, J. ; YANG, J. ; LIU, X. ; CHEN, H. ; DEAN, D. B. ; ZHANG, C.: MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? In: *Am J Pathol* 170 (2007), S. 1831–1840
- [67] HE, L. ; THOMSON, J. M. ; HEMANN, M. T. ; HERNANDO-MONGE, E. ; MU, D. ; GOODSON, S. ; POWERS, S. ; CORDON-CARDO, C. ; LOWE, S. W. ; HANNON, G. J. ; HAMMOND, S. M.: A microRNA polycistron as a potential human oncogene. In: *Nature* 435 (2005), S. 828–833
- [68] JOHNSON, S. M. ; GROSSHANS, H. ; SHINGARA, J. ; BYROM, M. ; JARVIS, R. ; CHENG, A. ; LABOURIER, E. ; REINERT, K. L. ; BROWN, D. ; SLACK, F. J.: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. In: *Cell* 120 (2005), S. 635–647
- [69] CALDAS, C. ; BRENTON, J. D.: Sizing up miRNAs as cancer genes. In: *Nat Med* 11 (2005), S. 712–714
- [70] LEE, Y. S. ; DUTTA, A.: The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. In: *Genes Dev* 21 (2007), S. 1025–30
- [71] VAN ROOIJ, E. ; OLSON, E. N.: MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. In: *J Clin Invest* 117 (2007), S. 2369–76
- [72] LIU, Z. ; SALL, A. ; YANG, D.: MicroRNA: An emerging therapeutic target and intervention tool. In: *Int J Mol Sci* 9 (2008), S. 978–99
- [73] LI, M. ; MARIN-MULLER, C. ; BHARADWAJ, U. ; CHOW, K. H. ; YAO, Q. ; CHEN, C.: MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease. In: *World J Surg* 33 (2009), S. 667–84
- [74] LUNDSTROM, K.: Micro-RNA in disease and gene therapy. In: *Curr Drug Discov Technol* 8 (2011), S. 76–86
- [75] ROBERTSON, B. ; DALBY, A. B. ; FEDOROV, Y. ; KARPILOW, J. ; KHVOROVA, A. ; LEAKE, D. ; VERMEULEN, A.: *Specificity of highly potent miRNA inhibitors*. https://www.dharmacon.com/uploadedFiles/Home/Support_Center/Posters/miridian-inhibitor-poster.pdf. Version: 2008
- [76] KRÜTZFELDT, J. ; RAJEWSKY, N. ; BRAICH, R. ; RAJEEV, K. G. ; TUSCHL, T. ; MANOHARAN, M. ; STOFFEL, M.: Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. In: *Nature* 438 (2005), S. 685–9
- [77] MATTES, J. ; YANG, M. ; FOSTER, P. S.: Regulation of microRNA by antagomirs: a new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function? In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 36 (2007), S. 8–12
- [78] ESAU, C. C.: Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides. In: *Methods* 44 (2008), S. 55–60
- [79] KRÜTZFELDT, J. ; KUWAJIMA, S. ; BRAICH, R. ; RAJEEV, K. G. ; PENA, J. ; TUSCHL, T. ; MANOHARAN, M. ; STOFFEL, M.: Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. In: *Nucleic Acids Res* 35 (2007), S. 2885–92
- [80] ROBERTSON, B. ; DALBY, A. B. ; KARPILOW, J. ; KHVOROVA, A. ; LEAKE, D. ; VERMEULEN, A.: Specificity and functionality of microRNA inhibitors. In: *Silence* 1 (2010), S. 10
- [81] VERMEULEN, A. ; ROBERTSON, B. ; DALBY, A. B. ; MARSHALL, W. S. ; KARPILOW, J. ; LEAKE, D. ; KHVOROVA, A. ; BASKERVILLE, S.: Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function. In: *RNA* 13 (2007), Nr. 5, S. 723–30
- [82] EBERT, M. S. ; NEILSON, J. R. ; SHARP, P. A.: MicroRNA sponges: competitive inhibitors of

- small RNAs in mammalian cells. In: *Nat Methods* 4 (2007), S. 721–6
- [83] MISHRA, P. J. ; BANERJEE, D. ; BERTINO, J. R.: MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. In: *Cell Cycle* 7 (2008), S. 853–8
- [84] LEWIS, B. P. ; SHIH, I. H. ; JONES-RHOADES, M. W. ; BARTEL, D. P. ; BURGE, C. B.: Prediction of mammalian microRNA targets. In: *Cell* 115 (2003), S. 787–98
- [85] BRENECKE, J. ; STARK, A. ; RUSSELL, R. B. ; COHEN, S. M.: Principles of microRNA-target recognition. In: *PLoS Biol* 3 (2005), S. e85
- [86] DOENCH, J. G. ; SHARP, P. A.: Specificity of microRNA target selection in translational repression. In: *Genes Dev* 18 (2004), S. 504–511
- [87] GRIMSON, A. ; FARH, K. K. ; JOHNSTON, W. K. ; GARRETT-ENGELE, P. ; LIM, L. P. ; BARTEL, D. P.: MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. In: *Mol Cell* 27 (2007), S. 91–105
- [88] SAUNDERS, M. A. ; LIANG, H. ; LI, W. H.: Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007), S. 3300–5
- [89] CHEN, K. ; RAJEWSKY, N.: Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. In: *Nat Genet* 38 (2006), S. 1452–6
- [90] YU, Z. ; LI, Z. ; JOLICOEUR, N. ; ZHANG, L. ; FORTIN, Y. ; WANG, E. ; WU, M. ; SHEN, S. H.: Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. In: *Nucleic Acids Res* 35 (2007), S. 4535–41
- [91] CHEN, K. ; SONG, F. ; CALIN, G. A. ; WEI, Q. ; HAO, X. ; ZHANG, W.: Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. In: *Carcinogenesis* 29 (2008), S. 1306–11
- [92] WU, M. ; JOLICOEUR, N. ; LI, Z. ; ZHANG, L. ; FORTIN, Y. ; L'ABBE, D. ; YU, Z. ; SHEN, S.: Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. In: *Carcinogenesis* 29 (2008), S. 1710–1716
- [93] CHRISTENSEN, B. C. ; MOYER, B. J. ; AVISSAR, M. ; OUELLET, L. G. ; PLAZA, S. L. ; MCCLEAN, M. D. ; MARSIT, C. J. ; KELSEY, K. T.: A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. In: *Carcinogenesis* 30 (2009), S. 1003–7
- [94] MISHRA, P. J. ; BERTINO, J. R.: MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. In: *Pharmacogenomics* 10 (2009), S. 399–416
- [95] BANDIERA, S. ; HATEM, E. ; LYONNET, S. ; HENRION-CAUDE, A.: microRNAs in diseases: from candidate to modifier genes. In: *Clin Genet* 77 (2010), S. 306–313
- [96] ZHANG, W. ; WINDER, T. ; NING, Y. ; POHL, A. ; YANG, D. ; KAHN, M. ; LURJE, G. ; LABONTE, M. J. ; WILSON, P. M. ; GORDON, M. A. ; HU-LIESKOVAN, S. ; MAURO, D. J. ; LANGER, C. ; ROWINSKY, E. K. ; LENZ, H. J.: A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. In: *Ann Oncol* (2010)
- [97] SONG, F.-J. ; CHEN, K.-X.: Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: big effects on cancer. In: *Chin J Cancer* 30 (2011), S. 381–391
- [98] SUN, G. ; YAN, J. ; NOLTNER, K. ; FENG, J. ; LI, H. ; SARKIS, D. A. ; SOMMER, S. S. ; ROSSI, J. J.: SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. In: *RNA* 15 (2009), S. 1640–51

- [99] DUAN, R. ; PAK, C. ; JIN, P.: Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. In: *Hum Mol Genet* 16 (2007), S. 1124–31
- [100] TIAN, T. ; SHU, Y. ; CHEN, J. ; HU, Z. ; XU, L. ; JIN, G. ; LIANG, J. ; LIU, P. ; ZHOU, X. ; MIAO, R. ; MA, H. ; CHEN, Y. ; SHEN, H.: A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18 (2009), S. 1183–7
- [101] XU, J. ; HU, Z. ; XU, Z. ; GU, H. ; YI, L. ; CAO, H. ; CHEN, J. ; TIAN, T. ; LIANG, J. ; LIN, Y. ; QIU, W. ; MA, H. ; SHEN, H. ; CHEN, Y.: Functional variant in microRNA-196a2 contributes to the susceptibility of congenital heart disease in a Chinese population. In: *Hum Mutat* 30 (2009), S. 1231–1236
- [102] HU, Z. ; CHEN, J. ; TIAN, T. ; ZHOU, X. ; GU, H. ; XU, L. ; ZENG, Y. ; MIAO, R. ; JIN, G. ; MA, H. ; CHEN, Y. ; SHEN, H.: Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. In: *J Clin Invest* 118 (2008), S. 2600–8
- [103] LEE, H. C. ; YANG, C. W. ; CHEN, C. Y. ; AU, L. C.: Single point mutation of microRNA may cause butterfly effect on alteration of global gene expression. In: *Biochem Biophys Res Commun* (2010)
- [104] GLINSKY, G. V.: An SNP-guided microRNA map of fifteen common human disorders identifies a consensus disease phenocode aiming at principal components of the nuclear import pathway. In: *Cell Cycle* 7 (2008), S. 2570–83
- [105] ABELSON, J. F. ; KWAN, K. Y. ; O'ROAK, B. J. ; BAEK, D. Y. ; STILLMAN, A. A. ; MORGAN, T. M. ; MATHEWS, C. A. ; PAULS, D. L. ; RASIN, M.-R. ; GUNEL, M. ; DAVIS, N. R. ; ERCAN-SENCICEK, A. G. ; GUEZ, D. H. ; SPERTUS, J. A. ; LECKMAN, J. F. ; DURE 4TH, L. S. ; KURLAN, R. ; SINGER, H. S. ; GILBERT, D. L. ; FARHI, A. ; LOUVI, A. ; LIFTON, R. P. ; SESTAN, N. ; STATE, M. W.: Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. In: *Science* 310 (2005), S. 317–320
- [106] WANG, G. ; VAN DER WALT, J. M. ; MAYHEW, G. ; LI, Y.-J. ; ZÜCHNER, S. ; SCOTT, W. K. ; MARTIN, E. R. ; VANCE, J. M.: Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. In: *Am J Hum Genet* 82 (2008), S. 283–289
- [107] CLOP, A. ; MARCQ, F. ; TAKEDA, H. ; PIROTTIN, D. ; TORDOIR, X. ; BIBÉ, B. ; BOUIX, J. ; CAIMENT, F. ; ELSÉN, J. ; EYCHENNE, F. ; LARZUL, C. ; LAVILLE, E. ; MEISH, F. ; MILENKOVIC, D. ; TOBIN, J. ; CHARLIER, C. ; GEORGES, M.: A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. In: *Nat Genet* 38 (2006), S. 813–818
- [108] HU, Z. ; BRUNO, A. E.: The Influence of 3'UTRs on MicroRNA Function Inferred from Human SNP Data. In: *Comp Funct Genomics* 2011 (2011), S. 910769
- [109] YE, Y. ; WANG, K. K. ; GU, J. ; YANG, H. ; LIN, J. ; AJANI, J. A. ; WU, X.: Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. In: *Cancer Prev Res (Phila)* 1 (2008), S. 460–9
- [110] LIN, J. ; HORIKAWA, Y. ; TAMBOLI, P. ; CLAGUE, J. ; WOOD, C. G. ; WU, X.: Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma. In: *Carcinogenesis* 31 (2010), S. 1805–1812
- [111] KIM, J.-S. ; CHOI, Y. Y. ; JIN, G. ; KANG, H.-G. ; CHOI, J.-E. ; JEON, H.-S. ; LEE, W.-K. ; KIM, D.-S. ; KIM, C. H. ; KIM, Y. J. ; SON, J.-W. ; JUNG, T. H. ; PARK, J. Y.: Association of a common AGO1 variant with lung cancer risk: a two-stage case-control study. In: *Mol Carcinog* 49 (2010), S. 913–921
- [112] LARSSON, E. ; SANDER, C. ; MARKS, D.: mRNA turnover rate limits siRNA and microRNA

- efficacy. In: *Mol Syst Biol* 6 (2010), S. 433. – Larsson, Erik Sander, Chris Marks, Debora Research Support, Non-U.S. Gov't England Molecular systems biology *Mol Syst Biol*. 2010 Nov 16;6:433.
- [113] ARVEY, A. ; LARSSON, E. ; SANDER, C. ; LESLIE, C. S. ; MARKS, D. S.: Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity. In: *Mol Syst Biol* 6 (2010), S. 363
- [114] KERTESZ, M. ; IOVINO, N. ; UNNERSTALL, U. ; GAUL, U. ; SEGAL, E.: The role of site accessibility in microRNA target recognition. In: *Nat Genet* 39 (2007), Nr. 10, S. 1278–84
- [115] LONG, D. ; LEE, R. ; WILLIAMS, P. ; CHAN, C. Y. ; AMBROS, V. ; DING, Y.: Potent effect of target structure on microRNA function. In: *Nat Struct Mol Biol* 14 (2007), S. 287–294
- [116] LIMA, W. F. ; MONIA, B. P. ; ECKER, D. J. ; FREIER, S. M.: Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics. In: *Biochemistry* 31 (1992), S. 12055–12061
- [117] MERCATANTI, A. ; RAINALDI, G. ; MARIANI, L. ; MARANGONI, R. ; CITTI, L.: A method for prediction of accessible sites on an mRNA sequence for target selection of hammerhead ribozymes. In: *J Comput Biol* 9 (2002), S. 641–653
- [118] AMARZGUIOUI, M. ; BREDE, G. ; BABAIE, E. ; GROTLI, M. ; SPROAT, B. ; PRYDZ, H.: Secondary structure prediction and in vitro accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes. In: *Nucleic Acids Res* 28 (2000), S. 4113–4124
- [119] SCZAKIEL, G. ; KRETSCHMER-KAZEMI FAR, R.: The role of target accessibility for antisense inhibition. In: *Curr Opin Mol Ther* 4 (2002), S. 149–153
- [120] KRETSCHMER-KAZEMI FAR, R. ; SCZAKIEL, G.: The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Aug, Nr. 15, S. 4417–4424
- [121] OVERHOFF, M. ; ALKEN, M. ; KRETSCHMER-KAZEMI FAR, R. ; LEMAITRE, M. ; LEBLEU, B. ; SCZAKIEL, G. ; ROBBINS, I.: Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. In: *J Mol Biol* 348 (2005), S. 871–81
- [122] REYNOLDS, A. ; LEAKE, D. ; BOESE, Q. ; SCARINGE, S. ; MARSHALL, W. S. ; KHVOROVA, A.: Rational siRNA design for RNA interference. In: *Nat Biotechnol* 22 (2004), Nr. 3, S. 326–30
- [123] PICARD, V. ; ERSDAL-BADJU, E. ; LU, A. ; BOCK, S. C.: A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase. In: *Nucleic Acids Res* 22 (1994), S. 2587–91
- [124] SANGER, F. ; COULSON, A. R.: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. In: *J Mol Biol* 94 (1975), S. 441–448
- [125] ECKARDT, S. ; ROMBY, P. ; SCZAKIEL, G.: Implications of RNA structure on the annealing of a potent antisense RNA directed against the human immunodeficiency virus type 1. In: *Biochemistry* 36 (1997), S. 12711–12721
- [126] BENECKE, H.: *RNA/Protein & Protein/Protein-Interaktionen innerhalb des U11/U12 di-snRNP Partikels des U12-abhängigen Spleißosoms aus HeLa-Zellen.*, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abteilung Zelluläre Biochemie. Göttingen, Diss., 2004
- [127] PONTIUS, B. W. ; BERG, P.: Rapid renaturation of complementary DNA strands mediated by cationic detergents: a role for high-probability binding domains in enhancing the kinetics of molecular assembly processes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991), S. 8237–8241
- [128] NEDBAL, W. ; FREY, M. ; WILLEMANN, B. ; ZENTGRAF, H. ; SCZAKIEL, G.: Mechanistic insights into p53-promoted RNA-RNA annealing. In: *J Mol Biol* 266 (1997), S. 677–87
- [129] NEDBAL, W. ; HOMANN, M. ; SCZAKIEL, G.: The association of complementary ribonucleic acids can be strongly increased without lowering Arrhenius activation energies or significantly

- altering structures. In: *Biochemistry* 36 (1997), S. 13552–7
- [130] WÜNSCHE, W. ; SCZAKIEL, G.: The activity of siRNA in mammalian cells is related to the kinetics of siRNA-target recognition in vitro: mechanistic implications. In: *J Mol Biol* 345 (2005), Nr. 2, S. 203–9
- [131] MATHEWS, D. H. ; SABINA, J. ; ZUKER, M. ; TURNER, D. H.: Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. In: *J Mol Biol* 288 (1999), S. 911–940
- [132] ZUKER, M.: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), S. 3406–3415
- [133] GRIFFITHS-JONES, S. ; GROCOCK, R. J. ; VAN DONGEN, S. ; BATEMAN, A. ; ENRIGHT, A. J.: miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), S. D140–D144
- [134] BETEL, D. ; WILSON, M. ; GABOW, A. ; MARKS, D. S. ; SANDER, C.: The microRNA.org resource: targets and expression. In: *Nucleic Acids Res* 36 (2008), S. D149–D153
- [135] REBHAN, M. ; CHALIFA-CASPI, V. ; PRILUSKY, J. ; LANCET, D.: GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases. In: *Trends Genet* 13 (1997), S. 163
- [136] WU, C. ; OROZCO, C. ; BOYER, J. ; LEGLISE, M. ; GOODALE, J. ; BATALOV, S. ; HODGE, C. L. ; HAASE, J. ; JANES, J. ; HUSS, Jon W. 3rd ; SU, A. I.: BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. In: *Genome Biol* 10 (2009), S. R130
- [137] SHERRY, S. T. ; WARD, M. H. ; KHOLODOV, M. ; BAKER, J. ; PHAN, L. ; SMIGIELSKI, E. M. ; SIROTKIN, K.: dbSNP: the NCBI database of genetic variation. In: *Nucleic Acids Res* 29 (2001), S. 308–311
- [138] MOONEY, S. D. ; ALTMAN, R. B.: MutDB: annotating human variation with functionally relevant data. In: *Bioinformatics* 19 (2003), S. 1858–1860
- [139] BAO, L. ; ZHOU, M. ; WU, L. ; LU, L. ; GOLDOWITZ, D. ; WILLIAMS, R. W. ; CUI, Y.: PolymiRTS Database: linking polymorphisms in microRNA target sites with complex traits. In: *Nucleic Acids Res* 35 (2007), S. D51–D54
- [140] ZIEBARTH, J. D. ; BHATTACHARYA, A. ; CHEN, A. ; CUI, Y.: PolymiRTS Database 2.0: linking polymorphisms in microRNA target sites with human diseases and complex traits. In: *Nucleic Acids Res* 40 (2012), S. D216–D221
- [141] GONG, J. ; TONG, Y. ; ZHANG, H.-M. ; WANG, K. ; HU, T. ; SHAN, G. ; SUN, J. ; GUO, A.-Y.: Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. In: *Hum Mutat* 33 (2012), S. 254–263
- [142] LARKIN, M. A. ; BLACKSHIELDS, G. ; BROWN, N. P. ; CHENNA, R. ; MCGETTIGAN, P. A. ; MCWILLIAM, H. ; VALENTIN, F. ; WALLACE, I. M. ; WILM, A. ; LOPEZ, R. ; THOMPSON, J. D. ; GIBSON, T. J. ; HIGGINS, D. G.: Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics* 23 (2007), S. 2947–2948
- [143] REHMSMEIER, M. ; STEFFEN, P. ; HOCHSMANN, M. ; GIEGERICH, R.: Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. In: *RNA* 10 (2004), S. 1507–1517
- [144] STOTHARD, P.: The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. In: *Biotechniques* 28 (2000), S. 1102–1104
- [145] MARTIN, M. M. ; LEE, E. J. ; BUCKENBERGER, J. A. ; SCHMITTGEN, T. D. ; ELTON, T. S.: MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. In: *J Biol Chem* 281 (2006), S. 18277–84

- [146] MARTIN, M. M. ; BUCKENBERGER, J. A. ; JIANG, J. ; MALANA, G. E. ; NUOVO, G. J. ; CHOTANI, M. ; FELDMAN, D. S. ; SCHMITTGEN, T. D. ; ELTON, T. S.: The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. In: *J Biol Chem* 282 (2007), S. 24262–9
- [147] SETHUPATHY, P. ; BOREL, C. ; GAGNEBIN, M. ; GRANT, G. R. ; DEUTSCH, S. ; ELTON, T. S. ; HATZIGEORGIOU, A. G. ; ANTONARAKIS, S. E.: Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. In: *Am J Hum Genet* 81 (2007), S. 405–13
- [148] ADAMS, B. D. ; FURNEAUX, H. ; WHITE, B. A.: The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. In: *Mol Endocrinol* 21 (2007), S. 1132–47
- [149] MISHRA, P. J. ; HUMENIUK, R. ; LONGO-SORBELLO, G. S. ; BANERJEE, D. ; BERTINO, J. R.: A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007), S. 13513–8
- [150] BAUDIN, B.: Polymorphism in angiotensin II receptor genes and hypertension. In: *Exp Physiol* 90 (2005), S. 277–282
- [151] ORO, C. ; QIAN, H. ; THOMAS, W. G.: Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. In: *Pharmacol Ther* 113 (2007), S. 210–226
- [152] ROSSKOPF, D. ; MICHEL, M. C.: Pharmacogenomics of G protein-coupled receptor ligands in cardiovascular medicine. In: *Pharmacol Rev* 60 (2008), S. 513–535
- [153] BONNARDEAUX, A. ; DAVIES, E. ; JEUNEMAITRE, X. ; FÉRY, I. ; CHARRU, A. ; CLAUSER, E. ; TIRET, L. ; CAMBIEN, F. ; CORVOL, P. ; SOUBRIER, F.: Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. In: *Hypertension* 24 (1994), S. 63–69
- [154] TSIAMBAS, E. ; GEORGIANNOS, S. N. ; SALEMIS, N. ; ALEXOPOULOU, D. ; LAMBROPOULOU, S. ; DIMO, B. ; IOANNIDIS, I. ; KRAVVARITIS, C. ; KARAMERIS, A. ; PATSOURIS, E. ; DOURAKIS, S.: Significance of estrogen receptor 1 (ESR-1) gene imbalances in colon and hepatocellular carcinomas based on tissue microarrays analysis. In: *Med Oncol* 28 (2011), S. 934–940
- [155] SHIMIZU, I.: Impact of oestrogens on the progression of liver disease. In: *Liver Int* 23 (2003), S. 63–69
- [156] CHANG, J. ; NICOLAS, E. ; MARKS, D. ; SANDER, C. ; LERRO, A. ; BUENDIA, M. A. ; XU, C. ; MASON, W. S. ; MOLOSHOK, T. ; BORT, R. ; ZARET, K. S. ; TAYLOR, J. M.: miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. In: *RNA Biol* 1 (2004), S. 106–113
- [157] LAGOS-QUINTANA, M. ; RAUHUT, R. ; YALCIN, A. ; MEYER, J. ; LENDECKEL, W. ; TUSCHL, T.: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. In: *Curr Biol* 12 (2002), S. 735–739
- [158] IKEDA, S. ; PU, W. T.: Expression and function of microRNAs in heart disease. In: *Curr Drug Targets* 11 (2010), S. 913–25
- [159] VAN ROOIJ, E. ; SUTHERLAND, L. B. ; LIU, N. ; WILLIAMS, A. H. ; MCANALLY, J. ; GERARD, R. D. ; RICHARDSON, J. A. ; OLSON, E. N.: A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), S. 18255–18260
- [160] SOBER, S. ; LAAN, M. ; ANNILO, T.: MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. In: *Biochem Biophys Res Commun* 391 (2010), S. 727–32
- [161] GOTO, Y. ; YUE, L. ; YOKOI, A. ; NISHIMURA, R. ; UEHARA, T. ; KOIZUMI, S. ; SAIKAWA, Y.: A

- novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. In: *Clin Cancer Res* 7 (2001), S. 1952–6
- [162] LU, J. ; CHANG, P. ; RICHARDSON, J. A. ; GAN, L. ; WEILER, H. ; OLSON, E. N.: The basic helix-loop-helix transcription factor capsulin controls spleen organogenesis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), S. 9525–9530
- [163] LU, J. ; RICHARDSON, J. A. ; OLSON, E. N.: Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. In: *Mech Dev* 73 (1998), S. 23–32
- [164] MUKHOPADHYAY, P. ; PACHER, P. ; DAS, D. K.: MicroRNA signatures of resveratrol in the ischemic heart. In: *Ann N Y Acad Sci* 1215 (2011), S. 109–16
- [165] TIKHOMIROVA, A. ; BELETSKAYA, I. V. ; CHALIKIAN, T. V.: Stability of DNA duplexes containing GG, CC, AA, and TT mismatches. In: *Biochemistry* 45 (2006), S. 10563–10571
- [166] PATZEL, V. ; SCZAKIEL, G.: Length dependence of RNA-RNA annealing. In: *J Mol Biol* 294 (1999), S. 1127–1134
- [167] SETHUPATHY, P. ; CORDA, B. ; HATZIGEORGIOU, A. G.: TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. In: *RNA* 12 (2006), S. 192–7
- [168] PAPADOPOULOS, G. L. ; RECZKO, M. ; SIMOSSIS, V. A. ; SETHUPATHY, P. ; HATZIGEORGIOU, A. G.: The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. In: *Nucleic Acids Res* 37 (2009), S. D155–D158
- [169] VERGOULIS, T. ; VLACHOS, I. S. ; ALEXIOU, P. ; GEORGAKILAS, G. ; MARAGKAKIS, M. ; RECZKO, M. ; GERANGELOS, S. ; KOZIRIS, N. ; DALAMAGAS, T. ; HATZIGEORGIOU, A. G.: TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. In: *Nucleic Acids Res* 40 (2012), S. D222–D229
- [170] CHEN, K. ; MAASKOLA, J. ; SIEGAL, M. L. ; RAJEWSKY, N.: Reexamining microRNA site accessibility in *Drosophila*: a population genomics study. In: *PLoS One* 4 (2009), S. e5681
- [171] MITCHELL, A. A. ; ZWICK, M. E. ; CHAKRAVARTI, A. ; CUTLER, D. J.: Discrepancies in dbSNP confirmation rates and allele frequency distributions from varying genotyping error rates and patterns. In: *Bioinformatics* 20 (2004), S. 1022–1032
- [172] PLATZER, M. ; HILLER, M. ; SZAFRANSKI, K. ; JAHN, N. ; HAMPE, J. ; SCHREIBER, S. ; BACKOFEN, R. ; HUSE, K.: Sequencing errors or SNPs at splice-acceptor guanines in dbSNP? In: *Nat Biotechnol* 24 (2006), S. 1068–1070
- [173] MUSUMECI, L. ; ARTHUR, J. W. ; CHEUNG, F. S. G. ; HOQUE, A. ; LIPPMAN, S. ; REICHARDT, J. K. V.: Single nucleotide differences (SNDs) in the dbSNP database may lead to errors in genotyping and haplotyping studies. In: *Hum Mutat* 31 (2010), S. 67–73
- [174] PONTIUS, B. W. ; BERG, P.: Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein: implications for a mechanism for rapid molecular assembly. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990), S. 8403–8407
- [175] KUMAR, A. ; WILSON, S. H.: Studies of the strand-annealing activity of mammalian hnRNP complex protein A1. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 10717–10722
- [176] KEDDE, M. ; AGAMI, R.: Interplay between microRNAs and RNA-binding proteins determines developmental processes. In: *Cell Cycle* 7 (2008), S. 899–903
- [177] LEIBOVICH, L. ; MANDEL-GUTFREUND, Y. ; YAKHINI, Z.: A structural-based statistical approach suggests a cooperative activity of PUM1 and miR-410 in human 3'-untranslated regions. In: *Silence* 1 (2010), S. 17
- [178] KEDDE, M. ; VAN KOUWENHOVE, M. ; ZWART, W. ; OUDE VRIELINK, J. A. ; ELKON, R. ; AGAMI,

- R.: A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility. In: *Nat Cell Biol* 12 (2010), S. 1014–20
- [179] WAGNER, E. G. ; SIMONS, R. W.: Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. In: *Annu Rev Microbiol* 48 (1994), S. 713–742
- [180] FRANCH, T. ; PETERSEN, M. ; WAGNER, E. G. ; JACOBSEN, J. P. ; GERDES, K.: Antisense RNA regulation in prokaryotes: rapid RNA/RNA interaction facilitated by a general U-turn loop structure. In: *J Mol Biol* 294 (1999), S. 1115–1125
- [181] SCHWARZ, D. S. ; DING, H. ; KENNINGTON, L. ; MOORE, J. T. ; SCHELTER, J. ; BURCHARD, J. ; LINSLEY, P. S. ; ARONIN, N. ; XU, Z. ; ZAMORE, P. D.: Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. In: *PLoS Genet* 2 (2006), S. e140
- [182] CHENG, C. ; BHARDWAJ, N. ; GERSTEIN, M.: The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs. In: *BMC Genomics* 10 (2009), S. 431
- [183] REICH, S. J. ; FOSNOT, J. ; KUROKI, A. ; TANG, W. ; YANG, X. ; MAGUIRE, A. M. ; BENNETT, J. ; TOLENTINO, M. J.: Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. In: *Mol Vis* 9 (2003), S. 210–216
- [184] OPKO HEALTH INC.: <http://www.opko.com/research/?doc=ophthalmics>. – Abrufdatum: 08.06.2012
- [185] STRUMBERG, D. ; SCHULTHEIS, B. ; MEYER-SABELLEK, W. ; VANK, C. ; GEBHARDT, F. ; SANTEL, A. ; KEIL, O. ; GIESE, K. ; KAUFMANN, J. ; DREVS, J.: Antimetastatic activity of Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation, targeting protein kinase N3 (PKN3): Final results of a phase I study in patients with advanced solid tumors. In: *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr e13597), 2012
- [186] LANFORD, R. E. ; HILDEBRANDT-ERIKSEN, E. S. ; PETRI, A. ; PERSSON, R. ; LINDOW, M. ; MUNK, M. E. ; KAUPPINEN, S. ; ØRUM, H.: Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. In: *Science* 327 (2010), S. 198–201
- [187] SANTARIS PHARMA A/S: <http://www.santaris.com/product-pipeline/drug-candidates/infectious-diseases>. – Abrufdatum: 08.06.2012
- [188] THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. In: *Cell* 72 (1993), S. 971–983
- [189] PFISTER, E. L. ; KENNINGTON, L. ; STRAUBHAAR, J. ; WAGH, S. ; LIU, W. ; DIFIGLIA, M. ; LANDWEHRMEYER, B. ; VONSATTEL, J. P. ; ZAMORE, P. D. ; ARONIN, N.: Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. In: *Curr Biol* 19 (2009), S. 774–8
- [190] SCHOLEFIELD, J. ; GREENBERG, L. J. ; WEINBERG, M. S. ; ARBUTHNOT, P. B. ; ABDELGANY, A. ; WOOD, M. J.: Design of RNAi hairpins for mutation-specific silencing of ataxin-7 and correction of a SCA7 phenotype. In: *PLoS One* 4 (2009), S. e7232
- [191] MÜLLER, G. A. ; HANSEN, U. ; XU, Z. ; GRISWOLD, B. ; TALAN, M. I. ; MCDONNELL, N. B. ; BRIEST, W.: Allele-specific siRNA knockdown as a personalized treatment strategy for vascular Ehlers-Danlos syndrome in human fibroblasts. In: *FASEB J* 26 (2012), S. 668–677
- [192] WANG, Z.: *MicroRNA Interference Technologies Chapter 4: miRNA Mimic Technology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009
- [193] XIAO, J. ; YANG, B. ; LIN, H. ; LU, Y. ; LUO, X. ; WANG, Z.: Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4. In: *J Cell Physiol* 212 (2007), S. 285–292

A Anhang

A.1 PCR-Details

Im folgenden Abschnitt sind für die im Abschnitt 4.1.1 beschriebenen PCRs die Reaktionsansätze sowie die entsprechenden PCR-Programme im Detail aufgeführt.

A.1.1 PCRs zur 3'-UTR Amplifikation

Tabelle A.1: PCR-Details zur Amplifikation der AGTR1 3'-UTR

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
cDNA Bibliothek	0,2 µg	1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s
5×Phusion HF Puffer	1 ×	2.	35 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
dNTPs	0,8 mM			Annealing	64 °C	20 s
AGTR1 FW Spel 2	0,5 µM			Extension	72 °C	30 s
AGTR1 RV SacI 2	0,5 µM	3.	1 ×	finale Extension	72 °C	450 s
Phusion Pol	1 u					
	f.v. 50 µl					

Tabelle A.2: PCR-Details zur Amplifikation der ESR1 3'-UTR

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
cDNA aus MCF-7 RNA	0,125 µg	1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s
5×Phusion HF Puffer	1 ×	2.	35 ×	Denaturierung	98 °C	30 s
dNTPs	0,8 mM			Annealing	70 °C	30 s
ESR1 FW Spel	0,5 µM			Extension	72 °C	60 s
ESR1 RV MluI	0,5 µM	3.	1 ×	finale Extension	72 °C	450 s
Velocity bzw. Precisor Pol	1 u					
	f.v. 50 µl					

Tabelle A.3: PCR-Details zur Amplifikation der MRAS 3'-UTR

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
MRAS PCR Fragment 1	10 ng	1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s
MRAS PCR Fragment 2	20 ng	2.	3 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
5×Phusion HF Puffer	1 ×			Annealing	63 °C	20 s
dNTPs	0,825 mM			Extension	72 °C	132 s
MRAS FW SacI	0,25 µM	3.	32 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
MRAS RV Sall	0,25 µM			Annealing/Extension	72 °C	152 s
Phusion Pol	1 u	4.	1 ×	finale Extension	72 °C	450 s
	f.v. 50 µl					

Tabelle A.4: PCR-Details zur Amplifikation der TCF21 3'-UTR

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
TCF21 PCR Fragment 1	10 ng	1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s
TCF21 PCR Fragment 2	10 ng	2.	10 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
5×Phusion HF Puffer	1 ×			Annealing	68 °C	20 s
dNTPs	0,96 mM			Extension	72 °C	90 s
TCF21 FW DraI	0,39 µM	3.	25 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
TCF21 RV Sall	0,39 µM			Annealing/Extension	72 °C	110 s
Phusion Pol	1 u			finale Extension	72 °C	450 s
	f.v. 50 µl					

A.1.2 Mutagenese-PCRs

Tabelle A.5: Übersicht verwendeter Templates und Primer zur Mutagenese-PCR

AGTR1	Template:	pMIR-Luci AGTR1 3'-UTR A (17,47 ng/µl)
	Primer (FW,M,RV):	AGTR1 FW SpeI 2,AGTR1 FW SNP,AGTR1 RV SacI 2
ESR1	Template:	pMIR-Luci ESR1 3'-UTR C (18,33 ng/µl)
	Primer (FW,M,RV):	ESR1 FW SpeI,ESR1 FW SNP,ESR1 RV MluI
MRAS	Template:	pmirGLO MRAS 3'-UTR C (25,19 ng/µl)
	Primer (FW,M,RV):	MRAS FW SacI,MRAS FW SNP,MRAS RV Sall
TCF21	Template:	pmirGLO TCF21 3'-UTR C (23,09 ng/µl)
	Primer (FW,M,RV):	TCF21 FW DraI,TCF21 FW SNP,TCF21 RV Sall

Für jede der durchgeführten Mutagenese-PCRs wurde die folgende Reaktion mit denen in Tab. A.5 aufgelisteten Templates und Primern angesetzt:

Tabelle A.6: Allgemeiner Reaktionsansatz der Mutagenese-PCR

	f.c.
Template	3,6 fmol
5×Phusion HF Puffer	1×
dNTPs	0,8 mM
RV-Primer	0,1 µM
M-Primer	0,1 µM
Phusion Pol	2 u
	f.v. 100 µl

Im Folgenden werden die PCR-Programme der Mutagenese-PCRs im Einzelnen aufgeführt.

Tabelle A.7: Mutagenese-PCR Programme AGTR1 und ESR1

			PCR-Programm			
			AGTR1		ESR1	
1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s	98 °C	180 s
2.	10 ×	Denaturierung	98 °C	10 s	98 °C	30 s
		Annealing	64 °C	20 s	70 °C	30 s
		Extension	72 °C	30 s	72 °C	60 s
3.	1 ×	finale Extension	72 °C	450 s	72 °C	450 s

Tabelle A.8: Mutagenese-PCR Programm MRAS und TCF21

			PCR-Programm			
			MRAS		TCF21	
1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s	98 °C	180 s
2.	3 ×	Denaturierung	98 °C	10 s	98 °C	10 s
		Annealing	63 °C	20 s	68 °C	20 s
		Extension	72 °C	132 s	72 °C	90 s
3.	7 ×	Denaturierung	98 °C	10 s	98 °C	10 s
		Annealing/Extension	72 °C	152 s	72 °C	110 s
4.	1 ×	finale Extension	72 °C	450 s	72 °C	450 s

A.1.3 PCRs zum Anfügen der T7 Promotor-Erkennungssequenz

Im folgenden Abschnitt werden die PCR-Reaktionen aufgeführt, mittels derer die Erkennungssequenz des T7 Promotors an das 5'-Ende der jeweiligen 3'-UTR Sequenz angefügt wurde.

Tabelle A.9: Details der AGTR1 T7-PCR

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
pMIR AGTR1 3'-UTR A/C	93,75 ng	1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s
5×Phusion HF Puffer	1×	2.	5 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
dNTPs	0,625 mM			Annealing	67 °C	20 s
AGTR1 T7 FW	0,625 µM			Extension	72 °C	90 s
AGTR1 RV Sacl 2	0,625 µM	3.	30 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
Phusion Pol	1,5 u			Annealing/Extension	72 °C	50 s
	f.v. 75 µl	4.	1 ×	finale Extension	72 °C	450 s

Tabelle A.10: Details der MRAS T7-PCR

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
pmirGLO MRAS 3'-UTR C/T	62,5 ng	1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s
5×Phusion HF Puffer	1×	2.	3 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
dNTPs	0,825 mM			Annealing	63 °C	20 s
MRAS T7 FW	0,25 µM			Extension	72 °C	132 s
MRAS RV Sall	0,25 µM	3.	32 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
Phusion Pol	1u			Annealing/Extension	72 °C	152 s
	f.v. 50 µl	4.	1 ×	finale Extension	72 °C	450 s

Tabelle A.11: Details der TCF21 T7-PCR

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
pmirGLO TCF21 3'-UTR C/G	62,5 ng	1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s
5×Phusion HF Puffer	1×	2.	5 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
dNTPs	0,8 mM			Annealing	66 °C	20 s
TCF21 T7 FW	0,325 µM			Extension	72 °C	90 s
TCF21 RV Sall	0,325 µM	3.	30 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
Phusion Pol	1 u			Annealing/Extension	72 °C	110 s
	f.v. 50 µl	4.	1 ×	finale Extension	72 °C	450 s

Tabelle A.12: Details der TCF21 200er T7-PCR

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
pmirGLO TCF21 3'-UTR C/G	75 ng	1.	1 ×	Denaturierung	98 °C	180 s
5×Phusion HF Puffer	1 ×	2.	5 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
dNTPs	0,375 mM			Annealing	68 °C	20 s
TCF21 200 T7 FW	0,25 µM			Extension	72 °C	20 s
TCF21 200 RV	0,25 µM	3.	30 ×	Denaturierung	98 °C	10 s
Phusion Pol	1,2 u			Annealing/Extension	72 °C	30 s
		4.	1 ×	finale Extension	72 °C	450 s
	f.v. 60 µl					

A.1.4 Kolonie-PCRs

Tabelle A.13: Details zur Kolonie-PCR von AGTR1, ESR1 und MRAS. PCR-Produkte: AGTR1 1150 bp, ESR1 1434 bp, MRAS 1469 bp

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
10×Taq Puffer	1 ×	1.	1 ×	Denaturierung	95 °C	180 s
dNTPs	0,8 mM	2.	35 ×	Denaturierung	95 °C	15 s
FW-Primer ¹	0,5 µM			Annealing	55 ² bzw. 57 ³ °C	30 s
RV-Primer ⁴	0,5 µM			Extension	72 °C	105 s
Taq Pol	400 u	3.	1 ×	finale Extension	72 °C	300 s
	f.v. 20 µl					

¹ AGTR1: AGTR1 Seq FW, ESR1: ESR1 Seq FW, MRAS: pmirGLO FW

² AGTR1 und ESR1

³ MRAS

⁴ AGTR1 und ESR1: pMIR Luci RV, MRAS: MRAS Seq RV

Tabelle A.14: Details zur Kolonie-PCR von TCF21. PCR-Produkt: 400 bp

PCR-Ansatz	f.c.	PCR-Programm				
10×Taq Puffer	1 ×	1.	1 ×	Denaturierung	95 °C	180 s
dNTPs	0,53 mM	2.	35 ×	Denaturierung	95 °C	15 s
pmirGLO FW	0,5 µM			Annealing	57 °C	30 s
TCF21 Kolonie PCR RV	0,5 µM			Extension	72 °C	45 s
Taq Pol	300 u	3.	1 ×	finale Extension	72 °C	300 s
	f.v. 15 µl					

A.2 Geräte- und Materialhersteller

accelrys®(San Diego, CA, USA), Ambion (siehe Applied Biosystems), Amersham Pharmacia (Freiburg, D), Audion Elektro (Kleve, D), anthos Mikrosysteme GmbH (Krefeld, D), Applied Biosystems (Darmstadt, D), **B**andelin (Berlin, D), B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D), Beckman Coulter (Krefeld, D), Becton Dickinson (Heidelberg, D), Biocat (Heidelberg, D), Bioline (London, GB), Biomers (Ulm, D), Biometra (Göttingen, D), Biorad (München, D), Biozym (Hessisch Oldendorf, D), Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, D), Brand (Wertheim, D), Brandt (Ludwigshafen, D), **C**anon (Krefeld, D), Cambrex (East Rutherford, NJ, USA), Cisco (St. Peters, MO, USA), Clontech (Palo Alto, CA, USA), **D**SMZ (Braunschweig, D), **E**ppendorf (Hamburg, D), Eurofins MWG (Ebersberg, D), **F**eather (Osaka, J), Fermentas (St. Leon-Rot, D), Finnzymes (Espoo, FIN), Fluka (Buchs, D), Forma Scientific (Marietta, OH, USA), Fuji (Düsseldorf, D), **G**E Healthcare (München, D), Gerhardt (Königswinter, D), Gibco (Karlsruhe, D), Gilson (Bad Camberg, D), Greiner (Frickenhäuser, D), **H** + P Labortechnik (Oberschließheim, D), Hartmann (Braunschweig, D), Heidolph (Schwalbach, D), Heraeus Instruments (Hanau, D), Hettich (Tuttlingen, D), Hirschmann (Eberstadt, D), Infors (Bottmingen, CH), Invitrogen (Karlsruhe, D), **J**ahnke & Kunkel (Staufen, D), **K**ern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, D), KnF Neuberger (Freiburg, D), **L**iebherr (Ochsenhausen, D), LKB (Bromma, S), **M**acherey & Nagel (Düren, D), Merck (Darmstadt, D), Millipore (Schwalbach, D), **N**algene (Rochester, NY, USA), neoLab (Heidelberg, D), New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), **P**AA (Pasching, A), Peqlab (Erlangen, D), Perkin-Elmer (Boston, MA, USA), Phase (Lübeck, D), Pharmacia Biotech (Düsseldorf, D), Promega (Mannheim, D), Qiagen (Hilden, D), **R**enner GmbH (Dannstadt, D), Roche (Basel, A), Roth (Karlsruhe, D), **S**arstedt (Nümbrecht, D), Sartorius (Göttingen, D), Savant (Midland, MI, USA), ScalTec (Göttingen, D), Schleicher & Schüll (Dassel, D), Schott (Darmstadt, D), Scotsman (Vernon Hills, IL, USA), Serva (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D), Sörk-Tronik (Medingen, D), Systec (Wettenberg, D), **T**echna (Jahnsdorf, D), Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA), Th. Geyer (Renningen, D), **V**ilber Lourmat (Eberhardzell, D), **W**aters (Eschborn, D), Werner Hassa GmbH (Lübeck, D), Whatman (Dassel, D), **Z**eiss (Jena, D)

A.3 Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen erläutert. Sollte sich die Abkürzung aus der englischen oder lateinischen Bezeichnung ergeben, ist diese in kursiver Schrift angegeben und zusätzlich die deutsche Übersetzung mit aufgeführt.

A	Adenin
A₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung

AG	Arbeitsgruppe
AGTR1	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Varianz-Analyse
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BS	Bindestelle
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytosin
ca.	circa
CAD	<i>coronary artery disease</i> , koronare Herzerkrankung
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	<i>coding sequence</i> , kodierende Sequenz
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie Virus
CNV	<i>copy number variation</i> , Kopienzahlveränderung
cpm	counts per minute, Zerfälle pro Minute
ct	<i>cycle treshold</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddNTP	di-Desoxynukleotidtriphosphat
d.h.	das heißt
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	<i>double-stranded</i> , doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
ESR1	Estrogen Rezeptor 1
EtOH	Ethanol
f.c.	<i>final concentration</i> , finale Konzentration
FGF20	Fibroblast Growth Factor 20
FKS	fötales Kälberserum
FL	firefly Luciferase
FW	<i>forward</i> , vorwärts
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GWAS	<i>genome-wide association study</i> , genom-weite Assoziationsstudie
h	<i>hour</i> , Stunde
H₂O	Wasser

hnRNP	heterogene nukleäre Ribonukleoproteine
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i> , intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
i.d.R.	in der Regel
IMM	Institut für Molekulare Medizin
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
k	Ratenkonstante
Kap.	Kapitel
kb	kilo Basen
LB	Luria Bertani
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
mfe	<i>minimal free energy</i> , minimale freie Energie
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio.	Million(en)
miRNA	microRNA
miR-SNP	Bezeichnung für einen SNP, der die miRNA Regulation beeinflusst
MKII	Medizinische Klinik II
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MRAS	muscle RAS oncogene homolog
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
n.d.	nicht detektierbar
NEB	New England Biolabs
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pb²⁺	Blei(II)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
piRNA	<i>Piwi-interacting ribonucleic acid</i>
PITA	Probability of Interaction by Target Accessibility
PLB	<i>passive lysis buffer</i> , passiver Lyse-Puffer
pmol	Pikomol
PNK	Polynukleotidkinase
Pol	Polymerase
pre-miRNA	<i>precursor</i> miRNA
pri-miRNA	<i>primary</i> miRNA
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAF	Risiko Allel Frequenz

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RL	<i>Renilla</i> Luciferase
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RV	<i>reverse</i> , rückwärts
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SLITRK1	Slit and NTRK-like 1
SND	<i>Single Nucleotide Differences</i> , Einzelnukleotid-Unterschiede
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
ss	<i>single stranded</i> , einzelsträngig
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCF21	Transkriptionsfaktor 21
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
tRNA	Transfer-RNA
u	unit(s) (enzymatische Aktivität)
U	Uracil
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i> , gegen, im Vergleich zu
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
XC	Xylencyanol
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

A.4 Verzeichnis gebräuchlicher, fremdspachiger Begriffe

Tabelle A.15: Gebräuchliche, fremdsprachige Begriffe

<i>guide</i> Strang	reifer miRNA Einzelstrang
<i>seed</i> -Region	Positionen 2-8 des miRNA <i>guide</i> Stranges (ausgehend vom 5'-Ende)
<i>match</i>	perfekte Watson-Crick Basenpaarung (G-C bzw. A-U(T))

mismatch keine perfekte Watson-Crick Basenpaarung
mimic Imitator, Mime

A.5 Abbildungsverzeichnis

2.1	Fluss der Genexpression	4
2.2	GWAS-Prinzip	6
2.3	Schema der miRNA- und siRNA-vermittelten Regulation der Genexpression .	9
2.4	Modulation der miRNA-Regulation durch miRNA <i>mimics</i> und Inhibitoren . . .	10
2.5	Mögliche Änderungen der Genexpression durch miR-SNPs	12
3.1	Verwendete Luciferase Reportergeren-Vektoren	28
4.1	Schematischer Ablauf der Mutagenese-PCR	34
4.2	Schematischer Ablauf des RNA-Strukturprobings	48
4.3	Schematische Darstellung des RNA-RNA-Annealings	50
4.4	Schematische Darstellung der systematischen RNA-Sekundärstrukturanalyse mittels mfold	54
5.1	Lokalisation des SNPs rs5186 innerhalb der miR-155 Bindestelle in der <i>AGTR1</i> mRNA	59
5.2	Lokale Bindungsenergien zwischen AGTR1 rs5186- und miR-155-Varianten .	60
5.3	AGTR1 Luciferase-Reporter-Transkript der AGTR1 miR-155 Bindestelle	61
5.4	AGTR1 Luciferase-Reporter-Transkript der gesamten AGTR1 3'-UTR	62
5.5	Hemmung der kurzen und langen AGTR1-Reporter durch pre-miR-155	63
5.6	Hemmung der kurzen und langen AGTR1-Reporter durch die miR-155-Varianten	64
5.7	Komplementaritäten und Bindungsenergien der AGTR1-Varianten mit siAG- TR1 A und siAGTR1 C	65
5.8	Unterschiedliche siRNA-vermittelte Hemmung der kurzen und langen AGTR1- Reporter	66
5.9	Die AGTR1 Strukturvorhersage weist auf Unterschiede zwischen den SNP- Varianten hin	68
5.10	Strukturprobung der AGTR1 <i>in vitro</i> Transkript-Varianten zeigt unterschiedliche Spaltpmuster	69
5.11	Komplexbildung aus AGTR1 3'-UTR und siAGTR1	72
5.12	RNase-Schnittstellen des AGTR1-siRNA-Komplexes	73
5.13	Komplexe aus AGTR1 3'-UTR und siAGTR1 sind vor RNase-Abbau geschützt	74
5.14	Lokalisation des SNPs rs9341070 innerhalb der miR-122 Bindestelle in der <i>ESR1</i> mRNA	76

5.15 Lokale Bindungsenergien zwischen ESR1 rs9341070- und miR-122-Varianten	77
5.16 ESR1 Luciferase-Reportertranskripte	78
5.17 Hemmung der kurzen und langen ESR1 Reporter durch verschiedene miRNA Tools	79
5.18 Komplementarität der ESR1-Varianten mit siESR1 C und siESR1 U	80
5.19 Unterschiedliche Hemmung der kurzen und langen ESR1-Reporter durch siRNAs	80
5.20 Minimale Unterschiede in der Strukturvorhersage der ESR1-Varianten	82
5.21 Strukturprobing der ESR1-Varianten deutet nicht auf strukturelle Unterschiede hin	83
5.22 Schematische Darstellung der <i>MRAS</i> mRNA mit der Lage des SNPs und den miR-195 und miR-135 Bindestellen	90
5.23 Lokale Bindungsenergien von <i>MRAS</i> 3'-UTR mit der miR-195 bzw. miR-135a	91
5.24 <i>MRAS</i> Strukturvorhersage weist auf SNP-induzierte Unterschiede hin	93
5.25 Generierung des Gesamtlänge <i>MRAS</i> 3'-UTR-Inserts über Teilfragmente	94
5.26 Differentielle Regulation der <i>MRAS</i> -Varianten durch miR-195 und miR-135a	95
5.27 Schematische Darstellung der Positionierung der <i>MRAS</i> Probing-Primer	95
5.28 Strukturprobing der <i>MRAS</i> 3'-UTR <i>in vitro</i> Transkript-Varianten zeigt unterschiedliche Spaltmuster	96
5.29 Untersuchung der zeitabhängigen Komplexbildung der <i>MRAS</i> 3'-UTR-Varianten mit miR-195 und miR-135a	98
5.30 <i>DHFR</i> mRNA mit Lokalisation des SNPs rs34764978 und der miR-24 Bindestellen	101
5.31 SNPs in der <i>DHFR</i> 3'-UTR	103
5.32 Lokalisation des SNPs rs12190287 innerhalb der miR-224 Bindestelle in der <i>TCF21</i> mRNA	105
5.33 Lokale Bindungsenergien zwischen <i>TCF21</i> rs12190287- und miR-224-Varianten	106
5.34 Prozentualer Anteil des jeweiligen Strukturkontextes der <i>TCF21</i> SNP-Varianten gruppiert nach Fenstergröße dargestellt	108
5.35 Vorhersage SNP-korrelierte Sekundärstrukturunterschiede zwischen den <i>TCF21</i> -Varianten	108
5.36 Generierung des Gesamtlänge <i>TCF21</i> 3'-UTR-Inserts über Teilfragmente	109
5.37 Generierung des verkürzten <i>TCF21</i> 3'-UTR-Inserts	110
5.38 Versuchsablauf zur Untersuchung der miRNA-vermittelten Regulation von <i>TCF21</i>	110
5.39 Primer zur Allel-spezifischen Amplifikation der <i>TCF21</i> -Varianten	111
5.40 Allel-spezifische Amplifikation der <i>TCF21</i> -Varianten	112
5.41 qPCR-Standardkurven zur Berechnung der <i>TCF21</i> -Transkriptmenge	113

5.42 miRNA-vermittelte Hemmung von TCF21 auf Transkriptebene	114
5.43 miRNA-vermittelte Hemmung von TCF21 auf Proteinebene	115
5.44 miRNA-vermittelte Hemmung der verkürzten TCF21-Reporter auf Proteinebene	116
5.45 Komplementarität der TCF21-Varianten zur siTCF21 C und siTCF21 G	117
5.46 Hemmung der Expression von TCF21 3'-UTR Luciferase-Reportern durch siRNAs	118
5.47 Schematische Darstellung der verwendeten TCF21 <i>in vitro</i> Transkripte	119
5.48 Strukturprobing der TCF21 3'-UTR-Varianten zeigt unterschiedliche Spaltmus- ter	120
5.49 Strukturprobing der verkürzten TCF21 <i>in vitro</i> Transkript-Varianten zeigt eben- falls unterschiedliche Spaltmuster	121
5.50 Unterschiedliche Kinetik der Komplexbildung der TCF21 3'-UTR-Varianten mit miR-224 und miR-224_SNP	122
5.51 Unterschiedliche Kinetik der Komplexbildung der TCF21 3'UTR Varianten mit miR-224 und miR-224_SNP in Abwesenheit von CTAB	124
5.52 Kinetik der spezifische Komplexbildung zwischen TCF21 und miR-224	125
5.53 Unterschiedliche Kinetik der Komplexbildung der verkürzten TCF21 <i>in vitro</i> Transkripte mit miR-224 und miR-224_SNP	126
5.54 Temperaturabhängige Komplexbildung zwischen TCF21 3'-UTR-Varianten und miR-224	128
5.55 Arrhenius-Plots des TCF21-Annealings	129
5.56 Annealing von miR-224 an TCF21 <i>in vitro</i> Transkripte mit anschließendem Probing	131
5.57 Kinetik des siRNA-Annealings an die TCF21 3'-UTR	132
5.58 Kinetik des siRNA-Annealings verkürzte TCF21 <i>in vitro</i> Transkripte	134
6.1 Modell der Funktion des RNA-Bindeproteins Pumilio bei der miRNA-vermittel- ten Regulation von p27	143

A.6 Tabellenverzeichnis

3.1 Geräte	17
3.2 Verbrauchsmaterialien	19
3.3 Chemikalien	19
3.4 <i>NCBI</i> mRNA Referenz-Sequenzen	21
3.5 DNA Oligonukleotide	21
3.6 miRNAs	22
3.7 siRNAs	23
3.8 Klonierungs-Primer	24

3.9	Sequenzier-Primer	25
3.10	Mutagenese-Primer	25
3.11	T7 Promotorsite-Primer	26
3.12	Probing-Primer	26
3.13	qRT-PCR-Primer	27
3.14	Plasmide	27
3.15	Kits	28
3.16	Enzyme	29
3.17	Größenmarker	29
3.18	Zellkulturmedien	30
3.19	<i>E.coli</i> Stämme	30
3.20	Puffer und Lösungen	30
4.1	Programm der Mutagenese-PCR	34
4.2	PCR-Programm zum Anfügen der T7 Promotorsite	35
4.3	Programm der Kolonie-PCR	35
4.4	qPCR: Reaktionsansatz und PCR-Programm	36
4.5	Sequenzier-PCR: Reaktionsansatz und PCR-Programm	37
4.6	10×dNTP-Mix Zusammensetzungen	38
4.7	Übersicht klonierter Inserts	39
4.8	Übersicht verwendeter Restriktionsenzyme	44
4.9	Spezifität verwendeter Probing-Agenzien	48
4.10	Übersicht der Reaktionsansätze des Annealings mit anschließendem Strukturprobing	52
4.11	Übersicht verwendeter Zelllinien.	52
4.12	Übersicht verwendeter Online-Tools	55
4.13	Übersicht verwendeter Programme	56
5.1	Übersicht der analysierten SNPs aus der Literatur	58
5.2	Übersicht der analysierten SNPs aus der MKII	58
5.3	Ergebnisse der AGTR1 Sekundärstrukturvorhersage	67
5.4	Ratenkonstanten des AGTR1 siRNA-Annealings	72
5.5	Ergebnisse der ESR1 RNA Sekundärstrukturvorhersage	81
5.6	Übersicht der SNP-Lokalisation weiterer analysierter SNPs	85
5.7	Übersicht der miRNA Bindestellen innerhalb der Ziel-Gen 3'-UTRs	86
5.8	Ergebnisse der c17orf39 Sekundärstrukturvorhersage	87
5.9	Ergebnisse der NT5C2 Sekundärstrukturvorhersage	87
5.10	Ergebnisse der SLC22A3 Sekundärstrukturvorhersage	88
5.11	Ergebnisse der MRAS Sekundärstrukturvorhersage für die SNP-Position	92

5.12 Ergebnisse der MRAS Sekundärstrukturvorhersage für die miR-195 und miR-135 Bindestellen	93
5.13 Ratenkonstanten des Annealings von MRAS 3'-UTR und miR-195 in Anwesenheit von CTAB	98
5.14 Ergebnisse der DHFR Sekundärstrukturvorhersage der miR-24 Bindestelle 1	101
5.15 Ergebnisse der DHFR Sekundärstrukturvorhersage der miR-24 Bindestelle 2	102
5.16 Ergebnisse der TCF21 Sekundärstrukturvorhersage	107
5.17 Ratenkonstanten des miRNA-Annealings der TCF21 3'-UTR-Varianten in An- und Abwesenheit von CTAB	123
5.18 Vergleich der Ratenkonstanten des TCF21 miRNA-Annealings von Gesamtlänge und verkürzten <i>in vitro</i> Transkripten in Anwesenheit von CTAB	127
5.19 Thermodynamische Parameter des TCF21-miR-224-Annealings bei 37°C . .	129
5.20 Ratenkonstanten des Annealings von TCF21 3'-UTR und siTCF21	133
5.21 Vergleich der Ratenkonstanten des siRNA-Annealings von Gesamtlänge und verkürzten TCF21 <i>in vitro</i> Transkripten	134
5.22 Tabellarische Übersicht ausgewählter Ergebnisse	136
A.1 PCR-Details zur Amplifikation der AGTR1 3'-UTR	165
A.2 PCR-Details zur Amplifikation der ESR1 3'-UTR	165
A.3 PCR-Details zur Amplifikation der MRAS 3'-UTR	166
A.4 PCR-Details zur Amplifikation der TCF21 3'-UTR	166
A.5 Übersicht verwendeter Templates und Primer zur Mutagenese-PCR	166
A.6 Allgemeiner Reaktionsansatz der Mutagenese-PCR	167
A.7 Mutagenese-PCR Programme AGTR1 und ESR1	167
A.8 Mutagenese-PCR Programm MRAS und TCF21	167
A.9 Details der AGTR1 T7-PCR	168
A.10 Details der MRAS T7-PCR	168
A.11 Details der TCF21 T7-PCR	168
A.12 Details der TCF21 200er T7-PCR	169
A.13 Details zur Kolonie-PCR von AGTR1, ESR1 und MRAS	169
A.14 Details zur Kolonie-PCR von TCF21	169
A.15 Gebräuchliche, fremsprachige Begriffe	173

A.7 Publikationsliste

Originalartikel

- 2012-06 **MicroRNA-mediated regulation of gene expression is affected by disease-associated SNPs within the 3'-UTR via altered RNA structure**
U. Haas, G. Sczakiel, S.D. Laufer
In: RNA Biol. 2012 Jun;9(6):924-37

Vortrag

- 2012-06 **SNPs within the 3'-UTR of target mRNA are related to dysregulated miRNA-mediated control of gene expression via altered RNA structure**
Glostrup (DK) U. Haas
Department of Clinical Diagnostics, The Glostrup Research Institute, Glostrup University Hospital

Konferenzbeiträge - Poster

- 2012-02 **A 3'-UTR-located miR-SNP of TCF21 is related to altered regulation of gene expression by miR 224: involvement of local RNA structure**
Vancouver (Kanada) U. Haas, S.D. Laufer, P. Diemert, J. Erdmann, G. Sczakiel
Keystone Symposium: „Gene Silencing by Small RNAs“
- 2011-09 **Single nucleotide polymorphisms within the 3'-UTR of target RNA are related to dysregulated miRNA-mediated control of gene expression via altered RNA structure**
Cambridge (UK) U. Haas, S.D. Laufer, G. Sczakiel
6th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology
- 2011-04 **Analysis of disease-correlated SNPs in microRNA targets reveals a potential role of RNA structure for microRNA function**
Mosbach U. Haas, G. Sczakiel, S.D. Laufer
62. Mosbacher Kolloquium: „Mechanisms of RNA-mediated regulation“, Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie
- 2011-02 **miR-SNPs influence microRNA function via changes of RNA structure**
Banff (Kanada) U. Haas, G. Sczakiel, S.D. Laufer
Keystone Symposium: „MicroRNAs and Human Disease“ und „MicroRNAs and Non-Coding RNAs and Cancer“

A.8 Danksagung

Ich danke allen, die zur Durchführung und zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei:

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel – der die Durchführung meiner Dissertation am Institut für Molekulare Medizin ermöglichte. Bedanken möchte ich mich besonders für das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine intensive und persönliche Betreuung sowie die zahlreichen wertvollen Diskussionen und Erörterungen wissenschaftlicher Fragestellungen.

Frau Dr. rer. nat. Sandra Laufer – für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die intensive Betreuung des Promotionsprojektes während unserer gemeinsamen Zeit am Institut und darüberhinaus.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann – für den wissenschaftlichen Austausch im Rahmen der „Kardiovaskulären Genomforschung“ sowie für ihre Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters – für die Bereitschaft zur Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses im Rahmen der Durchführung der Disputation.

Für die finanzielle Unterstützung meines Promotionsprojektes danke ich der **Werner und Klara Kreitz-Stiftung** sowie Frau Dr. Sandra Laufer für die Bereitstellung von Mitteln aus ihrer **Forschungsförderung der Universität zu Lübeck**.

Allen **Mitstreitern** während meiner Zeit am Institut –insbesondere **Frau Dr. Anke Detzer, Frau Dr. Andrea Deerberg, Frau Mira Elbasyouny, Frau Christina Engel, Herrn Patrick Lamm** und **Frau Sarah Willkomm**– für die hilfreichen Diskussionen, Anregungen und sonstige Unterstützung sowie die abwechslungsreichen Momente zwischendurch.

Frau Petra Höltig – für die stete und hilfsbereite Unterstützung bei den kleinen und großen Dingen organisatorischer und bürokratischer Art aber auch ihren wenn nötig aufmunternden Beistand.

Dankbar bin ich für **Herrn Winfried Wünsche's** Hilfe und Ratschläge rund ums Labor und die vielen gemeinsamen, ideenreichen Besprechungen.

Herrn Simon Dornseifer – für die überaus hilfreiche Automatisierung der RNA-Faltung mittels mfold.

Allen weiteren **Mitarbeitern** des Instituts für Molekulare Medizin –insbesondere **Frau Gabriele Kreutzfeldt, Frau Kirsten Frank** und **Frau Dr. Rosel Kretschmer-Kazemi Far**– für die freundliche Aufnahme am Institut, jedwede Hilfe und Unterstützung im Laboralltag sowie für die anregenden Diskussionen zwischendurch.

Meinem **LaTeX-Support** – vor Ort und im www.

Meinen **(Lauf-) Freunden** hier wie da – für die oftmals zu kurz gekommenen aber dennoch abwechslungsreichen, unterhaltsamen Stunden fernab von Labor und PC.

Meiner **Familie** – für ihren stetigen Rückhalt und die fortwährende Unterstützung.

Andreas – für seine unermüdliche Unterstützung und Geduld, seinen immer verlässlichen Beistand und so vieles andere mehr.