

**Validierung von miRNA-Zielgen-
Interaktionen und ihre Charakterisierung
bei Motoneuronenerkrankungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Biologie

Universität Bielefeld

vorgelegt von

Robert Heinen

aus Krefeld

Juni 2007

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Posttranskriptionelle Genregulation durch miRNAs	2
2.1.1	Historie der RNAi-Forschung	4
2.1.2	Biogenese von miRNAs im Menschen und in der Maus	6
2.1.3	Mechanismus der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genregulation	8
2.1.4	Mechanismus der Zielgenerkennung	10
2.1.5	Computergestützte Vorhersagen von miRNA-Zielgenen	12
2.1.6	Das Vorhersageprogramm RNAhybrid	14
2.1.7	Einfluss einer miRNA-vermittelten Genregulation	17
2.1.8	Bekannte Funktionen von miRNAs	17
2.2	Die Wobbler-Maus	19
2.3	Ziele dieser Arbeit	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Bakterienstämme	22
3.1.2	Zelllinien	22
3.1.3	Mausstämme	22
3.1.4	Vektoren	23
3.1.5	Oligonukleotide	23
3.1.6	Kulturmedien	29
3.1.6.1	Kulturmedien für Bakterien	29
3.1.6.2	Zellkulturmedien	29
3.1.7	Antibiotika	30
3.1.8	DNA-Längenstandards	30
3.1.9	Enzyme	30
3.1.10	Kits	31
3.1.11	Chemikalien	32
3.1.12	Antikörper	32
3.1.13	<i>In silico</i> Ressourcen	32
3.1.14	Bezugsquellen	33
3.2	DNA-Methoden	33
3.2.1	Handhabung rekombinanter Bakterien	33
3.2.2	Transformation von Bakterien	34
3.2.3	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	35
3.2.4	Agarosegelelektrophorese	35
3.2.5	Plasmidisolierung aus Bakterien	36
3.2.5.1	Easy Präp	36
3.2.5.2	Alkalische Lyse	37
3.2.5.3	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien mittels Ionenaustauschersäulen	38
3.2.5.4	Endotoxinfreie Plasmidisolierung	39
3.2.6	DNA-Isolierung aus Mausegewebe	39
3.2.7	Schnellpräparation von DNA aus Mausschwanzspitzen	40
3.2.8	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	41
3.2.9	Aufreinigung von PCR-Produkten	41
3.2.10	Quantifizierung von Nucleinsäuren	42
3.2.11	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
3.2.11.1	Gradienten-PCR	44
3.2.11.2	Verwendung einer Proofreading-Polymerase	44
3.2.11.3	Kolonie-PCR	45
3.2.12	Klonierung von PCR-Produkten	45

3.2.13	Restriktionsspaltung von DNA	46
3.2.14	DNA-Ligationen	46
3.2.15	Aufreinigung und Ankonzentrierung von DNA	47
3.2.16	Transfer von DNA auf Membranen (Southern-Blot)	48
3.2.17	Herstellung von radioaktiven Sonden (Random Priming).....	48
3.2.18	Hybridisierung und Detektion von Southern Blots	49
3.3	RNA-Methoden	50
3.3.1	RNA-Isolierung (total-RNA Präparation).....	50
3.3.2	Transfer von RNA auf Membranen (Northern Blot)	51
3.3.3	Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-Sonden am 5'Ende	52
3.3.4	Hybridisierung und Detektion von Northern Blots	52
3.3.5	Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)	53
3.3.6	Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR).....	54
3.3.7	5'RACE.....	55
3.3.7.1	5'RACE mit Hilfe des Systems von Roche	55
3.3.7.2	5'RACE mit Hilfe einer Adapterligation	56
3.4	Zellkulturmethoden	56
3.4.1	Kultivierung von Zellen	57
3.4.2	Langzeit-Lagerung von Zellen	57
3.4.3	Transiente Transfektion	58
3.4.4	Erzeugung einer Zelllinie mit stabiler Integrationen des Gens EGFP	59
3.5	Proteinbiochemische Methoden	59
3.5.1	Proteinisolierung	59
3.5.2	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	60
3.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
3.5.4	Coomassie-Färbung	61
3.5.5	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)	62
3.5.6	Immundetektion	62
3.5.7	Immunblot-Stripping.....	63
3.6	Präparation von Mausgeweben für <i>in situ</i> Hybridisierungen	63
3.7	Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System	63
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Vorhersage von miRNA-Zielgen-Interaktionen.....	65
4.1.1	Sequenzdaten-Beschaffung	65
4.1.2	Festlegen der Suchparameter	67
4.1.3	Poisson-Statistik	67
4.1.4	Orthologie-Vergleich	68
4.2	Validierung von vorhergesagten miRNA-Zielgen-Interaktionen.....	69
4.2.1	Etablierung des Testsystems.....	69
4.2.2	Validierung von Vorhersagen aus der Kategorie „klassische Vorhersage“	71
4.2.3	Validierung von Vorhersagen aus der Kategorie „G:U-zulassen“.....	78
4.2.4	Validierung von Vorhersagen aus der Kategorie „freie Vorhersage“	80
4.3	Charakterisierung der Interaktion der miRNA-17-3p und dem Gen <i>Vimentin</i> .83	
4.3.1	Validierung der inhibitorischen Wirkung der miRNA-17-3p durch die Interaktion mit der vorhergesagten Zielsequenz	84
4.3.2	Nachweis der Inhibition des nativen Gens <i>in vivo</i>	85
4.3.3	Untersuchung der miRNA-17-3p-Wirkung auf mRNA von Vimentin.....	86
4.4	Verknüpfung der miR17-3p:Vimentin-Interaktion mit der Wobbler-Maus.....	91

4.4.1	Vergleichende <i>in situ</i> Hybridisierungen der miR-17-3p im Rückenmark von Wobbler- und Wildtyp-Mäusen	92
4.4.2	Auswirkung der differentiellen Vimentin-Expression auf den Phänotyp der Wobbler-Maus	94
4.4.3	Vergleichende Expressionsuntersuchung von miRNAs mittels miRNA-Microarray	97
4.5	Charakterisierung der Expression und Funktion der miRNA-138	98
4.5.1	Erzeugung einer Mauslinie mit einem Null-Allel für miRNA-138.....	99
4.5.2	Reannotation der exakten miRNA-138 Sequenz.....	101
5	Diskussion.....	103
5.1	miRNA-Zielgenvorhersage	103
5.1.1	Verbesserung der Sequenzdatenqualität zur Steigerung der Spezifität und Sensitivität der Zielgenvorhersage	104
5.1.2	Validierung von miRNA-Zielgen-Interaktionen der Kategorie „klassische Vorhersage“	105
5.1.3	Validierung von miRNA-Zielgen-Interaktionen der Kategorien „G:U zulassen“ und „freie Vorhersage“	108
5.1.4	Bewertung der Daten und des Testsystems.....	110
5.1.5	Evaluation des Algorithmus	112
5.1.6	Mögliche Funktionen der validierten Interaktionen	114
5.1.6.1	<i>Ptdsr</i> :miR-96.....	114
5.1.6.2	<i>FutIV</i> :miR-412	114
5.1.6.3	<i>Mapk7</i> :miR-143	115
5.1.6.4	<i>Isl2</i> :miR-375.....	115
5.1.6.5	<i>Plk2</i> :miR-27b	116
5.1.6.6	<i>Vim</i> :miR-17-3p.....	116
5.2	Charakterisierung und Funktionsanalyse von miRNAs	117
5.2.1	Charakterisierung der miR-138.....	117
5.2.2	Einfluss von Vimentin in der Wobbler-Maus	118
5.2.3	Einfluss von miRNAs bei der Ausprägung des Wobbler-Phänotyps	120
5.3	Ausblick	124
6	Literatur	126
7	Anhang	136
7.1	Daten der Gewichts und Kraftmessungen.....	136
7.2	Vergleichende Sequenzanalyse des murinen <i>Trpc3</i> -Gens	138
7.3	Hybridisierungsstrukturen der analysierten miRNA-Zielgen-Interaktionen ..	138
7.4	Abkürzungsverzeichnis	142
7.5	Danksagung.....	144
7.6	Erklärung.....	145

1 Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNAs) sind eine kürzlich entdeckte Klasse posttranskriptioneller Genregulatoren, die in einer Vielzahl von Metazoen, Pflanzen und Viren verbreitet sind. Diese ~22nt langen, nicht kodierenden RNAs spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation vieler biologischer Prozesse, wie z.B. der Entwicklung, Differenzierung, Proliferation, dem Stoffwechsel und bei Erkrankungen. In Metazoen binden sie zusammen mit dem Effektor-Komplex RISC als miRNP vorwiegend im 3'UTR der Zielgen-mRNA mit unvollständiger Komplementarität, was zur Inhibierung der Translation führt. Eine miRNA kann mehrere Zielgene haben und umgekehrt kann ein Zielgen mit mehreren miRNAs interagieren. Obwohl bis heute ca. 3500 miRNAs in Metazoen entdeckt wurden, sind ihre Zielgene weitestgehend unbekannt, da die notwendigen Eigenschaften für eine Bindung nicht vollständig erfasst sind.

In dieser Arbeit wurde ein Reporter-System zur Validierung von miRNA-Zielgen-Interaktionen etabliert und weiterentwickelt. Es konnten sechs neue miRNA-Zielgene validiert werden, die durch das Programm RNAhybrid vorhergesagt wurden. Durch die Analyse der Rohdaten, der Auswertung der Validierungsexperimente und der stetigen interdisziplinären Diskussion mit dem Entwickler des Programms, Dr. Marc Rehmsmeier, konnte ein entscheidender Beitrag zur Verbesserung des Programms geleistet werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Charakterisierung von miRNAs in Wobbler-Tieren, die durch die Degeneration von Motoneuronen ein Mausmodell für SMA und ALS darstellen. Es konnte eine negative Korrelation der Expression zwischen der miR-17-3p und dem Zielgen Vimentin, welches in Wobbler-Tieren verstärkt exprimiert ist, festgestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese miRNA das Protein- und das mRNA-Niveau von Vimentin negativ reguliert. Die verstärkte Expression und Akkumulation von Vimentin in Wobbler-Tieren konnte als Grund für die Degeneration von Motoneuronen, durch Phänotypanalysen im Hinblick auf Krankheitsprogression und -beginn von Wobbler-Tieren mit intaktem und mit ausgeschaltetem Vimentin-Gen, ausgeschlossen werden. Durch die Erstellung eines vergleichenden miRNA-Expressionsprofils des Rückenmarks aus Wobbler- und Wildtyp-Tieren konnten neue Hinweise für die Pathologie der Erkrankung gewonnen werden. So zeigten sich im Rückenmark erkrankter Tiere vier miRNAs als negativ reguliert. Die Analyse der vorhergesagten Zielgene dieser miRNAs und die Tatsache, dass diese miRNAs in Wobbler-Tieren geringer exprimiert sind, lassen auf apoptotische Prozesse als Grund für die Degeneration der Motoneurone schließen.

Die Hinweise, dass miRNAs bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen, geben einen völlig neuen Einblick in die Pathomechanismen und können die Entwicklung neuer Therapieansätze anregen.

2 Einleitung

2.1 Posttranskriptionelle Genregulation durch miRNAs

Jede Zelle eines komplexen Organismus besitzt tausende von Genen, deren Produkt innerhalb des Organismus in den meisten Fällen nur zu einem bestimmten Zeitpunkt, in speziellen Geweben, unter bestimmten Bedingungen oder in festgelegter Konzentration benötigt wird. Dies erfordert ein äußerst komplexes System der Regulation. Die Regulation von Genen wird derzeit in vier Klassen eingeteilt (siehe Abbildung 2-1): Regulation der Transkription (1), posttranskriptionelle Regulation (2), Regulation der Translation (3) und posttranslationelle Regulation (4).

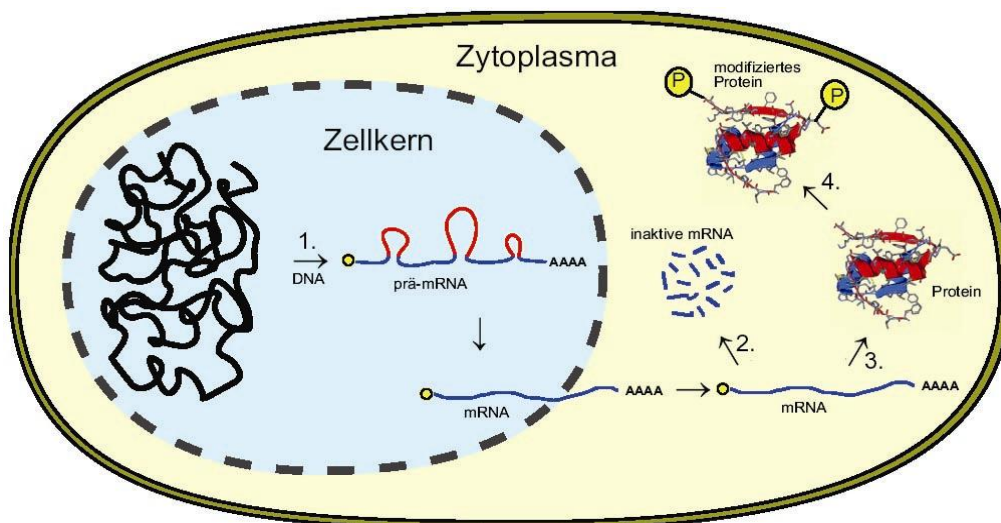
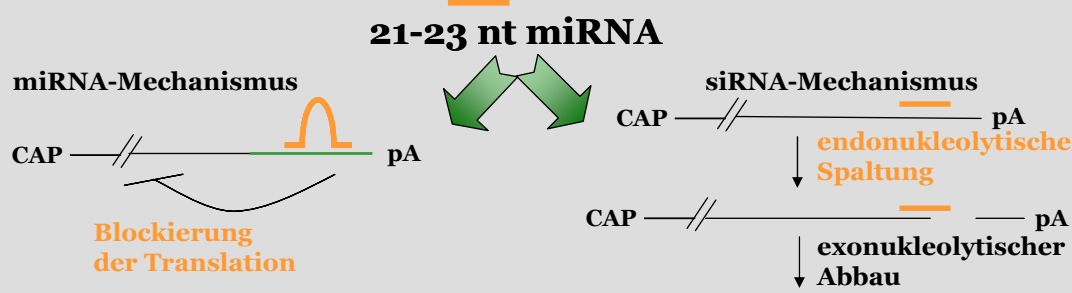


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Genexpression Die Zahlen zeigen die Hauptklassen der Regulation an: 1) Regulation der Transkription, 2) posttranskriptionelle Regulation, 3) Regulation der Translation und 4) posttranslationelle Regulation (aus Alberts *et al.*, 1995)

Das Gebiet der posttranskriptionellen Genregulation in Tieren und Pflanzen gewann im Laufe der vergangenen Jahre durch die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) enorm an Bedeutung. Bei der RNA-Interferenz werden kleine RNA-Moleküle von ca. 20-24 Nukleotiden in einen Effektor-Proteinkomplex eingebaut. Dieser Ribonukleoprotein-Komplex (RISC, *RNA induced silencing complex*) bewirkt eine negative Regulation der Ziel-mRNA wobei die kleinen RNAs die zielerkennende Funktion durch Basenpaarungen mit dem Zielgen haben. Die negative Regulation wird entweder durch eine Spaltung der Ziel-RNA oder durch eine Blockade der

Translation bewirkt. Aufgrund der Tatsache, dass der Effektor-Komplex mit unterschiedlichen, spezifischen zielerkennenden RNA-Molekülen bestückt werden kann, stellt die RNA-Interferenz ein sehr flexibles System der Genregulation dar. Die Herkunft dieser kleinen RNAs ist entweder endogen (microRNAs bzw. miRNAs) oder exogen (siRNA, *small interfering RNA*), wie im Fall der Virusabwehr. Die Tatsache, dass siRNAs auch künstlich in Zellen gebracht werden können und dort ganz spezifisch Gene ausschalten, macht die RNA-Interferenz zu einem sehr wertvollen Werkzeug für die Erforschung von Genen, aber auch bei der Entwicklung von Therapien. Die Forscher Andrew Fire und Craig Mello hatten einen maßgeblichen Anteil an der Entdeckung und Aufklärung der RNA-Interferenz, und ihnen wurde dafür im Jahr 2006 der Nobelpreis für Medizin verliehen.

Box1: Definition und Wirkungsweise von miRNAs und siRNAs



- stRNA (small temporal RNA):** historische Bezeichnung der ersten entdeckten miRNAs *lin-4* und *let-7*
 - miRNA (micro RNA):** kleines, ca. 22 Nukleotide langes und einzelsträngiges RNA-Molekül, das als Gen chromosomal codiert ist.
 - siRNA (small interfering RNA):** kleines, ca. 22 Nukleotide langes und einzelsträngiges RNA-Molekül mit exogenem Ursprung, siRNAs sind nicht als Gene codiert. Sie entstehen z.B. bei der natürlichen Virusabwehr oder sie werden als molekularbiologisches Werkzeug appliziert.
 - miRNA-Mechanismus:** die Bindung eines kleinen RNA-Moleküls und seines Effektor-Komplexes im 3'UTR einer mRNA führt in erster Linie zur Blockierung der Translation des Gens
 - siRNA-Mechanismus:** die Bindung eines kleinen RNA-Moleküls und seines Effektor-Komplexes in einer mRNA führt zu einer endonukleolytischen Spaltung der mRNA
- Kreuzbeziehung zwischen miRNAs, siRNAs, miRNA-Mechanismus und siRNA-Mechanismus:**
- miRNAs wirken in Metazoen meist nach dem miRNA-Mechanismus.
 - miRNAs können aber auch zur endonukleolytischen Spaltung einer mRNA führen und somit nach dem siRNA-Mechanismus wirken. Diese Interaktion ist in Pflanzen vorherrschend.
 - siRNAs werden z.B. appliziert, um die endonukleolytische Spaltung einer bestimmten mRNA herbei zuführen, man spricht von einem *Gen-knock-down*.
 - siRNAs können aber auch dem miRNA-Mechanismus folgen und zur Blockierung der Translation eines Gens führen. Diese Tatsache führt bei *Gen-knock-down*-Experimenten häufig zu ungewollten *Off-Target*-Effekten.

2.1.1 Historie der RNAi-Forschung

Im Jahr 1990 wurde eine Studie veröffentlicht, in der versucht wurde, die Farbintensität von Petunienblüten zu verstärken (Napoli *et al.*, 1990). Dies sollte durch die Überexpression des Gens Chalcon-Synthase (CHS) erreicht werden. Allerdings wurde der gegenteilige Effekt erzielt, die Farbintensität war schwächer und teilweise blieben die Blüten sogar weiß. Obwohl die transgenen Pflanzen mehrere Kopien der Chalcon-Synthase trugen, war die mRNA-Menge um ein 50-faches geringer als in Wildtyp-Pflanzen. Dieser Effekt wurde damals als Cosuppression bezeichnet.

1993 entdeckte die Arbeitsgruppe von Victor Ambros, dass das Gen *lin-4* in *C.elegans* nicht für ein Protein codiert, aber zwei unterschiedlich große Transkripte hervorbringt. Es wurde vermutet, dass sich das längere Transkript (61nt) in eine *stem-loop*-Struktur faltet und wahrscheinlich der Vorläufer des kürzeren Transkripts (21nt) ist (Lee *et al.*, 1993). Kurz darauf entdeckte man, dass dieses kurze Transkript, genannt stRNA (*small temporal RNA*), mehrere komplementäre Sequenzen im 3'UTR des Gens *lin-14* besitzt und die Proteinmenge von *lin-14* reguliert, ohne das mRNA-Niveau zu verändern. Diese Entdeckung ließ die Vermutung zu, dass *lin-4* mit *lin-14* eine RNA:RNA-Interaktion eingeht. Mutationen in *lin-4* führten dazu, dass diese kurze RNA das Zielgen *lin-14* nicht mehr regulieren konnte, und Larven des Fadenwurms *C.elegans* somit nicht mehr zur Transition von dem ersten zum zweiten Larvenstadium in der Lage waren (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993).

1998 zeigten Andrew Fire und Craig Mello, dass die Applikation von doppelsträngiger RNA in *C.elegans* zu einer genspezifischen und starken RNA-Interferenz führt.

Wenige Monate später konnte gezeigt werden, dass RNAi ein natürlicher antiviraler Abwehrmechanismus sein kann. Bei Pflanzen, die mit einem Virus infiziert wurden, fanden sie kleine RNA-Moleküle (25nt) die komplementär zur viralen RNA waren (Hamilton und Baulcombe 1999).

In den Jahren 2000 und 2001 erschienen zwei Veröffentlichungen, in denen gezeigt wurde, dass applizierte doppelsträngige RNA in 21-23nt lange Fragmente geschnitten wird. Einzelstränge dieser Fragmente werden in einen Effektor-Komplex (RISC) eingebaut und sind anschließend maßgeblich an der Degradation der Ziel-mRNA beteiligt (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001; Hammond *et al.*, 2001).

Im Jahr 2000, sieben Jahre nach der Entdeckung von *lin-4*, wurde die zweite stRNA *let-7* entdeckt (Reinhart *et al.*, 2000). Diese reguliert u.a. das Gen *lin-41* und spielt im *C.elegans* ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Transition der Larven.

Wenige Monate nachdem gezeigt werden konnte, dass *lin-4* kein Einzelfall war, führten mehrere Gruppen systematische Suchen nach neuen kleinen RNAs in der *D. melanogaster*, in *C.elegans* und im Menschen durch (Lagos-Quintana *et al.*, 2001 und 2003; Lau *et al.*, 2001; Lee and Ambros, 2001). In diesen ersten Studien wurden dutzende neuer kleiner RNAs gefunden, die miRNAs genannt wurden. Durch diese Entdeckung wuchs das Interesse an diesem regulatorischen Mechanismus und an der Aufklärung der Funktion dieser RNAs, was man anhand der Veröffentlichungen sehen kann (siehe Abbildung 2-2). Bis heute sind in einer Vielzahl von Metazoen, Pflanzen und Viren insgesamt über 4000 miRNAs gefunden worden (Griffith-Jones 2006), und es wird immer deutlicher, dass sie bei vielen biologischen Prozessen wie z.B. Entwicklung, Differenzierung, Proliferation, Stoffwechsel und auch bei Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielen.

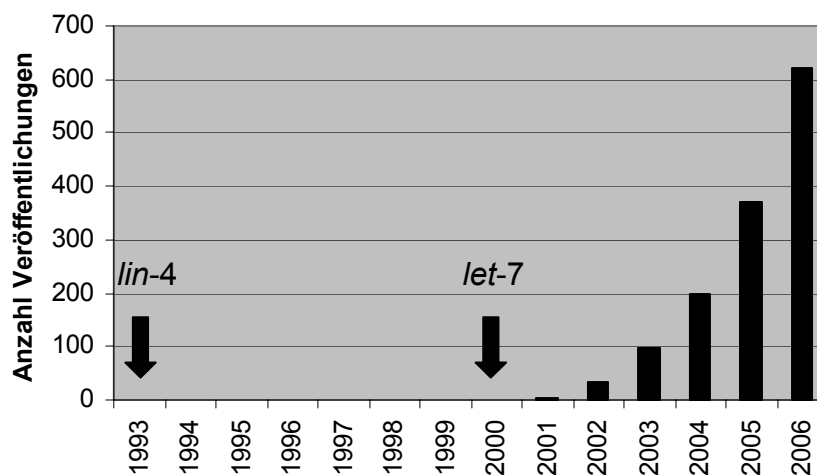


Abbildung 2-2: Anzahl der Veröffentlichungen auf dem Gebiet der miRNAs der letzten Jahre
Quelle: Pub-Med Datenbank, gesucht wurde mit dem Stichwort miRNA (Stand: Mai 2007).

2.1.2 Biogenese von miRNAs im Menschen und in der Maus

Mit etwa 75% liegen die meisten miRNA-Gene in intergenischen Regionen und bilden eigenständige Transkriptionseinheiten (Li *et al.* 2007). Etwa 25% sind jedoch in Introns von Genen lokalisiert, so dass sie mit diesen Genen koexprimiert werden. Sie liegen meistens, wie in Eukaryonten üblich, als monocistronische Gene vor. Darüber hinaus bilden sie aber auch Gen-Cluster mit polycistronischen Primärtranskripten (Lagos-Quintana *et al.*, 2001 und 2003, Lau *et al.*, 2001). Sehr viele der bisher entdeckten miRNAs sind in nahe verwandten Organismen, wie z.B. Mensch und Maus, hoch konserviert. Bei vielen konnte sogar eine Konservierung auch in evolutionär entfernteren Organismen nachgewiesen werden (Aravin *et al.*, 2003; Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2003). Die Primärtranskripte von miRNA-Genen (pri-miRNA) werden hauptsächlich durch die RNA-Polymerase-II synthetisiert und haben am 5'-Ende die m^7G -CAP-Struktur sowie einen poly-A-Schwanz am 3'-Ende (Cai *et al.*, 2004).

Das Primärtranskript wird durch den so genannten *microprocessor* zur *Precursor-miRNA* (pre-miRNA) umgewandelt (zur Übersicht siehe Abbildung 2-3). Dieser Enzymkomplex besteht aus dem RNA bindenden Protein DGCR8 und der TypIII-RNase Drosha (Denli *et al.*, 2004; Landthaler *et al.* 2004; Gregory *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). Die resultierende pre-miRNA bildet immer einen charakteristischen *stem-loop* mit einer Länge von ca. 70 Nukleotiden aus. Der *microprocessor* erkennt innerhalb des Primärtranskripts die *stem-loop*-Struktur und schneidet die pre-miRNA, ausgehend von der *Loop*-Struktur, nach ca. zwei helikalen Umdrehungen aus der pri-miRNA heraus (Lee *et al.*, 2003). Diese Distanzmessung wird von Sekundärstrukturen innerhalb des *stems* beeinflusst, und somit kann die exakte Schnittstelle fein justiert werden (Zheng und Cullen, 2003). Das entstehende 5'-Phosphat und der Überhang von 2 Nukleotiden am 3'-Ende der pre-miRNA sind charakteristische Merkmale einer RNase-III-Prozessierung (Lee *et al.*, 2002). Die genaue Funktion des Proteins DGCR8 ist noch nicht bekannt, jedoch verläuft die pri-miRNA-Prozessierung in Zellen, bei denen DGCR8 runterreguliert wurde (*knock-down*), wesentlich schlechter (Gregory *et al.*, 2004; Landthaler *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass das Protein die *stem-loop*-Struktur der pri-miRNAs erkennt, bindet und gleichzeitig das katalytisch aktive Enzym Drosha in räumliche Nähe zur pri-miRNA bringt.

Die pre-miRNA wird anschließend durch Ran-GTP und den Export-Rezeptor Exportin5 in einem aktiven Prozess aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Yi *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004).

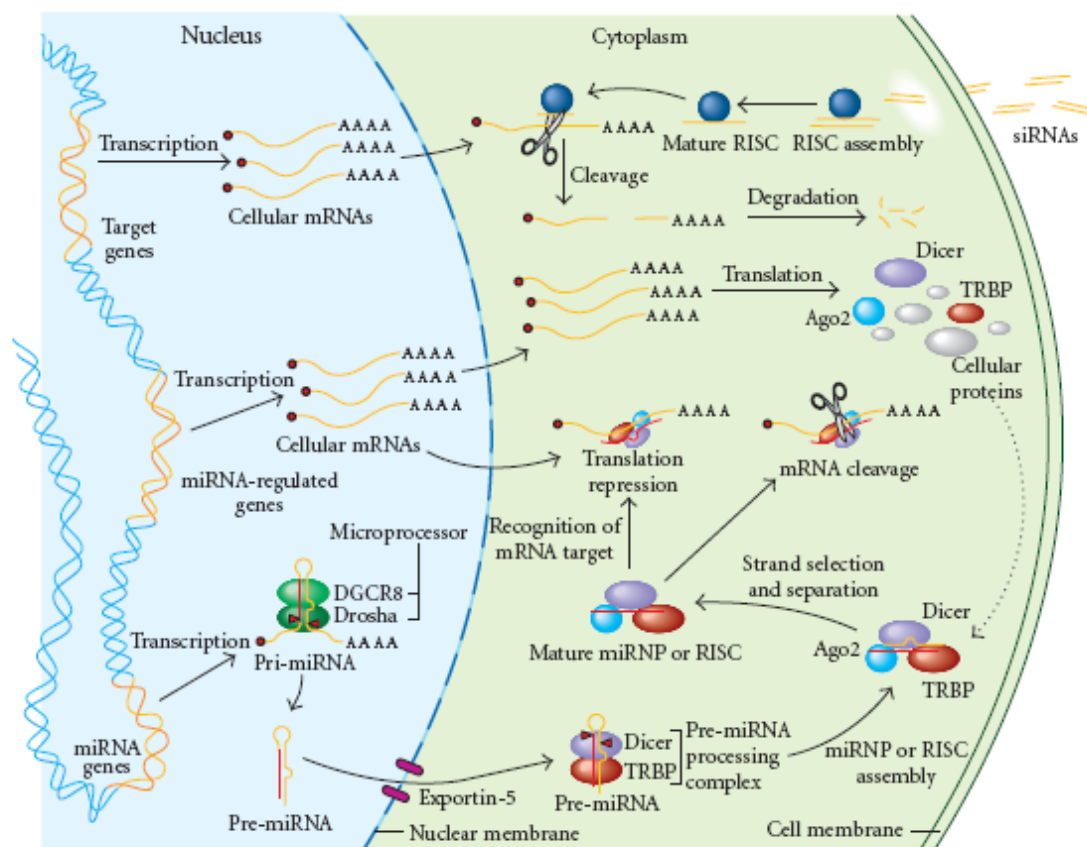


Abbildung 2-3 Regulation von mRNA durch miRNAs: miRNA Gene werden von der Polymerase II transkribiert. Das Primärtranskript (pri-miRNA) wird im Nukleus von dem *microprocessor*, bestehend aus den Proteinkomponenten Drosha und DGCR8, in 60-70 nt miRNA-Precursor (pre-miRNA) prozessiert. Nach dem Kern-Export in das Zytoplasma durch Exportin 5 wird die pre-miRNA von dem Enzym Dicer und dem transaktivierenden Protein TRBP geschnitten. Hieraus resultiert die miRNA-Duplex mit ca. 21-23 bp. Nachdem die miRNA von ihrem Gegenstrang getrennt wurde, wird sie in den Effektor-Komplex RISC (RNA induced silencing complex) eingebaut. Dieser besteht vorwiegend aus den Proteinen Dicer, TRBP und Ago2. RISC kann nun spezifisch mRNAs schneiden oder die Translation inhibieren. Es können auch künstlich hergestellte *small interfering RNAs* (siRNA) in Zellen gebracht werden. Diese werden in den endogenen RISC eingebaut und imitieren somit eine miRNA. (Abbildung aus Ouelett *et al.*, 2005)

Der nächste Schritt der miRNA-Reifung wird von dem Enzym Dicer ausgeführt. Dicer ist ebenfalls eine RNaseIII Endonuklease und besitzt eine PAZ-Domäne (Piwi/Argonau/Zwille) (Hutvagner *et al.*, 2001). Durch diese Domäne erkennt das Protein Dicer die 3'-Überhänge der pre-miRNAs. Anschließend schneidet das Enzym, die pre-miRNA innerhalb des *stems*, wodurch auch hier ein 5'-Phosphat und 3'-Überhänge von zwei Nukleotiden entstehen (Zhang *et al.*, 2004). So entsteht die

miRNA-Duplex mit ca. 20-24nt Länge, die weiterhin am Dicer gebunden bleibt. Dicer ist ein absolut essentieller Bestandteil der miRNA-Biogenese, und Mäuse, in denen Dicer ausgeschaltet ist, sterben während der frühen Embryonalentwicklung zwischen Tag 7 und 8 (Bernstein *et al.* 2003). Im weiteren Verlauf beginnt sich der so genannte RISC (RNA induced silencing complex) auszubilden. Hier bindet zunächst das Protein TRBP an die miRNA-Duplex und hilft so das Protein Ago2 zu rekrutieren (Chendrimada *et al.* 2005). Während der Ausbildung von RISC entwindet eine Helikase, wahrscheinlich Gemin3 (Mourelatos *et al.* 2002), die miRNA-Duplex. Bei diesem Vorgang bleibt die reife einzelsträngige miRNA in dem Komplex gebunden und der Gegenstrang wird abgebaut. Die Auswahl, welcher Strang der RNA abgebaut wird, und welcher in RISC inkorporiert bleibt, wird durch die relative Stabilität der Enden der Duplex getroffen. Es wird der Strang eingebaut, der an dem 5'-Ende eine schwächere Hybridisierungsstruktur ausbildet (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Dieses microRibonukleoprotein (miRNP), bestehend aus der Zielgen erkennenden miRNA und dem katalytischen Effektor-Komplex RISC, hat eine negative regulatorische Wirkung auf Zielgene.

2.1.3 Mechanismus der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genregulation

Derzeit werden zwei unterschiedliche Mechanismen der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genregulation beschrieben, bei denen entweder die Ziel-mRNA endonukleolytisch gespalten wird, oder aber in erster Linie die Translation der Ziel-mRNA blockiert wird.

Bindet das miRNP mit vollständiger oder nahezu vollständiger Komplementarität zu einer Zielsequenz im 3'UTR einer mRNA, so wird diese im Zytoplasma zwischen den Positionen 10 und 11, ausgehend vom 5'-Ende der miRNA, geschnitten und anschließend abgebaut (Haley *et al.*, 2004; Elbashir *et al.*, 2001; Chiu *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2004). Dieser Mechanismus wird auch häufig siRNA-Modus oder siRNA-pathway genannt. Er tritt in den meisten Fällen nur bei Pflanzen auf (Llave *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003). Es sind jedoch auch Fälle beschrieben worden, wo dieser siRNA-Modus in Metazoen beobachtet wurde (Davis *et al.*, 2005; Yekta *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005). Anschließend werden die zwei mRNA-Fragmente in einem ATP-abhängigen Prozess von dem miRNP getrennt und das miRNP kann erneut an

eine Ziel-mRNA binden. Das 3'-Fragment wird im Zytoplasma von der 5'-3'-Exonuklease Xrn1 abgebaut, während das 5'-Fragment durch Exosome in 3'-5'-Richtung abgebaut wird (Haley *et al.*, 2004; Orban und Izaurralde 2005).

Bindet das miRNP nur partiell an die Ziel-mRNA, wird zunächst nur die Translation blockiert und die mRNA wird nicht geschnitten (Olsen und Ambros 1999; Doench *et al.*, 2003). Hierbei spricht man von dem miRNA-Modus oder miRNA-*pathway*. Nach der derzeitigen Vorstellung wird die Translation wahrscheinlich bei der Initiation blockiert (Pillai *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2006; Thermann und Hentze 2007). Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass die miRNA-vermittelte Genregulation das Proteinniveau des Zielgens beeinflusst, ohne einen Einfluss auf das mRNA-Niveau zu haben (Wightman *et al.*, 1993), stehen neuere Erkenntnisse (Lim *et al.*, 2005; Bagga *et al.*, 2005; Schmitter *et al.*, 2006), die zeigen, dass miRNAs die Stabilität der Zielgen-mRNA beeinflussen. Hierbei kann die mRNA, welche spezifisch durch das miRNP gebunden ist, in *P-bodies* transportiert werden (Liu *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005). Wurde das miRNP von der mRNA getrennt, kann es wieder in das Zytosol entlassen werden und dort weitere Ziel-mRNAs binden (Pillai *et al.*, 2005). In den *P-bodies* kann die mRNA anschließend durch den Abbau des Poly-A-Schwanzes destabilisiert werden (Wu *et al.*, 2006; Giraldez *et al.*, 2006). Weiterhin kann die CAP-Struktur entfernt werden, wodurch ein Abbau durch die 5'-3'-Exonuklease Xrn1 eingeleitet wird (Seth und Parker 2003). Ob nach dem Transport in *P-bodies* eine Degradation der mRNA stattfindet oder nur die Translation blockiert wird, hängt wahrscheinlich von der Bindung weiterer Signalproteine ab (Behm-Ansmant *et al.*, 2007). Es wird weiterhin angenommen, dass die mRNA zu einem späteren Zeitpunkt sogar wieder freigegeben werden kann und in *P-bodies* somit nur zwischengelagert wird.

Box2: Zentrale Proteine der si/miRNA Prozessierung und des si/miRNPs in unterschiedlichen Eukaryonten

	Vertebraten	<i>D. melanogaster</i>	<i>C.elegans</i>	Pflanzen
Argonaute-Proteine	Ago2 (miRNA, siRNA)	Ago1 (miRNA) Ago2 (siRNA)	ALG1/2 (miRNA) RDE-1 (siRNA)	AGO1 (miRNA, siRNA)
Typ III RNAsen	Drosha (miRNA) Dicer (miRNA, siRNA)	Drosha (miRNA) Dicer-1 (miRNA) Dicer-2 (siRNA)	Drosha (miRNA) DCR-1 (miRNA, siRNA)	DCL1 (miRNA) DCL2 (siRNA)
dsRNA Bindeproteine	DGCR8 (miRNA) TRBP (miRNA)	Pasha (miRNA) Loquacious (miRNA) R2D2 (siRNA)	RDE-4 (miRNA siRNA)	Hyl1 (miRNA)
miRNA Kern-Exporter	Exportin5	Exportin5		HASTY

Die Prozessierung und Biogenese von miRNAs und siRNAs sind in den unterschiedlichen Spezies nach allgemeiner Vorstellung sehr ähnlich.

Eindeutige Unterschiede zeigen sich bei *D. melanogaster*. In diesem Organismus sind miRNA- Prozessierung und -Effektor-Komplex von der siRNA hinsichtlich des Mitwirkens von zentralen Proteinen getrennt. So scheint z.B. in Vertebraten Ago2 das zentrale Protein des miRNPs und siRNPs zu sein, während in *D. melanogaster* Ago1 mit miRNAs und Ago2 mit siRNA assoziiert wird.

In Pflanzen besteht gegenüber von Metazoen ein grundlegender Unterschied im Hinblick auf die Lokalisation der Biogeneseschritte. Bei Pflanzen findet die Prozessierung von der pri-miRNA bis zur miRNA-Duplex im Zellkern statt, während in Metazoen die pre-miRNA aus dem Zellkern exportiert wird und die Prozessierung zur miRNA-Duplex im Zytosol erfolgt.

2.1.4 Mechanismus der Zielgenerkennung

Nach der derzeitigen Meinung liegen die Zielsequenzen von miRNAs meistens im 3'UTR von Zielgenen. Es sind jedoch auch einzelne Ausnahmen bekannt, bei denen die miRNA mit dem ORF oder 5'UTR interagiert (Zeng *et al.*, 2002; Doench und Sharp 2004). In Pflanzen binden miRNAs nahezu perfekt an Zielsequenzen der mRNA, meistens im ORF. Durch diese hohe Komplementarität kann bei der bioinformatischen Suche nach Zielgenen ein Signal vom Hintergrundrauschen signifikanter unterschieden werden. Im Gegensatz dazu binden miRNAs in Metazoen in der Regel mit geringerer Komplementarität an die Zielsequenzen. Diese Tatsache, zusammen mit der geringen Länge von miRNAs, macht eine bioinformatische Suche mit hoher Sensitivität und Spezifität zu einer großen Herausforderung (Lai, 2004; Lewis *et al.*, 2005; Brennecke *et al.*, 2005). Daher wurden und werden große Anstrengungen unternommen, um charakteristische, notwendige und hinreichende Merkmale einer miRNA:Zielsequenz-Hybridisierung zu identifizieren.

Laborexperimentelle und computergestützte Analysen der miRNA-Zielsequenz-Strukturen haben ergeben, dass eine perfekte Komplementarität nach Watson-Crick von 6-7 Nukleotiden im 5'-Bereich der miRNA ein wichtiges Signal bei der Zielgenerkennung darstellt (Brennecke *et al.*, 2005; Doench und Sharp 2004; Lewis *et al.*, 2005; Kiriakidou *et al.*, 2004; Rajewsky 2006; siehe Abbildung 2-4 A). Die Ausbildung dieses so genannten *seeds* beginnt am zweiten und endet am siebten

oder achten Nukleotid, gezählt vom 5'-Ende der miRNA. Es wird angenommen, dass der *seed* das Kernelement der miRNA-vermittelten Regulation ist. Die Arbeitsgruppe von Steve Cohen leistete einen enormen Beitrag bei der Aufklärung der Zielgenerkennung (Brennecke *et al.*, 2005). Sie haben systematisch eine Zielsequenz mutiert und den Einfluss der Mutation auf die negative regulatorische Wirkung analysiert. Gleichzeitig haben sie auch systematisch die kooperative Wirkung mehrerer veränderter Zielsequenzen analysiert. Sie konnten zeigen, dass ein *seed* für eine negative Regulation ausreichen kann, und dass eine Komplementarität die über den *seed* hinaus geht, den Effekt verstärkt. Auch wenn eine einzelne Zielsequenz ausreichen kann, um eine negative Regulation des Zielgens zu bewirken (Kiriakidou *et al.*, 2004; Brennecke *et al.*, 2005; Saxena *et al.*, 2003), wird die Effizienz durch eine kooperative Wirkung mehrerer Zielsequenzen verstärkt (Brennecke *et al.*, 2005; Doench *et al.*, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 1-2 G:U-Basenpaarungen innerhalb des *seeds* zu einer negativen Regulation des Zielgens führen, allerdings fällt sie meist schwächer aus (Brennecke *et al.*, 2005; Didiano und Hobert 2006). Die Ausbildung eines *seeds* ist aber nicht immer zwingend notwendig für die miRNA-vermittelte Genregulation. So konnte gezeigt werden, dass eine starke Komplementarität im 3'-Bereich der miRNA eine schwächere Bindung innerhalb des *seeds* kompensieren kann (Vella *et al.*, 2004; Brennecke *et al.*, 2005, siehe Abbildung 2-4 b).

Vielen Arbeitsgruppen haben berichtet, dass untersuchte miRNA-Zielsequenz-Strukturen die beschriebenen Kriterien häufig zwar erfüllen, aber bei Validierungsexperimenten keinen Effekt zeigten (Lewis *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2006; Krek *et al.* 2005; Kiriakidou *et al.*, 2004; Vella *et al.*, 2004; Didiano und Hobert 2006). Somit sind die Regeln, welche die Hybridisierungsstruktur betreffen, entweder noch nicht ausreichend präzise formuliert, oder es spielen bislang völlig unberücksichtigte Faktoren eine Rolle, wie z.B. RNA-bindende Proteine, die so die Zielsequenz blockieren. Weiterhin scheinen Kriterien, welche die Zielsequenz nicht direkt betreffen, einen großen Einfluss zu haben. So zeigt die Interaktion der miRNA *lisy-6* mit dem 3'UTR des Gens *cog-1* in *C. elegans* einen eindeutigen Effekt. Nachdem die funktionale *cog-1*-Zielsequenz in den 3'UTR des Gens *unc-54* transferiert wurde, konnte der inhibitorische Effekt nicht mehr nachgewiesen werden (Didiano und Hobert 2006). Ebenso können Mutationen außerhalb einer validierten Zielsequenz zum Verlust des regulatorischen Effekts

führen (Long *et al.*, 2007). Es konnte in dieser Publikation gezeigt werden, dass die Änderung der Sekundärstruktur der Zielgen-RNA zu dem Verlust des Effekts führt, wahrscheinlich aufgrund einer verringerten Zugänglichkeit für die miRNA zur Zielsequenz. Somit spielt bei der Erkennung von miRNA-Zielen nicht nur die Zielsequenz selber eine Rolle, sondern auch die strukturelle Möglichkeit an diese Zielsequenz hybridisieren zu können.

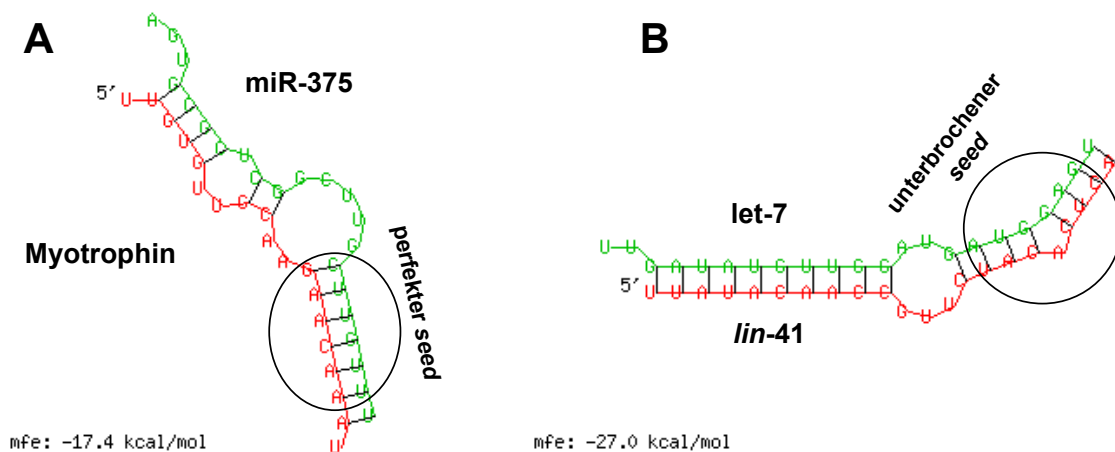


Abbildung 2-4 Zwei unterschiedliche Hybridisierungsstrukturen zwischen miRNA und Zielsequenz: **A)** Zwischen der miRNA (grün) und der Zielsequenz (rot) werden perfekte Watson-Crick-Basenpaarungen der Nukleotide 2-7 vom 5'-Ende der miRNA ausgebildet (*seed*). **B)** Der *seed* ist unterbrochen, dies wird aber durch eine starke Komplementarität im 3'-Bereich der miRNA kompensiert.

2.1.5 Computergestützte Vorhersagen von miRNA-Zielgenen

Eine miRNA kann unterschiedliche Gene regulieren, gleichzeitig kann ein Gen aber auch durch unterschiedliche miRNAs reguliert werden (Doench und Sharp 2004; Enright *et al.*, 2003; John *et al.*, 2004; Krek *et al.*, 2005). Durch diese Möglichkeiten zusammen mit der Tatsache, dass bislang über 4000 miRNAs in vielen Spezies nachgewiesen worden sind (Griffith-Jones 2006), bilden miRNAs ein sehr flexibles und potentes Netzwerk der Genregulation. Konservative Meinungen besagen, dass 30% der humanen Gene durch miRNAs reguliert werden können (Krek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005). Sehr sensitive Vorhersagen ermitteln sogar einen Wert von 95% (Miranda *et al.*, 2006). Für die Suche nach miRNA-Zielgenen sind eine Reihe von Algorithmen entwickelt worden (zur Übersicht siehe Rajewsky 2006; Ioshikhes *et al.*, 2006; Brown und Sanseau 2005), die viele Suchparameter gemeinsam haben, sich im Detail bei der Bewertung jedoch unterscheiden. Die meisten Programme suchen nach *seeds* in 3'UTRs unter Verwendung von Smith-Waterman-Alignments, oder durch RNA-Faltungs-Techniken unter Berücksichtigung der *mfe* (*minimal free energy*). Mittlerweile lassen die meistens Algorithmen G:U-Basenpaarungen im *seed*

zu, bewerten diese aber schlechter. Betrachtet man nur die Suche nach einem *seed* von 6 Nukleotiden, so erwartet man diesen in einer Sequenz der Länge 4096 bei gleichverteilten Nukleotiden mit einer Wahrscheinlichkeit von nahezu 1. Lässt man zwei G:U Basenpaarungen zu, reicht bereits eine Sequenz der Länge 2304 aus. Unter der Berücksichtigung, dass es ca. 400 unterschiedliche miRNAs im Menschen gibt und unter der Annahme einer durchschnittlichen UTR-Länge von 500 Nukleotiden, lassen sich acht *seeds* für unterschiedliche miRNAs in einem UTR zufällig finden. Diese Anzahl erhöht sich sogar auf 14 *seeds*, wenn man zwei G:U-Basenpaarungen zulässt. Es wird allgemein jedoch nicht angenommen, dass jeder humane 3'UTR durchschnittlich acht funktionale miRNA Zielsequenzen enthält. Somit verwenden die Algorithmen zusätzlich unterschiedliche Bewertungssysteme, um ein Signal vom zufälligen Hintergrundrauschen trennen zu können. Viele suchen nach energetisch günstigen Strukturen zwischen dem 3'-Bereich der miRNA und der UTR-Sequenz und bewerten diese positiv. Weiterhin führt das Auftreten von mehreren potentiellen Zielsequenzen meist zu einer besseren Bewertung. Ein zusätzliches starkes Bewertungskriterium, um die statistische Signifikanz einer Vorhersage zu erhöhen, ist die Konservierung der Zielsequenz in orthologen Genen mehrerer Spezies. Viele der Algorithmen reduzieren den Suchraum oder Rechenaufwand für miRNA-Zielsequenzen sogar stark, indem sie nur Abschnitte von 3'UTR-Sequenzen betrachten, die in einem Alignment von zwei oder mehreren Spezies hoch konserviert sind.

Die derzeit wahrscheinlich gebräuchlichsten Vorhersagen für Zielgene im Menschen, deren Ergebnisse in öffentlichen Datenbanken abgelegt sind, stammen von den Programmen TargetScanS (Lewis *et al.*, 2005), miRanda (John *et al.* 2006) und PicTar (Krek *et al.*, 2005). In Tabelle 2-1 sind die wichtigsten Unterschiede bzw. Eigenschaften der Programme aufgeführt.

Ein Vergleich der Ergebnisse mehrerer Vorhersageprogramme bei *D. melanogaster* zeigte, dass eine Überlappung der Ergebnisse meist nur gering ist (Stark *et al.*, 2005). Somit müssen weitere Kriterien für eine möglichst sensitive und gleichzeitig spezifische Vorhersage gefunden werden. Aktuell konnte gezeigt werden, dass die Zugänglichkeit der miRNA zur Zielsequenz und damit auch ihr Einfluss wahrscheinlich stark durch die Sekundärstruktur des 3'UTRs beeinflusst wird (Long *et al.*, 2007, Robins *et al.*, 2005).

In Lall *et al.* (2006) stellt die Arbeitsgruppe von Nikolaus Rajewsky viele systematische Analysemethoden in *C.elegans* vor, welche die reine Zielsequenzsuche weit überschreiten. Sie korrelieren Vorhersagen von Interaktionen mit Expressionsprofilen von miRNAs und Zielgenen. Weiterhin versuchen sie funktionale Zusammenhänge zwischen vorhergesagten Zielgenen einer miRNA herzustellen, d.h. sie suchen z.B. nach Protein-Protein-Interaktionen zwischen Zielgenen einer miRNA oder nach phänotypischen Korrelationen.

Eine weitere wesentliche Verbesserung der Zielgen-Vorhersagen wird bei einer höheren Qualität der 3'UTR-Annotationen erwartet (Rajewsky 2006). So sind derzeitige Annotationen meist unvollständig und Variationen, wie z.B. die Benutzung unterschiedlicher Polyadenylierungssignale, bleiben meist unberücksichtigt.

	TargetScanS	miRanda	PicTar
Seed erforderlich	ja	nein	nein
G:U im <i>seed</i> zugelassen	nein	ja	ja
Berücksichtigung der Komplementarität außerhalb des <i>seeds</i>	nur in der direkten Umgebung des <i>seeds</i> bis zu einem Mismatch	ja	ja
Berücksichtigung der Anzahl an Zielsequenzen einer miRNA in einem Zielgen	ja	ja	ja
Orthologe Konservierung der Zielsequenz erforderlich	ja	ja	ja

Tabelle 2-1 Grundlegende Unterschiede der publizierten Vorhersagealgorithmen TargetScanS, miRanda und PicTar im Hinblick auf wichtige Kriterien.

2.1.6 Das Vorhersageprogramm RNAhybrid

Das Programm RNAhybrid ist von Dr. Marc Rehmsmeier an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld entwickelt worden (Rehmsmeier *et al.*, 2004) und ist ein anerkanntes Werkzeug zur Vorhersage von miRNA-Zielgen-Interaktionen. So wird die Webbrowser-Version monatlich über 2000-mal benutzt und Elemente des Kernalgorithmus finden Verwendung bei anderen Vorhersageprogrammen (pers. Mitteilung M. Rehmsmeier). Die Vorhersage dieses Programms erfolgt in einem schrittweisen Prozess (siehe Abbildung 2-5).

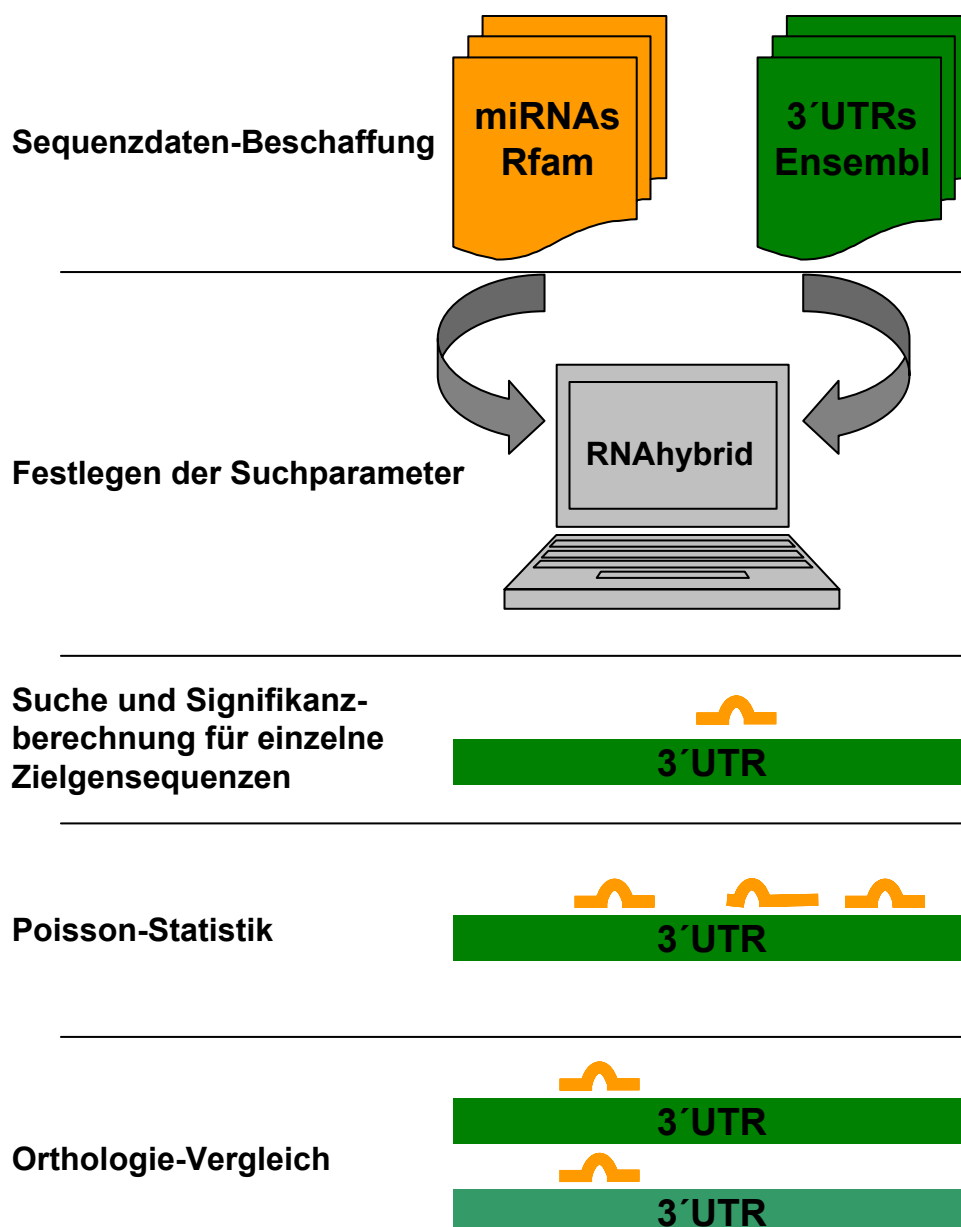


Abbildung 2-5 Ablaufschema einer miRNA-Zielgen-Vorhersage mit dem Programm RNAhybrid.
Sequenzdaten-Beschaffung: die Sequenzen der miRNAs werden der Rfam-Datenbank entnommen, die 3'UTR Sequenzen verschiedener Spezies der Ensembl-Datenbank. **Festlegen der Suchparameter:** Je nach Art der Suche können hier verschiedene Strukturanforderungen gestellt werden. Führt man z.B. eine Vorhersage in Pflanzen durch, kann die Größen von akzeptierten *Bulges* genau bestimmt werden, für eine Vorhersage in Metazoen kann man z.B. einen *seed* fordern und G:U Paarung erlauben oder verbieten. **Suche und Signifikanzberechnung für einzelne Zielgene:** Der Algorithmus sucht für jede miRNA die besten, d.h. die energetisch günstigsten und statistisch signifikantesten Hybridisierungsmöglichkeiten in allen 3'UTRs unter Berücksichtigung der eingestellten Suchparameter und somit der Struktur und der *mfe* (*minimal free energy*). **Poisson-Statistik:** bei diesem Schritt ermittelt das Programm die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten mehrerer Zielgensequenzen einer miRNA in einem Gen unter der Annahme einer Poisson-Verteilung. **Orthologie-Vergleich:** hierbei wird die statistische Signifikanz für das Auftreten von Zielsequenzen einer miRNA in orthologen Genen ermittelt, wobei die Ähnlichkeit der 3'UTR-Sequenzen berücksichtigt wird.

Zunächst sucht das Programm nach energetisch günstigen Hybridisierungsstellen zwischen den zu untersuchenden miRNAs und 3'UTRs. Das Prinzip beruht auf einer

Variation der klassischen RNA-Faltung (Zucker und Stiegler, 1981), in der nicht eine Sequenz gefaltet wird, sondern Hybridisierungsstrukturen von zwei Sequenzen miteinander gesucht werden. Frühere Algorithmen suchten energetisch günstige Hybridisierungsstellen, indem sie die Sequenz des 3'UTRs mit der miRNA über eine Linker-Sequenz miteinander verbunden und diese eine Sequenz dann gefaltet haben. Die anschließende RNA-Faltung führte häufig zu Hybridisierungsstrukturen, bei denen z.B. auch die Linker-Sequenz mit der 3'UTR-Sequenz hybridisierte, oder aber auch die 3'UTR-Sequenz selber Sekundärstrukturen ausbildete (Stark *et al.*, 2003). Dadurch dass bei dem Programm RNAhybrid zwei einzelne Sequenzen hybridisiert werden, entfällt die Linker-Sequenz, und die Hybridisierung mit sich selbst kann leicht verboten werden. Somit werden die Struktur-Artefakte unterbunden. Die präzise und flexible Grammatik macht es leicht möglich, bestimmte strukturelle Mindestanforderungen, wie z.B. einen *seed*, an eine Hybridisierungsstruktur zu stellen. Neue Erkenntnisse können somit gut in den Algorithmus eingebaut werden. So wurde z.B. nachträglich die Option eingebaut, G:U-Basenpaarungen zuzulassen oder zu verbieten. Weiterhin wurde die Möglichkeit einer Limitierung bestimmter Hybridisierungsstrukturen implementiert, wie z.B. eine Beschränkung auf höchstens fünf aufeinander folgende ungebundene Nukleotide. Nach der Suche nach Hybridisierungsstrukturen, welche die geforderten Kriterien erfüllen, werden diese mit rein statistischen Analysen begutachtet und die Ergebnisse gefiltert. In einem nächsten Schritt ermittelt das Programm, ob sich in dem 3'UTR eines Gens mehrere potentielle Zielsequenzen für eine miRNA befinden. Ein solcher Fall wird von dem Programm unter der Annahme einer Poisson-Verteilung statistisch bewertet. Um die Signifikanz der Vorhersage zu erhöhen, kann ein Vergleich von Zielsequenzen in orthologen 3'UTR-Sequenzen vorgenommen werden. Hierbei berücksichtigt der Algorithmus die Konservierung der 3'UTR-Sequenz, damit das Auftreten vorhergesagter Zielsequenzen in zwei sehr nahe verwandten Spezies nicht überbewertet wird. Mit Hilfe des Programms wurden bereits Vorhersagen in den Arthropoden *D.melanogaster*, *D. pseudoobscura*, und *A. gambiae* durchgeführt. Anhand weniger bekannter miRNA-Zielgene konnte gezeigt werden, dass das Programm erfolgreich diese Zielgene vorhersagt (Rehmsmeier *et al.*, 2004).

2.1.7 Einfluss einer miRNA-vermittelten Genregulation

Zwar sagen Algorithmen vorher, dass 30%-95% der humanen Gene durch miRNAs reguliert werden, jedoch sind bislang nur wenige Interaktionen gut charakterisiert worden. Weiterhin sind die Auswirkungen einer negativen Regulation weitestgehend unklar. David Bartel und Chang-Zheng Chen (2004) beschrieben drei unterschiedliche Kategorien von Zielgenen. Bei diesen handelt es sich um *Switch-Targets*, *Neutral-Targets* und *Tuning-Targets*. Bei *Switch-Targets* hat die miRNA-vermittelte Regulation eine direkte Auswirkung auf die Zelle. Das verringerte Proteinniveau des Zielgens führt dazu, dass das Gen seine Funktion nicht mehr ausreichend erfüllen kann. Im Fall eines *Neutral-Targets* hat die negative Regulation des Gens keine Auswirkung auf die Zelle, weil die Veränderung der Proteinmenge nur sehr gering ist. Alternativ kann der Mechanismus, bei dem dieses Protein gebraucht wird, im Hinblick auf die Menge des Proteins sehr robust sein. Die dritte Klasse wird als *Tuning-Targets* bezeichnet und sie hebt die Möglichkeiten einer miRNA-vermittelten Genregulation hervor. Die Expression der Zielgene dieser Kategorie wird nicht so stark reprimiert, dass sie ihre Aufgaben nicht mehr erfüllen können, vielmehr wird ihre Expression gedämpft. Somit kann die Menge bestimmter Proteine, wie z.B. regulatorische Proteine, fein justiert und für die entsprechende Funktion optimiert werden. Gleichzeitig können Fluktuationen auf Transkriptionsebene schnell und reversibel ausgeglichen werden.

Ein weiteres Modell für die Wirkungsweise von miRNAs ist die „*Safeguard*“-Theorie (Hornstein *et al.* 2005). Diese Theorie besagt, dass miRNAs in Zellen exprimiert werden, in denen ihr Zielgen nicht exprimiert sein darf. Kommt es aufgrund dynamischer Schwankungen zu einer leichten Transkription des Gens, kann dessen Translation durch miRNAs blockiert und so der Fehler korrigiert werden. Das „*Safeguard*“-Modell wird auch von der Beobachtung unterstützt, dass einige der miRNA-Zielgene, in den Geweben gering exprimiert werden, in denen die miRNAs verstärkt exprimiert sind (Lim *et al.*, 2005, Farh *et al.*, 2005).

2.1.8 Bekannte Funktionen von miRNAs

Die beiden ersten entdeckten miRNAs *lin-4* und *let-7* haben großen Einfluss auf die Entwicklung der Larven von *C.elegans*. Weiterhin sind miRNAs in embryonalen Stammzellen exprimiert (Suh *et al.* 2004) und zeigen auch während der

Embryonalentwicklung ganz distinkte Expressionsprofile (Wienholds *et al.* 2005). Somit wurde anfänglich vermutet, dass miRNAs in erster Linie bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen eine übergeordnete Rollen spielen. So konnte z.B. der muskelspezifischen miR-1 eine Funktion bei der Herzentwicklung zugeordnet werden (Zhao *et al.*, 2005 und 2007), während die miR-196 eine Reihe von Homeoboxgenen reguliert (Yekta *et al.*, 2004). Die miRNAs -181 -142 und -223 haben einen großen Einfluss bei der Hämatopoese (Chen *et al.*, 2004), während die miR-143 bei der Adipozytendifferenzierung einen entscheidenden Faktor darstellt (Esau *et al.*, 2004). Auch die Entwicklung des zentralen Nervensystems wird von miRNAs beeinflusst, so reguliert die miR-134 das Protein Limk1 und damit auch die Größe der dendritischen Dornen von Neuronen (Schratt *et al.*, 2006).

Jedoch wird immer deutlicher, dass miRNAs auch außerhalb der Entwicklung Funktionen bei der Regulation haben können, wie z.B. im Stoffwechsel. So reguliert die miR-375 das Gen Myotrophin und reprimiert so die Insulinsekretion in der Bauchspeicheldrüse (Poy *et al.*, 2004).

Weiter haben miRNAs einen entscheidenden Einfluss bei der Induktion oder Suppression der Apoptose. So inhibieren die miR-2, miR-6, miR-11, miR-13 und miR-308 die proapoptotischen Gene *hid*, *grim*, *reaper*, und *sickle* in *D. melanogaster*, um bestimmte apoptotische Vorgänge bei der Embryonalentwicklung zu verhindern (Brennecke *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004, Leaman *et al.*, 2005). Zudem wird der miR-21 eine starke Apoptose-Suppressor-Funktion bei Glioblastomen zugeschrieben (Chan *et al.*, 2004). Micro-RNAs können umgekehrt aber auch Apoptose induzieren. So reprimiert das Polycistron, bestehend aus den miRNAs miR-15a und miR-16-1, bei chronischer lymphatischer Leukämie das antiapoptotische Gen *Bcl2* (Calin *et al.*, 2002; Cimmino *et al.*, 2005).

Der Einfluss von miRNAs bei onkogenen Prozessen gewinnt immer mehr an Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der miRNA *let-7* bei Lungenkrebs die Zellproliferation verhindert, wahrscheinlich durch die Inhibierung ihres onkogenen Zielgens *Ras* (Takamizawa *et al.* 2004; Johnson *et al.*, 2005). Im Gegensatz hierzu steht die Wirkung des miR-17-92-Clusters, welches bei B-Zell-Lymphomas und bei Lungenkrebs stark exprimiert ist und die Zellproliferation verstärkt (Hayashita *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2005). Dieses miRNA-Cluster kann durch den onkogenen Transkriptionsfaktor c-Myc aktiviert

werden. Es scheint den Apoptose-Signalweg zu blockieren und steigert somit das Zellwachstum (O'Donnell *et al.*, 2005, Matsubara *et al.*, 2007).

Bei nahezu allen untersuchten Krebserkrankungen lässt sich eine differenzielle Expression von miRNAs beobachten (Zhang *et al.*, 2006). Man verspricht sich durch die Erstellung charakteristischer miRNA-Expressionprofile eine exaktere diagnostische Tumor-Typisierung zu erreichen, um somit besser den richtigen Therapie-Ansatz wählen zu können.

Obwohl mehrere hundert miRNAs nachgewiesen worden sind, und auch gezeigt werden konnte, dass sie in diversen Prozessen einen entscheidenden Einfluss haben, sind bislang nur vergleichsweise wenige Zielgene experimentell nachgewiesen worden. In der Datenbank TarBase (Sethupathy *et al.* 2006), eine Datenbank für validierte miRNA-Zielgen-Interaktionen, sind gegenwärtig nur 112 Zielgene im Menschen und 28 Zielgene in der Maus hinterlegt. Gleichzeitig beschreiben Algorithmen zur Zielgen-Vorhersage jedoch mitunter mehrere hundert Gene, die durch eine miRNA reguliert werden könnten. Somit sind weitere umfangreiche Analysen zur Verbesserung der miRNA-Zielgen-Vorhersage notwendig, um das Wirkungsspektrum der miRNA-vermittelten Genregulation vollständig erfassen zu können.

2.2 Die Wobbler-Maus

Die Wobbler-Maus (Gensymbol *wr*) ist eine autosomal rezessive Mutante des Mausstamms C57Bl/Fa (Falconer *et al.*, 1956), mit einer Punktmutation im Gen *Vps54* (Schmitt-John *et al.*, 2005). Von der Mutation betroffene Tiere zeigen einen Tremor der vorderen Extremitäten und einen wackligen Gang, der namensgebend für die Mutante ist (engl. *to wobble* = wackeln). Bedingt durch den progressiven Charakter dieser Erkrankung können betroffene Tiere spätestens im Alter von sechs Wochen nicht mehr mit den Vorderpfoten greifen und zeigen ein deutlich reduziertes Gewicht gegenüber den Wurfgeschwistern. Mikroskopische Untersuchungen zeigen eine Degeneration von ca. 40% der Motoneuronen des cervikalen und thorakalen Rückenmarks bei Wobbler-Tieren (Baulac *et al.*, 1983). Darüber hinaus zeigt sich eine deutliche Vakuolisierung der degenerierenden Motoneuronen (Andrews und Maxwell, 1967, Duchon und Strich, 1968, Mitsumoto und Bradley, 1982, Rathke-Hartlieb *et al.*, 1999), die von einer massiven Astrogliose begleitet wird (Laage *et al.*,

1988). Homozygote Wobbler-Mäuse sind nicht fertil und zeigen eine abnormale Spermienmorphologie (Heimann *et al.*, 1991). Die zellbiologische Funktion des Gens *Vps54* ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht genau aufgeklärt. Es scheint jedoch an dem retrograden Vesikeltransport vom endosomalen Kompartiment zum trans-Golgi-Netzwerk beteiligt zu sein (Conibear und Stevens, 2000, Oka und Krieger, 2005) und der Verlust des Gens führt zu einer embryonalen Letalität (Schmitt-John *et al.*, 2005). Es wird spekuliert, dass die Punktmutation in dem Gen zu einer verringerten Bindeaffinität mit Interaktionspartnern führt und somit der axonale Transport gestört wird (Schmitt-John *et al.*, 2005).

Die Wobbler-Maus ist aufgrund ihres neurologischen Phänotyps ein gut untersuchtes Modell für humane neurodegenerative Erkrankungen. So wird in der Wobbler-Maus durch die selektive Motoneuronendegeneration im Hirnstamm und Rückenmark das klinische Bild der humanen spinalen Muskelatrophie (SMA) gut abgebildet. Weiterhin sind auch Bereiche des ersten Motoneurons betroffen, so dass die Wobbler-Maus auch als Modell für konkrete Fragestellungen bezüglich der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) herangezogen werden kann (Boillee *et al.*, 2003).

2.3 Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, miRNA-Zielgen-Interaktionen zu validieren, die durch das Programm RNAhybrid vorhergesagt wurden, um anhand der gewonnenen Daten das Programm bewerten zu können. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten dazu beitragen, den Algorithmus sowie die Vorhersagen zu verbessern. Durch spezifischere und sensitivere Vorhersagen kann man einen besseren Eindruck über das Wirkungsspektrum und über die Komplexität des regulatorischen Netzwerks von miRNAs erhalten, was gerade am Anfang eines jungen Forschungsgebietes wie dem der miRNAs von großem Interesse ist.

Zu Beginn dieser Arbeit sollten durch molekularbiologische Experimente miRNA-Zielgen-Interaktionen von Mensch und Maus nachgewiesen werden, die von dem Programm RNAhybrid vorhergesagt wurden. Gleichzeitig sollte die Durchsicht der Rohdaten einer globalen Zielgen-Vorhersage Fehler aufdecken und Verbesserungsvorschläge hervorbringen. Während der Arbeit kamen neue Erkenntnisse über die Zielgenerkennung von miRNAs auf. Der Versuch, diese Ergebnisse in das Programm einzubauen, sollte ebenfalls durch die laborexperimentelle Validierung von Interaktionen begleitet werden, um so das Programm bewerten und verbessern zu können.

Eine weitere Aufgabe bestand darin, einen möglichen Einfluss von miRNAs auf die Wobbler-Erkrankung zu untersuchen. Unter den validierten miRNA-Zielen befand sich ein Gen, welches in der Wobbler-Maus differenziell exprimiert ist. Zunächst sollte die miRNA-Zielgen-Interaktion genauer charakterisiert werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die entsprechende miRNA in Wobbler-Tieren ebenfalls differenziell exprimiert ist, und welchen Einfluss das Zielgen auf den Phänotypen hat. Die Erstellung eines vergleichenden Expressionsprofils von miRNAs zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren mit Hilfe der Microarray-Technologie sollte einen tieferen Einblick in die Wobbler-Pathologie bringen, um neue Hinweise für die Ursachen der Motoneurondegeneration zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

***Escherichia coli* XL1-Blue** (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacZΔM15 Tn10(Tet^R))) Sambrock et al., 1989

***Escherichia coli* TOP10F'** (F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG), TOPO Manual, 2002, Invitrogen

***Escherichia coli* JM109** (endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15]), Chemisch kompetente Zellen, Promega

***Escherichia coli* DH5α** (F' end A1 hsd R17 (r_k⁻, m_k⁻) sup E44 thi-1 λ⁻ rec A1 gyr A96 rel A1 Δ(arg F' lac ZYA) U 169 ψ80d lacZΔM15)

3.1.2 Zelllinien

Neuro-2A (*mouse neuroblastoma*, Olmsted et al., 1970); (DSMZ-Nr.: ACC 148)

NSC-19 (*mouse neuroblastoma* – spinal cord hybrids, Cashman et al., 1992)

HeLa-S3 (*human cervix carcinoma* Puck et al., 1956) (DSMZ-Nr.: ACC 161)

3.1.3 Mausstämme

***Mus musculus laboratorius* C57Bl/6J**: Labor-Inzuchtstamm, ursprünglich am Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA etabliert.

***Mus musculus laboratorius* C57Bl/6J-wr**: Labor-Inzuchtstamm, der die Wobbler-Mutation trägt. Zuerst beschrieben von Falconer (1956).

***Mus musculus* CD1**: Labor-Auszuchtstamm, Harlan/Winkelmann

***Mus musculus laboratorius* 129SvJ^{Vim^{-/-};GFAP^{-/-}}**: Labor-Inzuchtstamm, der Null-Allele für die Gene Vimentin und GFAP trägt. Erzeugt und erhalten von Pekny (1999)

3.1.4 Vektoren

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
pCR4-TOPO	Klonierungen	Invitrogen, Karlsruhe (D)
pBluescript SK	Klonierungen	Stratagene, Heidelberg (D)
pJet1	Klonierungen	Fermentas, St. Leon-Rot(D)
pFloxPGKneominusSacI	Neomycin-Kassette	E-M Füchtbauer, Aarhus (DK)
pRL-TK	Renilla-Luciferase-Reportervektor	Promega, Mannheim
pGL3	Firefly-Luciferase-Reportervektor	Promega, Mannheim
pGL4.10TK	Firefly-Luciferase-Reportervektor	T. Frensing, Bielefeld
pGFP-N3	GFP-Expressionsvektor	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (FRA)

3.1.5 Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, RNA-Oligonukleotide von den Firmen MWG oder Dharmacon bezogen

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt
DNA-Oligonukleotide für die Validierung von miRNA-Ziegen-Interaktionen		
PMS2_mm_a	GATCTAGACACACCCCTTGTAGCATAGAG	1074bp
PMS2_mm_b	GCTCTAGACCTTAGTACACAAGTTTGC	
PMS2_hs_a	CCTCTAGAGAAAGAAGAAATCTTTCCAATTCTG	2823bp
PMS2_hs_b	TGCCATCACGTGGGAGCGCATGCAAACATAGAG	
MAPK7_Rmm_a	GATCTAGACACAGCTTGTGCCTTGCT	305bp
MAPK7_mmhs_b	GCGCTTAGCAACCTTGTATTTACAGGCCTCA	305bp
MAPK7_hs_a	GATCTAGATGTGCCTTGCTGCCACAGTA	
ARGH1_mm2_a	GATCTAGAAGAGAAGAGTGGGGGAGAGG	356bp
ARGH1_mm2_b	GCGCTTAGCCCTTAGATAATATATATATAAAAATAAACC	
ARGH1_hs_a	GATCTAGATTGCAAGAAGGAGAGGAATG	337bp
ARGH1_hs_b	GCGCTTAGCAAATAAACCTCCAATTCAGGGTA	
NNAT_mm_a2	GATCTAGACATCACCAGCTGAAGCCCTACATCTC	482bp
NNAT_mm_b2	ATGCTTAGCACTGCCCTGCAGGGTCCTAGGA	
NNAT_hs	GATCTAGAGCCGTATCATCAGGTGCTC	920bp
NNAT_hs_b	GCGCTTAGCGGTGCGCCTCTACTGCAC	
PFKM_mm_a	GATCTAGAACCTCTCTGGAGTGAGGGGAAAGAT	397bp
PFKM_mm_b	GCGCTTAGCCCAGCTGGCATTATTAGTGTA	
PFKM_hs_a	GATCTAGAACCTCTCTGGAGTGAGGGGAATAGAT	412bp
PFKM_hs_b	GCGCTTAGCACAGTGACCAGTTGGCATT	

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt
DNA-Oligonukleotide für die Validierung von miRNA-Ziegen-Interaktionen		
TRPC3UTRmm_a	GATCTAGAAGCCACCTGCAGTCAAGC	686bp
TRPC3UTRmm_b	GCGCTTAGCTTTTTGAACAACCCCATGAA	
TRPC3UTRhs_a	GATCTAGAAGCAACCTGGATTTGGCTTT	437bp
TRPC3UTRhs_b	GCGCTTAGCTGGCAGTTCAGTTGGTTTCA	
TRPC3_TS_mma	CTAGAAGAGTTCCTTGGGGGACAGGGT	27bp
TRPC3_TS-mmb	TTAACCCCTGTCCCCCAAGGAACTCTT	
TRPC3_TS_hs_a	CTAGATCAGTTCCTTGGGGACAGGGA	27bp
TRPC3_TS_hs_b	TTATCCCTGTCCCCAAGGAACTGAT	
Vti1a_mm_a	GATCTAGATGCATCTGGTCCCCCTTGATAA	2634bp
Vti1a_mm_b	GCGCTTAGCTTCTGGAGCAGGGTTGTTTC	
VT11A_hs_a	GATCTAGAACCAGAACCAGCCAGTGGAAAT	985bp
VT11A_hs_b	GCGCTTAGCCGGCCAGAGAGCTTTAATTTT	
AMPD3_hs_a	GCTCTAGAGTCCAGCATTTGACATGCATT	1712bp
AMPD3_hs_b	GCCCATCACGTGGCACAGTCCTAGCTGACTTTATTTA ACA	
AMPD3_mm_a	TATCTAGAGCCCCAGCGGTCCACACACAC	1501bp
AMPD3_mm_b	GCGCTTAGCCACAGTCCTAATAGACTTTATTTG	
ISL2UTRmm_b	GCGCTTAGCGTCCCCTACTATTGCCTCAC	608bp
ISL2UTRmmhsa	GATCTAGACATGCTCCCTGCATGAGAC	608bp
ISL2UTRhs_b	GATCTAGATCCCCTACTATGAACTGGCTGT	
FutIV_mm_a	GATCTAGAGGCCATTCTGTGTGAACTGA	2248bp
FutIV_mm_b	bGACACGTGTTAAGGATTTATTTGAAATAGGCAAT	
FutIV_hs_a	TATCTAGAAGCCGCGCTCCCCTGGAA	4183bp
FutIV_hs_b2	GCTCTAGATCATTTCATCTCATTATTTTAATCA	
Clcn3_mm_a	GATCTAGAGTCCCTGTAGATGAGGACAGAG	2226bp
Clcn3_mm_b	GACACGTGTGCTTTAATATGGATCCTGAAATG	
Clcn3_hs_a	GCGCTAAGCATCTCACAGATGAGGAGAGAGAAGAAA CG	1005bp
Clcn3_hs_b	GACCATCACGTGGTCAAAGCAGCAGCATTATTTATTT	
SFRP4_mm_a	GATCTAGATTACTTTCTGTGATGGAGCCA	458bp
SFRP4_mm_b	GCGCTTAGCAGTATCATTTCCTGCCTTT	
SFRP4_hs_a	GCGCTAAGCGCTAACTAGTTTCCAAAGCGGAG	1537bp
SFRP4_hs_b	GACCATCACGTGGTTGTGAGTGAAGAAACCACCT	
Zic1_mm_a	GATCTAGAAATCAGAAACAAAACATGCCGA	994bp
Zic1_mm_b	GCGCTTAGCGCCATAAATATTGAATAGCTGTAACAT	
ZIC1_hs_a	GATCTAGAAATCAGAAACAAAACATCGAACAAAAC	1007bp
ZIC1_hs_b	GCGCTTAGCAAGGTACGAAAGGTTACCAAACA	

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt
DNA-Oligonukleotide für die Validierung von miRNA-Ziegen-Interaktionen		
RGS4_mm_a	GCGCTAAGCTTCTCACACAGAGGCAGGGAG	1368bp
RGS4_mm_b	GACACGTGTTGGTCTCTGCTAGCCTTGG	
RGS4_hs_a	GCGCTAAGCTTCTCACCTGAAGGCAGAGG	2024bp
RGS4_hs_b	GACCATCACGTGGAGCGTGACCTCCAGACCTA	
CALCB_mm_a2	GATCTAGAGTCACTAGCAGCTCCAGGAA	352bp
CALCB_mm_b	GCGCTTAGCTTTCACATCTCCCTAAGTTCAA	
CALCB_hs_a	GATCTAGAGCAGATGAATGACTCCAGGAAG	533bp
CALCB_hs_b	GCGCTTAGCAAATTGTAATGCATCACCAAGG	
SLC23A1_mm_a	GATCTAGAAGCCACCTCAATGAAAGGAG	1113bp
SLC23A1_mm_b	GCGCTTAGCTTGCTTGACTCAAACCTTTTCG	
SLC23A1_hs_a	GATCTAGAAAAATGACTTCCAGGAAAGGAAGC	453bp
SLC23A1_hs_b	GCGCTTAGCTTTAATATTATGCATTAGTCTTGAAGTG	
PTDSR_mm_a	GATCTAGACCACATGTGGCCGCTGTCT	196bp
PTDSR_mm_b	GCGCTTAGCAAATAGGTAAGGGTTTCATTGG	
PTDSR_hs_a	GCGCTAAGCGCAGATAAAGAGACTCTCCCTGA	3843bp
PTDSR_hs_b	GACACGTGAAAATGATGAACAAGTTTCACCCAAG	
VimUTR-mm-1a	GCTCTAGATGCAGTACCAGCAAGAAGGA	285bp
VimUTR-mm-2b	AGCCATCACGTGGCTCGAGGAAGCAGTAACAAGTTGGT CAGA	
VimUTR-hs-1a	GCTCTAGAGCACACACTCAGTGCAGCAA	297bp
VimUTR-hs-2b	AGCCATCACGTGGCTCGAGGGTTGGATACTTGCTGGAA AA	
Vim-mm-wt-a	CTAGACTCGAGCAAGTGCCTTTACTGCAGTCCACGTG	37bp
Vim-mm-wt-b	GTGGACTGCAGTAAAGGCACTTGCTCGAGT	
Vim-hs-wt-a	CTAGACTCGAGCAAGTGCCTTTCTGCAGTCCACGTG	36bp
Vim-hs-wt-b	GTGGACTGCAGAAAGGCACTTGCTCGAGT	
Vim-hs-Mperf-a	CTAGACTCGAGCAAGTGCCTTCACTGCAGTCCACGTG	37bp
Vim-hs-Mperf-b	GTGGACTGCAGTGAAGGCACTTGCTCGAGT	
Vim-degen-a	CTAGACTCGAGACCGCAACGTTTCAGTCCACGTG	33bp
Vim-degen-b	GTGGACTGAACGTTGCGGTCTCGAGT	
PLK2-mm_a	GATCTAGAAATTATTTTCGAGCGGACCTC	597bp
PLK2-mm_b	GCGCTTAGCTGCCAAGAGTTTGAATGGT	
PLK2-hs_a	GCGCTAAGCAAGACTTTTTCGAATGGACCCTATG	599bp
PLK2-hs_b	GACCATCACGTGG CAACGGTTTAAAATGGTCA	

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt
Verschieden Verwendungszwecke (<i>multiple cloning site</i>, <i>real-time PCR</i>, Sequenzierungen; miR-138-KO-Vektor; RACE-Primer)		
Vim_LC_a	AAGACGGTTGAGACCAGAGA	162bp
Vim_LC_b	TGCAGTAAAGGCACTTGAAA	
Vim-LC-N2a_a	CACTCCCTCTGGTTGACACC	154bp
Vim-LC-N2a_b	TTCTTGCTGGTACTGCGTTGTTG	
Vim-LC-TS_mm_a	CCTGGAGTCACTTCCTCTGG	186bp
Vim-LC-TS_mm_hs_b	CAAATCTATCTTGCGCTCCTG	186bp
Vim-LC-TS_hs_a	TCTGGATTCCTCCCTCTGG	
beta-Actin-LC-mm_a	AGATTACTGCTCTGGCTCCT	149bp
beta-Actin-LC-mm_b	GGACTCATCGTACTCCTGCT	
beta-Actin-LC-hs_a	GAGAAAATCTGGCACCACAC	154bp
beta-Actin-LC-hs_a	ACAGCCTGGATAGCAACGTA	
pRLTK-LCIntron_a	TTCTTCTGACACAACAGTCTCG	190bp
pRLTK -LCIntron_b	CATCCGTTTCCTTTGTTCTG	
pGL3-LC3a	GCTCAACAGTATGGGCATTT	201bp
pGL3-LC3b	CGGGAGGTAGATGAGATGTG	
pGL3-mcs-fwd	GGAAAACCTCGACGCAAGAAA	Sequenzierprimer
pGL3-mcs-rev	TGGTTTGTCCAAACTCATCAA	Sequenzierprimer
pRL-TKmcsfwd	TCGTTGAGCGAGTTCTCAA	Sequenzierprimer
pRL-TKmcsrev	TGGTTTGTCCAAACTCATCA	Sequenzierprimer
mcs pGL-RLTKs	CTAGAGAATTCCTGCAGCCGCGGATATCGCTAAGC CCACGTGATGG	47bp Zur Erzeugung der <i>multiple cloning</i> <i>site</i>
mcs pGL-RLTKas	CTAGCCATCACGTGGGCTTAGCGATATCCCGCGGCT GCAGGAATTCT	
pJET1-fwd	GCCTGAACACCATATCCATCC	Sequenzierprimer
pJET1-rev	GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC	Sequenzierprimer
138_up_a	GGTACCTGTTGCTCTGGGGTCTTGCT	2987bp
138_up_b	GGGCCACCAGAAATGGGTGGCTTCTTC	
138_do_a	GAGCGGCCGCGGGACCACAGGACACAGGAAC	2878bp
138_do_b	CCGCGGGTCCAACAGACCAGCCAGCA	
RACE_anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	
RACE_SP1Vim_mm	GAAGCAGTAACAAGTTGGTCAGA	
RACE_SP2Vim_mm	TTCTAGCACAAGATTTCTTCGTAAA	
RACE_SP3Vim_mm	TTTTCTACGTCTTTGGGGTGT	
RACE_SP1Vim_hs	GGTTGGATACTTGCTGGAAAA	
RACE_SP2Vim_hs	AAGTATTCTAGCACAAGATTTTCTGT	
RACE_SP3Vim_hs	TCTTGTAGGAGTGTCCGTTGTT	

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt
Vim-Race-Norm-fwd	GGAGCGCAAGATAGATTTGG	
5r-miR138-outer	CGGCCTGATTCACAACAC	
5r-miR138-inner	GGCCTGATTCACAACACCA	
5RACE-ligation-Outer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	
5RACE-ligation-Inner	GAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG	
Hybridisierungssonden		
let-7b_Sonde	AACCACACAACCTACTACCTC	
miR26a-Sonde	AGCCTACCTGGATTACTTGAA	
miR136-Sonde	TCCATCATCAAAACAAATGGAGT	
mir143_Sonde	TGAGCTACAGTGCTTCATCTCA	
miR151-star_Sonde	TACTAGACTGTGAGCTCCTCGA	
miR-205_Sonde	CAGACTCCGGTGGAATGAAGGA	
Mir27bSonde	GCAGAACTTAGCCACTGTGAA	
miR328_Sonde	ACGGAAGGGCAGAGAGGGCCAG	
Mir339Sonde	TGAGCTCCTGGAGGACAGGGA	
miR351_Sonde	CAGGCTCAAAGGGCTCCTCAGGGA	
mir375_Sonde	TCACGCGAGCCGAACGAACAAA	
miR-412_Sonde	ACGGCTAGTGACCAGGTGAAGT	
miR-432_Sonde	AGACATGGAGGAGCCATCCAG	
miR453_Sonde	CGAACTCACCACGGACAACCTC	
miR489_Sonde	GCTGCCGTATATGTGATGTCACT	
miR-515-3p_Sonde	ACGCTCCAAAAGAAGGCACTC	
miR-520h_Sonde	ACTCTAAAGGGAAGCACTTTGT	
miR96_Sonde	GCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA	
mir17-3p-Sondehs	CTACAAGTGCCTTCACTGCAGT	
mir17-3p-Sondemm	TACAAGTGCCTTCACTGCAGT	
138_S1_a	TGTGTCCCTCTTCTGTTGTAGG	463bp
138_S1_b	CTCCTGGTTGGTGCTCAAGG	
138_S5_a	AACACTGGGTGGTTCCAGAG	521bp
138_S5_b	CACAGTCTCAGCGTCTTTCC	

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt
RNA-Oligonukleotide (artifizielle miRNAs)		
mmu-miR17-3p	ACUGCAGUGAGGGCACUUGUA	
mmu-miR17-3ppass	CAAGUGCCUCACUGCGGUUG	
hsa-miR17-3p	ACUGCAGUGAAGGCACUUGU	
hsa-miR17-3ppass	AAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	
vim-17Tssi	ACUGCAGUAAAGGCACUUGAAA	
vim-17Tssi	UCAAGUGCCUUUACUGCAGUAA	
miR-27b	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	
miRr-27bpass	AGAACUUAGCCACUGUGGGCA	
miR-143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCA	
miR-143pass	AGCUACAGUGCUCUACUUGGG	
miR-339	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCA	
miR-339pass	AGCUCCUGGAGGACAGGGCCG	
miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	
miR-375Pass	ACGCGAGCCGAACGAACAGGCC	
miR-205	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG	
miR-205pass	GACUCCGGUGGAAUGAAGUUCA	
miR-151star	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGUA	
miR-151starpass	CUAGACUGUGAGCUCCUCGCUU	
miR-489	AGUGACAUCACAUAUACGGCAGC	
miR-489pass	UGCCGUUAUUGUGAUGUCAUCUA	
miR-328	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU	
miR-328pass	GGAAGGGCAGAGAGGGCCGAGG	
miR-453	GAGGUUGUCCGUGGUGAGUUCG	
miR-453pass	AACUCACCACGGACAACUUUAA	
miR-432star	CUGGAUGGCUCCUCCAUGUCU	
miR-432starpass	ACAUGGAGGAGCCAUCUGGCC	
miR-412	ACUUCACCUGGUCCACUAGCCGU	
miR-412pass	GGCUAGUGGACCAGGUGAACUAA	
miR-96	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGC	
miR-96pass	AAAAAUGUGCUAGUGCCGGAU	
miR-515-3p	GAGUGCCUUCUUUUGGAGCGU3	
miR-515-3ppass	GCUCCAAAAGAAGGCACUUUG3	
miR-136	ACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGGA	
miR-136pass	CAUCAUCAAAAACAAUUGGAGCCU	
miR-351	UCCUGAGGAGCCCUUUGAGCCUG	
miR-351pass	GGCUCAAAGGGCUCCUCAGGGGAC	
miR-520-h	ACAAAGUGCUUCCUUUAGAGU	
miR-520-hpass	UCUAAAGGGAAGCACUUUGCUU	
siEGFP	GGCAAGCUGACCCUGAAGUUU	
siEGFPpass	ACUUCAGGGUCAGCUUGCCUU	
RNA-Adapter für 5'RACE	GCUGAUGGCCAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGC UUUGAUAAA	erhalten von der AG Weisshaar Uni- Bielefeld

3.1.6 Kulturmedien

3.1.6.1 Kulturmedien für Bakterien

Für die Anzucht von Bakterien wurden folgende Nährmedien verwendet:

LB-Medium (1l)	LB-Agar (1l)	SOB-Medium (1l)	SOC-Medium (1l)
10g Bacto-Tryptone	LB-Broth + 15g	20 g/l Bactotrypton	SOB
5g Hefeextrakt	Bacto- Agar	5 g/l Hefeextrakt	2, 5mM KCl
200mM NaCl		10mM NaCl	20mM Glukose
			10 mM MgCl ₂

Nachdem die Substanzen gelöst waren, wurde der pH-Wert der Lösungen mit 5N NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert. Nachdem die LB-Medien auf ca. 50 °C abgekühlt waren konnte das Antibiotikum Ampicilin zugesetzt werden. Im Fall von Agar-Lösungen wurden zudem noch 0,16 ml IPTG (1M) und 0,26 ml X-Gal (250 mg/ml) hinzugegeben.

3.1.6.2 Zellkulturmedien

Wachstumsmedium (NSC-19; Neuro2a; HeLa-S3)	Freezing-Medium (NSC-19; Neuro2a; HeLa-S3)
87% DMEM 1x High Glucose mit 4,5g/l Glucose und L-Glutamin 1% 100x Penicillin/Streptomycin (PAA) 1% ml L-Glutamin (200mM) (PAA) 1% ml 100x None Essential Aminoacids 10% FCS (PAA)	40% DMEM 1x High Glucose mit 4,5g/l Glucose und L-Glutamin 50% FCS (PAA) 10% DMSO
CMF-PBS (kurz PBS)	
136mM NaCl 3mM KCl 8mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 1,5mM KH ₂ PO ₄	

DMEM wurde von der Firma BioWhittaker bzw. PAA bezogen.

3.1.7 Antibiotika

Um eine Selektion transformierter Zellen durchzuführen, wurden Antibiotika zugesetzt.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	150mg/ml in Wasser	25-150µg/ml
Tetracyclin	50mg/ml in Ethanol	10-15µg/ml
Kanamycin	20mg/ml in Wasser	20µg/ml
Geneticin (G418)	50mg/ml in Wasser	100-800µg/ml

3.1.8 DNA-Längenstandards

Bezeichnung	Fragmentlängen	Bezugsquelle
Gene DNA Ladder Mix	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 (bp)	MBI Fermentas
DNA Leiter 100bp-	100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 (bp)	MBBL
DNA Leiter 100bp- (erweitert)	100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 (bp)	MBBL
Mark12 Protein-ladder	200, 116.3, 97.4, 66.3, 55.4, 36.5, 31.0, 21.5, 14.4, 6.0, 3.5, 2.5 (kDa)	Invitrogen

3.1.9 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq-DNA Polymerase Mastermix	Qiagen, Peqlab
<i>Pfu</i>-Polymerase	Peqlab, MBI Fermentas
Expand High-Fidelity Kit	Roche
Expand Long-Template Kit	Roche
Transcriptor RT-Polymerase	Roche
Expand Reverse Transcrip	Roche

Enzym	Bezugsquelle
Shrimp Alkaline Phosphatase	MBI Fermentas
Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas
Klenow-Fragment DNA-Polymerase	MBI Fermentas
RNase A	Roth
Lysozym	Roth
Proteinase K	Sigma
RNase Inhibitor	Roche, MBI Fermentas
Trypsin-EDTA	PAA
T4-RNA Ligase	New England Biolabs
DNaseI	Qiagen

3.1.10 Kits

Enzym	Bezugsquelle
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen; (ebenso Alternativprodukte der Firmen Macherey-Nagel, Eppendorf und Peqlab)
Nucleo-Spin Extract Kits	Macherey-Nagel
Endotoxfree	Sigma (ebenso ein Alternativprodukt der Firma Peqlab)
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen
GeneJET™ PCR Cloning Kit	MBI Fermentas
Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit	Stratagene
QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
5'/3' RACE Kit, 2nd Generation	Roche
BCA Protein Assay Kit	Pierce
LightCycler® TaqMan® Master	Roche
TaqMan® MircoRNA Reverse TranscriptonKit	Applied Biosystems
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Sybr Green PCR-Mastermix	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
miRNeasy Mini Kit	Qiagen

3.1.11 Chemikalien

Chemikalien wurden, falls nicht anders beschrieben, von der Firmengruppe Sigma-Aldrich oder Roth bezogen.

3.1.12 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller	Arbeitskonzentration (Western Blot)
anti-Vimentin	monoklonaler Maus-Antikörper gegen Vimentin; Primärantikörper	Sigma-Aldrich	1:5000
anti- β -Actin	monoklonaler Maus-Antikörper gegen anti- β -Actin; Primärantikörper	Sigma-Aldrich	1:10000
anti-Maus HRP	HRP-gekoppelter polyklonaler Ziegen-Antikörper, Sekundärantikörper	Dianova	1:6666

3.1.13 *In silico* Ressourcen

Programm	URL
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed
Ensembl Genom Browser	http://www.ensembl.org/index.html
UCSC Genom Browser	http://genome.ucsc.edu/
BCM Search Launcher	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/
Webcutter	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM
RepeatMasker	http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/
Protein Tools	http://www.expasy.org/tools/
RNAhybrid	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/
TargetScan	http://www.targetscan.org/
PicTar	http://pictar.bio.nyu.edu/
MiRanda	http://www.microna.org/
miRBase	http://microna.sanger.ac.uk/

3.1.14 Bezugsquellen

Sofern nicht gesondert indiziert, war der Firmensitz in Deutschland.

Firma	Firmensitz	Firma	Firmensitz
Agilent	Santa Clara (CA, USA)	Miltenyi	Köln
Amersham	München	MWG	Ebersberg
Applied Biosystems	Darmstadt	Nunc	Wiesbaden
BD Falcon	Heidelberg	Omnilab	Bremen
Berthold&Egg	Bad Wildbad	PAA	Cölbe
Dharmacon	Lafayette (CO, USA)	Peqlb	Erlangen
Dianove	Hamburg	Pierce	Rockford (IL, USA)
Eppendorf	Wesseling-Berzdorf	Promega	Mannheim
Hettich	Tuttlingen	Qiagen	Hilden
IIT	Bielefeld	Roche	Mannheim
Invitrogen	Karlsruhe	Roth	Karlsruhe
Kodak	Rochester, NY, USA	Schleicher&Schüll	Dassel
Macherey-Nagel	Düren	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
MBBL	Bielefeld	Stratagene	Amsterdam (NED)
MBI Fermentas	St. Leon-Rot	The Baker Company	Sanford (ME, USA)

3.2 DNA-Methoden

3.2.1 Handhabung rekombinanter Bakterien

Für die Anzucht der Bakterien ist generell darauf zu achten, dass eine Reinkultur angelegt wird. Dies bedeutet, dass beim Animpfen des Mediums nur ein Klon verwendet wird, ggf wurden hierfür zuvor Bakterien einer Kultur auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Für das Wachstum in Flüssigkultur wurde in der Regel Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Dieses Medium wurde nach der Herstellung autoklaviert, um eine Kontamination mit anderen Mikroorganismen zu vermeiden. Nach dem Abkühlen auf unter 50°C konnten dem Medium Antibiotika für eine Selektion zugesetzt werden. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden dem LB-Medium 15g/l Agar zugegeben, anschließend autoklaviert und nach dem Abkühlen konnten Selektionskomponenten hinzugegeben werden, wie z.B. Antibiotika oder IPTG und X-Gal für eine Blau-Weiß-Selektion. Danach wurde der noch flüssige Agar zum Aushärten in Petrischalen gegossen. Bakterien können auf

diesen Platten einige Wochen bei 4°C gelagert werden. Um rekombinante Bakterienkulturen für mehrere Jahre zu lagern, ist eine Aufbewahrung in 20% Glycerin bei -70°C erforderlich. Dafür wurden 800µl einer frischen Bakterienkultur mit 200µl 100% Glycerin versetzt. Diese Suspension wurde mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers durchmischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend konnte diese Glycerinkultur bei -70°C für längere Zeit aufbewahrt werden.

3.2.2 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von *E. coli* Zellen wurden chemisch kompetente One Shot™ Zellen (Top10F') der Firma Invitrogen verwendet, oder selber aus den Stämmen JM109 der Firma Promega oder XL1-Blue erzeugt (3.2.3). Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis angetaut und 2µl Ligationsansatz oder Plasmidlösung (ca. 5ng/µl) zugegeben und mit der Pipettenspitze umgerührt. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wird das Gefäß mit den Zellen 30-50 Sekunden lang in ein 42°C Wasserbad überführt und danach sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt. 250-800µl SOC-Medium wurden zugefügt. Die Zellen erholten sich anschließend bei 37°C für eine Stunde im Schüttler. Von diesem Ansatz wurden 50 und 200µl auf Selektionsplatten (Ampicillin) ausplattiert.

Für die Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde der Gene Pulser™ der Firma BIO-RAD verwendet. Hierzu wurden am Gerät eine Spannung von 2,5kV, ein Widerstand von 400Ω und eine Kapazität von 25µF eingestellt. Die elektrokompetenten XL1-Blue Zellen wurden auf Eis angetaut. 2-5µl des zu transformierenden Ligationsansatzes wurde zu den Zellen pipettiert und für eine Minute auf Eis inkubiert. Eine vorgekühlte Elektroküvette wurde mit dem Ansatz beladen und in den Schlitten gestellt. Dabei war darauf zu achten, dass die Küvette von außen keine Restfeuchtigkeit aufweist. Nach dem Einschieben des Kontaktgebers wurden die beiden Knöpfe am Gene Pulser™ solange gleichzeitig gedrückt, bis ein Signalton ertönt. Sofort danach wurde 0,8ml SOC-Medium zu den Zellen pipettiert und der Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 90-minütiger Erholung der Zellen in dem 37°C Schüttler wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert.

3.2.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die in 3.2.2 beschriebene Hitzeschock-Transformation wurden die chemisch kompetenten Zellen nach einem Protokoll von Inoue et al. (1990) hergestellt. Hierzu wurden zunächst zwei Übernachtskulturen mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstamms und je 5 ml LB-Medium bei 37°C hergestellt. Anschließend überführte man die Kulturen in 250ml SOB Medium und inkubierte die Kultur bei 20°C bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von ca. 0,6. Anschließend wurde die Kultur für 10 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 3000g und 4°C geerntet. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet in 80ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 2500g und 4°C. Das Pellet wurde wieder abgezogen und die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und mit Dimethylsulfoxid zu einer Endkonzentration von 7% versetzt. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis konnten die Zellen aliquotiert, danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert werden.

TB-Puffer

10mM Pipes

15mM $CaCl_2$

250mM KCl

55mM $MnCl_2$

Pipes, $CaCl_2$ und KCl in H_2O lösen; pH 6,7 mit KOH einstellen anschließend entsprechende Menge $MnCl_2$ zugeben und die Lösung steril filtrieren

55mM $MnCl_2$

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, die DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennt und durch die Einlagerung eines Farbstoffs, wie z.B. Ethidiumbromid, sichtbar macht. Aufgrund der Phosphodiester-Brücken in der DNA trägt diese eine stark negative Ladung. In einem Gleichspannungsfeld wandert die DNA in Richtung der Anode. Erfolgt die Wanderung in einer Gelmatrix, so ändert sich die elektrophoretische Mobilität durch den Ogston-Siebeffekt und der Reptationstheorie, so dass eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihren Größen möglich ist.

Zur Herstellung der Gele wurde je nach Fragestellung eine entsprechende Menge Seakem LE Agarose (0,8-2%) (BioWhittaker) in TAE-Puffer eingewogen, in der

Mikrowelle kurz aufgekocht und auf einen Magnetrührer gestellt, um Luftbläschen aus der Lösung zu entfernen. Daraufhin wurde das Gel in der gewünschten Größe (Minigel 7 x 10cm; Großes Gel 13 x 15cm) gegossen und ein Gelkamm eingesteckt. Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm gezogen. In die Geltaschen wurde die zu analysierende DNA pipettiert, nachdem diese mit 6x Probenpuffer gemischt worden war. Dieser Puffer ermöglicht das Beladen der Geltasche, indem er die Dichte der DNA-Suspension erhöht, zudem beinhaltet er die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylenxyanol, welche es ermöglichen, die zurückgelegte Wanderungstrecke der Fragmente abzuschätzen. Für eine genauere Größenbestimmung der analysierten Proben wurde ein Fragmentlängenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5V/cm. Anschließend wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (1µg/ml 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid in TAE) für 15-20min. geschüttelt. Der Farbstoff interkaliert in die Nukleinsäure. Durch UV-Bestrahlung auf einem Transilluminator (312nm) fluoresziert der Farbstoff orange (590 nm) und gibt somit die Lage der einzelnen DNA-Banden wieder. Die Ergebnisse wurden mithilfe einer fotografischen Dokumentationsanlage (Digitalkamera: CCDKamera KP-16a, Hitachi; Thermoprinter: Mitsubishi photo printer P500) festgehalten

TAE-Puffer	6x Probenpuffer
0,04M TrisAcetat	0,25% Bromphenolblau
1mM EDTA pH8.0	0,25% Xylenxyanol
	30% Glycerin

3.2.5 Plasmidisolierung aus Bakterien

3.2.5.1 Easy Präp

Eine sehr einfache und schnelle Methode, um Plasmid-DNA zu gewinnen, ist die von Berghammer (1993) beschriebene Methode "Easy-Präp". Diese Methode eignet sich gut, um eine größere Anzahl von Bakterienklonen auf eine erfolgreiche Transformation zu testen. Ein Nachteil ist die geringe Reinheit, da hier auf den Phenolisierungsschritt verzichtet wird. Die Reinheit ist aber für schnelle Tests durchaus ausreichend. Durchführbar ist die Easy-Präp allerdings nur für endA⁻-Stämme, da die Endonuklease A nicht durch Hitze inaktivierbar ist und die DNA abbauen würde.

Zunächst wurde ein Eppendorfreaktionsgefäß mit ca. 1 ml LB-Medium befüllt und einige Zellen des zu untersuchenden Klons mit einer sterilen 10µl Pipettenspitze angeimpft. Die Spitze verblieb während des Wachstums in dem Reaktionsgefäß und diente der besseren Durchmischung der Kultur. Anschließend wurden zwei Löcher in den Deckel des Gefäßes gestochen, um eine bessere Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Dann ließ man die Kultur Ü/N bei 37°C im Heizschüttler wachsen und zentrifugierte die stationären Bakterien 30-60sec in der Eppifuge (13000 rpm, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 50µl Lysispuffer (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA, 15% Sucrose, 0,4mg/ml RNAse A, 2mg/ml Lysozym, 0,1mg/ml BSA) gelöst. Nach 5min im Schüttler bei Raumtemperatur wurde das Eppendorfggefäß für 30sec in ein 100°C Wasserbad gegeben, was zur Lyse der Bakterien führte. Anschließend wurde für 60sec auf Eis inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur in der Eppifuge, wurde der Überstand in ein sauberes Eppendorfggefäß überführt. 3-6µl des Überstandes konnten für eine Testspaltung eingesetzt werden.

3.2.5.2 Alkalische Lyse

Diese von Birnboim und Doly (1979) beschriebene Methode der Plasmid-Isolierung wurde im Rahmen dieser Arbeit angewandt, um Plasmid-DNA aus endA⁺-Stämmen zu isolieren. Die hiermit erzielte Plasmidkonzentration und deren Reinheit waren für Testspaltungen und Ligationen ausreichend.

Die Anzucht einer stationären Bakterienkultur erfolgte wie in dem Protokoll der Easy Präp (3.2.5.1). Anschließend wurde die Kultur 30-60sec in der Eppifuge (13000 rpm, RT) zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet in 300µl eiskalter Lösung 1 resuspendiert. Die Zugabe von 300µl Lösung 2 bewirkte durch die Erhöhung des pH-Wertes ein Denaturieren der chromosomalen DNA. Das SDS ermöglichte das Ablösen DNA-assoziiertes Proteine. Das Eppendorfggefäß wurde 5-9mal invertiert, und für 5min auf Eis inkubiert. Mit 300µl Lösung 3 wurden chromosomale DNA und Proteine gefällt. Das Eppendorfggefäß wurde invertiert, bis sich eine homogene Suspension bildete und für 5min auf Eis inkubiert.

Nach fünfminütiger Zentrifugation (13000rpm in der Eppifuge, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch wurden letzte in Lösung befindliche Proteine extrahiert. Dazu wurden 750µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und

vorsichtig invertiert. Nach kurzem Zentrifugieren (2min) wurde die obere (wässrige) Phase vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Dabei sollte ein Mitnehmen der Interphase vermieden werden. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden zu dieser Lösung 700µl Isopropanol gegeben und vorsichtig invertiert. Nach zweiminütiger Inkubation (RT) wurde anschließend 6 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgegossen.

Nachdem der Alkohol komplett abgesaugt wurde, wurde das Pellet ca. 10 Minuten bei RT getrocknet. Die DNA wurde je nach Pelletgröße in 30-50µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3
50mM Glucose	stets frisch ansetzen	3M Kaliumacetat
25mM Tris-Cl (pH8.0)	0,2N NaOH	(mit Eisessig pH4.8 einstellen)
10mM EDTA (pH8)	1% SDS	
100µg/ml RNase A		

3.2.5.3 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien mittels Ionenaustauschersäulen

Für die Präparation von hochreiner Plasmid-DNA oder von Plasmiden mit geringer Kopienzahl empfiehlt sich die Verwendung eines Kits. Diese basieren ebenfalls auf der alkalischen Lyse, nur wird hier keine Aufreinigung der DNA mit Phenol/Chloroform vorgenommen. Durch die Herstellung optimaler Salzkonzentrationen und pH-Werte wird die Plasmid-DNA in einer equilibrierten Ionenaustauscher-Säule gebunden, gereinigt und anschließend von ihr eluiert. Auf diese Weise können degradierte RNA, zelluläre und nukleinsäureassoziierte Proteine von der Plasmid-DNA entfernt werden. Die Fällung erfolgt mit Isopropanol. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA in Wasser vollständig resuspendiert.

Ein alternatives Verfahren ist die DNA-Aufreinigung über Silicamembran-Säulen. Der Ablauf ist dem der Ionenaustauscherchromatographie sehr ähnlich und soll daher hier nicht detailliert aufgeführt werden. Zunächst werden Bakterien durch eine alkalische Lyse aufgeschlossen, dann die DNA an das Säulenmaterial gebunden, durch Waschen werden unerwünschte Produkte wie Proteine und RNA entfernt und letztendlich wird die hochreine DNA eluiert. Der Unterschied liegt darin, dass die DNA nicht über Ionenladungen an die Säule bindet, sondern durch polare

Wechselwirkungen. Im Bindepuffer ist ein chaotropes Salz enthalten, welches die Hydrathülle der DNA entfernt, so dass diese an die Silicamembran binden kann. Der Vorteil bei diesem Verfahren ist, dass die Elution direkt mit Wasser erfolgen kann, so dass eine DNA-Fällung nicht mehr erforderlich ist. Nachteilig ist die geringere Kapazität der Säulen. Für dieses Verfahren wurden Kits verschiedener Anbieter wie z.B. Qiagen, Peqlab oder Eppendorf genutzt.

3.2.5.4 Endotoxinfreie Plasmidisolierung

Endotoxine oder Lipopolysaccharide sind Zellmembrankomponenten von gram-negativen Bakterien. Sie können bei Transfektionen von DNA in eukaryontische Zellen sehr störend wirken, da sie die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen und zu unerwünschten Reaktionen wie Stimulierung der Proteinsynthese oder Aktivierung der Komplement-Kaskade (Immunantwort) führen. Aufgrund ihrer chemischen Struktur und Eigenschaften sowie der Tendenz micellenartige Komplexe zu bilden, werden sie bei den unter 3.2.5.3 beschriebenen Methoden nicht diskriminiert. Für die Isolierung von Plasmiden, die später in der Zellkultur eingesetzt wurden, wurden daher Kits eingesetzt (Sigma-Adrich oder Peqlab), die Endotoxine vor dem Beladen der Ionenaustauscher- oder Silicamembran-Säulen durch ein Bindemittel aus dem Zellysate entfernen. Die Entfernung erfolgte durch die Zugabe des Bindemittels zu dem Zellysate, schütteln, 10-minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Inkubation bei 37°C für 5 Minuten. Danach erfolgte durch 3-minütige Zentrifugation bei 3000g eine Phasentrennung des Bindemittels und des endotoxinfreien Lysates. Der weitere Ablauf glich dem in 3.2.5.3.

3.2.6 DNA-Isolierung aus Mausgewebe

Diese Methode aus Molecular Biology (Boehring, Mannheim) eignet sich, um aus Gewebe chromosomale DNA zu isolieren. Um eine effiziente Ausbeute an DNA zu erzielen, wird die DNA aus Geweben hoher Zelldichte isoliert, da hier der Anteil an Desoxynucleinsäuren gegenüber der Gewebemasse am höchsten ist. Hierzu eignen sich Organe wie Herz, Leber, Nieren, Lungen und Milz besonders gut.

Nach der Präparation des Gewebes aus der Maus wurde die Gewebeprobe schnell in flüssigem N₂ schockgefroren, um eine Degradierung der DNA durch nucleolytischen Abbau der Enzyme zu verhindern, wobei darauf zu achten war, dass die Probenmasse 400mg nicht überschritt. Anschließend wurde das Gewebe in einer

vorgekühlten Reibschale in flüssigem N₂ mit wenig Quarzsand zu feinem Pulver gemahlen, in 12ml Greinerröhrchen überführt und in 4ml DNA-Gewebe-Extraktionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 400µg Proteinase K (\Rightarrow 0,1 mg/ml) wurde der Reaktionsansatz Ü/N bei 55°C geschüttelt. Dem Ansatz wurden 3ml Phenol zugegeben, um dann 1,5h bei 4°C zu schütteln und anschließend 10 min. zu zentrifugieren (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 75%). Hiernach wurde ausschließlich die obere wässrige Phase entnommen und mit 4ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und 1,5h bei 4°C invertiert. Der Ansatz wurde erneut für 10min zentrifugiert (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 75%), die obere wässrige Phase wurde in ein neues Greinerröhrchen überführt und mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 30min bei 4°C invertiert. Es erfolgte ein weiterer 10-minütiger Zentrifugationsschritt (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 75%), und die obere wässrige Phase wurde mit ½ Vol Ammoniumacetat (7,5 M) und 2,5 Vol 100% Ethanol (bei -20°C vorgekühlt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gut invertiert. Die DNA wurde Ü/N bei 4°C gefällt. Anschließend wurden 5min (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 90%) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die DNA mit 2ml 70% Ethanol (bei -20°C vorgekühlt) gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 90%), wonach der Überstand abgesaugt und das Pellet unter dem Abzug getrocknet wurde. Hiernach wurde die DNA gut in 2ml TE-Puffer resuspendiert, und die Konzentration konnte durch UV-Absorptionsspektrometrie bestimmt werden.

DNA-Gewebe-Extraktionspuffer	TE-Puffer
100mM NaCl	10 mM Tris-Cl pH 7,4
10mM Tris-Cl	1 mM EDTA pH 8,0
25mM EDTA	
0,5% SDS	
pH 8,0	

3.2.7 Schnellpräparation von DNA aus Mausschwanzspitzen

Für eine Diagnostik der zu untersuchenden Maus-Genotypen wurde eine DNA-Probe der einzelnen Tiere benötigt. Diese wurde aus einem ca. 3mm langen Stück Schwanzspitze gewonnen, die den Mäusen beim Entwöhnen vom Muttertier

abgenommen wurde. Die Spitze wurde in 300µl Pufferlösung (10mM Tris pH 8, 50mM KCl, 0,045% Tween20 und 0,045% NP40) zerkleinert und nach Zusatz von Proteinase K in einer Endkonzentration von 10µg/ml für mindestens 2 Stunden bei 55°C im Schüttler inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und der Überstand nach einer kurzen Zentrifugation in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für eine PCR-Diagnostik wurden 1-2µl dieser Präparation eingesetzt.

3.2.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Wird zum Beispiel nach einer Restriktionsspaltung nur ein bestimmtes Fragment für weitere Arbeiten benötigt, so ist es möglich, die verdaute DNA über ein Agarosegel aufzutrennen. Nach dem Färben mit Ethidiumbromid werden auf einem Transilluminator die Größen der einzelnen Banden bestimmt und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Für die DNA-Extraktion aus Agarose wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN oder das Nucleospin Extract Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Beispielhaft ist das Protokoll der Firma QIAGEN angegeben. Hierbei wurde das isolierte Agaroseblöckchen gewogen und in dem 3fachen Volumen QG Puffer bei 50°C ca. 10 Minuten gelöst. Der Ansatz wurde anschließend auf eine mitgelieferte Minisäule gegeben und durch Zentrifugation für 1 Minute in einer Tischzentrifuge an das Säulenmaterial gebunden. Nach dem Waschen mit 750µl PE-Puffer wurde die Säule durch wiederholtes Zentrifugieren getrocknet und die DNA mit 30µl Elutionspuffer (10mM Tris-Cl pH 8.0) eluiert. Die Konzentration wurde anschließend in einem Agarosegel abgeschätzt, oder photometrisch bestimmt.

3.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die für Ligationen eingesetzt werden sollten, mussten von Salzen, Nukleotiden, Primern und Enzymen gereinigt werden. Hierzu wurde der Nucleospin Kit (Macherey&Nagel) verwendet.

Der PCR-Reaktionsansatz wurde nach den Amplifikationsschritten mit dem zweifachen Volumen Bindepuffer gemischt und auf die entsprechenden Säulen gegeben. Anschließende Bindung an die Silicasäule sowie Wasch- und

Elutionsschritte wurden nach den Anweisungen des Herstellerprotokolls durchgeführt.

3.2.10 Quantifizierung von Nucleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren im UV-Bereich bei 260nm, wofür die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich sind. Eine reine Lösung doppelsträngiger DNA mit 50µg/ml erreicht einen Wert von $OD_{260} = 1$. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} liegt bei reiner DNA bei 1,8 und bei reiner RNA, aufgrund des Hyperchromie-Effekts (Lottspeich et al., 1998), bei 2,0. Je mehr Proteinanteile sich in der Suspension befinden, desto weiter unterschreitet dieser Quotient den Wert 1,8.

Messungen wurden mit dem UV/Vis-Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 (PepLab) durchgeführt.

Eine weitere Methode der Konzentrationsbestimmung ist das Abschätzen der Fluoreszenz von interkaliertem Ethidiumbromid. Dazu wurde die DNA-Probe gegen einen Fragmentlängenstandard bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen, im elektrischen Feld aufgetrennt und anschließend im Ethidiumbromidbad gefärbt. Bei der Anregung mit UV-Licht fluoresziert Ethidiumbromid orange. Hierbei konnte ein Mengenverhältnis zwischen eingesetztem Marker mit bekannter Konzentration und der Probe anhand der Fluoreszenzintensität abgeschätzt werden.

3.2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine einfach zu handhabende Methode, um DNA selektiv zu amplifizieren. Hierbei muss man allerdings über Sequenzinformationen der flankierenden Bereiche des zu vervielfältigen Stückes verfügen. Für diese Bereiche werden Oligonukleotidprimer synthetisiert, so dass sie in gegenläufiger Richtung an den komplementären DNA-Strang binden können und so die Ziel-DNA einrahmen. Nach einer Hitze-Denaturierung werden die angelagerten Primer (Annealing) von einer hitzestabilen DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Dieser Vorgang (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird bis zu 35-mal wiederholt. Das bei jedem Zyklus entstehende Fragment dient im nächsten als Matrize, so dass eine exponentielle Amplifikation stattfindet.

Essentiell für diese Reaktion ist eine hitzestabile Polymerase, da die Denaturierung der Template-DNA bei 92-94°C stattfindet. Verwendung findet in der Regel die *Taq*-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, die ein Temperaturoptimum von 72°C besitzt.

Bei der Auswahl eines Primers sind folgende Regeln einzuhalten (QIAGEN, *Critical Factors for Successful PCR*): Folgen von 3 oder mehr G oder C am 3' Ende sollten genau wie ein T am 3' Ende vermieden werden. Außerdem sollten komplementäre Sequenzen innerhalb des Primers oder zwischen den eingesetzten Primern nicht auftauchen. Die Länge des Primers sollte zwischen 18-30 Nukleotiden liegen, da kleinere Primer zu unspezifischen Nebenreaktionen führen könnten. Der GC-Gehalt sollte zwischen 40-60% liegen. Die Annealing-Temperatur T_m kann nach der 2 + 4-Regel abgeschätzt werden. Hierbei rechnet man für jede A+T Paarung 2°C und für G+C 4°C. Als Ausgangspunkt sollte man die Annealing-Temperatur 5°C unter dem abgeschätzten T_m Wert wählen. Die Primer-Konzentration sollte im Bereich von 0,1 bis 0,5µM liegen. Bei hoher Primer-Konzentration ist die Gefahr einer unspezifischen Reaktion größer. Die Anzahl der PCR-Zyklen sollte 35 nicht übersteigen, da sonst eventuell zunehmende unspezifische Reaktionen überbewertet würden. Die Aktivität der DNA-Polymerase nimmt mit jedem weiteren Zyklus ab.

Standard-PCR

	Komponenten	Ausgangskonzentration	Einsatz in µl
1	<i>Taq</i> -Polymerase		0,3
2	10x Puffer	200mM Tris pH 8,0; 20 mM MgCl ₂ , 0,1% Tween20, 160mM (NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
3	dNTPS	10mM	0,2
4	Wasser		16,1
5	upstream-Primer	50pmol/µl	0,2
6	downstream-Primer	50pmol/µl	0,2
7	DNA-Template	10-100ng/µl	1

Die *Taq*-Polymerase wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Weisshaar selber rekombinant hergestellt und mir zur Verfügung gestellt. Die konstanten Komponenten 1-4 wurden teilweise auch als 2x-Mastermix bezogen (Qiagen oder Peqlab).

Ein Standard-Amplifikationsprogramm wurde wie folgt durchgeführt:

Reaktion	Temperatur °C	Zeitdauer min
initiale Denaturierung	94	2
30 Zyklen	Denaturierung	0,5
	Annealing	primerspezifisch
	Elongation	0,5-4
finale Elongation	72	10

Die Zeiten für die Denaturierung sind generell so gering wie möglich zu halten, um die Polymerase nicht unnötig zu schädigen. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des Amplifikats, als Richtwert für die *Taq*-Polymerase gilt eine Syntheserate von 1kb/min. Die finale Elongation dient der eventuell notwendigen Vervollständigung der Replikation.

3.2.11.1 Gradienten-PCR

Um die optimale Annealing-Temperatur für ein Primerpaar zu testen, besitzt die Maschine Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf eine Zusatzfunktion, mit der es möglich ist, in einer PCR 12 verschiedene Temperaturen mit einer Spanne von bis zu 20°C parallel zu fahren. Auf diese Weise lässt sich leicht die optimale Temperatur für eine möglichst hohe Spezifität eines Primerpaars feststellen. Die Reaktion wurde wie in 3.2.11 beschrieben angesetzt.

3.2.11.2 Verwendung einer Proofreading-Polymerase

Um ein Produkt zu erhalten, das keine oder nur wenige Punktmutationen enthält, kann man eine Polymerase mit einer Proofreading Aktivität (3'-5' Exonuklease Aktivität) verwenden. Die bei einer Standard-PCR verwendete *Taq*-Polymerase besitzt keine Korrekturaktivität und ist daher für bestimmte Anwendungen, bei denen es auf eine korrekte Sequenz ankommt (z.B. Klonierungen 3'UTRs, Amplifikation isogener Bereiche für eine homologe Rekombination oder Mutagenese von Vektoren), ungeeignet. Verwendet wurden: *Pfu*-Polymerase (MBI Fermentas), Expand High Fidelity (Mix aus *Taq* und einer nicht näher bezeichneten Proofreading Polymerase, Roche) oder, um besonders lange Fragmente zu erzeugen, Expand Long-Template Polymerase (Mix aus *Taq* und *Tgo*, Roche) und *PfuUltra*

High Fidelity (Stratagene). Die Polymerasen wurden nach den Anleitungen der Hersteller verwendet.

3.2.11.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Methode, mit der eine schnelle Analyse rekombinanter Bakterien möglich ist. Hierbei wurde ein Ansatz wie bei einer Standard PCR zusammengestellt (siehe oben), nur wurde auf die Zugabe von Template-DNA verzichtet. Das fehlende Volumen wurde durch Wasser ersetzt. Mit einer Pipettenspitze wurde dann die zu untersuchende Bakterienkolonie vorsichtig auf der Platte angepickt, auf einer zweiten Platte kurz ausgestrichen und in den PCR-Ansatz unter leichten Drehungen abgestreift. Hierbei war darauf zu achten, dass kein Medium von der Platte mitgenommen wird. Die Parameter der PCR wurden, bis auf eine längere initiale Denaturierung (4 Minuten), gegenüber einer Standardreaktion nicht geändert.

3.2.12 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) verwendet. Der linearisierte TOPO TA Vektor besitzt die Topoisomerasel, die kovalent an einen Thymin Überhang gebunden ist, was eine effizientere Klonierung von Fragmenten mit Adenosin Überhängen, die von der *Taq* Polymerase erzeugt werden, erlaubt. Die Effizienz der A-Addition hängt von der 5'-Base des komplementären Primers ab. So sollte man hier ein Adenosin oder Guanin wählen (Mühlhardt, 2000).

Möchte man PCR-Produkte klonieren, die mit einer Proofreading Polymerase hergestellt worden sind, so wurden durch Inkubation des Fragmentes mit *Taq* Polymerase und dATP für 10 Minuten bei 72°C die gewünschten A-Überhänge erzeugt. Anschließend wurden die in den Vektor pCR4-TOPO-ligierten Produkte in OneShot[®] TOP10-Zellen transformiert (Handbuch TOPO-Cloning, Invitrogen).

Ein alternatives, häufig verwendetes, Produkt ist das pJet PCR Cloning Kit der Firma MBI Fermentas. Der Unterschied liegt darin, dass hier stumpfe Enden in den Vektor pJET1 kloniert werden. Wurden die PCR-Produkte in Gegenwart einer Polymerase erzeugt, die Überhänge produziert (wie z.B. *Taq*-Polymerase), wurden diese mit Hilfe des im Kit enthaltenen Blunting Enzyms entfernt. Die Durchführung erfolgte nach

Anleitung des Herstellers. Die anschließende Transformation erfolgte meist in chemisch kompetente XL1-Blue Zellen.

3.2.13 Restriktionsspaltung von DNA

Je nach Menge der zu spaltenden DNA wurde das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes bestimmt. Für Testspaltungen wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes mit 20 μ l angesetzt. Hierbei wurden 1,0 μ g DNA, ca. 2 U Restriktionsenzyme (Menge ist Abhängig von der Konzentration, bzw. der spezifischen Aktivität der Enzyme) und 2 μ l 10-fach Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Bei Restriktionsspaltungen größerer DNA Mengen, z.B. für nachfolgende Ligationen, wurde ein Volumen von 50-100 μ l eingesetzt. 5-10 μ g DNA, 10U Restriktionsenzyme, 5 μ l (10) μ l 10-fach Puffer und mit Wasser bis auf 50 μ l (100 μ l) auffüllen. Die Ansätze wurden bei 37°C (oder einer anderen für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur) 2 Stunden bis über Nacht inkubiert (je nach Verwendung).

3.2.14 DNA-Ligationen

Führt man Ligationen mit einem Vektor durch, der nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten ist, kann man die Rate der Religierungen des linearen Vektors ohne Insert durch den Einsatz von alkalischer Shrimp Phosphatase verringern. Dazu werden in den Restriktionsansatz des Vektors zusätzlich 1 μ l Shrimp Phosphatase gegeben und diese nach 37°C Inkubation durch kurzes Erhitzen (15 Minuten bei 65°C) inaktiviert. Die Wirkung ist eine Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden. Beim Einsatz mit zwei Restriktionsenzymen kann auf den Dephosphorylierungsschritt verzichtet werden. Die T4-Ligase (MBI Fermentas) wird mit einem 10-fachen Reaktionspuffer geliefert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 20 μ l, das Mengenverhältnis zwischen Vektor und Insert beträgt 1:5. Setzt man standardmäßig 25ng Vektor ein, so kann man nach folgender Formel die Fragmentmenge für die Ligation berechnen (Mühlhardt, 2000):

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 125 [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Für eine Ligation mit kohäsiven Enden wurde 1 Weiss-Unit an T4 Ligase eingesetzt. Die Ligationstemperatur beträgt 16°C und die Ligation erfolgte über Nacht (alternativ bei 22°C für 1h). Der Ligationsansatz enthält 2 μ l 10-fach Puffer, Vektor, Insert und 1 μ l T4-Ligase. Der Rest des Volumens wurde mit autoklaviertem Aqua_{bidest} aufgefüllt.

Will man in einen Vektor eine kurze DNA-Sequenz integrieren, um z.B. Restriktionsschnittstellen einzufügen, kann ein Adapter hergestellt werden, indem zwei Oligonukleotide konstruiert werden, die diese Schnittstellen beinhalten und zu sich selbst komplementär sind. Diese werden dann zusammen hybridisiert und anschließend durch eine Ligation in den gewünschten Vektor integriert. Zunächst mussten die Oligonukleotide durch eine Kinase phosphoryliert werden, um eine spätere Ligation durchführen zu können. Der Reaktionsansatz stellte sich für jedes Oligonukleotid wie folgt dar: 2µl des Oligonukleotides (1pmol/µl), 1µl 10x Forward Reaction Buffer (MBI Fermentas), 1µl ATP (10mM), 1µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl; MBI Fermentas) und 4µl H₂O_{bidest.} Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt, anschließend wurden beide phosphorylierten Oligonukleotide vermischt. Danach wurde die Suspension in einem Wasserbad oder Thermoschüttler auf 95°C erhitzt und die Kinase durch eine 15-minütige Inkubation bei dieser Temperatur deaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz langsam auf RT abgekühlt, wodurch die beiden komplementären Nukleinsäuren spezifisch hybridisierten und ein doppelsträngiger Adapter entstand. Danach konnte der Adapter mit einem entsprechend geöffneten und dephosphorylierten Vektor ligiert werden (70ng Vektor und 1,5µl der Oligohybridisierungsreaktion).

3.2.15 Aufreinigung und Ankonzentrierung von DNA

Um die bei einer Restriktionsspaltung oder Ligation eingesetzten Salze und Proteine aus dem Ansatz zu entfernen, wird eine Ethanol-Fällung angewendet. Zu 100µl DNA-Suspension wurden 1/10 Volumen (10µl) 3M Natriumacetat pH 5,2, und 2,5 Volumen (275µl) 100% Ethanol -20°C gegeben. Falls die DNA in einem geringeren Volumen als 100µl vorlag, wurde der Ansatz mit H₂O_{bidest} auf 100µl aufgefüllt. Die Lösung wurde mehrmals invertiert und über Nacht bei -20°C, inkubiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 13000rpm (RT) wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und für 10-15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet luftgetrocknet und anschließend in einem angemessenem Volumen H₂O_{bidest} (autoklaviert) resuspendiert.

Falls die DNA-Konzentration der Ausgangssuspension gering ist (<250ng/ μ l), so besteht die Möglichkeit anfangs einen *Carrier* wie etwa t-RNA oder Glykogen hinzuzugeben, um die Effizienz der Präzipitation zu erhöhen.

3.2.16 Transfer von DNA auf Membranen (Southern-Blot)

Für den Transfer wurden verschiedene Membranen, z.B. von Pall, Millipore oder Schleicher und Schuell, mit Porengrößen von 0,45 μ m verwendet. Hierzu wurden die DNA-Fragmente im Gel durch Inkubation mit 0,25N HCl für 20 Minuten partiell depuriniert. Die so generierten Strangbrüche sollten den Transfer auf die Membran erleichtern. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gespült, um die restliche Säure zu entfernen. Die Denaturierung wurde mit 0,5N NaOH und 1,5M NaCl für 30 Minuten durchgeführt.

Für den Blot-Aufbau wurde eine Schale zur Hälfte mit 20x SSC (3M NaCl; 0,3M Na-Citrat; pH 7,0) gefüllt und eine Glasplatte quer darüber gelegt. Eine Flüssigkeitsbrücke wurde erzeugt, indem man 3MM-Whatman Papier über die Glasplatte legte und die überstehenden Enden in die SSC Lösung eintauchen ließ. Das Gel wurde umgekehrt auf die Flüssigkeitsbrücke positioniert. Ein zurechtgeschnittenes passendes Stück Membran und drei weitere Lagen Whatman Papier wurden luftblasenfrei darüber gelegt. Anschließend wurde ein Stapel saugfähiges Papier (mindestens 10cm) aufgelegt. Eine kleine Glasplatte und ein mindestens 300g schweres Gewicht komplettierten den Aufbau. Zusätzlich wurde zwischen dem unteren Whatman Papier und den saugfähigen oberen Papieren an überstehenden Enden Parafilm gelegt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Die Membran wurde für 60 Minuten im 80°C Schrank getrocknet und die DNA somit fixiert. Zusätzlich wurde eine UV-Fixierung (0,8J/cm²) durchgeführt. Die Membran wurde anschließend trocken bis zur Verwendung gelagert.

3.2.17 Herstellung von radioaktiven Sonden (Random Priming)

Die verwendeten zu markierenden DNA-Sonden wurden entweder durch eine PCR-Reaktion oder durch Restriktionsspaltungen und Gelaufreinigung von klonierten Fragmenten hergestellt und anschließend mit dem PCR Purification Kit (Macherey&Nagel) aufgereinigt und mit dem *Prime-It[®] RmT Random Primer Labeling Kit* (Stratagene) oder mit Klenow-Polymerase (MBI Fermentas) markiert. Beide Labeling-Reaktionen sind sehr ähnlich. Beim Stratagene Kit wurden die

mitgelieferten Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert, um den Inhalt am Boden des Gefäßes zu konzentrieren (Microspheres mit random Primer (Nonamere), Nukleotide, Puffer und Kofaktoren). Ungefähr 50ng Aufgereinigtes PCR Produkt wurden zugegeben und das Volumen mit Aqua_{dest} auf 42µl aufgefüllt. Um die DNA zu denaturieren, wurde diese für 5 Minuten im kochenden Wasser erhitzt und das Reaktionsgefäß kurz anzentrifugiert. Bei Raumtemperatur wurden 5µl des Radionukleotids ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ mit 3000Ci/mmol; Amersham) zugegeben. Mit der Pipette wurde die Probe gut durchmischt. Anschließend wurden 3µl der Magenta DNA Polymerase (4U/µl) in den Ansatz gegeben und wieder mit der Pipette durchmischt. Nach Inkubation in einem Wasserbad bei 37°C für 10 Minuten und Zugabe von 2µl Stop-Solution ist die Labeling-Reaktion abgeschlossen. Bei der Markierung mit Klenow-Polymerase wurden zunächst 25ng der Sonde mit H₂O_{bidest} auf ein Gesamtvolumen von 9µl aufgefüllt, 10 Minuten gekocht und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden dann 2µl Hexanukleotide in 10x Reaktionspuffer (Roche), 1µl Klenow-Enzym (MBI Fermentas), 5µl $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3000Ci/mmol) und 3µl einer ATG-Lösung (je Nukleotid 0,5mM; MBI Fermentas) zugegeben. Nachdem der Ansatz gut gemischt und kurz anzentrifugiert worden war, erfolgte die Labeling-Reaktion für 30-40 Minuten bei 37°C.

Um die nicht eingebauten Nukleotide aus dem Ansatz zu entfernen, wurden die ProbeQuantTM G-50 Micro Columns (Amersham) verwendet. Diese wurden kurz gevortext und für eine Minute bei 735g (2500rpm) zentrifugiert, um die Equilibrierungslösung aus der Säule zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß gestellt und die Labeling Reaktion tropfenweise auf die Säule gegeben. Eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 735g konzentrierte die markierte Sonde am Boden des Eppendorfgefäßes, die nicht eingebauten Nukleotide wurden in der Säule zurückgehalten. Um Einzelstränge zu erhalten, wurde die so aufgereinigte Sonde für 5 Minuten aufgekocht, kurz anzentrifugiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

3.2.18 Hybridisierung und Detektion von Southern Blots

Die zu hybridisierenden Blots wurden in eine Hybridisierungsröhre passender Größe überführt. Vorgewärmter (60°C) Hybridisierungspuffer PerfecthybTM Plus (Sigma-Aldrich) wurde in die Röhre gegeben (0,125ml/cm²). Um unspezifische Bindungen abzusättigen wurde denaturierte Heringssperma-DNA, in einer Endkonzentration

von 100µg/ml zugegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 30 Minuten bei 68°C wurde die frisch gelabelte Sonde in die Prehybridisierungslösung gegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass man nicht die Membran berührt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Um eine hohe Stringenz zu erreichen, wurde die Membran einmal für 20 Minuten in *Low Stringency*-Puffer (2x SSC, 0,1% SDS) und einmal in *Ultra-high Stringency*-Puffer (0,1x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Die gewaschenen Blots wurden nun in Haushaltsfolie verpackt und mit einem *storage phosphor screen* (Kodak) in einer Expositionskassette für mindestens 3 Stunden inkubiert. Der Screen speichert die Energie der β -Strahlen der radioaktiv markierten Sonden lokal. Mit Hilfe des Gerätes Typhoon Phosphoimager (Amersham) wird diese gespeicherte Energie durch eine Laser-induzierte Stimulation visualisiert und quantifizierbar dokumentiert. Der Screen konnte danach durch Lichtbestrahlung mit dem Gerät Screen-Erazer (Amersham) rekonstituiert werden.

3.3 RNA-Methoden

3.3.1 RNA-Isolierung (total-RNA Präparation)

Alle in diesem Protokoll genannten Mengenangaben beziehen sich auf eine Gewebemenge von 100mg oder $1 \cdot 10^7$ Zellen, und somit müssen alle Volumenangaben an die vorhandenen Gewebemengen angepasst werden. Gewebe oder Zellen wurden nach der Isolierung sofort in flüssigem Stickstoff gefroren, um den Degradationsprozess durch RNasen zu minimieren. Bei der Durchführung des Protokolls wurde stets darauf geachtet, Kontaminationen mit RNase zu vermeiden, d.h. es wurden z.B. RNase-freie Lösungen und Plastikwaren eingesetzt.

Pro 100mg gefrorenen Gewebes wurde 1ml Denaturierungslösung (4M Guanidinium-Thiocyanat; 25mM Na-Citrat pH7.0; 0,5% Na-Sarcosyl (v/v); 0,1M β -Mercaptoethanol) zugegeben, und anschließend wurde das Gewebe mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Danach wurden 1ml Phenol, 0,2ml CHCl_3 /Isoamylalkohol (49:1) und 0,1ml 2M Na-Acetat pH4.0 zugegeben und gründlich geschüttelt. Bei 10000g wurde 20min in der Sorvall RC5b Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Greinerröhrchen gegeben. Um die RNA zu fällen, wurde ein Volumen Isopropanol (oder 3 Volumen Ethanol) hinzugegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die RNA wurde 15min bei 10000g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0,3ml Denaturierungslösung

aufgenommen, in ein Eppendorfgefäße überführt und durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol (alternativ 3 Volumen Ethanol) für 1 Stunde bei -80°C gefällt. Bei 4°C wurde die RNA für 15min in der Eppendorfszentrifuge (13000rpm) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 0,5ml 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, um β -Mercaptoethanol-Rückstände zu beseitigen. Nun wurde zum Auswaschen von Salzen noch einmal 0,5ml 70 % Ethanol zugegeben, 15min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Nachdem der Überstand vollständig abgesaugt worden war, wurde das Sediment luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 100 μl DEPC- H_2O (0,1% DEPC in H_2O , über Nacht (ü/N) inkubieren und zweimal autoklavieren) aufgenommen und für 10min bei 65°C im Thermoschüttler resuspendiert. Sollte die RNA für eine miRNA-microArray Hybridisierung bei der Firma Miltenyi eingesetzt werden, wurde die Qualität der RNA im Gerät 2100Bioanalyzer der Firma Agilent ermittelt.

3.3.2 Transfer von RNA auf Membranen (Northern Blot)

Für den Nachweis der Expression von miRNAs in Zellen oder Geweben wurden die RNA-Proben zunächst in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Für ein Gel mit den Abmessungen 12cmx15cmx0,8mm benötigt man ca. 20ml denaturierende PAA-Lösung, die man mit 20 μl TEMED und 200 μl 10%APS für die Polymerisation versetzt und schüttelt, und anschließt damit das Gel gießt. Nach einstündiger Auspolymerisation ließ man das Gel für 30 Minuten in 1xTBE bei 19mA vorlaufen. Vor dem Beladen des Gels wurden die Probentaschen sehr gut ausgespült. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Fällern oder Eindampfen von ca. 30 μg RNA-Probe, die anschließend in 20 μl RNA-Probenpuffer für 10 Minuten unter schütteln resuspendiert wurde. Anschließend wurden die Sekundärstrukturen durch Inkubation bei zunächst 10 Minuten bei 65°C und anschließend für 5 Minuten auf Eis aufgebrochen. Nach dem Beladen des Gels, ließ man die Proben für ca. 10 Minuten bei 10mA in das Gel einlaufen. Die Auftrennung erfolgte für ca 2,5 Stunden bei 20mA. Um die Qualität der RNA und des Gellaufs beurteilen zu können, wurde das Gel anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und analysiert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) erfolgte nach dem Semy-Dry-Elektroblot-Verfahren. Hierzu wurden Whatmanpapier und Nylonmembran auf die Gelgröße zurechtgeschnitten, durch TBE befeuchtet und anschließend wie folgt gestapelt, wobei die Reihenfolge von Anode zu Kathode beschrieben wird; 3 Lagen

Whatmanpapier, Nylonmembran, Gel, 3 Lagen Whatmanpapier. Der Transfer erfolgte für 35 Minuten bei einer Stromstärke von 3,3 mA pro cm² Membran und die Fixierung bei 10mJ/cm² und für 30 Minuten bei 80°C.

PAA-Lösung für 60 ml	10xTBE	RNA-Probenpuffer
25,2g Harnstoff	0,09M TrisCl pH8.0	8M Harnstoff
22,5ml 2%Bis-, 38%Acrylamid	0,09M Borsäure	0,1% Bromphenolblau
6ml 10xTBE	2mM EDTA	0,1% XylenyanoI
10,5 ml H ₂ O		In TBE

aus Short Protocols in Molecular Biology

3.3.3 Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-Sonden am 5'Ende

Für die Detektion wurden DNA-Oligonukleotid-Sonden verwendet, ggf. auch LNA-Oligonukleotid-Sonden (*locked nucleic acid*) der Firma Exiqon um eine höhere Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Die Markierung erfolgte über den Transfer des radioaktiv markierten γ -Phosphates der Substanz γ^{32} -ATP (Amersham) auf das 5'Ende des Oligonukleotids. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

5' Labeling

1 μ l Oligonukleotid (20pmoles/ μ l)
 5 μ l γ^{32} -ATP
 1 μ l T4 Polynukleotidkinase (MBI Fermentas)
 5 μ l 10x T4 *forward* Puffer
 38 μ l H₂O

Die Aufreinigung erfolgte wie in 3.2.17 beschrieben mit ProbeQuantTM G-50 oder G25 Micro Columns (Amersham).

3.3.4 Hybridisierung und Detektion von Northern Blots

Der Ablauf ähnelte dem der Hybridisierung von Southern-Blots sehr (3.2.18).

Die Nylonmembranen wurden zusammen mit 6ml vorgewärmten Hybridisierungspuffer PerfecthybTM Plus (Sigma-Aldrich) und denaturierter Heringssperma-DNA, in

Hybridisierungsröhren gegeben und für 30 Minuten bei 40°C prehybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde erfolgte die Hybridisierung über Nacht. Tags darauf wurden die Membranen zunächst mit 2xSSC 0,1%SDS (siehe 3.2.16) für 30 Sekunden, dann mit 2xSSC 0,1%SDS für 10 Minuten und zuletzt mit 1xSSC 0,1%SDS für 3 Minuten gewaschen, und anschließend wurde das Ergebnis wie in 3.2.18 beschrieben dokumentiert. Sollten die Membranen erneut für eine Hybridisierung einer anderen Sonde eingesetzt werden, so wurden sie so oft mit 90°C warmer 1%iger SDS-Lösung für 5 Minuten geschüttelt, bis der Szintillator keine Radioaktivität mehr auf den Membranen feststellen konnte. Anschließend wurden sie 3x für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1xSSC gewaschen und anschließend trocken gelagert.

3.3.5 Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

Bei der reversen Transkription (RT) stellt man mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) aus RNA copy-DNA (cDNA) her. Diese wurde in einer nachfolgenden PCR auf bestimmte Transkripte qualitativ untersucht oder durch qRT-PCR im Lightcycler (siehe) quantitativ betrachtet. Für die RT-Reaktion wurden verschiedene Reverse Transkriptasen verwendet. Neben der Transcriptor RT (Roche), der AMV RT (Invitrogen) fand das Omniscript RT Kit (Qiagen) häufig Verwendung. Die verschiedenen Reversen Transkriptasen unterscheiden sich in der Reaktionstemperatur. So kann man z.B. die Transcriptor RT bei 55°C inkubieren, was im Falle von sehr GC-reichen RNAs große Vorteile hat, da weniger Sekundärstrukturen die Reaktion behindern. Beispielhaft sei hier die Reaktion für die QIAGEN Omniscript RT angegeben. Für eine Reaktion nimmt man 2µg Gesamt-RNA in 10µl DEPC-H₂O und gibt 10µl des folgenden Mastermixes hinzu: 1µl RNasin, 1:4 verdünnt (Promega), 0,5µl polyT-Primer (0,5µg/µl), 2µl RT-Puffer, 2µl dNTPs (5µM), 1µl Omniscript RT, und 3,5µl DEPC-H₂O. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 60 bis 90 Minuten. Anschließend wurde eine Hitzedenaturierung der RT bei 95°C für 15 Minuten durchgeführt. Falls sehr lange Produkte erwünscht waren, wurde dieser Schritt übersprungen. Für qualitative Betrachtungen wurde in der Regel 1µl des RT-Reaktionsgemisches für eine nachfolgende PCR eingesetzt.

3.3.6 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe des LightCycler Systems (Roche) wurde eine Quantifizierung von Transkriptmengen in der online PCR von Transkriptmengen unter Verwendung des Farbstoffs SYBR Green I (QIAGEN) durchgeführt. Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und die Menge des PCR-Produktes konnte über die Fluoreszenzzunahme bei 521nm bestimmt werden. Hierzu wurde der Wendepunkt (crossing point) in der log-Phase der sigmoiden Fluoreszenzkurve jeder Probe bestimmt. Die ideale Produktgröße in der online PCR liegt zwischen 150 und 200bp. Beim Primerdesign ist, wenn möglich, auf dieses Kriterium geachtet worden. Die Ansätze wurden immer als Doppelbestimmung (Technisches Replikat) durchgeführt um Pipettierfehler und andere Schwankungen zu minimieren. Der verwendete Standard-Ansatz sah folgendermaßen aus: 20µl Sybr Green MasterMix, je 0,4µl Primer (50µmol/µl), 17,2µl H₂O und 2µl Template (Standard RT-Ansatz, siehe 3.3.5). Von diesen 40µl sind je 18,5µl in eine für den Lightcycler vorgesehene Glaskapillare (Roche) gegeben worden. Nach Zentrifugieren bei 1000g für 1 Minute wurde das Gerät beladen und gestartet. LightCycler PCRs wurden nach folgendem Standard-Programm durchgeführt. Während einer initialen Denaturierung von 95°C für 15 Minuten wurde die Polymerase aktiviert. Es schlossen sich bis zu 50 Zyklen mit 20 Sekunden und 94°C Denaturierung, 20 Sekunden 58°C Annealing und 15 Sekunden 72°C Elongation an. Im Anschluß an die letzte Elongationsphase führte das Gerät eine Schmelzkurvenanalyse durch, so dass Ergebnisse ohne Nebenprodukte identifiziert und ausgewertet werden konnten. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte gegenüber einem internen Standard, meist β-Aktin. Hiermit wurde die Transkriptmenge normalisiert. Es wurden generell Ansätze von drei biologischen mit je zwei technischen Replikaten gemessen. Zur Berechnung der normalisierten Transkriptmenge von Wildtyp und Mutante wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Gen A in Gewebe X}) - C_T (\text{Gen N in Gewebe X})$$

Die ΔC_T Werte (*certain threshold level*) wurden so aus den Messungen für β-actin (Gen N) und das zu untersuchende Gen (Gen A) ermittelt. Die drei Messwerte für den Wildtyp wurden gemittelt und genau wie die drei Wobblers-Messwerte nach folgender Formel in relative Transkriptmengen (X) umgerechnet: $X = 2^{-\Delta C_T}$

Die relativen Transkriptmengen der Mutante wurden anschließend durch die Werte des Wildtyps geteilt und so zueinander in Verhältnis gesetzt.

Für die Quantifizierung von miRNAs wurde das System der Firma Applied Biosystems verwendet. Hierbei erfolgt die reverse Transkription mit einem miRNA spezifischen Primer aus 1-100ng Gesamt-RNA. Der Reaktionsansatz wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt. Die *real time* Quantifizierung der PCR erfolgte nicht durch die Fluoreszenz-Messung eines interkalierenden Farbstoffs, sondern nach dem Taq-Man-Prinzip. Hierbei liegt in dem PCR-Ansatz eine miRNA-spezifische Sonde vor, welche am 3'Ende mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt ist. Ist die Sonde frei in Lösung, verhindert ein Quencher, der an das 5'Ende der Sonde gekoppelt ist, eine Anregung des Farbstoffs und somit die Fluoreszenz. Bindet die Sonde während der Amplifikation spezifisch an ihre Zielsequenz, so wird die Sonde nukleolytisch gespalten und somit der Farbstoff räumlich von dem Quencher getrennt. Das führt dazu, dass der Fluoreszenzfarbstoff zur detektierbaren Lichtemission angeregt werden kann.

3.3.7 5'RACE

3.3.7.1 5'RACE mit Hilfe des Systems von Roche

Die Methode der 5'-RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) wurde zur Bestimmung der miRNA vermittelten Spaltstelle im Vimentingen, unter Verwendung des 5'/3'RACE Kit, 2nd Generation TM der Firma Roche Diagnostics, verwendet.

Die isolierte Gesamt-RNA wurde, unter Zuhilfenahme eines genspezifischen Primers (Sp1), direkt in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Nach dem Verdau der RNA wurde mittels terminaler Transferase ein poly-A-Schwanz an das 3'-Ende der neu synthetisierten cDNA synthetisiert. Diese poly-A-cDNA wurde mittels PCR amplifiziert. Dafür wurde zum Einen ein poly-dT-anchor-Primer und zum Anderen ein genspezifischer Primer (Sp2) verwendet. Das resultierende PCR-Produkt wurde in den Vektor pJet1 kloniert und anschließend zur Bestimmung der Spaltposition sequenziert.

Die Durchführung erfolgte exakt wie im mitgeliefertem Handbuch beschrieben.

3.3.7.2 5'RACE mit Hilfe einer Adapterligation

Eine Alternative zu dem 5'RACE-System der Firma Roche ist die Ligation eines Adapters an endständige 5'Phosphate eines RNA-Fragments. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert.

Reaktionsansatz für die RNA-Adapterligation

10µg Gesamt-RNA
2,0 µl RNA-Adapter (300ng/µl)
2,0 µl T4-RNA_Ligase (New England Biolabs)
2,0 µl T4-RNA_Ligase-Puffer
0,5 µl RNase-Inhibitor (MBI-Fermentas)
x µl RNase-freies H ₂ O für ein Gesamtvolumen von 20 µl

Für die Ligation wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription (siehe 3.3.5) mit 9,5µl des Reaktionsansatzes und einem genspezifischen Primer. Anschließend wurde eine leicht angewandelte Standard-PCR mit dem genspezifischen Primer, dem 5'Adapter-Outer-Primer durchgeführt und 2µl der cDNA. Die Abwandlung bestand darin, dass die Annealing-Temperatur im erstens Amplifikationsschritt 70°C betrug und für 20 Zyklen jeweils um 0,5°C gesenkt wurde. Danach erfolgten weitere 10 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 60°C. In einer 2. PCR wurden 1µl der 1. PCR als Template sowie ein zweiter genspezifischer Primer und der 5'Adapter-Inner-Primer bei gleichem Amplifikationsprogramm eingesetzt. Anschließend wurden die PCR-Fragmente in den Vektor pJet1 kloniert (3.2.12) und sequenziert (IIT).

3.4 Zellkulturmethoden

Glasflaschen und Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert. Gestopfte Glas-Pipetten wurden im Sterilisator für 4 Stunden bei 160°C hitzsterilisiert. Zellkulturschalen, Kryoröhrchen und andere Plastikware sowie Pipettenspitzen von den Firmen Nunc, BDFalcon und Omnilab wurden als sterile Einmalplastikware verwendet. Alle Medienzusätze (FCS, nichtessentielle Aminosäuren, Glutamin, Trypsin/EDTA) wurden als sterile Flüssigprodukte vom Hersteller PAA bezogen. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Reinraumwerkbank „SterilGARD“ (The Baker Company) durchgeführt.

3.4.1 Kultivierung von Zellen

HeLa-S3- und N2a-Zellen wurden im Wachstumsmedium (siehe 3.1.6.2) bei 37°C und 7,5% CO₂-Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Zellen dicht bewachsener Zellkulturschalen wurden durch Trypsinbehandlung vom Untergrund gelöst und in angemessener Zelldichte in neue Kulturgefäße überführt.

Nach Abwaschen von trypsinhemmenden Serumrückständen mit CMF-PBS wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (PAA) 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Beim Ablösen vom Untergrund runden sich die Zellen ab. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von ca. 7ml vorgewärmten Wachstumsmedium gestoppt. Je nach gewünschter Zelldichte wurde ein Teil der Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt und mit Wachstumsmedium versorgt. Das Auszählen der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ermöglicht das Aussähen einer definierten Zellzahl.

3.4.2 Langzeit-Lagerung von Zellen

Zum Schutz vor Kontamination und genetischen Veränderungen werden Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren gelagert. Um osmotische Schäden und Eiskristallbildung gering zu halten, werden die Zellen in einem Einfriermedium mit DMSO langsam heruntergekühlt. Da DMSO zytotoxisch wirkt, muss zügig gearbeitet werden.

Trypsinierte Zellen wurden in Greiner-Röhrchen durch 5 Minuten Zentrifugation in der Hettich-Zentrifuge bei etwa 500g sedimentiert. Das Sediment wurde in 1ml Einfriermedium aus 40% DMEM, 50% FCS und 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen gefüllt. Dabei sollte die Zellzahl bei etwa 10⁶ Zellen pro Milliliter Einfriermedium liegen.

In einer mit Isopropanol umspülten Einfrierbox (Nalgene) wurden die Zellen gleichmäßig und langsam über Nacht auf -80°C heruntergekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in der Dampf- oder Flüssigphase eines Stickstofftanks.

Das Auftauen der Zellen wurde zügig im 37°C Wasserbad vorgenommen. Die Zellen wurden mit 9ml Wachstumsmedium in einem Greinerröhrchen aufgenommen und abzentrifugiert. Anschließend wurde das DMSO enthaltende Medium abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und in einer Kulturflasche ausgesät.

3.4.3 Transiente Transfektion

Für die Transfektionen wurde meist das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) verwendet. Die eingesetzten Mengen waren abhängig von dem Größenmaßstab der transfizierten Kultur und der Art der Transfektion (DNA oder RNA und RNA).

Tags zuvor wurden Zellen in Wachstumsmedium ohne Antibiotika ausgesät. Für eine Transfektion wurde Lipofectamine 2000 zunächst mit DMEM zusammengegeben und für eine Prekomplexierung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zu mit DMEM verdünnten DNA/RNA-Suspensionen gegeben und für die Ausbildung des DNA/Lipid-Komplexes 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend gab man die DNA/Lipid-Komplex zu den Zellen. Je nach Experiment wurden die Zellen 1,5 bis 5 Tage kultiviert und anschließend analysiert. Erfolgte die Kultivierung nach einer Transfektion für mehr als 2 Tage, wurde das Medium alle 2 Tage gewechselt. Nachfolgend sind die eingesetzten Mengen für verschiedene Experimente und Kultivierungsmaßstäbe tabellarisch aufgelistet.

Zellen/ Format	Zelldichte bei Transfektion und Kultivierungs- volumen	Lipofectamine 2000 in μ l	Verdünnungs- volumen Lipofectamine 2000 in μ l	Nukleinsäuren in ng Normalisierungs-/ Testvektor/ RNA	Verdünnungs- volumen Nukleinsäuren in μ l
N2a/ 6-Well	70-90% 2 ml	5	250	200/200/2600	250
N2a/ 24-Well	70-90% 2 ml	2	50	5/50/650	50
HeLa-S3/ 6Well	80-95% 2 ml	2,5	250	200/200/2600	250
HeLa-S3/ 24Well	80-95% 2 ml	1	50	5/50/650	50
Transfektion von miRNAs					
N2a/ 6-Well	30-50%	5	alternativ 250 auch Oligofectamine	2600	250
HeLa-S3/ 6Well	50-80%	2,5	alternativ 250 auch Oligofectamine	2600	250

3.4.4 Erzeugung einer Zelllinie mit stabiler Integrationen des Gens EGFP

N2a Zellen wurden im 6-Well-Format wie in 3.4.3 mit 5µg des Vektors pEGFP-N3 (*enhanced green fluorescent protein*) Vektor transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, 1:20 verdünnt und auf 100mm Schalen ausgesät. Zudem wurde dem Wachstumsmedium der Selektionsmarker G418 (400µg/ml) zugegeben. Nach 3 Tagen wurden die Zellen erneut gesplittet, verdünnt und mit Selektionsmedium inkubiert. Nach weiteren 2 Tagen wurden einige Zellen eines Klons mechanisch mit einer Pipettenspitze isoliert und in einem 24er-Well trypsinisiert und mit Selektionsmedium inkubiert. Die Selektionsdauer betrug weitere 10 Tage, wobei positive Klone je nach Zelldichte alle 2-4 Tage gesplittet wurden; Wachstumsmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Nach 10 Tagen wurden Zelllinien auf die Expression von EGFP fluoreszenzmikroskopisch analysiert, und besonders stark exprimierende Linien wurden in einer Zellkulturflasche mit Selektionsmedium expandiert. Anschließend konnten die Zelllinien für Versuche eingesetzt, oder wie in 3.4.2 beschrieben gelagert werden.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Proteinisolierung

Die Proteinisolierung transfizierter Zellen erfolgte 72 und 120 Stunden nach der Transfektion. Für die Lyse der Zellen wurden 150µl RIPA-Lysispuffer zu den Zellen gegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst, durch Auf- und Abpipettieren durch eine 0,2 mm Kanüle homogenisiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10000g wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und entweder direkt für Folgeversuche eingesetzt, oder bei -80°C gelagert.

RIPA-Lysispuffer

5mM EDTA

5mM 1,10-Phenanthrolin

1× Proteinaseinhibitor (Complete™ EDTA-free, Roche)

in RIPA-Puffer (1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, in PBS)

3.5.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) durchgeführt. Hierbei bilden die Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex, so dass man eine photometrische Messung gegen Eichlösungen durchführen kann.

Hierzu wurden 25 μl der zu messenden Proteinlösung mit 500 μl Testlösung (BCA Reagenz A zu BCA Reagenz B wie 50:1) gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend ließ man die Lösungen auf Raumtemperatur abkühlen und es folgte die photometrische Messung im BioPhotometer bei 562nm (Eppendorf).

3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molekülmasse wird die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit einem von U.K. Laemmli (1970) entwickelten, SDS-haltigen, diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt. Die Proben werden mit dem anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) behandelt, wodurch ein Protein-SDS-Komplex mit konstanter negativer Nettoladung pro Masseneinheit entsteht. Somit ist eine Auftrennung der Proteine im porösen Polyacrylamidgel bei angelegtem elektrischem Feld möglich. Für eine gute Auflösung wird das Trenngel mit einem weitporigen Sammelgel überschichtet, an deren Grenzschicht die Proteine aufgestaut werden und somit eine Zonenschärfung erfahren.

Das Trenngel wurde unmittelbar nach Mischen der Komponenten zwischen zwei durch 0,8mm dicke Abstandhalter getrennte Glasplatten eines Gelsystems der Firma Peqlab (Erlangen) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach minimal einstündiger Auspolymerisation bei Raumtemperatur (besser: über Nacht bei 4°C) wurde die Geloberfläche mit SDS-Laufpuffer gewaschen und anschließend das Sammelgel darüber gegossen. In das Sammelgel wurde ein Kamm zur Ausbildung von Geltaschen für die Probenauftragung gesteckt. Nach der Polymerisationszeit von etwa 45min wurde die Gelkammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt, der Kamm vorsichtig herausgezogen und die Taschen mit Puffer ausgewaschen. Nun konnten die Proben, die mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt wurden, mit einer Hamilton-Pipette in die Taschen geladen werden. Zusätzlich wurde der Proteingrößenmarker Mark12 (Invitrogen) aufgetragen.

	Trenngel 7,5%	Sammelgel 3,75%
Acrylamid-Mix mit 30% AA, 0,8% BisAA (Rotiphorese Gel 30, Roth)	675µl	3,75%
3M Tris, pH 8,8	500µl	250µl
1M Tris, pH 6,8	-	-
H ₂ O _{bidest}	2,7ml	190µl
60% Saccharose	-	650µl
10% SDS	40µl	375µl
10% APS	40µl	15µl
TEMED	4µl	15µl

Die Proteinproben liefen nach der Beladung der Gele bei einer konstanten Stromstärke von 12,5-15mA pro Gel für ca. 2 Stunden.

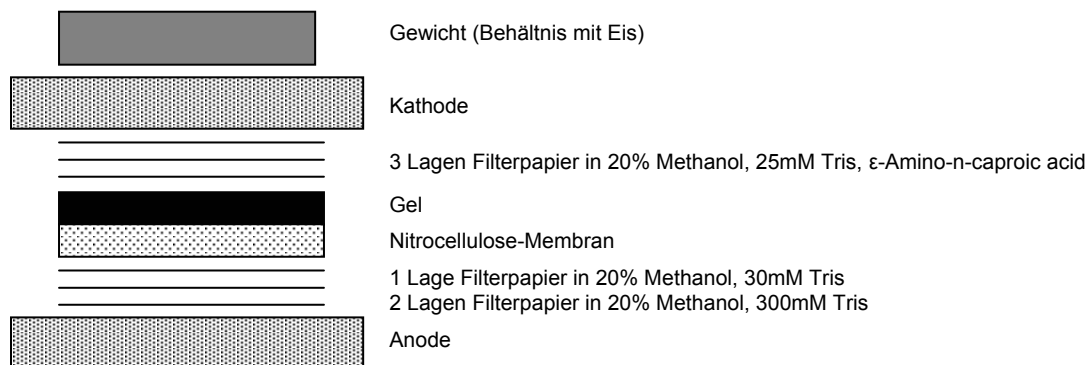
10x SDS-Laufpuffer	5x SDS-Probenpuffer
2,5M Glycin	250mM Tris, pH6,8
250mM Tris-Base	10% (w/v) SDS
1% (w/v) SDS	50% Glycerol
	0,05% Bromphenolblau
	100mM β-Mercaptoethanol

3.5.4 Coomassie-Färbung

Nach der Auftrennung im SDS-PAGE können die Proteine im Gel durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Um eine hoch-sensitive Färbung zu erzielen, wurde die Coomassie-Färbelösung PageBlue (Fermentas) verwendet. Vor der Färbung wurden die Proteine zunächst durch eine Fixierlösung (25% 2-Propanol, 10% Essigsäure in H₂O) im Gel fixiert. Danach wurde das Gel dreimal für 10 Minuten in H₂O_{bidest} gewaschen. Die Färbung mit 20ml PageBlue erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur bei leichtem Schütteln. Abschließend wurde das Gel noch einmal mit H₂O_{bidest} gewaschen.

3.5.5 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrisch durch einen Semidry-Elektroblot bei einer Stromstärke von 135mA pro Gel für 1 Stunde auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran BA85, Porengröße 0,45µm; Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Zur Kontrolle des Elektroblots und zur Markierung der Markerbanden wurden die Membranen reversibel mit Ponceau-Rot (Sigma-Aldrich) gefärbt, anschließend mit 1x TBS (0,137M NaCl, 10mM Tris, pH7,3) entfärbt.



Aufbau eines Semidry-Elektroblots

3.5.6 Immundetektion

Zunächst wurden freie Proteinbindungsstellen der Nitrocellulose-Membran abgesättigt. Dieses Blocken erfolgte mit 5% Magermilchpulver oder 3% BSA in TTBS-Waschpuffer (TBS, 0,1% Tween20) bei 4°C über Nacht (alternativ: 1h bei RT). Anschließend wurde die Membran mit einer Verdünnung des Primärantikörpers in 5% Magermilchpulver oder 0,5% BSA in TTBS bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 10min mit TTBS gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Nun wurde eine Stunde mit einer Verdünnung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Entwicklung des Immunblots mit dem ECL-System Lumi-Glo (Roche). Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase oxidiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol, dabei wird Licht emittiert. Dabei konnten ECL-Filme (HyperfilmECL, Amersham) je nach Intensität der Reaktion 30 Sekunden bis 24 Stunden belichtet werden. Die Entwicklung und Fixierung der Filme erfolgte mit Kodak x-ray Developer LX 24 und Kodak x-ray Fixer AL4 (Eastman Kodak).

3.5.7 Immunblot-Stripping

Um eine Membran mit einem weiteren Primärantikörper inkubieren zu können, müssen zuvor gebundene Antikörper abgewaschen werden. Dazu wurde die Membran eine Stunde bei 37°C in Stripping-Lösung (2% SDS in PBS) inkubiert. Anschließend musste sie erneut abgesättigt werden und konnte dann mit einem anderen Primärantikörper untersucht werden.

3.6 Präparation von Mausgeweben für *in situ* Hybridisierungen

Für *in situ* Hybridisierungen und immunhistochemische Experimente wurde aus Wobbler-Tieren und Wildtyptieren das cervikale und thoracale Rückenmark präpariert. Anschließend wurde das Gewebe zur Fixierung in 10ml 4%iger Paraformaldehyd-Lösung, gelöst in PBS, für 30 Minuten bei 4°C geschwenkt. Danach wurde das Gewebe 3-mal mit PBS gewaschen und über Nacht in 30%iger Succrose-Lösung bei 4°C geschwenkt. Die Gewebe wurden anschließend in ca. 1cm lange Stücke geschnitten und in OCT-compound eingebettet. Die so fixierten Gewebe wurden entweder bei -80°C gelagert oder auf Trockeneis an unseren Kooperationspartner verschickt.

3.7 Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System

Für die Validierung von miRNA-Zielgen-Interaktionen wurde das Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System der Firma Promega verwendet. Das Prinzip des Systems ist der Vergleich von Luziferaseaktivitäten zwischen Zellkulturen, die mit unterschiedlichen Komponenten transfiziert wurden. Der Vektor für die Luziferase aus dem Organismus *Renilla reformis* wurde dahingehend verändert, dass er die Zielsequenz für eine bestimmte miRNA enthielt. Dieser wurde zusammen mit dem Vektor der die Luziferase aus dem Organismus *Photinus pyralis* (*Firefly-Luziferase*) trägt (dient der Bestimmung der Transfektionseffizienz dient), und der miRNA-Duplex cotransfiziert, die als Interaktionspartner für die klonierte Zielsequenz vorhergesagt wurde. Dieser Ansatz sollte mit einer Transfektion verglichen werden, die ebenso die beiden Vektoren enthielt, jedoch anstatt der miRNA-Duplex eine mock-Kontrolle. Die Transfektionen wurden im 24-Well-Maßstab durchgeführt (siehe 3.4.3). Die Ernte

erfolgte 36 Stunden nach der Transfektion, indem die Zellen 2x mit PBS gewaschen wurden und anschließend mit 150µl passivem Lysispuffer aus dem System 15 Minuten bei RT geschüttelt wurden. Der Ansatz wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert und erneut für 15 Minuten bei RT geschüttelt. Die Proben wurden anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und der Zelldebris durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 100000g sedimentiert. Die Messung der *Firefly*-Luziferase-Aktivität erfolgte, indem man zu 10µl der Proteinsuspension 50µl LARII Lösung gab und die *relative light units* (RLUs) im Luminometer MiniLumat LB 9506 (Berthold) mit einer Messdauer von 10 Sekunden bestimmte. Anschließend gab man zu diesem Ansatz 50µl Stop&Glo-Lösung und ermittelte die RLUs, und somit die Aktivität der Renilla-Luziferase, ebenso mit einer Messdauer von 10 Sekunden. Diese Werte wurden ins Verhältnis gesetzt und konnten somit mit der mock-Transfektion verglichen werden.

4 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein Reporter-Assay zur systematischen Validierung von miRNA-Zielgen-Interaktionen etabliert und weiter entwickelt. Anschließend wurden durch das Programm RNAhybrid (Rehmsmeier *et. al* 2004) vorhergesagte miRNA-Zielgen-Interaktionen unterschiedlicher Vorhersage-Kategorien validiert. Anhand der gewonnen Erkenntnisse, durch Analyse der Rohdaten und stetiger interdisziplinärer Diskussion mit dem Entwickler Dr. Marc Rehmsmeier (Universität Bielefeld) wurde ein entscheidender Beitrag zur Verbesserung des Programms geleistet.

Anschließend wurde die Interaktion zwischen der miR-17-3p und dem Zielgen Vimentin genauer untersucht. Gleichzeitig wurde die Bedeutung der verstärkten Expression von Vimentin bei Wobbler-Tieren im Hinblick auf den Phänotyp analysiert.

Weiterhin wurde ein vergleichendes miRNA-Expressionsprofil erstellt, um neue Hinweise für die Ursache der Motoneurondegeneration bei Wobbler-Tieren zu erhalten.

4.1 Vorhersage von miRNA-Zielgen-Interaktionen

Anfangs beschäftigte ich mich mit der Auswertung und Analyse einer bereits durchgeführten Vorhersage. Hierbei sind mir einige Nachteile des Programms aufgefallen, die anschließend mit Dr. Marc Rehmsmeier diskutiert und geändert wurden. Da das Programm nicht von mir entwickelt wurde, soll in dieser Arbeit darauf verzichtet werden, den Algorithmus detailliert zu erörtern. Das Ablaufschema einer miRNA-Zielgen-Vorhersage ist in Abbildung 2-5 beschrieben. Im Folgenden werde ich durch mich offenkundig gemachte Nachteile und die dadurch angeregten Änderungen beschreiben.

4.1.1 Sequenzdaten-Beschaffung

Die verwendeten miRNA-Sequenzen wurden der Rfam-Datenbank entnommen. In dieser Datenbank sind publizierte miRNAs abgelegt, die bestimmte Kriterien wie z.B. den experimentellen Nachweis durch ein Northern-Blot-Experiment oder die Klonierung einer miRNA (Ambros *et al.* 2003) erfüllen. Es kann vorkommen, dass eine miRNA aus einem Mausgewebe kloniert worden ist, welche im menschlichen Organismus noch nicht analysiert wurde. Durch die fortwährenden Bemühungen,

möglichst alle miRNAs zu identifizieren, werden diese Unregelmäßigkeiten zwar geringer, stellen aber immer noch ein Problem dar, da z.B. in der aktuellen Rfam-Datenbank (Version 9.2) 475 miRNAs für den Menschen nachgewiesen sind, für die Maus jedoch nur 377 und für die Ratte nur 234.

Fehlt eine bestimmte miRNA z.B. im miRNA-Datenset der Maus, kann in der Maus-Vorhersage nicht das gleiche miRNA-Zielgen wie im Menschen vorhergesagt werden, dies führt bei dem Orthologie-Vergleich zu einer negativen Bewertung. Damit für die Vorhersagen der Zielgene in Mensch, Maus und Ratte ein homogenes miRNA-Set vorliegt, wurden die einzelnen miRNA-Datensets von uns miteinander abgeglichen. Ein weiterer Grund für das Abgleichen der miRNA-Sequenzen waren auftretende Punktmutationen. Diese konnten dazu führen, dass die automatisierten Annotationen in diesen Fällen zu unterschiedlichen miRNAs führen. Ein Beispiel hierfür ist die murine miRNA-322. Bei dieser miRNA liegt eine Punktmutation vor, so dass diese miRNA ursprünglich als neue miRNA (miR-424) annotiert wurde.

```
>hsa-miR-424 CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA
```

```
>mmu-miR-322 CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGGA
```

Diese falsche Annotation führt dazu, dass die automatisierte Suche nach orthologen Zielgenen der miR-322 im Menschen fehlschlägt, da kein Vergleich mit den Zielgenen einer hsa-miR-322 möglich ist. Mittlerweile wurden auch diese Probleme in der Rfam-Datenbank weitestgehend manuell beseitigt, so ist diese miRNA in der Maus mittlerweile als miR-424 deklariert.

Die 3'UTR-Sequenzen wurden aus der Ensembl-Datenbank gewonnen. Aus dieser können annotierte 3'UTR Sequenzen aller Gene direkt extrahiert werden. Jedoch sind bisweilen nicht für alle Gene 3'UTR Sequenzen annotiert. In solchen Fällen wurde von uns anfangs eine Sequenz von 2kb stromabwärts des Stopp-Codons als 3'UTR dieses Gens festgelegt. Dieses führte in einigen Fällen dazu, dass repetitive Sequenzen extrahiert wurden, die energetisch günstige Hybridisierungsstellen für miRNAs beinhalteten und somit durch die Poisson-Statistik sehr gute Bewertungen erhielten. Diese offensichtlichen Fehler konnten beseitigt werden, indem nicht per se eine Sequenz von 2kb stromabwärts des Stopp-Codons eines Gens extrahiert wurde, sondern nur bis zum Auftreten des ersten Polyadenylierungssignals (AATAAA oder ATTAAA).

4.1.2 Festlegen der Suchparameter

Die Fragestellung nach hinreichenden Anforderungen für miRNA Zielsequenzen wurde in vielen Arbeitsgruppen weltweit bearbeitet, ohne dass ein Konsens für die minimalen Anforderungen gefunden wurde. Es konnte häufig gezeigt werden, dass der so genannte *seed* ein wichtiges Merkmal ist (Lai 2002; Lewis *et al.* 2003; Stark *et al.* 2003). Hierbei müssen die Nukleotide 2-7, gezählt am 5'-Ende der miRNA, mit der Zielgenesequenz Basenpaarungen nach Watson-Crick bilden. Andere Studien zeigten, dass auch G:U-Basenpaarungen im *seed* zu einem inhibitorischen Effekt führen (Kirkiaridou *et al.* 2004; Brennecke *et al.* 2005). Außerdem konnte von der Arbeitsgruppe von Stephen Cohen gezeigt werden, dass das Fehlen eines *seed*s durch eine bessere Bindung im 3'-Bereich der miRNA kompensiert werden kann (Brennecke *et al.* 2005). Ausgehend von diesen Studien sollten mit dem Programm RNAhybrid drei separate Vorhersagen mit unterschiedlichen Strukturanforderungen durchgeführt werden:

- „klassische Vorhersage“: ein *seed* mit den Nukleotiden 2-7 vom 5'-Ende der miRNA wird verlangt und G:U-Basenpaarungen werden verboten. Da ein *seed* von vielen Arbeitsgruppen propagiert wird, ist diese Vorhersage nicht nur hilfreich, um neue Zielgene vorherzusagen, sondern macht die Analyse hinsichtlich der Spezifität gegenüber anderen Vorhersagemethoden vergleichbar.
- „G:U-zulassen“: ein *seed* wird verlangt und G:U-Basenpaarungen werden zugelassen.
- „freie Vorhersage“: es werden keine strukturellen Anforderungen gestellt.

4.1.3 Poisson-Statistik

Durch die Poisson-Statistik wird die statistische Signifikanz für die Beobachtung von mehreren Bindestellen für eine miRNA in einem 3'UTR ermittelt. Hierbei wird eine Poisson-Verteilung angenommen, die bei der Bewertung seltener Ereignisse angewendet werden kann. Am Ende dieser Bewertung werden alle vorhergesagten miRNA-Zielgen-Interaktionen verworfen, die nicht unter einem bestimmten Schwellenwert bleiben.

Die Wahrscheinlichkeit k Bindestellen zu finden kann durch die nachfolgende Formel ermittelt werden:

$$P[X = k] = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

Wobei λ die Wahrscheinlichkeit der Bindestelle mit der niedrigsten Signifikanz ist und k die Anzahl der Bindestellen. Hierbei fiel mir auf, dass bestimmte Konstellationen nicht optimal bewertet wurden, was zu einer geringeren Sensitivität führte. Dies soll im Folgenden an einem fiktiven Beispiel erläutert werden. Findet das Programm in dem 3'UTR eines Gens x drei Bindestellen mit den Einzelwahrscheinlichkeiten $p_1=10^{-6}$, $p_2=10^{-7}$ und $p_3=10^{-1}$, so wird $\lambda=10^{-1}$ und $k=3$ gesetzt und man erhält als Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieser drei Hybridisierungsstellen $P[x=3]=1,51 \cdot 10^{-4}$. Dieser Wert kann über dem geforderten Schwellenwert liegen und das Gen wird somit als miRNA-Ziel verworfen, obwohl es zwei sehr signifikante Hybridisierungsstellen beinhaltet. Mein Vorschlag war es, eine Signifikanz-Optimierung der Kombinationen vorzunehmen. In diesem Beispiel verwirft man die Hybridisierungsstelle mit p_3 und erhält $P[x=2]=5 \cdot 10^{-13}$. Danach verwirft man die Hybridisierungsstelle mit p_1 und erhält $P[x=1]=10^{-7}$. Anschließend verwendet man die Kombination mit der höchsten Signifikanz, in diesem Beispiel also $P[x=2]=5 \cdot 10^{-13}$. Um die Aussage treffen zu können, mit welcher Wahrscheinlichkeit man k oder mehrere solcher Hybridisierungsstellen findet, wird das oben erhaltene Ergebnis in folgender Formel verwendet:

$$P[X \geq k] = 1 - \sum_{i=0}^{k-1} P[X = i]$$

Zielgene, die unter einem bestimmten Schwellenwert bleiben, werden somit weiter analysiert.

4.1.4 Orthologie-Vergleich

Das Programm RNAhybrid bewertet das Auftreten von Zielsequenzen für eine miRNA in orthologen Genen positiv und berücksichtigt dabei den Grad der Homologie. So wird das Auftreten von vorhergesagten Zielsequenzen in orthologen 3'UTR-Sequenzen mit geringerer Homologie besser bewertet als in 3'UTR-Sequenzen mit hoher Homologie.

Für die spätere laborexperimentelle Validierung waren in erster Linie miRNA-Zielgen-Interaktionen von Interesse, die Zielsequenzen in mehreren Spezies haben, da man hier von einer konservierten und wichtigen Funktion der Interaktion ausgehen kann. Somit wurden nur Zielgene berücksichtigt, die Treffer in mindestens zwei der drei untersuchten Spezies (Mensch, Maus und Ratte) hatten.

4.2 Validierung von vorhergesagten miRNA-Zielgen-Interaktionen

4.2.1 Etablierung des Testsystems

Für den Nachweis der miRNA/Zielgen-Interaktion wurde das *Dual-Luciferase-Reporter-Testsystem* eingesetzt. Das Prinzip ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Man transfiziert eukaryontische Zellen mit einem Plasmid, das ein Luciferasegen von dem Organismus *Renilla reformis* trägt. Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, exprimieren transient das Gen. Anschließend werden die Zellen lysiert und man ist dann in der Lage, die Luciferaseaktivität mit Hilfe einer biochemischen Nachweismethode quantitativ zu messen, da die Umsetzung des Substrates durch diese Luciferase eine Chemilumineszenz bewirkt. Integriert man in den 3'UTR des Luciferasegens eine vorhergesagte miRNA-Zielsequenz und exprimieren die Zellen die entsprechende miRNA, so sollte es im Vergleich zum unmodifizierten Reportervektor (Leervektor) zu einer Verringerung der Luciferaseaktivität kommen. Da Transfektionen von Nukleinsäuren variabel verlaufen und von vielen Faktoren abhängig sind, werden die Zellen mit einem weiteren Reporter-Vektor cotransfiziert, der ein Luciferasegen aus dem Organismus *Phontinus pyralis* trägt. Diese Luciferase bewirkt ebenfalls eine Chemilumineszenz, benötigt dazu aber ein anderes Substrat. Zudem sind die Luciferasen bei unterschiedlichen pH-Werten aktiv, so dass zwischen beiden unterschieden werden kann. Durch die Cotransfektion der zweiten Luciferase, welche die Zielsequenz nicht enthält, hat man nun ein Maß für die Transfektionseffizienz. Wendet man das System wie bis hierher beschrieben an, so ist man von einer endogenen Expression der gewünschten miRNA abhängig. Um diese Abhängigkeit zu umgehen, wurde das Testsystem dahingehend verändert, dass man die RNA-Duplex der gewünschten miRNA zusammen mit den beiden Luciferasevektoren cotransfiziert. Bei dem Vergleichsexperiment wurde anstatt der miRNA-Duplex eine Kontroll-RNA-Duplex transfiziert.

Wie bereits angedeutet, hängt die Effizienz dieses Testsystems von vielen verschiedenen Faktoren ab: verwendete Zelllinie, Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion, Wachstumsdauer vom Zeitpunkt der Transfektion bis zur Bestimmung der Enzymaktivität, eingesetztes Transfektionsreagenz, Menge des Testvektors, des Kontrollvektors sowie der RNA und dem Verhältnis von Nukleinsäuren zu dem

Transfektionsreagenz. Für die Optimierung des Systems wurden publizierte Interaktionen verwendet (Kiriakidou *et al.* 2004, Lewis *et al.* 2003), wobei verschiedene Parameter im Rahmen des Optimierungsprozesses variiert wurden.

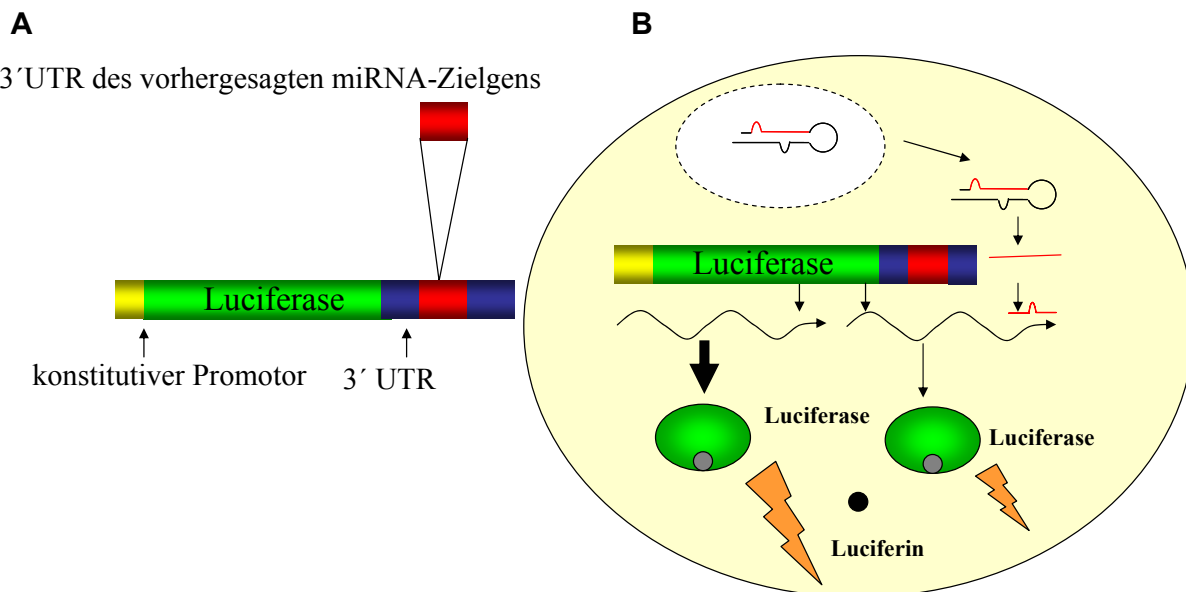


Abbildung 4-1 Schema für das Reporter-Experiment zur Zielgen-Validierung: A: Der 3'UTR des vorhergesagten miRNA-Zielgens wird in die 3'UTR des Luciferasegens kloniert. B: Nach der Transfektion in z.B. Neuro2a-Zellen wird das modifizierte Luciferasegen exprimiert. Die Expression der Luciferase kann quantitativ durch einen Aktivitätstest bestimmt werden und steht in Abhängigkeit zu einer Interaktion mit den miRNAs. Die Transfektionseffizienz wird durch die Normalisierung mit Aktivitäten einer zweiten Luciferase durchgeführt, die cotransfiziert wurde (nicht dargestellt)

Zur Kontrolle wurden Zellen mit der gleichen Konzentration einer RNA-Duplex transfiziert, die keine Bindestellen in der GFP-mRNA hat. Die transfizierten Kulturen wurden täglich im Hinblick auf ein GFP-Signal fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In Abbildung 4-2 ist der höchste Grad an GFP-Inhibierung, der bei einer Konzentration von 100nM siRNA nach 36h erreicht wurde. Die Ergebnisse der Optimierung sind im Kapitel 3.4.3 aufgelistet. Im Rahmen der Optimierung fiel mir auf, dass die RNA-Duplices einen Einfluss auf die Transkription oder Translation der Luciferasen haben können, auch ohne dass diese mit Zielensequenzen modifiziert wurden. Dieser Einfluss variierte in Abhängigkeit der eingesetzten RNA-Duplices, der Zelldichte bei der Transfektion und dem Zustand der Zelle beim Aussäen. Aus diesem Grund wurden bei den Validierungsexperimenten zusätzlich immer Kontrollexperimente mit dem Leervektor durchgeführt, um das eigentliche Experiment im Hinblick auf diese Effekte normalisieren zu können.

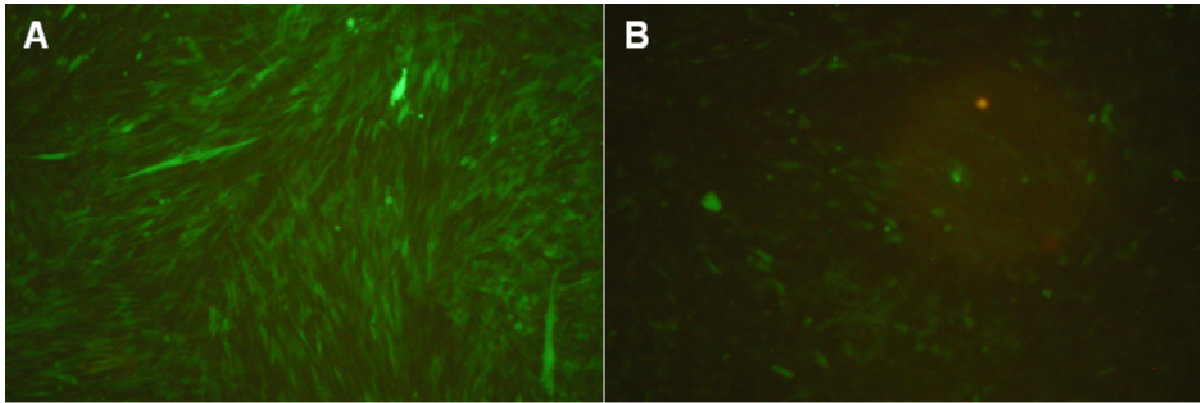


Abbildung 4-2 Zellkultur-Experiment zur Optimierung der RNA-Konzentration: Eine Neuro2a-Zelllinie, die das GFP stabil im Genom integriert trägt, wurde in **A**) mit einer Kontroll-RNA und in **B**) mit einer siRNA gegen GFP bei einer Konzentration von 100nM RNA transfiziert, Aufnahme nach 36h (20x vergrößert). Die Betrachtung im Durchlichtmikroskop zeigte, dass beide Kulturen konfluent gewachsen waren.

Damit bei dem Klonieren der Zielsequenzen in den Reportervektor Restriktionsschnittstellen keinen limitierenden Faktor darstellen, wurde in den 3'UTR des Luciferasegens des Vektors pRL-TK eine *mcs* (*multiple cloning site*) eingefügt (siehe Kapitel 3.2.14; Oligonukleotide: mcspGL-RLTKs und mcspGL-RLTKas), wodurch ein höheres Maß an molekularbiologischer Flexibilität erreicht wurde. Dieser Vektor wird im Folgenden pRL-TKmcs genannt.

4.2.2 Validierung von Vorhersagen aus der Kategorie „klassische Vorhersage“

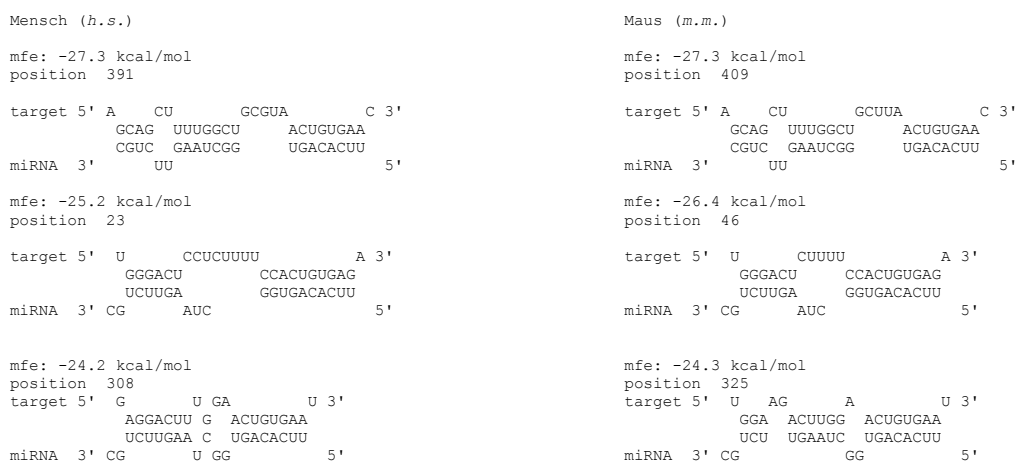
Die Vorhersage für diese Kategorie wurde von Dr. Marc Rehmsmeier durchgeführt. Hier sollten wie in Kapitel 4.1 beschrieben statistisch signifikante Zielsequenzen gefunden werden, die einen *seed* ohne G:U-Basenpaarungen bilden. Anschließend sollte für die Validierungsexperimente eine Auswahl an miRNA-Zielgenen getroffen werden. Bei der Auswahl wurden unterschiedliche Kriterien berücksichtigt. Es sollten zufällig Zielgene von den 50 signifikantesten Interaktionen aller Vorhersagen ausgewählt werden (Gesamtanalyse), die in mindestens zwei der drei untersuchten Spezies (Mensch, Maus und Ratte) auftreten. Weiterhin sollten Interaktionen getestet werden, die innerhalb der Vorhersage mit einer einzelnen miRNA signifikante Ergebnisse erzielten. Hierbei wurde das Auftreten in mehreren Spezies jedoch nicht gefordert. Zuletzt sollten auch Interaktionen getestet werden, die Besonderheiten aufwiesen, wie z.B. Zielsequenzen deren Position im 3'UTR nicht konserviert waren. Jeweils der humane und murine 3'UTR der ausgewählten Gene wurden mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurde versucht, den vollständigen UTR zu amplifizieren und zu

klonieren. Gleichzeitig wurden die Primer für die einzelnen UTRs so konstruiert, dass sie am 5'-Ende zusätzlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme beinhalteten, die nur in der *mcs* des Luciferasevektors pRL-TK*mcs* vorkommen und nicht in der UTR-Sequenz. Hierdurch wurde eine gerichtete Klonierung in den Luciferasevektor möglich.

Im Folgenden werden die untersuchten Zielgene aufgeführt und hinsichtlich der Auswahlkriterien charakterisiert.

Plk2 (*Serine/threonine-protein kinase* PLK2; ENSG00000145632)

Plk2 ist ein vorhergesagtes Zielgen für die miR-27b und war mit einem p-Wert von $4,8 \cdot 10^{-9}$ auf Platz 3 der Gesamtanalyse. In zwei der drei untersuchten Spezies wurde eine Zielsequenz an einer im Sequenzalignment konservierten Stelle vorhergesagt. Die Hybridisierungsstruktur zwischen der miRNA und der Zielsequenz wurde vom Programm wie dargestellt ermittelt.



Der murine 3'UTR wurde mit Hilfe der Primer PLK2-mm_a und PLK2-mm_b, der humane mit Hilfe der Primer PLK2-hs_a und PLK2-hs_b amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Bpu*1102I in den Vektor pRL-TK *mcs* kloniert, die humane über *Bpu*1102I und *Van*91I. Das Resultat wurde durch Sequenzierung verifiziert. In der nachfolgenden Tabelle sind die Fakten für die weiteren analysierten Gene in komprimierter Darstellungsform angegeben. Die Hybridisierungsstrukturen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit dem Anhang beigelegt.

Gen	Genbeschreibung Ensembl ID Primer (Restriktionsenzyme)	miRNA	# <i>h.s./</i> <i>m.m./</i> <i>r.n.</i>	p-Wert und Position in der Gesamt- oder Einzelanalyse
<i>Trpc3</i>	Serine/threonine-protein kinase ENSG00000145632 TRPC3UTRmm_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Bpu</i> 1102I) TRPC3UTRhs_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Bpu</i> 1102I)	miR-339	1/1/1	$2 \cdot 10^{-9}$ höchste Signifikanz in der Gesamt-analyse
<i>Vim</i>	Vimentin ENSG00000026025 VimUTR_mm_1a/2b (<i>Xba</i> I/ <i>Van</i> 91I) VimUTR_hs_1a/2b (<i>Xba</i> I/ <i>Van</i> 91I)	miR-17-3p	0/1/1	$2 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamt-analyse an 24. Stelle
<i>Mapk7</i>	mitogen activated protein kinase 7 ENSG00000166484 MAPK7_Rmm_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Bpu</i> 1102I) MAPK7_Rhs_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Bpu</i> 1102I)	miR-143	2/1/1	$9,8 \cdot 10^{-6}$ In der Analyse für miR- 143 an 6. Stelle
<i>Arhgef1</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 1 ENSG00000076928 ARGH1_mm2_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Bpu</i> 1102I) ARGH1_hs2_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Bpu</i> 1102I)	miR-143	2/0/0	$3,9 \cdot 10^{-6}$ In der Analyse für miR- 143 an 1. Stelle
<i>Isl2</i>	Insulin gene enhancer protein ENSG00000159556 ISL2UTR_mm_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Bpu</i> 1102I) ISL2UTR_hs_a/b (<i>Xba</i> I; richtige Orientierung wurde via Sequenz- ierung bestätigt)	miR-375	1/2/0	$4,2 \cdot 10^{-5}$ In der Analyse für miR- 375 an 2. Stelle
<i>Ptdsr</i>	Phosphatidylserine receptor ENSG00000070495 PTDSR_mm_a/b PTDSR_hs_a/b	miR-96	1/1/0	$1,6 \cdot 10^{-5}$ In der Analyse für miR- 96 an 1. Stelle
<i>Pms2</i>	PMS2-C terminal-like ENSG00000187953 PMS2_mm_a/b (<i>Xba</i> I; richtige Orientierung wurde via Sequenz- ierung bestätigt) PMS2_hs_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Van</i> 91I)	miR-136	1/1/0	$2,7 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamt-analyse an 27. Stelle
<i>Ampd3</i>	AMP deaminase 3 ENSG00000133805 AMPD3_mm_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Bpu</i> 1102I) AMPD3_hs_a/b (<i>Xba</i> I/ <i>Van</i> 91I)	miR-351	2/1/1	$5,7 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamt-analyse an 42. Stelle

Tabelle 4-1 Charakterisierung der für Validierungsexperimente ausgewählten Zielgene: Spalte 1 enthält den Gennamen; Spalte 2 die Genbeschreibung, EnsemblID sowie die für die Klonierung verwendeten Primer und Restriktionsenzyme; Spalte 3 die miRNA die an die Zielgenesequenz hybridisiert; Spalte 4 die Anzahl vorhergesagter Zielsequenzen in den Spezies Mensch (*h.s.*), Maus (*m.m.*) und Ratte (*r.n.*); Spalte 5 das Resultat der Signifikanzberechnung sowie das Auswahlkriterium für die Validierung

Bei allen aufgeführten Zielgenen sind die Positionen der Zielsequenzen konserviert. Ausnahmen hiervon stellen die Zielgene *Pms2* und *Ampd3* dar, was auch ihr Auswahlkriterium für die Validierung darstellte.

50ng der modifizierten *Renilla*-Luciferasevektoren wurden für die Validierung zusammen mit 5ng des *firefly*-Normalisierungsvektors pGI3 oder pGL4.10TK und der entsprechenden miRNA (650ng) in Neuro2a-Zellen cotransfiziert. Die Zellen wurden nach 36 Stunden lysiert und die Transfektionseffizienz der einzelnen Ansätze mit Hilfe der *firefly*-Luciferaseaktivität normalisiert. Der inhibitorische Effekt wurde durch den Quotienten der normalisierten *Renilla*-Luciferaseaktivität bei der Transfektion mit einer miRNA und der entsprechenden Aktivität bei einer Kontroll-RNA ermittelt.

Die miRNA sollte auf die Expression des Leervektors keinen direkten Einfluss haben und der Quotient sollte somit immer 1 sein. Da die miRNA aber manchmal einen unspezifischen Einfluss auf die jeweilige Luciferaseexpression hatte, wurde das Leervektorexperiment, also mit dem unmodifizierten Vektor, cotransfiziert mit entweder der miRNA oder der Kontroll-RNA, auf 1 gesetzt. Anschließend wurde der inhibitorische Effekt des Experiments durch die Skalierung gegen das Leervektorexperiment korrigiert.

Es wurden mindestens 3 unabhängige Transfektionen mit je einem Kulturreplikate durchgeführt. Die Messungen der RLUs (*relative light units*) einer Transfektion wurden zur Absicherung der Resultate wiederholt und anschließend der Mittelwert gebildet. Die Signifikanz eines beobachteten inhibitorischen Effekts konnte mit Hilfe eines zweiseitigen gepaarten Student-t-Test ermittelt werden.

Wie in Abbildung 4-3 zu sehen ist, konnte für die Zielsequenzen der Gene *Plk2*, *Vim*, *Mapk7* und *Isl2* eindeutig gezeigt werden, dass die jeweilige miRNA eine negative Regulation in der murinen sowie der humanen Zielsequenz bewirkt. Bei der vorhergesagten Interaktion zwischen miR-96 und dem Gen *Ptdsr* ließ sich nur bei der murinen UTR ein inhibitorischer Effekt nachweisen. Für die UTR des Gens *Arhgef1* sogar nur eine recht schwache jedoch signifikante Inhibierung. Für die Gene *Trpc3* und *Ampd3* ließ sich nur ein schwache aber signifikante Inhibierung für die humanen Zielsequenzen nachweisen.

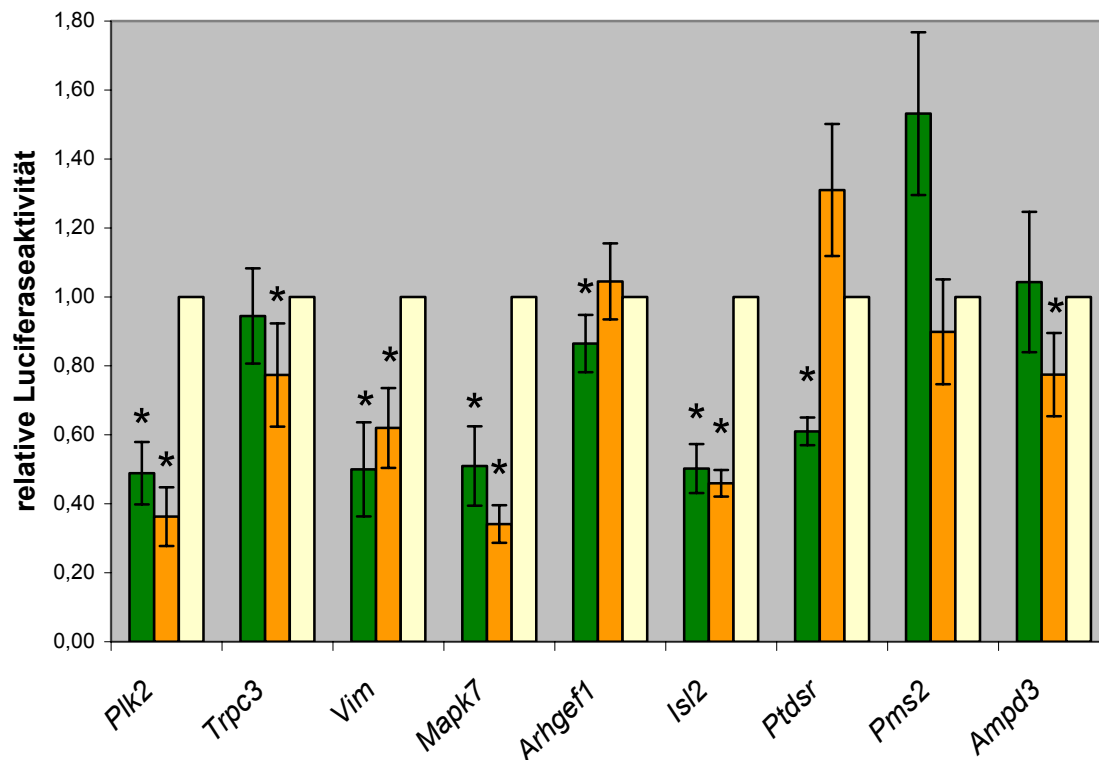


Abbildung 4-3 Reportergen-Assay zur Validierung ausgewählter miRNA-Zielgen-Interaktionen aus der Kategorie „klassisch“: Die murinen (grüne Balken) und humanen (orange Balken) UTRs wurden in die *mcs* des Vektors pRL-TK*mcs* kloniert. 50ng eines Vektors wurden mit 5ng des Normalisierungsvektor pGL3 und der entsprechenden miRNA-Duplex (650ng) oder der Kontroll-RNA cotransfiziert. Anschließend wurden die Experimente hinsichtlich der Transfektionseffizienz normalisiert, und die Luciferaseaktivitäten wurden ins Verhältnis gesetzt. Das Leervektorexperiment wurde auf 1 gesetzt (gelbe Balken). Um einen unspezifischen Einfluss der miRNA in den Experimenten zu korrigieren, wurde die relative Luciferaseaktivität der Experimente gegen das Leervektorexperiment skaliert. Die Sterne geben signifikante Resultate mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,005$ an (gepaarter zweiseitiger Student-t-Test; $n=6-14$).

Eine Sonderstellung nahm das Gen *Trpc3* ein, da bei den Klonierungen Mutationen aufgetreten sind. Für die Klonierung des Gens *Trpc3* wurde genomische DNA des Stamms 129SvJ verwendet. Die anschließende Sequenzierung ergab 6 SNPs (siehe Anhang) zwischen den Mausstämmen 129SvJ und C57Bl/6J (Ensembl-Sequenz). Einer der Polymorphismen lag innerhalb einer Zielsequenz. Dieses hätte Auswirkungen auf die Interaktion haben können.

C57Bl/6J		129SvJ
target 5' A	U	U 3'
	GAGUUCC UGGGGGACAGGG	GAGUUCC UGGGGGACAGGG A
	CUCGAGG ACCUCCUGUCCC	CUCGAGG ACCUCCUGUCCC U
miRNA 3' A		U 5'
		miRNA 3' A
		5'

Zwar erbrachte bereits die energetisch günstigere Hybridisierungsstruktur keine guten Resultate. Weiterhin ist das erste Nukleotid nicht an der Ausbildung des *seeds* beteiligt (Yuang *et al.* 2006; Brennecke *et al.* 2005; Kriakidou *et al.* 2004) und sollte somit nur eine untergeordnete Rolle bei der miRNA-Zielgen-Interaktion spielen. Dennoch wurde auch die Interaktion mit der vorhergesagten Zielsequenz aus dem Stamm C57Bl/6J getestet. Hierzu wurde ausschließlich die Zielsequenz mittels Oligohybridisierung (siehe Kapitel 3.2.14 mit den Primern TRPC3_TS_mma/b) konstruiert und in den Vektor pRL-TKmcS kloniert. Das Reporter-Assay erbrachte auch hier, wie erwartet, mit einer relativen Luciferaseaktivität von 0,95 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $>0,15$, keine signifikante Inhibierung. Somit scheint der Polymorphismus nicht dafür verantwortlich gewesen zu sein, dass das Gen im Reporter-Assay nicht inhibiert wurde und *Trpc3* ist kein Zielgen für die miR-339. Gleichzeitig wurde hiermit ein weiteres Beispiel gefunden, dass die Position1 keinen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion hat.

Das hier vorgestellte Luziferasereporter-Testsystem basiert auf dem Vergleich der Zielsequenz und der exogen applizierten miRNA gegen die Kontroll-RNA. Wird die zu untersuchende miRNA jedoch bereits endogen exprimiert, kann dies dazu führen, dass die Luciferase auch im Vergleichsexperiment so stark inhibiert wird, dass die exogene miRNA nur einen schwächeren oder sogar keinen zusätzlichen Effekt hervorruft. So erbrachte das Reporter-Assay für die Vimentin:miR-17-3p-Interaktion in HeLa-S3, diese Zellen exprimieren diese miRNA endogen (siehe Abbildung 4-4), nur eine relative Luciferaseaktivität von 0,72, während es in dem gleichen Experiment in Neuro2a-Zellen einen Wert von 0,57 hervorbrachte. Um die Resultate der Reporter-Assays besser beurteilen zu können, wurde die Zelllinie Neuro2a hinsichtlich der miRNA-Expressionen mit Hilfe von Northern-Blot-Experimenten untersucht (siehe Abbildung 4-4). Hierzu wurden 30µg total-RNA von Neuro2a und HeLa-S3 Zellen in einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen, fixiert und mit einer radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid-Sonde gegen die gewünschte miRNA hybridisiert. Die Resultate wurden mit dem Phospho-Imager Typhoon festgehalten. Die miRNAs miR-27b, miR-96 und miR-489 konnten in Neuro2a-Zellen nachgewiesen werden. In Abbildung 4-4 sind einige Northern-Blot-Ergebnissen beispielhaft dargestellt.

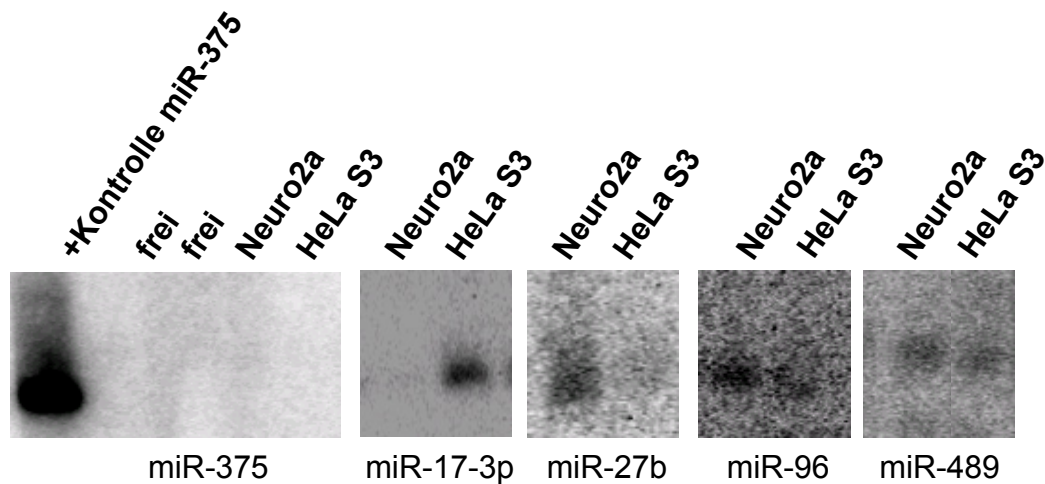


Abbildung 4-4 Northern-Blot-Experimente ausgewählter miRNAs: 30µg total-RNA von Neuro2a- und HeLa-S3 Zellen wurden in einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen, fixiert und mit einer radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid-Sonde gegen die gewünschte miRNA hybridisiert. Die Resultate wurden mit einem Phospho-Imager festgehalten.

Wie in Abbildung 4-4 zu erkennen ist, wird die miR-27-b in Neuro2a-Zellen auch endogen exprimiert. Somit wird die Luciferase, die den 3'UTR des Gens *Plk2* enthält, auch bei der Transfektion mit Kontroll-RNA negativ reguliert. Somit kann vermutet werden, dass der regulatorische Einfluss größer ist als das Experiment aussagt. Gleiches gilt für die Interaktion zwischen der miRNA-96 und dem Gen *Ptdsr*. Daher kann das humane *Ptdsr* als Zielgen nicht ausgeschlossen werden.

Vier Interaktionen zeigten starke inhibitorische Effekte für beiden Spezies und somit konnten vier neue Zielgene für miRNAs validiert werden. Für vier Gene konnte eine signifikante Inhibierung nur entweder für die Maus- oder Mensch-Sequenz gezeigt werden. Und ein nur Gen zeigte bei beiden Spezies keinen Effekt. Die Gene *Pms2* und *Ampd3* wurden anfangs ausgewählt, da sich ihre vorhergesagten Zielsequenzen an unterschiedlichen Stellen im Alignment der UTR-Sequenzen befanden und somit nicht konserviert waren. Jedoch zeigen die Zielsequenzen dieser Gene im Reporter-Assay keinen Effekt. Zudem kann hier die Aussage getroffen werden, dass ein „klassischer“ *seed* alleine nicht immer ausreicht, um eine negative Regulation zu bewirken.

4.2.3 Validierung von Vorhersagen aus der Kategorie „G:U-zulassen“

Die gängige Meinung zur miRNA-Zielgen-Vorhersage ist, dass ein *seed* ausgebildet wird. Hierbei ließen einige Programme anfangs G:U-Basenpaarungen jedoch nicht zu. Studien, die sich mit der Analyse der Strukturanforderungen an eine miRNA-Zielsequenz-Interaktion befassten, zeigten, dass auch G:U-Basenpaarung im *seed* zu einem inhibitorischen Effekt führen (Kiriakidou *et al.* 2004; Brennecke *et al.* 2005). Daher sollten in dieser Kategorie G:U-Basenpaarungen im *seed* erlaubt sein, was jedoch keine notwendige Bedingung war. Nachfolgend sind beispielhaft die Hybridisierungsstrukturen zwischen der miR-205 und der Zielsequenz des Gens *Pfkm* dargestellt.

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -26.1 kcal/mol position 2	mfe: -26.1 kcal/mol position 2	mfe: -25.4 kcal/mol position 3
target 5' C C A 3' CUCU UGGAGUGAGGGG GAGG ACCUUACUCCU	target 5' C C G 3' CUCU UGGAGUGAGGGG GAGG ACCUUACUCCU	target 5' C G 3' ACUU UGGAGUGAGGGG UGAG ACCUUACUCCU
miRNA 3' GUCU CC 5'	miRNA 3' GUCU CC 5'	miRNA 3' GUC GCC 5'
mfe: -28.1 kcal/mol position 131	mfe: -26.2 kcal/mol position 133	mfe: -25.4 kcal/mol position 139
target 5' C CCA C G 3' CAG UUCUGG GGAG UGGAGGA GUC GAGGCC CCUU ACUCCU	target 5' U G CCA C G 3' CAG CU UGG GGAG UGGAGGA GUC GA GCC CCUU ACUCCU	target 5' U G CCA U G 3' CAG CU UGG GGAG UGGGGGA GUC GA GCC CCUU ACUCCU
miRNA 3' U A 5'	miRNA 3' U G A 5'	miRNA 3' U G A 5'

Bei der Auswahl von Genen dieser Kategorie beschränkte ich mich auf die Gesamtanalyse. Weiterhin sollte auch hier in mindestens zwei von drei Spezies Treffer vorliegen. Die Validierung der miRNA-Zielsequenz-Interaktionen erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei der Kategorie „klassisch“. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Gen	Genbeschreibung Ensembl ID Primer (Restriktionsenzyme)	miRNA	#h.s./ m.m./ r.n.	p-Wert und Position in der Gesamtanalyse
FutIV	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase ENSG00000149211 FutIV_mm_a/b (XbaI/Eco72I) FutIV_hs_a/b (XbaI; richtige Orientierung wurde via Sequenz- orientierung bestätigt)	miR-412	3/2/0	$7 \cdot 10^{-8}$ In der Gesamtanalyse an 12. Stelle
Clcn3	Chloride channel protein 3 ENSG00000109572 Clcn3_mm_a/b (XbaI/Eco72I) Clcn3_hs_a/b (Bpu1102I/Van91I)	miR-432*	2/2/2	$1,4 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamtanalyse an 20. Stelle

Gen	Genbeschreibung Ensembl ID Primer (Restriktionsenzyme)	miRNA	#h.s./ m.m./ r.n.	p-Wert und Position in der Gesamtanalyse
Sfrp4	Secreted frizzled-related protein 4 precursor ENSG00000106483 Sfrp4_mm_a/b (XbaI/Bpu1102I) Sfrp4_hs_a/b (Bpu1102I/Van91I)	miR-453	1/1/1	$3,7 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamtanalyse an 34. Stelle
Pfkm	6-phosphofruktokinase, muscle type ENSG00000152556 Pfkm_mm_a/b (XbaI/Bpu1102I) Pfkm_hs_a/b (XbaI/Bpu1102I)	miR-205	2/2/2	$6,3 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamtanalyse an 47. Stelle

Tabelle 4-2 Charakterisierung der für Validierungsexperimente ausgewählten Zielgene: Spalte 1 enthält den Gennamen; Spalte 2 die Genbeschreibung, Ensembl ID sowie die für die Klonierung verwendeten Primer und Restriktionsenzyme; Spalte 3 die miRNA, die an die Zielgenesequenz hybridisiert; Spalte 4 die Anzahl vorhergesagter Zielsequenzen in den Spezies Mensch (*h.s.*), Maus (*m.m.*) und Ratte (*r.n.*); Spalte 5 das Resultat der Signifikanzberechnung sowie das Auswahlkriterium für die Validierung.

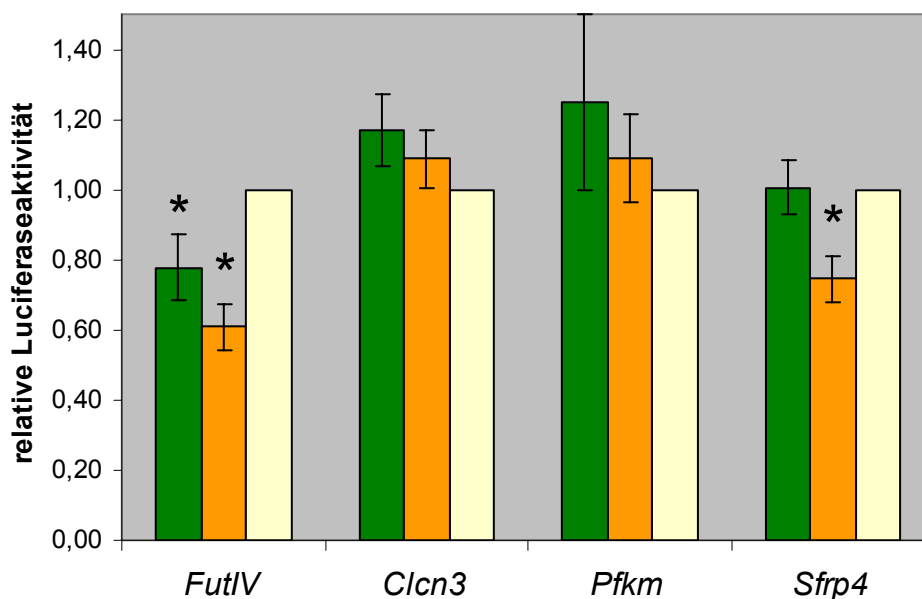


Abbildung 4-5 Reporteragen-Assay zur Validierung ausgewählter miRNA-Zielgen-Interaktionen aus der Kategorie „G:U-zulassen“: Die murinen (grüne Balken) und humanen (orange Balken) UTRs wurden in die *mcs* des Vektors pRL-TK*mcs* kloniert. 50ng eines Vektors wurden mit 5ng des Normalisierungsvektor pGL3 und der entsprechenden miRNA-Duplex (650ng) oder der Kontroll-RNA cotransfiziert. Anschließend wurden die Experimente hinsichtlich der Transfektionseffizienz normalisiert, und die Luciferaseaktivitäten ins Verhältnis gesetzt. Das Leervektorexperiment wurde auf 1 gesetzt (gelbe Balken). Um einen unspezifischen Einfluss der miRNA in den Experimenten zu korrigieren, wurde die relative Luciferaseaktivität der Experimente gegen das Leervektorexperiment skaliert. Die Sterne geben signifikante Resultate mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,005$ an (gepaarter zweiseitiger Student-t-Test; $n=6-10$).

Bei der Untersuchung dieser Kategorie wies das Gen *Sfrp4* lediglich eine schwache jedoch signifikante negative Regulation auf. Dies konnte jedoch nur für den humanen 3'UTR gezeigt werden.

FutIV konnte als Zielgen für die miRNA-412 identifiziert werden. Für das Gen wurden drei Zielsequenzen im Menschen und zwei in der Maus vorhergesagt. Betrachtet man die Hybridisierungsstrukturen genauer, so fällt auf, dass in beiden Spezies mindestens je eine Zielsequenz den Anforderungen der „klassischen“ Vorhersage entspricht. Somit kann in diesem Fall nicht eindeutig gesagt werden, ob der inhibitorische Effekt auf eine Zielsequenz mit oder ohne G:U-Basenpaarungen, oder evtl. sogar durch die Interaktion mit mehreren Zielsequenzen bewirkt wurde. Die anderen drei getesteten Gene *Cln3*, *Pfkm* und *Sfrp4* haben keinen „klassischen“ *seed*. Anhand der gewonnenen Daten kann die Aussage getroffen werden, dass die Vorhersage für diese Kategorie ineffizienter ist als für die Kategorie „klassisch“. Hier kann zusätzlich die Aussage getroffen werden, dass ein *seed* mit G:U-Basenpaarungen alleine nicht immer zu einer negativen Regulation führt.

4.2.4 Validierung von Vorhersagen aus der Kategorie „freie Vorhersage“

Viele Arbeitsgruppen beschreiben einen *seed* als wichtige, wenn nicht essentielle Voraussetzung, damit ein inhibitorischer Effekt erzeugt wird (Lewis *et al.* 2003; Krek *et al.* 2005; Kirkiaridou *et al.* 2004; Brennecke *et al.* 2005). Jedoch gibt es auch Hinweise, dass diese Voraussetzung durch eine gute, d.h. möglichst vollständige Hybridisierungsstruktur kompensiert werden kann (Brennecke *et al.* 2005; Lee *et al.* 1993; Moss *et al.* 1997). Bei dieser Kategorie wurden keine Strukturvoraussetzungen vorgegeben, d.h. auch die Ausbildung eines *seeds* wurde nicht gefordert, wird aber auch nicht verboten. Nachfolgend sind beispielhaft die Hybridisierungsstrukturen zwischen der miR-151* und der Zielsequenz des Gens *Nnat* dargestellt.

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -35.6 kcal/mol position 816	mfe: -35.6 kcal/mol position 774	mfe: -35.7 kcal/mol position 784
target 5' A A G G 3'	target 5' A A G G 3'	target 5' G A G G 3'
GCUAGAUUGU AGCUCCU GA	GCUAGAUUGU AGCUCCU GA	GCUAGAUUGU AGCUCCU GA
UGAUCUGACA UCGAGGA CU	UGAUCUGACA UCGAGGA CU	UGAUCUGACA UCGAGGA CU
miRNA 3' A C G 5'	miRNA 3' A C G 5'	miRNA 3' A C G 5'

Mit Hilfe dieser Analyse sollte überprüft werden, ob eine energetisch günstige und statistisch signifikante Hybridisierungsstruktur für einen inhibitorischen Effekt

hinreichend sind. Bei der Auswahl der Gene dieser Kategorie beschränkte ich mich auf die Gesamtanalyse. Weiterhin sollte auch hier in mindestens zwei von drei Spezies Treffer vorliegen.

Gen	Genbeschreibung Ensembl ID Primer (Restriktionsenzyme)	miRNA	#h.s./ m.m./ r.n.	p-Wert und Position in der Gesamtanalyse
Zic1	Zinc finger protein ZIC 1 ENSG00000152977 Zic1_mm_a/b (XbaI/Bpu1102I) Zic1_hs_a/b (XbaI/Bpu1102I)	miR-328	4/3/0	$1,1 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamt-analyse an 11. Stelle
Vti1a	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A ENSG00000151532 Vti1a_mm_a/b (XbaI/Bpu1102I) Vti1a_hs_a/b (XbaI/Bpu1102I)	miR-339	1/2/0	$1,1 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamt-analyse an 12. Stelle
Rgs4	Regulator of G-protein signaling 4 ENSG00000117152 Rgs4_mm_a/b (Bpu1102I/Eco72I) Rgs4_hs_a/b (Bpu1102I/Van91I)	miR-489	1/1/1	$6,2 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamt-analyse an 31. Stelle
Calcb	Calcitonin gene-related peptide 2 precursor ENSG00000175868 Calcb_mm_a2/b (XbaI/Bpu1102I) Calcb_mm_a/b (XbaI/Bpu1102I)	miR-515-3p	0/1/1	$8,1 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamt-analyse an 34. Stelle
Slc23a1	Solute carrier family 23 member 1 ENSG00000170482 Slc3a1_mm_a/b (XbaI/Bpu1102I) Slc3a1_hs_a/b (XbaI/Bpu1102I)	miR-520h	0/1/1	$1,1 \cdot 10^{-7}$ In der Gesamt-analyse an 42. Stelle
Nnat	Neuronatin ENSG00000053438 NNAT_mm_a2/b2 (XbaI/Bpu1102I) NNAT_hs_a/b (XbaI/Bpu1102I)	miR-151*	1/1/1	$1,3 \cdot 10^{-6}$ In der Gesamt-analyse an 49. Stelle

Tabelle 4-3 Charakterisierung der für Validierungsexperimente ausgewählten Zielgene: Spalte 1 enthält den Gennamen; Spalte 2 die Genbeschreibung, Ensembl ID sowie die für die Klonierung verwendeten Primer und Restriktionsenzyme; Spalte 3 die miRNA, die an die Zielgenesequenz hybridisiert; Spalte 4 die Anzahl vorhergesagter Zielsequenzen in den Spezies Mensch (h.s.), Maus (m.m.) und Ratte (r.n.); Spalte 5 das Resultat der Signifikanzberechnung sowie das Auswahlkriterium für die Validierung.

Die Validierung der miRNA-Zielsequenz-Interaktionen erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei der Kategorie „klassisch“. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-6 zusammengefasst.

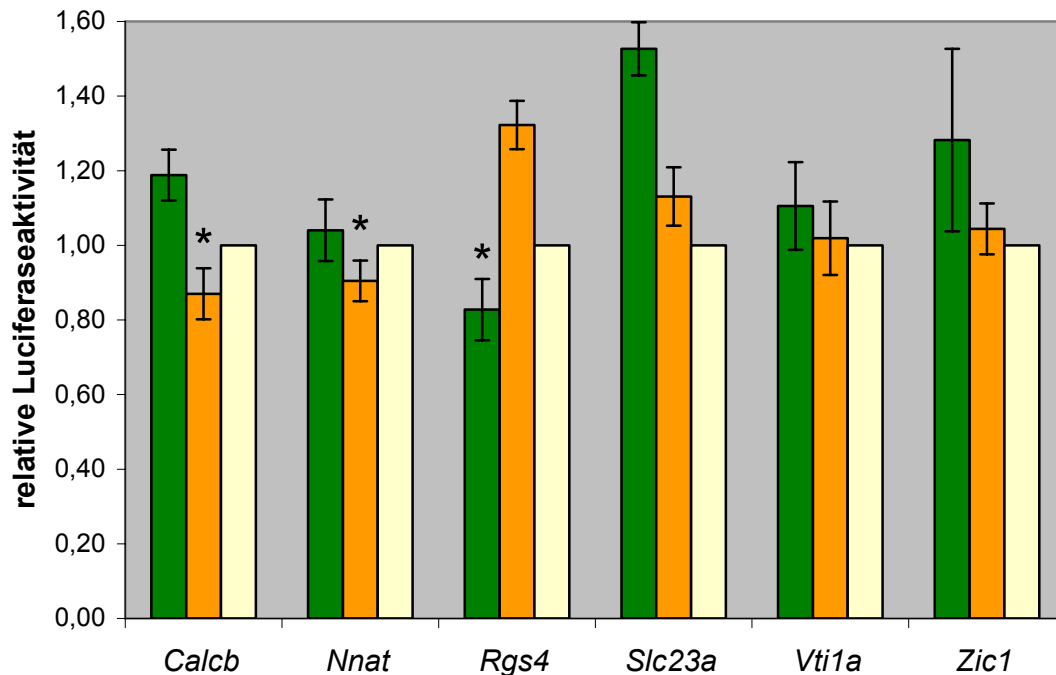


Abbildung 4-6 Reporteragen-Assay zur Validierung ausgewählter miRNA-Zielgen-Interaktionen aus der Kategorie „freie Vorhersage“: Die murinen (grüne Balken) und humanen (orange Balken) UTRs wurden in die *mcs* des Vektors pRL-TKmcs kloniert. 50ng eines Vektors wurden mit 5ng des Normalisierungsvektor pGL3 und der entsprechenden miRNA-Duplex (650ng) oder der Kontroll-RNA cotransfiziert. Anschließend wurden die Experimente hinsichtlich der Transfektionseffizienz normalisiert, und die Luciferaseaktivitäten wurden ins Verhältnis gesetzt. Das Leervektorexperiment wurde auf 1 gesetzt (gelbe Balken). Um einen unspezifischen Einfluss der miRNA in den Experimenten zu korrigieren, wurde die relative Luciferaseaktivität der Experimente gegen das Leervektorexperiment skaliert. Die Sterne geben signifikante Resultate mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,005$ an (gepaarter zweiseitiger Student-t-Test; $n=6-10$).

Bei der Untersuchung dieser Kategorie erzeugten die Interaktionen mit den humanen Zielsequenzen der Gene *Calcb* und *Nnat* sowie die murine UTR des Gens *Rgs4* einen schwachen aber signifikanten Effekt. Bei der Northern-Blot-Analyse ergab die miR-489 ein Signal (siehe Abbildung 4-4), so dass man hier in einer Zelllinie, welche die miRNA nicht endogen exprimiert, einen stärkeren Effekt erwarten kann. *Calcb*, *Slc24a* und *Nnat* hatten im gesamten 3'UTR keinen *seed*. Die 3'UTRs der Gene *Rgs4*, *Vti1a* und *Zic1* hingegen weisen mindestens einen *seed* auf. Somit kann auch hier die Aussage getroffen werden, dass ein *seed* keine hinreichende Bedingung für einen inhibitorischen Effekt ist. Zwar zeigen die Gene *Calcb* und *Nnat* eine Inhibierung, allerdings nur im Fall der humanen 3'UTRs, und auch da nur schwach. Insgesamt konnte in dieser Kategorie anhand der Daten kein eindeutiges Zielgen validiert werden.

4.3 Charakterisierung der Interaktion der miRNA-17-3p und dem Gen *Vimentin*

Besonderes Interesse erweckte die Interaktion zwischen der miRNA-17-3p und dem Gen *Vimentin*. In Tabelle 4-4 ist gezeigt, dass sowohl die miRNA-17-3p als auch die Zielsequenz im *Vimentin* 3'UTR hoch konserviert sind. Nur in *G.gallus* ist der *seed* unterbrochen, jedoch bildet auch hier der 3' Bereich der der miRNA eine energetisch sehr günstige Struktur mit der Zielsequenz aus, was wahrscheinlich eine Kompensation des unterbrochenen seeds bewirkt.

	miRNA	Vimentin UTR
<i>Gallus gallus</i>	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT--	AGCTTTCAGTGCCTTT-CTCAGTTTTCCATGA 114
<i>Monodelphis domestica</i>	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT-	AGCTTTTAAGTGCCTTT-CTGCAGTTTT-CCAAGA 103
<i>Homo sapiens</i>	ACTGCAGT GAAGGCACTTGT--	AGCTTTCAGTGCCTTT- CTGCAG TTTTT-CAGGA 104
<i>Mus musculus</i>	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT-	AGCTTTCAGTGCCTTTACTGCAGTTTTT-CAGGA 104
<i>Rattus norvegicus</i>	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT	AGCTTTCAGTGCCTTTACTGCAGTTTT--CAGGA 104
<i>Bos taurus</i>	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT--	AGCTTTCAGTGCCTTT-CTGCAGTTTTTTCAGGA 107
	***** * * * * * *	***** * * * * * * * * * * *

Tabelle 4-4 Multiples Alignment der miRNA und der Zielsequenz im 3'UTR des Vimentin-Gens in unterschiedlichen Spezies: Der Sequenzvergleich wurde für Spezies, in denen sowohl der *Vimentin* 3'UTR, als auch die miR-17-3p annotiert sind, durchgeführt. Die Nukleotide, die den *seed* bilden sind in den Maussequenzen fett geschrieben. Quelle der Sequenzen: Rfam Stand Mai 2007 Version 9.2; Ensembl-Datenbank: Build 44).

Bei genauerer Betrachtung der Hybridisierungsstruktur fallen Unterschiede in der miRNA Sequenz und der Zielsequenz auf, hieraus resultieren leicht unterschiedliche Strukturen.

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -32.9 kcal/mol	mfe: -38.1 kcal/mol	mfe: -38.4 kcal/mol
<pre> position 77 target 5' U U 3' CAAGUGCCUUU CUGCAGU GUUCACGGAAG GACGUCA miRNA 3' U U 5' </pre>	<pre> position 76 target 5' U U 3' CAAGUGCCUUUACUGCAGU GUUCACGGGAGUGACGUCA miRNA 3' U U 5' </pre>	<pre> position 76 target 5' U U 3' CAAGUGCCUUUUACUGCAGU GUUCACGGAAGGUGACGUCA miRNA 3' U U 5' </pre>

Es stellt sich einmal die Frage, ob die nahezu perfekten Hybridisierungsstrukturen nicht nur einen inhibitorischen Effekt auf die Translation der mRNA haben, sondern sogar zu einer endonukleolytischen Restriktion der mRNA führen, wie es meist bei Pflanzen der Fall ist. Weiterhin stellt sich die Frage, ob die unterschiedlichen Strukturen einen Einfluss auf die Interaktionen haben, und wenn ja auf welcher Ebene.

4.3.1 Validierung der inhibitorischen Wirkung der miRNA-17-3p durch die Interaktion mit der vorhergesagten Zielsequenz

Zunächst sollte sichergestellt werden, dass die Bindung mit der vorhergesagten Zielsequenz auch tatsächlich für den inhibitorischen Effekt verantwortlich ist, und nicht andere Sequenz- oder Strukturelemente innerhalb der *Vimentin* 3'UTRs. Um diese Aussage treffen zu können, sollten nur die vorhergesagten Zielsequenzen, und nicht wie zuvor der vollständige UTR, in den Luciferase-Reportervektor eingebracht und mittels Dual Luciferase Reporter Assay analysiert werden. Hierzu wurden zwei komplementäre Oligonukletide synthetisiert, die der Zielsequenz entsprechen und nach Hybridisierung zusätzlich Überhänge hatten, die typisch für eine Restriktionsspaltung mit den Enzymen *Xba*I und *Bpu*1102I sind. Anschließend konnten diese kurzen doppelsträngigen Oligonukleotide gerichtet in den Vektor pRL-TKmcS kloniert werden. Dieses wurde für die murine und humane Zielsequenz durchgeführt, aber auch für eine Positivkontrolle, bei der die murine miRNA-17-3p perfekt hybridisiert, und weiterhin für eine degenerierte Zielsequenz, bei welcher der Effekt geringer werden oder wegfallen sollte (Oligonukleotide: Vim-mm-wt-a/b, Vim-hs-wt-a/b, Vim-hs-Mperf-a/b, Vim-degen-a/b). Anschließend wurden 50ng eines Konstruktes zusammen mit 5 ng Normalisierungsvektor und entweder 650ng mir-17-3p oder Kontroll-RNA in Neuro2a-Zellen transfiziert. Die Lyse der Zellen und die anschließende Bestimmung der Luciferaseaktivität erfolgten 36 Stunden nach der Transfektion. Jedes Experiment wurde mit je zwei Kulturreplikaten dreimal wiederholt. Die Ermittlung der relativen Luciferaseaktivität erfolgte wie in 4.2.1 beschrieben. Wie in Abbildung 4-7 zu sehen ist, wird die Luciferaseaktivität bei den Vektoren, die nur die Zielsequenz vom Menschen und der Maus enthalten, signifikant gesenkt. Bei der perfekten Zielsequenz ist die Inhibierung sogar noch stärker, während sie bei der degenerierten Sequenz schwächer und auch nicht mehr signifikant ist. Mit diesem Experiment konnte der inhibitorische Effekt, der durch die miR-17-3p bewirkt wird, auf eine Interaktion mit der vorhergesagten Zielsequenz zurückgeführt werden.

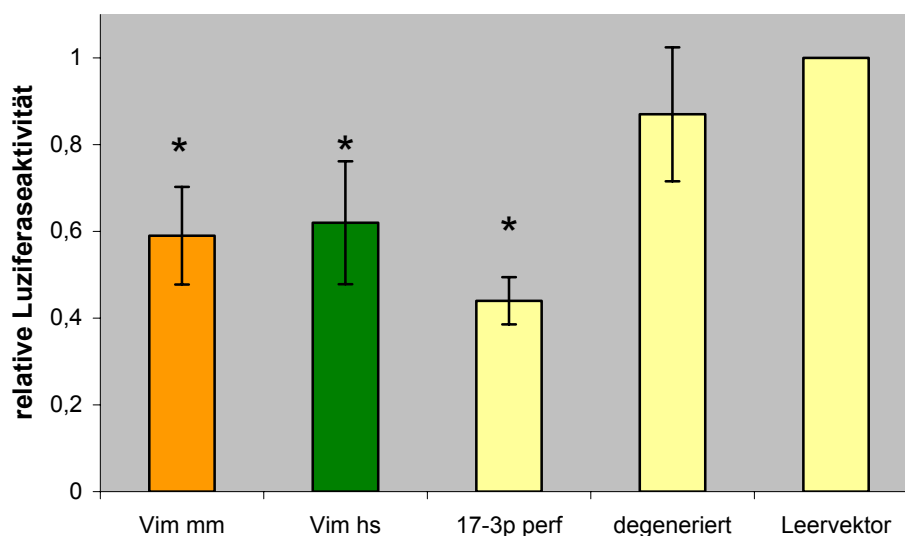


Abbildung 4-7 Validierung der vorhergesagten Zielsequenz als Interaktionspartner der miR-17-3p: die murine (mm) und die humane (hs) Zielsequenz sowie eine degenerierte Zielsequenz und eine, die eine perfekte Hybridisierung mit der miRNA-17-3p ermöglicht (17-3p-perf), wurden als DNA-Oligonukleotide synthetisiert, hybridisiert und in den Vektor pRL-TKmcS kloniert. 50ng dieser Vektoren wurden mit 5ng des Normalisierungsvektors pGL3 und der entsprechenden miRNA-Duplex (650ng) oder der Kontroll-RNA in Neuro2a-Zellen cotransfiziert. Anschließend wurden die Experimente hinsichtlich der Transfektionseffizienz normalisiert und die Luciferaseaktivitäten wurden ins Verhältnis gesetzt. Das Leervektorexperiment wurde auf 1 gesetzt. Um einen unspezifischen Einfluss der miRNA in den Experimenten zu korrigieren, wurde die relative Luciferaseaktivität der Experimente gegen das Leervektorexperiment skaliert. Die Sterne geben signifikante Resultate mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,005$ an (gepaarter zweiseitiger Student-t-Test; $n=6-10$).

4.3.2 Nachweis der Inhibition des nativen Gens *in vivo*

Bis hierher erfolgte die Validierung der Interaktion zwischen der vorhergesagten Zielsequenz in dem 3'UTR des Vimentingens und der miR-17-3p mit Hilfe eines exogenen und transient exprimierten Reportergens. Um die Frage zu beantworten, ob die miRNA auch das native Zielgen negativ reguliert, sollten Neuro2a-Zellen mit der murinen miR-17-3p oder einer Kontroll-RNA transfiziert werden. Anschließend sollte das Proteinniveau von Vimentin durch ein Western-Blot-Experiment mit dem Kontrollexperiment verglichen werden.

Bei *knockdown*-Experimenten von Vimentin mit siRNAs konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der siRNAs aufgrund der Abundanz des Proteins sowie dessen Stabilität erst nach 70h deutlich wurden (Elbashir *et al.* 2001, Harborth *et al.* 2004). Daher sollten die Proteine 72 und 120 Stunden nach der Transfektion isoliert werden.

Neuro2a-Zellen wurden mit 100nM miRNA-17-3p oder der Kontroll-RNA transfiziert. Jedes Experiment wurde für jeden Zeitpunkt mit einem Kulturreplikate durchgeführt. Die Proteinisolierung erfolgte 72 und 120 Stunden nach der Transfektion. 5µg der total-Proteinextrakte wurden in einem zehnpromzentigen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der immunhistochemische Nachweis von Vimentin konnte anschließend mit dem Anti-Vimentin-Erstantikörper (Verdünnung 1:5000) und HRP-gekoppeltem Anti-Maus-Zweitantikörper (Verdünnung 1:6000) erbracht werden. Um den Nachweis zu erbringen, dass in allen Spuren die gleiche Proteinmenge vorlag, wurden die gebundenen Antikörper wieder entfernt und die Membran für den immunhistochemischen Nachweis von β -Aktin eingesetzt (Anti- β -Actin-Erstantikörper 1:5000; HRP-gekoppelter Anti-Maus-Zweitantikörper 1:6000).

Wie in Abbildung 4-8 zu sehen ist wird auch das native Zielgen deutlich durch die miRNA-17-3p negativ reguliert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung kein Artefakt des Reportersystems ist.

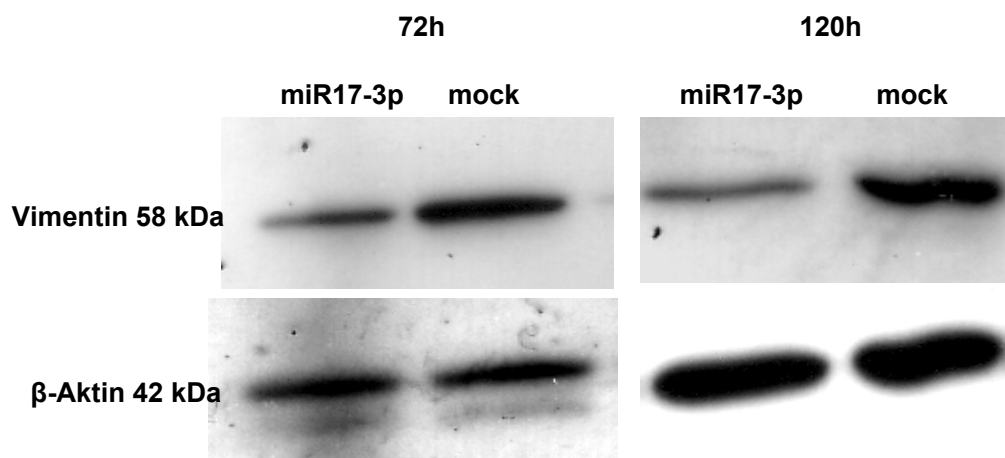


Abbildung 4-8 Nachweis der negativen Regulation von Vimentin durch die miR-17-3p auf Proteinebene: Neuro2a-Zellen wurden mit 100nM muriner miR-17-3p oder einer Kontroll-RNA transfiziert. Nach 72 und 120 Stunden wurden die Proteine isoliert, 5µg total-Proteinextrakt im 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach dem immunhistochemischen Nachweis von Vimentin wurden die Antikörper wieder entfernt und eine Ladekontrolle wurde durch den Nachweis von β -Actin durchgeführt.

4.3.3 Untersuchung der miRNA-17-3p-Wirkung auf mRNA von Vimentin

Aus dem Forschungsfeld der miRNAs in Pflanzen und der siRNAs weiß man, dass eine perfekte oder nahezu perfekte Hybridisierungsstruktur dazu führt, dass das

Zielgen endonukleolytisch geschnitten und anschließend abgebaut wird. Zu Beginn dieser Arbeit zeigten miRNA-Interaktionen in Metazoen nur Auswirkungen auf das Proteinlevel des Zielgens. In wenigen Fällen, wie z.B. bei der Interaktion zwischen miR196 und Hoxb8 (Yekta *et al.* 2004), konnte jedoch auch in Metazoen gezeigt werden, dass durch die miRNA eine spezifische endonukleolytische Spaltung mit anschließender Degradation erfolgt. Da bei der Interaktion von Vimentin und der miR17-3p eine nahezu perfekte Hybridisierungsstruktur ausgebildet wird, sollte durch eine quantitative *real-time*-PCR (qRT-PCR) die Frage beantwortet werden, ob die Zielsequenz endonukleolytisch geschnitten wird.

Hierzu wurden Neuro2a-Zellen und HeLa-S3-Zellen entweder mit der miR-17-3p oder mit der Kontroll-RNA transfiziert. Die Gesamt-RNA wurde nach 48 Stunden mit Hilfe des RNeasy-System der Firma Qiagen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung der *Vimentin*-mRNA erfolgte bei der Neuro2a-Probe mit den Primern Vim-LC-N2a_a/b und bei der HeLa-S3-RNA mit den Primern Vim_LC_a/b. Die Normalisierung erfolgte gegen das Gen β -Actin (Primer Neuro2a: beta-Actin-LC-mm_a; Primer HeLa-S3: beta-Actin-LC-mm_b). Abbildung 4-9A zeigt für beide Zelllinien das relative Verhältnis des Vimentinniveaus zwischen der Transfektion mit miR17-3p und der Kontroll-RNA. In beiden Zelllinien bewirkt die Transfektion mit der miRNA, dass das Vimentin-mRNA-Niveau um über 50% gesenkt wird. Um nachzuweisen, dass dieser Effekt auf der Interaktion mit dem Vimentin-3'UTR beruht, und nicht z.B. auf eine veränderte Transkriptionsrate des Gens, wurde das gleiche Experiment mit den Luziferasereporter genen durchgeführt (siehe Abbildung 4-9). Hierbei wurde der modifizierte Renilla-Luziferasegenvektor mit dem Vimentin 3'UTR (pRL-TK-VimUTRmm) zusammen mit der miRNA und dem *firefly*-Luziferase-Vektor zur späteren Normalisierung cotransfiziert. Für den relativen Vergleich diente wieder das gleiche Experiment, jedoch mit einer Kontroll-RNA anstelle der miRNA. Da die miR17-3p bei den Reporter-Assays nie einen unspezifischen Effekt auf den Leervektor zeigte, habe ich hier auf diese Kontrolle verzichtet.

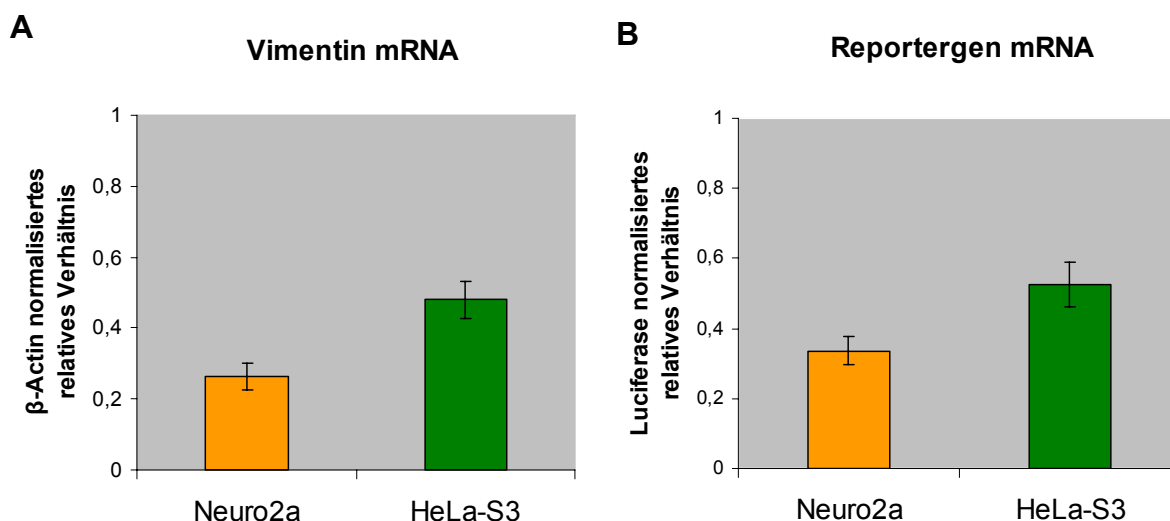


Abbildung 4-9 Quantitativer mRNA-Nachweis Zielsequenz-tragender Gene: **A)** Neuro2a- und HeLa-S3-Zellen wurden entweder mit miR-17-3p oder einer Kontroll-RNA transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine qRT-PCR für das Vimentin-Gen. Die Ergebnisse wurden gegen β -Actin normalisiert und ins Verhältnis gesetzt. **B)** Neuro2a- und HeLa-S3 Zellen wurden mit den Vimentin-UTR tragenden Renillaluziferase-Vektoren, dem Normalisierungsvektor pGL3 und entweder der miR17-3p oder der Kontroll-RNA transfiziert. Der quantitative Nachweis erfolgte wie in A, jedoch für die *Renilla*-Luciferase anstatt für Vimentin. Die Normalisierung erfolgte gegen die cotransfizierte *firefly*-Luciferase.

Weiterhin wurde das Experiment wieder in der murinen und der humanen Zelllinie mit den entsprechend unterschiedlichen 3'UTR-Sequenzen und miRNA-Duplices durchgeführt. Die RNA wurde 48 Stunden nach der Transfektion isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend wurde die *Renilla*-Luziferase-mRNA mittels qRT-PCR bestimmt (Primer pRLTK-LCIntron_a/b) und gegen die *firefly*-Luciferase-mRNA normalisiert (Primer: pGL3-LC3a/b). Auch hier zeigten beide Zelllinien, die mit der miRNA transfiziert wurden, ein deutlich reduziertes *Vimentin* mRNA-Niveau, so dass eine Regulation der Transkription nahezu ausgeschlossen werden kann. Somit stand fest, dass der Einfluss der miRNA-17-3p auf die *Vimentin* mRNA eine Degradation zur Folge hat.

Zeitgleich mit diesen Analysen wurden jedoch neue Studien anderer Arbeitsgruppen veröffentlicht, in denen eine miRNA-vermittelte mRNA Degradation beschrieben wurde. Diese Degradationen konnte jedoch nicht auf ein endokleolytisches Schneiden zurückgeführt werden, sondern auf einen generellen Mechanismus bei miRNAs, bei dem die gebundene Zielgen-RNA in sogenannte *p-bodies* transportiert und exonukleolytisch abgebaut wird. Aus diesem Grund musste ein eindeutiger Nachweis für das endonukleolytische Schneiden erbracht werden. Hierzu wurde zunächst die qRT-PCR wiederholt, jedoch mit einem Primerpaar, das die

Zielsequenz überspannt (Primer: Vim-LC-TS_mm_a/b). Wurde die Vimentin-mRNA in den Zellen in der Zielsequenz geschnitten und nicht sofort abgebaut, so sollte in dieser PCR weniger mRNA nachgewiesen werden als bei der zuvor beschriebenen qRT-PCR, da die Primer bei dieser im ORF hybridisieren. Beide Quantifizierungen erbrachten bei einem Vergleich mit dem Kontroll-Experiment ein nahezu gleiches relatives Verhältnis (ORF: $0,263 \pm 0,009$; Zielsequenz überspannend: $0,269 \pm 0,026$). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die mRNA sehr schnell nach dem Schneiden abgebaut wird und daher kein Unterschied festzustellen ist.

Um die Schnittstelle exakt nachzuweisen, sollte eine 5'RACE mit Hilfe des Systems der Firma Roche durchgeführt werden. Hierbei wurden Neuro2a- und HeLa-S3-Zellen mit der miR17-3p transfiziert und nach 48 Stunden die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA konnte, mit Hilfe eines genspezifischen Primers (RACE_SP1Vim_mm bzw. RACE_SP1Vim_hs), direkt durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die Primer lagen stromabwärts der Zielsequenz, somit sollte die reverse Transkription an der Schnittstelle in der Zielsequenz abbrechen. Nach dem Verdau der RNA wurde mittels terminaler Transferase ein poly-A-Schwanz an das 3'-Ende der cDNA synthetisiert. Diese polyadenylierte cDNA wurde mittels PCR amplifiziert. Dafür wurde ein poly-dT-anchor-Primer und ein zweiter genspezifischer Primer (RACE_SP2Vim_mm und RACE_SP2Vim_hs) verwendet. Es folgte eine zweite Amplifikation mit dem SP2-Primer und dem anchor-Primer, welcher kein poly-dT trug. Das resultierende PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die erwarteten Banden bei einer Größe von 171bp (Neuro2a) bzw. 177bp (HeLa-S3) wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und in den Vektor pJet1 kloniert und zur Bestimmung der Spaltposition sequenziert. Das ganze Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. In Abbildung 4-10 (C oben) ist das Resultat der gelelektrophoretischen Auftrennung abgebildet. Bei Zellkulturen, die mit der miRNA transfiziert wurden, ist deutlich die erwartete Bande bei ca. 180bp zu erkennen. Bei Zellen, die mit einer Kontroll-RNA transfiziert wurden, ist keine Bande zu erkennen. Zur Kontrolle wurde eine PCR mit dem zweiten genspezifischen Primer (RACE_SP2_Vim_mm und _hs) und dem Primer Vim-Race-Norm-fwd durchgeführt, welcher 10 Nukleotide stromabwärts der Zielsequenz lag (Abbildung 4-10 C unten).

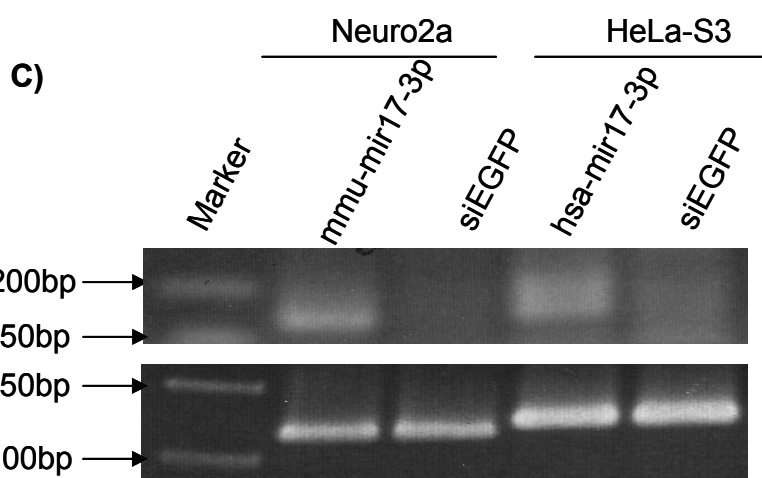
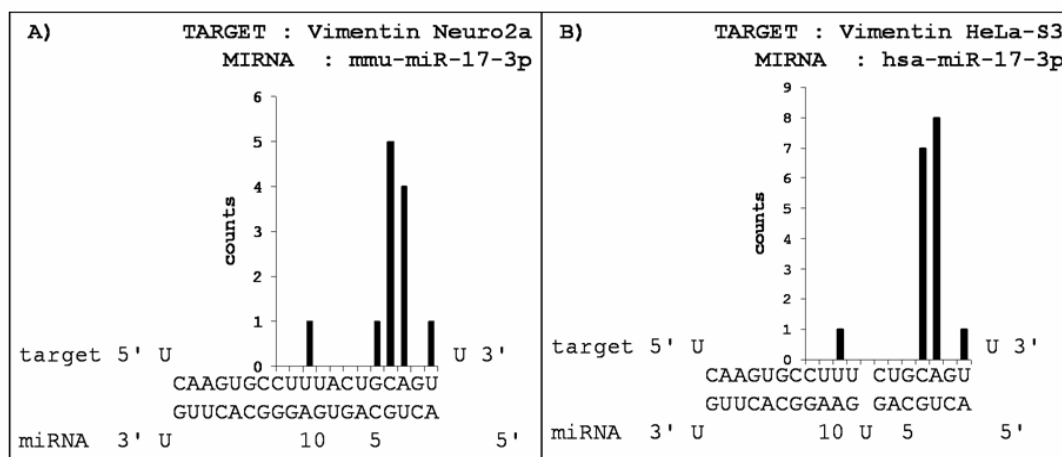


Abbildung 4-10 5'RACE des Vimentin-UTRs für den Nachweis einer endonukleolytischen Restriktion: Neuro2a- (A) und HeLa-S3-Zellen (B) wurden mit der speziesspezifischen miRNA-17-3p oder einer Kontroll-RNA transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion wurde Gesamt-RNA isoliert. Anschließend erfolgte eine 5'RACE mit Hilfe des Systems der Firma Roche. Hierbei wurde die RNA mit einem genspezifischen Primer in cDNA umgeschrieben und diese dann polyadenyliert. Das Fragment wurde mit Hilfe von zwei PCR-Reaktionen amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, aufgereinigt, in den Vektor pJet1 kloniert und sequenziert. Unten sind die Hybridisierungsstrukturen der Zielgene mit der miRNA dargestellt. Die Balken geben die Anzahl der sequenzierten Klone an der angezeigten Position wieder. Die Daten sind aus je zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. **C)** 5'Race-PCR-Produkte: gelelektrophoretische Auftrennung nach dem zweiten Amplifikationsschritt (oben). Zur Kontrolle wurde eine PCR mit Ausgangs-cDNA durchgeführt. Der Vorwärts-Primer lag 10 Nukleotide stromabwärts der Zielsequenz, der Rückprimer war der entsprechende SP2-Primer.

In Abbildung 4-10 A und B sind die 5'-Enden in der Hybridisierungsstruktur und die Anzahl der Klone dargestellt, deren Sequenzierung in der vorhergesagten Zielsequenz endeten. Im Fall der Neuro2a-Zellen akkumulierten 9 von 12 Klonen an den Positionen 3 und 4 in der Hybridisierungsstruktur, relativ zum 5'-Ende der miRNA gesehen, im Fall der HeLa-S3-Zellen sogar 17 von 19.

Dieses Experiment zeigt, dass die reverse Transkription meist an den Positionen 3 oder 4 endet, was auf eine endonukleolytische Restriktion hinweist. Es ist jedoch

bekannt, dass das Schneiden bei miRNAs und siRNAs immer zwischen Position 10 und 11 gezählt vom 5'-Ende der miRNA stattfindet.

Um zu klären, ob es sich hier um eine alternative Restriktionsposition handelt oder um ein Artefakt des Experiments, sollte ein weiterer Nachweis erbracht werden. Der Versuch das 5'RACE-System der Firma Roche so zu modifizieren, dass damit spezifisch 3'Enden gespaltener RNAs in eukaryontischen total-RNA-Proben nachgewiesen werden können, schlug fehl. Daher wurde eine zweite 5'-RACE-Methode angewendet (siehe Kapitel 3.3.7.2). Hierbei wurde eine Adapter-RNA an 5'phosphorylierte RNA-Enden ligiert, also an mRNAs, die keine CAP-Struktur besitzen. Für dieses Experiment wurden wieder Neuro2a- und HeLa-S3-Zellen mit der entsprechenden miRNA-17-3p transfiziert und die total-RNA 48 Stunden nach der Transfektion isoliert. Als Positivkontrolle erfolgte eine Transfektion in Neuro2a-Zellen mit einer RNA-Duplex, die perfekt mit der Zielsequenz hybridisiert.

Anschließend wurden die Ligationsansätze mit einem vimentinspezifischen Primer in cDNA umgeschrieben und das spezifische Produkt durch eine sequentielle *Nested-PCR* angereichert (Primer der ersten PCR: 5RACE-ligation-Outer und RACE_SP1Vim_mm bzw. _hs; Primer der zweiten PCR: 5RACE-ligation-inner und RACE_SP2Vim_mm bzw. _hs). Anschließend wurden die PCR-Produkte in den Vektor pJet1 kloniert und sequenziert. Alle sequenzierten Klone der Positivkontrolle wiesen eine Schnittstelle zwischen Position 10 und 11 auf. Trotz zahlreich getesteter Klone aus den miRNA-Experimenten von drei unabhängigen Transfektionen erbrachte keine Sequenzierung eine Schnittstelle in der Zielsequenz, weder an den zuvor beobachteten Stellen noch an Position 10. Somit konnte der Nachweis, dass die miRNA in der Zielsequenz zu einem Schnitt der mRNA führt, mit einer zweiten Methode nicht nachgewiesen werden.

4.4 Verknüpfung der miR17-3p:Vimentin-Interaktion mit der Wobbler-Maus

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Gen *Vimentin* im Rückenmark von Wobbler-Tieren gegenüber den Wildtypen hochreguliert ist. Da ich zeigen konnte, dass die miR17-3p einen negativen regulatorischen Effekt auf Vimentin bewirkt, sollte untersucht werden, ob die miR-17-3p ebenfalls im

Rückenmark der Wobbler-Tiere reguliert wird und welche Folgen die Vimentin Regulation haben könnte.

4.4.1 Vergleichende *in situ* Hybridisierungen der miR-17-3p im Rückenmark von Wobbler- und Wildtyp-Mäusen

Hierzu habe ich zunächst das cervikale und thorakale Rückenmark von Wobbler- und Wild-Tieren isoliert. Anschließend wurden die Gewebe in 4% PFA/PBS für 30 Minuten bei 4°C fixiert. Danach erfolgten 3 einminütige Waschschriffe in PBS bei 4°C und eine Inkubation der Gewebe in 30% Saccharose/PBS über Nacht bei 4°C. Tags darauf wurde das Rückenmark beider Genotypen in OCT-Compound eingebettet und auf Trockeneis an unsere Kooperationspartner nach Wien geschickt. Dort wurden Quer- und Längsschnitte angefertigt. Anschließend wurde die miR17-3p durch eine *in situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin (DIG) markierten LNA-Sonde nachgewiesen. Bei LNA-Sonden (*locked nucleic acid*) sind die Nukleinsäuren modifiziert, was zu einer erhöhten Sensitivität und Spezifität führt. Der Nachweis der gebundenen Sonden erfolgte über einen Anti-DIG-Zweitantikörper, der mit HRP (*horseradish peroxidase*) konjugiert war. Das genaue Protokoll wurde in Wien entwickelt (Obernosterer *et al.*, 2007 akzeptiert). Anschließend wurden Zellkerne mit Hilfe einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen sind in Abbildung 4-11 A dargestellt. In den Querschnitten und in den Längsschnitten lässt sich deutlich erkennen, dass die miRNA-17-3p in Wildtyp-Tieren ein stärkeres Signal erzeugt als bei Wobbler-Tieren. Die distinkten roten Signale sind wahrscheinlich als unspezifische Akkumulationen der Sonde zu bewerten, die bei der *in situ* Hybridisierung schnell ausflocken kann (persönliche Mitteilung Gregor Obernosterer). Der Signalunterschied zwischen den äußeren und den inneren Bereichen bei den Längsschnitten des Wildtyp-Rückenmarks könnte einen Hinweis auf einen Expressionsunterschied zwischen der grauen und der weißen Rückenmarksubstanz sein, müsste aber durch weitergehende Analysen nachgewiesen werden. Die differenzielle miR-17-3p-Expression konnte bei drei weiteren *in situ* Hybridisierungen an Rückenmarkschnitten unterschiedlicher Tiere reproduziert werden. Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen sollten durch Northern-Blot-Experimente reproduziert werden. Hierzu wurde das Rückenmark von je drei 50-60 Tagen alten Wobbler- und Wildtyp-Tieren präpariert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe Kapitel 3.3.1). Die Gesamt-RNA von je drei Tieren wurde vereinigt, wobei darauf geachtet wurde, dass das

Geschlechterverhältnis zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren gleich war. Anschließend wurden die Proben in einem denaturierenden 15%igen Polyacrylamidgel (8M Harnstoff) aufgetrennt und auf eine Membran transferiert und fixiert. Die Hybridisierung mit einer LNA-Sonde gegen miR-17-3p erfolgte bei 37°C über Nacht. Nach der Dokumentation mit einem Phosphoimager wurden die Sonden vollständig von der Membran gewaschen.

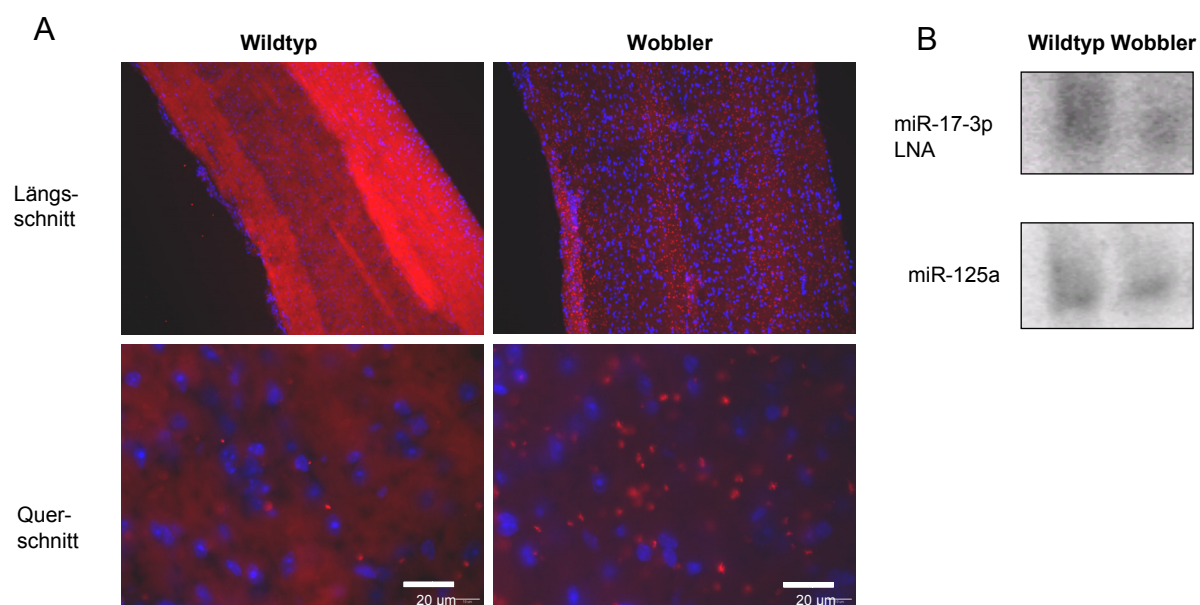


Abbildung 4-11 Expressionsuntersuchung der miR-17-3p im Rückenmark von Wobbler- und Wildtyp-Tieren: **A)** *In situ* Hybridisierung der miR-17-3p wurde mit Hilfe einer DIG-markierten LNA-Sonde nachgewiesen (rot), Zellkerne mit Hilfe einer DAPI-Färbung (blau). Längsschnitte sind 10-fach vergrößert und Querschnitte 63-fach vergrößert dargestellt **B)** Gesamt RNA von Wobbler- und Wildtyp-Tieren wurde isoliert, in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und fixiert. Die Hybridisierung für miR-17-3p erfolgte mit einer radioaktiv markierten LNA-Sonde bei 37°C über Nacht. Nach der Dokumentation wurden die gebundenen Sonden gewaschen und die gleiche Membran wurde für eine Kontrollhybridisierung mit einer DNA-Sonde für die miR-125a eingesetzt.

Die gleiche Membran wurde für eine Kontrollhybridisierung gegen die miR-125a eingesetzt. Diese miRNA kommt in neuronalem Gewebe vor (Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Wu und Belasco 2005) und war in einem vergleichenden miRNA-Microarray-Experiment mit Wobbler- und Wildtyp-Tieren nicht signifikant reguliert (siehe Kapitel 4.4.3). Wie in Abbildung 4-11 B zu sehen ist, erscheint im Wildtyp ein stärkeres miR17-3p Signal und eine densitometrische Quantifizierung mit der Software (ImageQuant) des Phosphoimagers erbrachte, dass die miR-17-3p in Wildtyp-Tieren ca. 1,4-fach stärker exprimiert ist.. Es bleibt aber anzumerken, dass die miR-17-3p nur mit Hilfe von LNA-Sonden nachweisbar war und generell schwache Signale zeigte. Insgesamt konnte ich das Ergebnis der *in situ* Hybridisierungen tendenziell

reproduzieren und man kann die Aussage treffen, dass die miR-17-3p in den untersuchten Rückenmarksgeweben zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren differenziell exprimiert ist.

4.4.2 Auswirkung der differentiellen Vimentin-Expression auf den Phänotyp der Wobbler-Maus

Aus einer früheren Arbeit in unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass Wobbler-Tiere gegenüber Wildtyp-Tieren hinsichtlich der Greifkraft beeinträchtigt sind und eine geringere Gewichtszunahme aufweisen (Schmitt-John *et al.*, 2005). Weiterhin haben Expressionsstudien gezeigt, dass das *Vimentin*-Gen in Wobbler-Tieren ca. um den Faktor 3 hochreguliert ist (Carsten Drepper 2005, Dissertation). Somit stellte sich die Frage, ob Vimentin maßgeblich an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt ist. Gewichts- und Kraftmessungen von Wobbler- und Wildtyp-Tieren und von Wobbler- und Wildtyp-Tieren, in denen das *Vimentin*-Gen ausgeschaltet war, sollten Aufschluss über diese Frage geben.

Hierzu wurde ein Mausstamm, der Null-Allele für die Gene *GFAP* und *Vimentin* hatte (Pekny und Frisen 1999), in die Wobbler-Zucht eingekreuzt. Ziel war es, den Wildtypstatus von *GFAP* wiederherzustellen, um anschließend vergleichende Gewichts- und Kraftmessungen mit Tieren unterschiedlicher Genotypen im Hinblick auf *Vps54* und *Vimentin* durchführen zu können (C57Bl6/6J^{Vim -/-; Vps54 wr/wr}; C57Bl6/6J^{Vim -/-; Vps54 +/-}; C57Bl6/6J^{Vim +/-; Vps54 wr/wr}; C57Bl6/6J^{Vim +/-; Vps54 +/-}). Die Würfe wurden 10 Tage nach der Geburt diagnostiziert. Mit genotypisch interessanten Tieren wurden alle zwei Tage Kraft- und Gewichtsmessungen bis zu einem Alter von 46 Tagen durchgeführt. Für die Kraftmessungen wurden die Tiere mit den vorderen Pfoten auf ein Gitter gesetzt, welches mit einem Newtonmeter verbunden war. Anschließend versuchte man die Maus mit einer horizontalen Bewegung von dem Gitter wegzubewegen, während diese sich an dem Gitter festhielt. Die ermittelte Zugkraft konnte anschließend abgelesen werden. In Abbildung 4-12 sind die Ergebnisse der Messungen von fünf unterschiedlichen Würfen gezeigt, wobei Männchen und Weibchen gemeinsam betrachtet wurden, da sie kaum Unterschiede aufwiesen (Originaldaten sind dem Anhang beigefügt). Außerdem zeigte die Messung eines Wurfes, bei dem alle vier Genotypen in Männchen repräsentiert waren, die gleichen Verläufe (siehe Anhang).

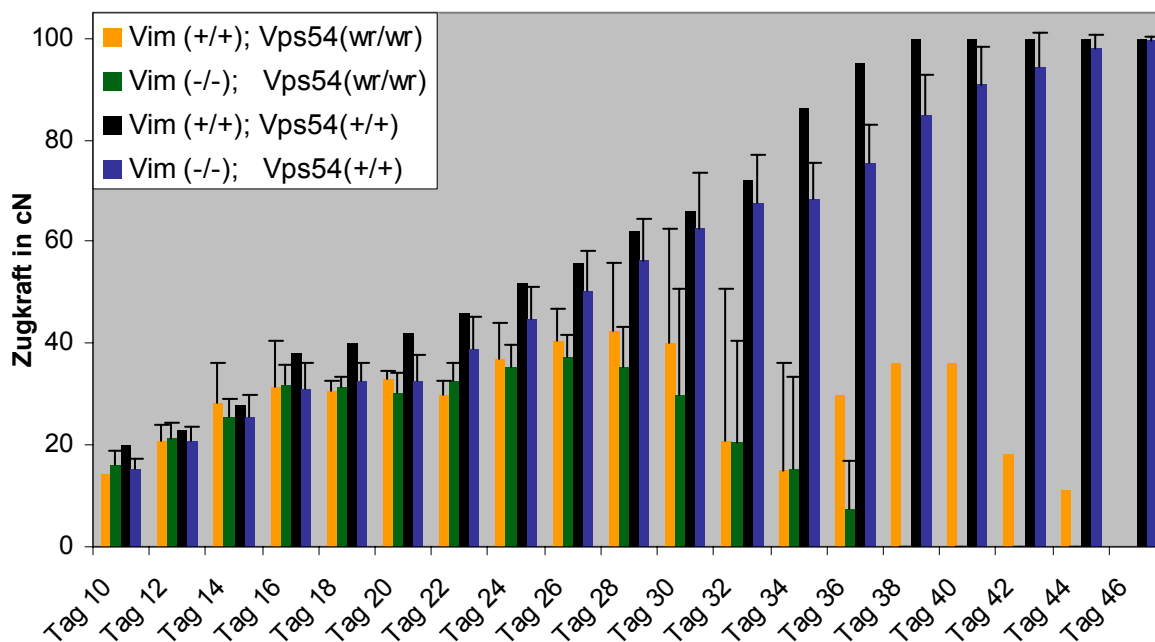


Abbildung 4-12 Kraftmessungen zur Aufklärung des Einflusses von Vimentin auf die Wobbler-Erkrankung: Die Kraft von zehn Tage alten Tieren wurde kontinuierlich alle zwei Tage bis zum Tag 46 mit Hilfe eines Newtonmeters gemessen. Die Werte von Tieren unterschiedlicher Würfe und unterschiedlichen Geschlechts wurden zusammengefasst. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet (C57Bl6/6J^{Vim^{-/-}; Vps54^{wr/wr}}; n= 5; C57Bl6/6J^{Vim^{-/-}; Vps54^{+/+}}; n=5; C57Bl6/6J^{Vim^{+/+}; Vps54^{wr/wr}}; n=2; C57Bl6/6J^{Vim^{+/+}; Vps54^{+/+}}; n=1).

Wobbler-Tiere zeigen verglichen mit dem Wildtyp den typischen Verlauf. Bis zum Tag 20 ist kein Unterschied zu erkennen. Danach weisen sie bis zum Tag 28 einen geringeren Kraftzuwachs gegenüber Wildtypen auf. Ab dem Tag 28 nimmt ihre Zugkraft kontinuierlich ab, bis sie nicht mehr greifen können, während die Zugkraft der Wildtyp-Tiere stetig zunimmt. Durch das Ausschalten des *Vimentin*-Gens kann keine Verbesserung oder Verschlechterung dieses Phänotyps festgestellt werden. Vergleicht man den Kraftzuwachsverlauf entsprechender Genotypen, so sind diese nahezu gleich. Die großen Schwankungen, die bei Wobbler-Tieren ab dem Tag 28 auftreten, können mit einer unterschiedlich starken Progression des Krankheitsverlaufs erklärt werden. Zudem kann es zu einem leicht verzögerten *onset* der Krankheit kommen. Weiterhin spielen aber auch die Wurfgröße und die Pflegebereitschaft der Mutter eine Rolle. Ab dem Tag 34 scheint die Tier-Gruppe mit dem Genotyp C57Bl6/6J^{Vim^{+/+}; Vps54^{wr/wr}} wieder an Kraft zu gewinnen. Allerdings gab es nur zwei Tiere in dieser Genotypengruppe, wovon ein Tier am Tag 34 verstarb, somit ist diese Schwankung als Artefakt der geringen Tierzahl in dieser Gruppe zu werten.

Der zweite hier betrachtete Parameter zur Analyse des Einflusses des *Vimentin*-Gens auf den Wobbler Phänotyp ist das Gewicht der Tiere. Die Gewichtsmessungen wurden mit einer handelsüblichen Digitalwaage vorgenommen und sind in Abbildung 4-13 dargestellt.

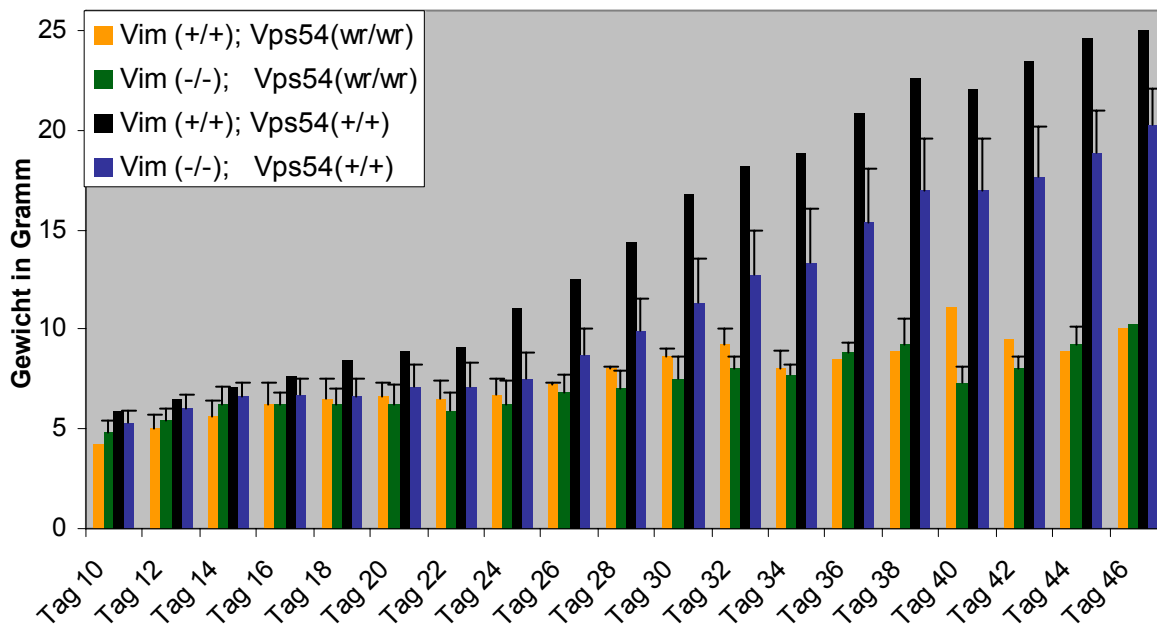


Abbildung 4-13 Gewichtsmessung zur Aufklärung des Einflusses von Vimentin auf die Wobbler-Erkrankung: Das Gewicht von zehn Tage alten Tieren wurde kontinuierlich alle zwei Tage bis zum Tag 48 ermittelt. Die Werte von Tieren unterschiedlicher Würfe und unterschiedlichen Geschlechts wurden zusammengefasst. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet (C57Bl6/6J^{Vim -/-; Vps54 wr/wr}; n= 5; C57Bl6/6J^{Vim -/-; Vps54 +/+}; n=5; C57Bl6/6J^{Vim +/+; Vps54 wr/wr}; n=2; C57Bl6/6J^{Vim +/+; Vps54 +/+}; n=1).

Auch bei den Gewichtsmessungen zeigt sich das für Wobbler-Tiere typische Bild. Bis zum *onset* der Krankheit sind keine Unterschiede zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren zu erkennen. Von Tag 20 bis zum Tag 46 nimmt das Gewicht von Wobbler-Tieren um nur ca. 65% zu, während Wildtypen ihr Gewicht im gleichen Zeitraum beinahe verdreifachen. Das Ausschalten des *Vimentin*-Gens erbrachte auch hier keine Änderung bei Wobbler-Tieren. Der Unterschied zwischen C57Bl6/6J^{Vim +/+; Vps54 +/+} und C57Bl6/6J^{Vim -/-; Vps54 +/+} ist wahrscheinlich auf eine Variation der Individualentwicklungen zurückzuführen. Um jedoch eindeutig einen Effekt auf den Gewichtsverlauf ausschließen zu können, soll die Stichprobenzahl erhöht werden.

Insgesamt kann man die Aussage treffen, dass die erhöhte Vimentin-Expression nicht maßgeblich an der Ausprägung der Wobbler-Erkrankung beteiligt ist. Der

Verlust des *Vimentin*-Transkripts scheint sich weder auf den *onset* der Erkrankung, noch auf den Verlauf selbst auszuwirken.

4.4.3 Vergleichende Expressionsuntersuchung von miRNAs mittels miRNA-Microarray

Im Rahmen der Entwicklung eines miRNA-Microarrays stellte ich der Firma Miltenyi RNA-Proben für eine vergleichende miRNA-Expressionsuntersuchung zur Verfügung. Ziel war es, das Expressionsprofil von miRNAs im Rückenmark von Mäusen zu erfassen. Eine solche Analyse für das Rückenmark von Mäusen war noch nicht veröffentlicht und stellte somit eine besondere Herausforderung dar. Anschließend sollte das Expressionsprofil von miRNAs im Rückenmark von Wobbler- und Wildtyp-Tieren verglichen werden.

Hierzu wurde das Rückenmark von 50-60 Tage alten Wobbler- und Wildtyp-Tieren präpariert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und deren Qualität ermittelt (siehe Kapitel 3.3.1). Die Gesamt-RNA von je drei Tieren wurde vereinigt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Geschlechterverhältnis zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren gleich war. Die RNA-Proben wurden auf Trockeneis an die Firma Miltenyi versendet.

5µg wurden dort für eine direkte Fluoreszenzmarkierung eingesetzt. Die so markierten RNA-Proben wurden auf einem miRNA-Microarray hybridisiert. Die Hybridisierungen wurden mit einem biologischen Replikate und einem weiter entwickelten miRNA-Microarray wiederholt. In Tabelle 4-5 sind die 67 miRNAs aufgelistet, die bei den Hybridisierungen ein Signal erzeugten, das mindestens 2-fach über dem Hintergrund lag.

Mit den erhaltenen Daten können erste Aussagen über die Qualität der Hybridisierung getroffen werden. So zeigten weitläufig exprimierte miRNAs wie z.B. Mitglieder der *let-7* Familie, miR-100 oder miR125a ein Signal (Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Sempere *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). Gleichzeitig geben miRNAs, die nicht in neuronalem Gewebe gefunden wurden und spezifisch für andere Gewebe sind, kein Signal. So konnte z.B. kein Signal für die leberspezifischen miR-122a und miR-194 (Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Sempere *et al.*, 2004) gefunden werden. Auf der anderen Seite geben die miRNAs miR-9, miR-124, miR-128a, miR-138 und miR-218 die spezifisch in neuronalem Gewebe exprimiert sind, ein deutliches Signal (Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Obernosterer *et al.*, 2006; Zhao *et al.*,

2006, Thomson *et al.*, 2004, Miska *et al.*, 2004, Saba und Booth 2006, Wang *et al.*, 2007; Sempere *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse geben einen interessanten Einblick in das Expressionsprofil von miRNAs im Rückenmark.

Expressionsprofil von miRNAs im Rückenmark von Mäusen

<i>let-7a</i>	miR-101	miR-127	miR-16	miR-23a	miR-30a-5p	miR-690
<i>let-7b</i>	miR-101b	miR-128a	miR-181a	miR-23b	miR-30b	miR-7
<i>let-7c</i>	miR-103	miR-128b	miR-185	miR-24	miR-30c	miR-720
<i>let-7d</i>	miR-107	miR-129-3p	miR-190	miR-26a	miR-30d	miR-9*
<i>let-7e</i>	miR-10a	miR-136	miR-195	miR-26b	miR-338	miR-9
<i>let-7f</i>	miR-10b	miR-138	miR-204	miR-27a	miR-33a	miR-98
<i>let-7g</i>	miR-124a	miR-143	miR-21	miR-27b	miR-342	miR-99a
<i>let-7i</i>	miR-125a	miR-144	miR-218	miR-29a	miR-34a	
miR-1	miR-125b	miR-145	miR-219	miR-29b	miR-376a	
miR-100	miR-126-3p	miR-15a	miR-22	miR-29C	miR-451	

Tabelle 4-5 miRNAs die im Rückenmark der Maus exprimiert sind und bei miRNA-Microarray-Experimenten ein Signal erzeugten, das mindestens 2-fach über dem Hintergrund lag.

Der nächste Schritt bestand darin, dass Expressionsprofil von miRNAs aus dem Rückenmark zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren zu vergleichen. Es wurden bei der Auswertung der Hybridisierungen nur Ergebnisse berücksichtigt, die in allen Hybridisierungen die gleiche Tendenz der Regulation hatten und über einem relativen Verhältnis von 1,5 lagen. Es konnten keine hochregulierten miRNAs in Wobbler-Tieren festgestellt werden. Jedoch zeigten die miRNAs miR-9 (Ratio: 1,8), miRNA-720 (Verhältnis: 1,8), miR-195 (Verhältnis: 1,7) und miR-136 (Verhältnis: 1,6) in Wobbler-Tieren eine deutlich geringere Expression. Derzeit werden diese Experimente mit weiteren biologischen Replikaten wiederholt, um die Ergebnisse zu bestätigen. Welche Funktionen mit regulierten miRNAs assoziiert sind, soll durch weiterführende Analysen erforscht werden.

4.5 Charakterisierung der Expression und Funktion der miRNA-138

Im Rahmen dieses Projektes sollten die Expression der miR-138 sowie deren Funktion genauer analysiert werden. Es wurden unterschiedliche Fragestellungen und Aufgaben in mehreren Arbeitsgruppen bearbeitet.

4.5.1 Erzeugung einer Mauslinie mit einem Null-Allel für miRNA-138

Um die Funktion dieser miRNA zu ermitteln, wurden in Bielefeld Zielgen-Vorhersagen für diese miRNA durchgeführt. Die Reporter-Assays sowie eine genauere Expressionsanalyse wurden in der Arbeitsgruppe von Javier Martinez am IMBA in Wien durchgeführt. Diese Vorgehensweise reicht jedoch nicht aus, um das ganze Wirkungsspektrum dieser miRNA zu erfassen. Daher sollte eine Mauslinie erzeugt werden, in der diese miRNA ausgeschaltet ist. Die Strategie und der entsprechende Vektor wurden in Bielefeld von Dr. Carsten Drepper und mir entwickelt und umgesetzt.

In der miRNA-Datenbank Rfam sind zwei miRNA-138 Gene aufgeführt, wobei diese sich lediglich im Primärtranskript bzw. Precursor unterscheiden. Die Expressionanalyse von Gregor Obernosterer (Obernosterer *et al.* 2006) zeigte jedoch, dass in allen untersuchten Gewebeproben nur die miRNA-138-2 exprimiert ist. Diese sollte mit Hilfe der *Replacement*-Strategie ausgeschaltet werden. Durch zwei homologe Rekombinationsereignisse kann ein bestimmter genomischer Bereich gegen eine andere Sequenz ausgetauscht oder einfach entfernt werden. Hier sollte das Gen miR-138-2 gegen ein Neomycinresistenzgen als Selektionsmarker ausgetauscht werden (siehe Abbildung 4-14 A). Hierzu wurde die Neomycinresistenzkassette über das Restriktionsenzym *ClaI* aus dem Vektor: #579 pFloxPGKneo minus *SacI* (erhalten von Prof. Dr. Ernst Martin Füchtbauer, Universität Aarhus, Dänemark) mobilisiert und über die gleiche Schnittstelle in den Vektor pBS-SK kloniert (pBSpGKneo-). Anschließend wurden vor und hinter der Resistenzkassette zwei ca. 3kb große homologe Bereiche kloniert, die das miR-138-2-Gen flankieren. Der Arm, der stromaufwärts der miRNA-138-2 liegt, wurde mit Expand Long Template PCR System und mit den Primern 138_up_a 138_up_b amplifiziert. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *KpnI* und *ApaI* war eine gerichtet Klonierung in den Vektor pBSpGKneo- möglich. In diesen wurde über die Schnittstelle *SacII* der stromabwärts liegende Arm, amplifiziert mit den Primern 138_do_a und 138_do_b, kloniert. Die richtige Orientierung und die Qualität der homologen Arme sowie der Resistenzkassette wurden mittels Sequenzierung überprüft. Damit eine Integration durch homologe Rekombinationen erfolgen kann, muss der Vektor im Rückgrat linearisiert werden, was durch das Enzym *PvuI* möglich war. Durch die jeweilige Rekombination der homologen Arme sollten 113 Nukleotide, welche die miRNA-138-2 beinhalten, gegen die Neomycinresistenzkassette

ausgetauscht werden. Damit die Resistenzkassette nicht mit dem Promotor der miRNA wechseltwirkt, wurde der Vektor so konstruiert, dass die Resistenzkassette nach der Integration in entgegengesetzter Orientierung zum miRNA Promotor liegt. Die Transformation in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurde in Dänemark, in der Arbeitsgruppe von Dr. Ernst Martin Füchtbauer, durchgeführt. Um nach der Neomycinselektion ortsspezifische von unspezifischen Integrationsereignissen unterscheiden zu können, wurden Southern-Blot Experimente durchgeführt.

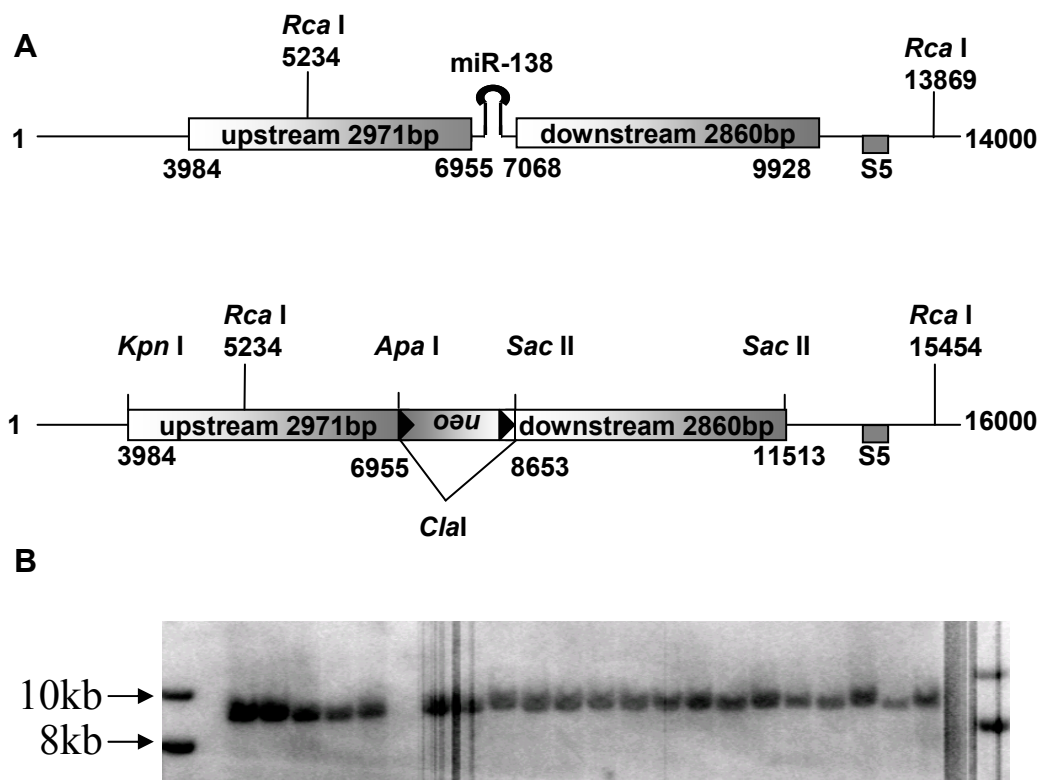


Abbildung 4-14 Erzeugung einer Mauslinie mit einem Null-Allel für die miR-138-2: **A)** Schematische Darstellung der chromosomalen Region des Gens miR-138-2 (Chr.8; 97206475:97220475) vor (oben) und nach (unten) erfolgreicher ortsspezifischer Integration des *Replacement*-Vektors. Die homologen Arme, die für die Konstruktion des KO-Vektors eingesetzt wurden, sowie deren Größe sind als Balken dargestellt. Die Sequenz der Sonde für Southern-Blot-Experimente ist mit S5 bezeichnet. Die Zahlen markieren relative Positionen innerhalb der 14kb großen Region. **B)** Exemplarische Darstellung von einem Southern-Blot-Experiment von ausgewählten ES-Zell-Klonen. Ca.10 μ g DNA ausgewählter ES-Zell-Klone wurden mit dem Enzym *RcaI* geschnitten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und mit der radioaktiv markierten Sonde S5 hybridisiert. Zu sehen sind die ca. 8,6 kb großen Wildtyp-Banden, sowie flankierend Größenmarker-Banden.

Klone deren Experiment zweifelhafte Ergebnisse hervorbrachten, wurden in Bielefeld erneut analysiert. Hierzu wurden ca. 5-10 μ g genomische DNA eines ES-Zell-Klons mit dem Enzym *RcaI* gespalten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf

eine Membran transferiert. Anschließend wurde der Southern-Blot mit einer spezifischen und radioaktiv markierten Sonde (S5) für eine Hybridisierung inkubiert. Wildtypallele zeigten ein Signal bei einer Bandengröße von ca. 8,6kb. Klone, bei denen eine ortsspezifische Integration erfolgte, sollten ein Wildtypallel sowie ein Null-Allel für die miRNA-138-2 aufweisen, und somit ein Signal bei 8,6kb und ein zweites bei 10,3kb zeigen (Abbildung 4-14 B).

Die zusätzlich in Bielefeld getesteten ES-Zell-Klone zeigten keine positiven Signale bei 10,3kb. Zukünftig sollen jedoch weitere ES-Zell-Klone getestet werden. Mit soll dann versucht werden, über eine Morulaaggregation chimäre Tiere zu erhalten, mit Hilfe derer die gewünschte 138-2-Null-Allel-Linie erzeugt werden kann.

4.5.2 Reannotation der exakten miRNA-138 Sequenz

Im Rahmen einer Kreuzspezies-Sequenzanalyse des miR-138-2 Precursors mit Hilfe des Programms *in silico Dicer* fiel Dr. Marc Rehmsmeier auf, dass ein Nukleotid stromaufwärts der annotierten reifen miRNA in 11 untersuchten Precursorsequenzen unterschiedlicher Spezies konserviert ist (siehe Abbildung 4-15). Die Nukleotide am 5'-Ende der miRNA bilden den *seed*, und dieser ist einer der maßgeblichen Suchparameter derzeitiger anerkannter Vorhersagealgorithmen für miRNA Targets. Aus diesen Gründen sollte ich mit Hilfe molekularbiologischer Methoden überprüfen, ob dieses konservierte Nukleotid auch in reifen miRNAs wiederzufinden ist. Dieses würde nach der klassischen Suchbeschreibung eine völlig andere Vorhersage an Zielgenen bedeuten. Um dieser Frage nachzugehen, sollte die miRNA-138 aus Geweben isoliert, kloniert und sequenziert werden. Hierfür wurden zwei RNA-Proben von der Arbeitsgruppe von Javier Martinez verwendet. Bei diesen Proben handelte es sich um isolierte RNA aus dem Gehirn adulter Mäuse sowie aus fötaler Leber. In diesen Proben war die miRNA-138 bereits durch ein Northern-Blot-Experiment nachgewiesen worden (Obernosterer *et al.* 2006). Anschließend wurde eine 5'RACE mit Hilfe einer Adapterligation durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.7.2). Zunächst wurde der Adapter unspezifisch an das phosphorylierte Ende der RNAs einer Gesamt-RNA-Probe ligiert. Anschließend wurde mittels reverser Transkriptase und einem miR138-2 spezifischen Primer (5r-miR138-outer) cDNA generiert und danach die miR138-2 mittels zwei Amplifikationen angereichert (Primer: 5'RACE-ligation-Outer und 5r-miR138-outer; 2. 5'RACE-ligation-Inner und 5r-miR138-inner). Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt, in den Vektor pJet1 kloniert und sequenziert. Alle sequenzierten

positiven Klone zeigten jedoch die annotierte 5' Sequenz und waren nicht um das konservierte Nukleotid verlängert.

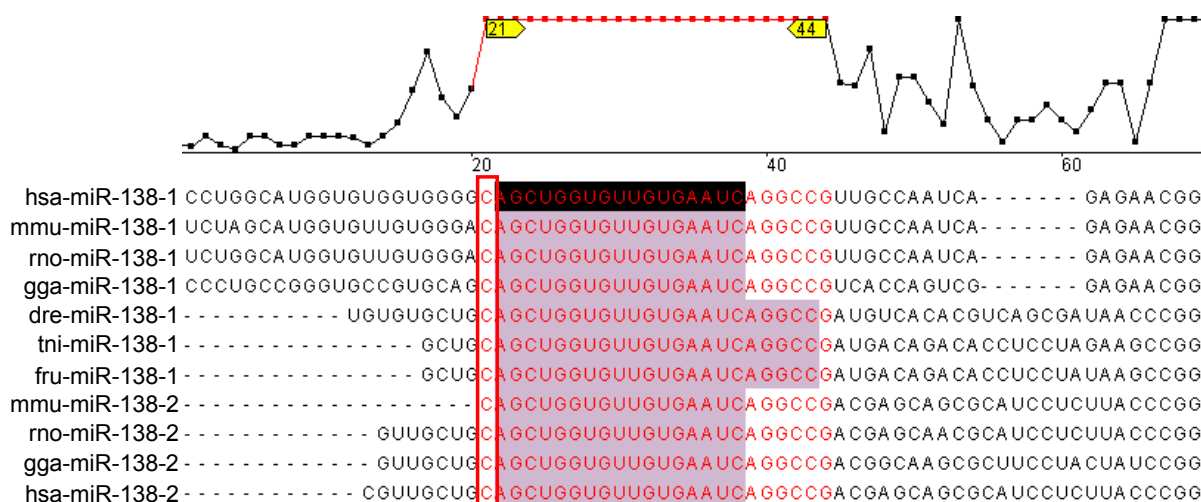


Abbildung 4-15 Grafische Darstellung des Alignments annotierter miRNA-138 precursor mit Hilfe des Programms InSilicoDicer: konservierte Nukleotide zwischen den Spezies Mensch (hsa), Maus (mmu), Ratte (rno), Zebrafisch (dre), Huhn (gga), Tetraodon (tni) und Kugelfisch (fru) sind in rot markiert. Als reife miRNAs annotierte Sequenzen sind blau unterlegt. Die Position des hoch konservierten Cytidins ist rot umrahmt.

Die durchgeführte Analyse zeigte, dass das hoch konservierte Cytidin in den untersuchten Proben nicht in der reifen miRNA vorkommt. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass in anderen Geweben oder Entwicklungsstadien eine alternative Prozessierung des miRNA-Primärtranskriptes stattfindet und dort das Cytidin das 5'-Ende der reifen miRNA bildet.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten sechs neue miRNA-Zielgen-Interaktionen validiert werden. Gleichzeitig zeigen die Resultate, dass eine kombinierte Suche von Hybridisierungsstrukturen der drei Kategorien sinnvoll ist, wobei immer mindestens ein „klassischer“ *seed* gefordert wird.

Es konnte gezeigt werden, dass die miR-17-3p auch das native Zielgen negativ regulieren kann, und dass die vorhergesagte Zielsequenz mit der miRNA interagiert, und nicht mit anderen Primär- oder Sekundärstrukturelementen. Weiterhin konnte eine negative Korrelation der verstärkten Vimentinexpression und der miRNA-Expression in Wobbler-Tieren hergestellt werden, was ein guter Hinweis auf eine Beteiligung der miR-17-3p an der Vimentinregulation ist. Gleichzeitig konnte aber die Akkumulation von Vimentin als Ursache für die Degeneration der Motoneuronen ausgeschlossen werden. Mit Hilfe des erstellten vergleichenden miRNA-Expressionsprofils zwischen dem Rückenmark von Wobbler- und Wildtyp-Tieren konnte ein völlig neuer Einblick in die Pathologie der Erkrankung gewonnen werden. Am Ende dieses Kapitels werde ich mit Hinblick auf die Ursache für die Degeneration der Motoneurone neue interessante Zusammenhänge darstellen und diskutieren.

5.1 miRNA-Zielgenvorhersage

Das Programm RNAhybrid ist ein Algorithmus zur Vorhersage von miRNA-Zielgenen (Rehmsmeier *et al.*, 2004). Hierbei legt der Benutzer in einem ersten Schritt die Suchparameter, wie z.B. das Vorhandensein eines *seeds*, fest. Anschließend sucht das Programm in den zu analysierenden Sequenzen nach energetisch günstigen Hybridisierungsstellen, welche die eingestellten Anforderungen erfüllen. Die Bewertung für das Finden einer oder mehrerer Zielsequenzen für eine miRNA in einem 3'UTR erfolgt nach statistischen Gesichtspunkten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch die Etablierung einer Plattform zur systematischen laborexperimentellen Validierung von miRNA-Zielgen-Interaktionen gezeigt werden, ob das Programm Zielgene *de novo* richtig vorhersagt.

5.1.1 Verbesserung der Sequenzdatenqualität zur Steigerung der Spezifität und Sensitivität der Zielgenvorhersage

Die Sequenzen der miRNAs der Spezies Mensch, Maus und Ratte wurden für die Vorhersagen der Datenbank Rfam entnommen und lokal in Dateien gespeichert. MicroRNAs sind zeitlich und räumlich unterschiedlich exprimiert, und Nachweise von miRNAs durch z.B. Klonierungen oder Northern-Blot-Experimente erfolgten in den drei Organismen in zum Teil unterschiedlichen Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Dostie *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2005; Suh *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Poy *et al.*, 2004). Daher wurde von uns überprüft, ob eine miRNA in jeder miRNA-Datei der drei Spezies vorkam. War das nicht der Fall wurde die entsprechende Datei um die fehlende miRNA ergänzt, so dass die Vorhersage von miRNA-Zielgenen in jeder Spezies mit den gleichen miRNAs vorgenommen werden konnte. Dieser Schritt war wichtig, da bei der Signifikanzberechnung im Orthologie-Vergleich der Vorhersage die Konservierung von Zielgenen in unterschiedlichen Spezies berücksichtigt und positiv bewertet wurde. Führt man diesen Schritt nicht durch, kann eine miRNA in einer der Dateien fehlen, und in dieser Spezies kann kein Zielgen für diese miRNA gefunden werden. Somit geht ein Konservierungs-Signal ggf. verloren. Durch die Erzeugung von homogenen Datensätzen wird dieser Fehler vermieden. Im Allgemeinen wird angenommen, dass miRNAs in nahe verwandten Spezies meist hoch konserviert sind (Griffith-Jones 2006; Hertel *et al.*, 2006; Berezikov *et al.*, 2005), wodurch unsere Vorgehensweise gerechtfertigt wird. Auf der anderen Seite treten immer mehr Hinweise auf, dass die Anzahl an speziesspezifischen miRNAs höher ist als man erwarten hat (Berezikov *et al.*, 2006). So konnte durch ein vergleichendes Hochdurchsatz-miRNA-Sequenzierprojekt zwischen dem Gehirn von einem Schimpansen und einem Menschen gezeigt werden, dass 1% der miRNAs für den Menschen spezifisch sind. Die stetige Verbesserung der Rfam-miRNA-Datenbank mit neuen Daten wird dabei helfen, zukünftig alle miRNAs einer Spezies erfassen zu können, um auf die oben aufgeführten miRNA-Daten-Abgleiche verzichten zu können.

Ein weiteres Problem stellte die Qualität der 3'UTR-Sequenzen dar, da diese bei vielen Genen der drei Spezies nicht annotiert sind. Trat ein solcher Fall auf, so wurde der 3'UTR von dem Stopp-Codon bis zu einem Polyadenylierungssignal generiert. Durch diesen Schritt konnte die Qualität der Vorhersage stark verbessert werden.

Bevor die Daten wie beschrieben bereinigt wurden, wurde bei einem Gen, dessen 3'UTR nicht annotiert ist, 2kb Sequenz stromabwärts des Stopp-Codons extrahiert und als 3'UTR dieses Gen verwendet. Durch diese hypothetischen 3'UTRs wurden häufig Zielsequenzen vorhergesagt, die in repetitiven, wahrscheinlich nicht transkribierten Bereichen lagen. Nach der Qualitätsverbesserung wurden diese repetitiven Zielsequenzen nicht mehr beobachtet. Somit konnte die Vorhersage durch die Verbesserung der Datenbank optimiert werden. Zwar ist nicht klar, ob die künstliche Generierung der 3'UTRs die Situation in der Zelle richtig widerspiegelt, jedoch ist es eine Näherung und die offensichtlich falsch-positiven Signale wurden unterbunden.

5.1.2 Validierung von miRNA-Zielgen-Interaktionen der Kategorie „klassische Vorhersage“

In dieser Arbeit konnte das Dual-Luziferase-Reportersystem eingesetzt werden, um die posttranskriptionelle negative regulatorische Wirkung von bestimmten miRNAs auf ihre vorhergesagten Zielgene nachzuweisen. Das System wurde so konfiguriert, dass es eine Plattform zur systematischen Analyse von miRNA-Zielgen-Interaktionen bot. Generell wurde die humane und die murine 3'UTR-Sequenz getestet, um die Aussagekraft der Experimente zu erhöhen, bzw um bei nicht eindeutigen Fällen eine bessere Bewertungsgrundlage zu haben. Da bekannt war, dass ein *seed* in vielen Fällen ein wichtiger Bestandteil der Hybridisierungsstruktur ist, wurde zunächst eine Vorhersage gemacht, die *seeds* verlangt und dabei G:U Basenpaarungen unterbindet. Es wurden sieben Gene aus der Vorhersage getestet, die signifikante Zielsequenzen in mindestens zwei von drei Spezies zeigten. Es konnte gezeigt werden, dass die 3'UTR Sequenzen der Gene *Vim*, *Isl2*, *Plk2*, *Mapk7*, und *Ptdsr* zu einer signifikant verringerten Reporteraktivität führten, wenn die entsprechende miRNA cotransfiziert wurde. Durch die stringenten Kontrollen und Normalisierungsschritte konnten die erhaltenen Ergebnisse direkt auf einen Einfluss der miRNA auf die 3'UTR-Sequenz, die in den Reportervektor kloniert wurde, zurückgeführt werden. Sekundäre Effekte, die sich in der Reporterogenaktivität widerspiegeln könnten, wie die Wirkung der miRNA auf endogene Gene, die Beeinflussung der Reportergentranskription oder der Einfluss auf den 3'UTR des unmodifizierten Reportergens, wurden durch die Normalisierungsschritte herausgefiltert.

Das Gen *Ptdsr* zeigte bei der Mausequenz eine Inhibierung mit einem Verhältnis von $0,61 \pm 0,04$. Die humane 3'UTR-Sequenz führte hingegen zu einem Verhältnis von $1,31 \pm 0,192$. Diese Diskrepanz liegt wahrscheinlich in dem großen Unterschied der 3'UTRs begründet. Der murine 3'UTR ist mit 199bp annotiert, während der humane 3'UTR mit 3849bp annotiert ist und vier „klassische“ Zielsequenzen für die Kontroll-RNA (siEGFP; Krek *et al.*, 2005) trägt. Die Kontroll-RNA hat auf die humane 3'UTR-Sequenz offensichtlich einen stärkeren Einfluss als die miR-96. Die Position im 3'UTR und die Hybridisierungsstruktur sind sehr ähnlich, so dass man bei der Verwendung anderer Kontroll-RNAs einen ähnlichen inhibitorischer Effekt erwarten kann, wie im Fall der murinen 3'UTR-Sequenz.

Das Gen *Trpc3* zeigte in dem Reporter-Assay trotz der nahezu perfekten Hybridisierungsstruktur (siehe Abbildung 5-1 A und B oben) nur einen schwachen Effekt. Eine Erklärung für das Ausbleiben eines inhibitorischen Effekts ist die stabile Sekundärstruktur der 3'UTR-Sequenz im Bereich der Zielsequenz (siehe Abbildung 5-1 A und B unten). Aktuelle Studien geben den Hinweis, dass eine stabile intramolekulare Struktur die Zugänglichkeit für das miRNP wahrscheinlich stark beeinträchtigt und die negative Regulation in verringertem Maße erfolgt oder ausbleibt (Robins *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2007; G. Obernosterer).

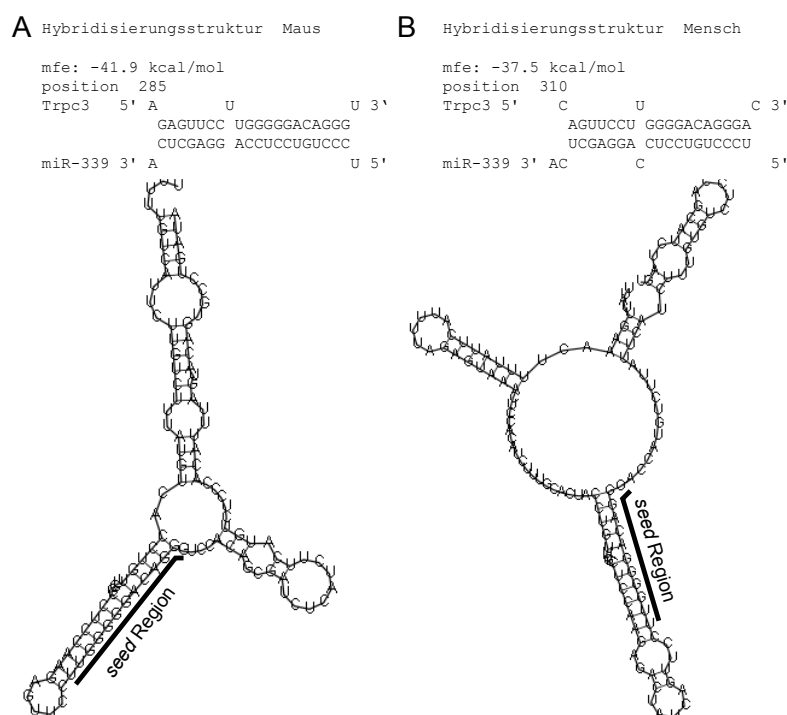


Abbildung 5-1 Die lokale intramolekulare Sekundärstruktur im Bereich der Zielsequenz erschwert oder verhindert die Bindung des miRNPs: **A)** Hybridisierungsstruktur der miR-339 mit der murinen 3'UTR-Sequenz des Gens *Trpc3* (oben). Lokale intramolekulare RNA-Faltung der 3'UTR-Sequenz im Bereich der Zielsequenz des murinen Zielgens *Trpc3* mit dem Programm RNAfold (unten). **B)** Gleiche Analyse wie in A mit der humanen Sequenz.

Weiterhin zeigte die miR-143 keinen Einfluss auf die 3'UTR-Sequenz des Gens *Arhgef1*. Die Sekundärstruktur der mRNA blockiert in diesem Fall die *seed*-Region nicht so ausgeprägt wie im Fall von *Trpc3*, jedoch finden sich auch hier keine Abfolgen von vier oder mehr ungepaarten Basen und somit könnte auch hier die intramolekulare Sekundärstruktur die Bindung des miRNPs unterbinden. Diese zusätzlichen Sekundärstruktur-Analysen könnten zukünftig helfen, die Spezifität der Vorhersagen zu erhöhen. Auf der anderen Seite kann man nicht davon ausgehen, dass die Sekundärstrukturvorhersagen den Zustand in der Zelle immer richtig darstellen, da sie mögliche Bindungen von Proteinen, welche somit einige Nukleotide für eine Basenpaarung blockieren, völlig unberücksichtigt lassen (Long *et al.*, 2007). Somit bleibt zu klären, wie stark sich die Spezifität der miRNA-Zielgen-Vorhersagen durch die Berücksichtigung der Sekundärstruktur verbessern lässt.

Die Analyse der Zielsequenzen von *Pms2* und *Ampd3*, die in einem Sequenzalignment nicht konserviert sind, führte nicht zu einer starken Reduktion der Reporteraktivität. Die Sekundärstruktur der jeweiligen Zielsequenz weist in der *seed*-Region zwar keinen ungepaarten Bereich von ca. vier Nukleotiden auf, jedoch ist die Sekundärstruktur der Zielsequenz auch hier insgesamt bei weitem nicht so ausgeprägt wie im Fall *Trpc3*. Somit könnte die Konservierung der Zielsequenzen eine signifikantere Bedeutung haben als ursprünglich von uns angenommen. Interessanterweise waren diese beiden Gene die einzigen unter den besten 50 Treffern dieser Kategorie, bei denen die Zielsequenzen nicht in einem Alignment konserviert waren, obwohl der Algorithmus dieses weder negativ noch positiv bewertet und die orthologen 3'UTR-Sequenzen meist nur im Bereich der Zielsequenz hoch konserviert waren. Dies ist ein Hinweis, dass ein funktionales Sequenzelement nicht nur aufgrund seiner Konservierung in einem Alignment identifiziert werden kann, sondern im Fall der Bewertung von miRNA-Zielsequenzen auch durch eine Signifikanzberechnung der Energie einer Hybridisierungsstruktur.

Das Verhältnis von $1,53 \pm 0,24$ der relativen Luziferaseaktivität bei der Sequenz des murinen 3'UTR von *Pms2* kann auch hier durch drei klassische Zielsequenzen für die Kontroll-RNA erklärt werden.

Insgesamt wurden in dieser Klasse im Rahmen dieser Arbeit fünf neue Zielgene für miRNAs nachgewiesen.

5.1.3 Validierung von miRNA-Zielgen-Interaktionen der Kategorien „G:U zulassen“ und „freie Vorhersage“

In den Studien der Arbeitsgruppen von Artemis Hatzigeorgiou und vor allem von Steve Cohen konnte gezeigt werden, dass G:U-Basenpaarungen innerhalb des *seeds* bekannter Zielsequenzen den inhibitorischen Effekt verringern, aber dennoch zu einer signifikanten Inhibierung der Translation führen (Brennecke *et al.*, 2005; Kiriakidou *et al.*, 2004; Yekta *et al.*, 2004). Ebenso wurde gezeigt, dass das Fehlen eines vollständigen *seeds* zu einer signifikanten Inhibierung führen kann (Brennecke *et al.*, 2005; Kiriakidou *et al.*, 2004; Vella *et al.*, 2005), wahrscheinlich aber nur, wenn gleichzeitig der 3'-Bereich der miRNA eine starke Bindung mit der Zielsequenz eingeht (Brennecke *et al.*, 2005). Diese Beobachtungen sollten in der Vorhersage berücksichtigt werden und so wurde durch Dr. Marc Rehmsmeier ein Vorhersage durchgeführt, die keine Strukturanforderung vorgibt. Es wurden zwei weitere separate Vorhersagen durchgeführt. In einer Vorhersage wurde ein *seed* gefordert, G:U-Basenpaarungen innerhalb des *seeds* aber zugelassen. Hierbei wurden „klassische *seeds*“ allerdings nicht ausgeschlossen, so dass es zu Überlappungen mit der „klassischen Vorhersage“ kommen konnte. *Plk2* und *Trpc3* traten z.B. in beiden Vorhersagen unter den 50 signifikantesten Zielgenen auf. Bei der zweiten Vorhersage wurden keine strukturellen Anforderungen gestellt. Auch hier kam es zu Überlappungen mit anderen Vorhersagen, so befand sich die Interaktion mit dem Zielgen *Trpc3* und dem bereits validierten Zielgen *Hoxb8* (Yekta *et al.*, 2004) unter den 50 signifikantesten Treffern.

In der Kategorie „freie Vorhersage“ wurden die murine und die humane 3'UTR-Sequenz von sechs Zielgenen auf eine Interaktion hin analysiert. Jedoch konnte bei keinem Zielgen eine signifikante Inhibierung beider Spezies nachgewiesen werden. Hierfür sind viele Gründe denkbar. Die 3'UTR-Sequenz des Gens *Nnat* besitzt z.B. in beiden Spezies keine *seeds* für die miR-151* und zeigte im Reporter-Assay nur für die humane Sequenz einen schwachen Effekt (Maus: $1,04 \pm 0,082$; Mensch: $0,90 \pm 0,054$). Auf der anderen Seite weist die Kontroll-RNA in der Mausequenz einen klassischen *seed* und einen mit G:U Basenpaarungen auf, und in der humanen Sequenz zwei *seeds* mit G:U-Basenpaarungen. Entweder wird ein schwacher inhibitorischer Effekt, der durch die miR-151* herbeigeführt wird, durch einen möglichen Effekt der Kontroll-RNA kompensiert, oder die miR-151* und auch die Kontroll-RNA bewirken keinen starken Effekt. Im letzteren Fall wäre *Nnat* kein

Zielgen für die miR-151*. Bei einer gleichartigen Analyse der anderen untersuchten 3'UTR-Sequenzen kommt man zu dem Ergebnis, dass nach derzeitigem Kenntnisstand ein schwacher Einfluss der Kontroll-RNA bei keiner der untersuchten 3'UTR-Sequenzen ausgeschlossen werden kann. In dieser Klasse führt keine der vorhergesagten Interaktionen zu einem Effekt in beiden Spezies, so dass die Suchparameter hier noch einmal überarbeitet werden müssen. Man könnte z.B. die Anzahl an ungepaarten Basen beschränken. Oder man führt eine kombinatorische Suche durch, bei der in einer 3'UTR-Sequenz mindestens ein *seed* gefordert wird, zusätzlich „freie“ Zielsequenzen aber dazu beitragen, das statistische Signal zu verstärken.

Aus der Kategorie „G:U-zulassen“ wurden vier Gene getestet, wovon das Gen *FutIV* bei beiden Spezies eine deutliche Inhibierung aufwies. Da die Sequenzen jedoch auch klassische *seeds* ausbilden können, kann der inhibitorische Effekt nicht eindeutig auf eine Zielsequenz zurückgeführt werden, die keinen klassischen *seed* hat. Auch hier sind zumindest die „klassischen“ *seed*-Sequenzen in einem Alignment zwischen Mensch und Maus konserviert.

Die humane 3'UTR-Sequenz des Gens *Sfrp4* zeigt eine signifikante und mit einem relativen Wert von $0,74 \pm 0,066$ deutliche Inhibierung. Dagegen führt die murine Sequenz nicht zu einem inhibitorischen Effekt der miRNA, obwohl die Hybridisierungsstruktur nahezu gleich ist und im Alignment auch konserviert ist. Erst die Analyse der Sekundärstruktur der 3'UTR-Sequenz gibt einen Hinweis für den Unterschied (siehe Abbildung 5-2 A und B). In der Sekundärstruktur des humanen 3'UTRs weist die *seed*-Zielsequenz und auch der 5'-Bereich der Zielsequenz mehr ungepaarte Nukleotide auf und ist somit für die miRNA wahrscheinlich zugänglicher als es bei der murinen Struktur der Fall ist. Die humane 3'UTR-Sequenz kann mit der miR-453 keinen klassischen *seed* ausbilden, so dass der inhibitorische Effekt auf eine Interaktion durch eine *seed*-Sequenz der Kategorie „G:U-zulassen“ oder sogar einer Hybridisierungsstruktur der Kategorie „freie-Vorhersage“ zurückgeführt werden kann.

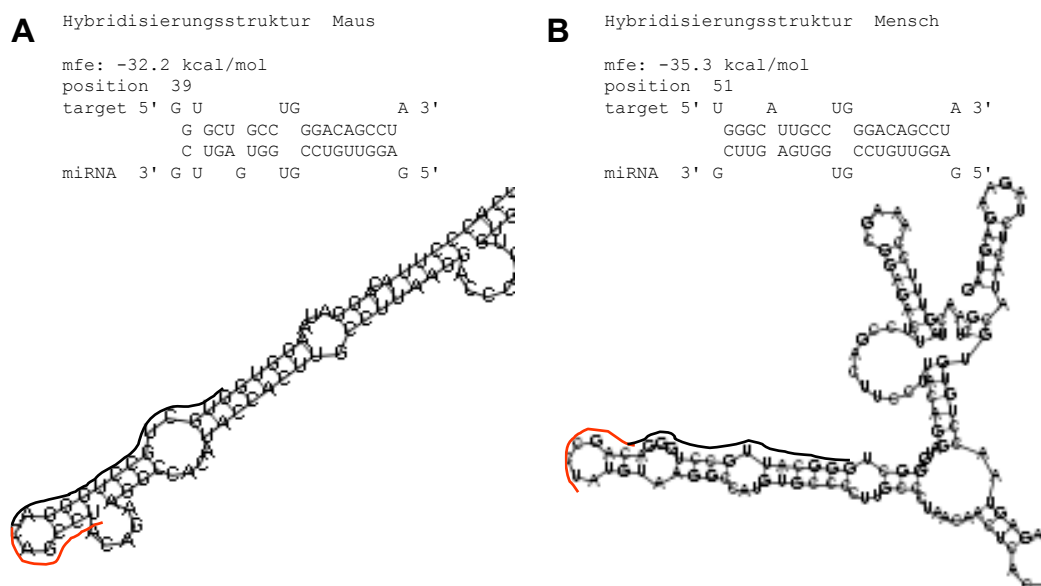


Abbildung 5-2 Die lokale intramolekulare Sekundärstruktur der murinen und humanen 3'UTR-Sequenz und die Hybridisierungsstruktur der Zielsequenz mit der miR-453: A) Hybridisierungsstruktur der miR-453 mit der murinen 3'UTR-Sequenz des Gens *Sfrp4* (oben). Lokale intramolekulare RNA-Faltung der 3'UTR-Sequenz im Bereich der Zielsequenz des murinen Zielgens *Sfrp4* mit dem Programm RNAfold (unten). Die *seed*-Region ist rot markiert, der übrige Teil der Hybridisierungsstruktur ist schwarz markiert **B)** Gleiche Analyse wie in A mit der humanen Sequenz.

Insgesamt kann man festhalten, dass die Effektivität bei der Vorhersage dieser beiden Kategorien schlechter zu sein scheint als bei der „klassischen Vorhersage“. Wie man jedoch anhand der Interaktion von *FutIV* mit miR-412 sehen kann, ist eine solche Vorhersage durch das Programm dennoch sinnvoll, da diese Interaktion in den anderen Kategorien nicht vorhergesagt wird. Eine Möglichkeit wäre, eine weitere Kategorie einzuführen, bei der man G:U-Basenpaarungen erlaubt, jedoch mindestens eine Zielsequenz mit klassischem *seed* fordert.

5.1.4 Bewertung der Daten und des Testsystems

Es sollte eine systematische Plattform zur Validierung von miRNA-Zielgenen etabliert werden, mit Hilfe dessen das Testen vieler miRNA Zielgene praktikabel ist. Das vorgestellte System kann diese Anforderungen zum größten Teil erfüllen. Jedoch wurde auch deutlich, dass das Fehlen eines inhibitorischen Effekts nicht zweifelsfrei den Schluss zulässt, dass die miRNA keinen inhibitorischen Effekt hat, da auch die Kontroll-RNA einen Effekt auf die Zielsequenz haben kann. Bei dem derzeitigen Kenntnisstand über die Anforderungen an miRNA-Zielsequenzen lassen sich jedoch

kaum Kontroll-RNAs generieren, bei denen man einen Einfluss auf eine bestimmte Sequenz zu 100% ausschließen kann. Die gleichzeitige Nutzung mehrerer unterschiedlicher Kontroll-RNAs könnte Abhilfe bei diesem Problem schaffen. Wissenschaftler der Firma Dharmacon konnten zeigen, dass die Nutzung von heterogenen siRNA-Gemischen die Anzahl und die Intensität von *Off-Target*-Effekten reduziert (Reynolds *et al.*, 2004). Interessiert man sich für eine spezielle Zielsequenz, kann man diese separat in den 3'UTR des Reportergens klonieren. Diese Methode alleine ist jedoch auch nicht ausreichend, da die Zielsequenz ohne den nativen Sequenz-Kontext, in erster Linie hinsichtlich der Änderung der Sekundärstruktur, betrachtet wird, was zu falschen Ergebnissen führen kann (Long *et al.*, 2007; Didiano *et al.*, 2006; Robins *et al.*, 2005). Das gleiche Argument gilt für die Mutation einzelner Basen, um die Zielsequenz zu degenerieren.

Die Stärke der Regulation, die mit dem vorgestellten System gemessen wurde, spiegelt quantitativ wahrscheinlich nicht die Situation im Organismus wider, da der Grad des Effekts von mehreren Faktoren abhängt. Zwar bewirkt man durch die Transfektion der miRNA-Duplex eine künstliche Überexpression der miRNA, ändert dabei aber nicht die Menge der RISC-Komponenten, so dass die Erhöhung der miRNPs mit der gewünschten miRNA geringer ausfällt als erwartet. Gleichzeitig spielt das Verhältnis der Konzentration von miRNP zum Zielgen eine Rolle. In dem Testsystem wird die Transkription des Reportergens über den recht starken Thymidin-Kinase-Promotor gesteuert. Wird das Zielgen normalerweise recht schwach exprimiert, wirkt sich der regulatorische Effekt auf die Gesamtproteinmenge drastischer aus. Ebenso spielt nicht nur die Konzentration des untersuchten Zielgens eine Rolle, sondern auch die Konzentration weiterer Zielgene, d.h. wenn in einer Zelle viele Zielgene für eine bestimmte miRNA exprimiert werden, dann teilen sich die miRNPs auf mehrere Ziel-mRNAs auf und der Effekt wird abgeschwächt.

Weiterhin können in den hier verwendeten Neuro2a-Zellen endogene miRNAs exprimiert sein, die ebenfalls einen Effekt auf die untersuchte 3'UTR-Sequenz haben.

Ebenso können systematische Analyse-Methoden keine Auskunft über die tatsächliche Funktion einer Interaktion in einem Organismus geben. So kann auch ein beobachteter starker inhibitorischer Effekt bei einem *neutral-target* nachgewiesen worden sein, d.h. der Organismus besitzt im Hinblick auf die Abundanz des Proteins eine hohe Toleranz (siehe 5.2.2). Auf der anderen Seite kann eine geringe

stöchiometrische Änderung von z.B. Protein-Dimeren bei Signalkaskaden zu einem nachhaltigen Effekt in einer Zelle führen (siehe 5.2.3). Ebenso kann eine kooperative Wirkung mehrerer miRNAs zu einem Übergang von einem *neutral-target* zu einem *switch-target* führen.

Der Nachweis eines negativen regulatorischen Effekts der miRNA lässt sich mit dem hier beschriebenen System jedoch sehr gut auf die untersuchte Zielgen-UTR-Sequenz zurückführen. Und gerade wegen der oben beschriebenen Unwägbarkeiten geben die Daten der validierten Interaktionen einen starken Hinweis, dass eine miRNA auch an ihrem eigentlichen Wirkungsort zu einer Regulation des untersuchten Gens führt, sofern miRNA und Zielgen räumlich und zeitlich gleich exprimiert werden. Letztendlich können jedoch nur detaillierte, aufwendige und für jede Interaktion angepasste Experimente die Frage beantworten, ob es sich bei den validierten Interaktionen um *switch*-, *neutral*- oder *tuning*-targets handelt.

5.1.5 Evaluation des Algorithmus

Mit Hilfe der laborexperimentellen Validierungsexperimente konnte ich zeigen, dass der Algorithmus Interaktionen der Kategorie „klassisch“ erfolgreich vorhersagt. Drei weitere Zielgene einer miRNA wurden von unserem Kooperationspartner in Wien getestet (aus datenschutzrechtlichen Gründen Wien 1,2 und 3 benannt). Zwei davon zeigten einen sehr deutlichen negativen regulatorischen Effekt (pers. Mitteilung Gregor Obernosterer; Originaldaten nicht gezeigt). Nimmt man diese Ergebnisse zusammen mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten, so erreicht das Programm eine Spezifität von 70%. In Tabelle 5-1 sind die Ergebnisse qualitativ zusammengefasst. Ebenso wurden diese Daten mit den Ergebnissen der drei häufig verwendeten Vorhersageprogramme PicTar, miRANDA und TargetScan, die ihre aktuellsten Vorhersage-Ergebnisse in öffentlichen Datenbanken abgelegt haben, verglichen (PicTar: 17 vertebrate genomes (unpublished); miRANDA: Update Thu Oct 19 2006; TargetScan: Release 3.1 November 2006). Im vorherigen Kapitel wurde erläutert, dass das Ausbleiben einer negativen Regulation im Reporter-Assay nicht ausschließt, dass das untersuchte Gen im Organismus trotzdem von der entsprechenden miRNA reguliert werden kann. Dennoch wurden für den Vergleich auch diese Ergebnisse aufgeführt, da man grundsätzlich nicht davon ausgehen kann, dass diese Fehlbeurteilung in allen Fällen eintritt.

	klassisch									
	<i>Vim</i>	<i>Trpc3</i>	<i>Isl2</i>	<i>Plk2</i>	<i>Mapk7</i>	<i>Argh1</i>	<i>Ptdsr</i>	<i>Wien1</i>	<i>Wien2</i>	<i>Wien3</i>
validiert	ja	nein	ja	ja	ja	nein	ja	ja	ja	nein
RNAhybrid	grün	rot	grün	grün	grün	rot	grün	grün	grün	rot
miRANADA	grün	rot	grün	grün	grün	grün	grün	rot	rot	grün
PicTar	grün	rot	rot	grün	rot	grün	rot	grün	grün	grün
TargetScan	rot	rot	rot	grün	grün	grün	rot	rot	grün	grün

	G:Uzugelassen					frei				
	<i>FutIV</i>	<i>Clcn3</i>	<i>Pfkm</i>	<i>Sfrp4</i>	<i>Calcb</i>	<i>Nnat</i>	<i>Rgs4</i>	<i>Slc23a</i>	<i>Vti1a</i>	<i>Zic1</i>
validiert	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
RNAhybrid	grün	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot
miRANADA	grün	rot	rot	rot	grün	grün	grün	grün	grün	grün
PicTar	rot	N/A	grün	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	grün	grün
TargetScan	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot

Tabelle 5-1 Vergleich der Vorhersagen der Programme RNAhybrid, miRANADA, PicTar und TargetScan mit in dieser Arbeit validierten Interaktionen: Es sind alle in dieser Arbeit untersuchten Gene aufgeführt und weitere drei, die von unserem Kooperationspartner in Wien validiert wurden. Wurde im Reporter-Assay ein signifikanter inhibitorischer Effekt der miRNA auf die 3'UTR Sequenz des vorhergesagten Gens in beiden Spezies nachgewiesen, ist dieses mit „Ja“ bezeichnet. Das Ausbleiben einer Interaktion ist mit „nein“ bezeichnet. Anschließend wurden die Vorhersagen der Programme mit den Validierungsexperimenten verglichen. Die Aussage des Farbcodes bezieht sich auf die Validierungsexperimente und meint entweder, die Vorhersage war „wahr“ (grün), oder sie war „falsch“ (rot). So sagen z.B. alle vier Programme *Trpc3* als Zielgen für die miR-339 vorher, da die Interaktion im Reporter-Assay keinen Effekt erzielte, wird die Analyse der Programme als „falsch“ bewertet. Das Programm TargetScan verlangt zwar *seeds* und lässt keine G:U-Basenpaarungen zu, da das Gen *FutIV* aber auch „klassische“ *seeds* mit der miR-412 ermöglicht, wird dieses Gen bei der Bewertung dieses Programms auch berücksichtigt. Vorhersagen für die miR-432, miR-453, 515-3p, miR-151*, miR-489 und miR-520h stehen von dem Programm PicTar nicht zur Verfügung.

Wie man in Tabelle 5-1 erkennen kann, sagt keines der Programme alle Interaktionen vorher, die einen Effekt im Reporter-Assay hatten. Dieses Ergebnis ist überraschend, da die Programme miRANADA, PicTar und Targetscan meist mehrere hundert Zielgene für eine miRNA vorhersagen. Die Begründung ist in den meisten Fällen in der Qualität der 3'UTR-Sequenzalignments zu suchen.

Auf der anderen Seite wird aber auch deutlich, dass der derzeitige Kenntnisstand über die Anforderungen einer Zielsequenz nicht ausreichend ist, um falsch-positive Signale zu unterbinden. So zeigten die 3'UTR-Sequenzen des Gens *Trpc3* keine Inhibierung, wohingegen eine Interaktion von allen vier Programmen vorhergesagt wurde. Eine objektive Beurteilung der Programme hinsichtlich der falsch-negativ Rate und der falsch positiv Rate kann hier nicht getroffen werden, da nur von dem Programm RNAhybrid vorhergesagte Interaktionen getestet wurden, und die getesteten Interaktionen somit nicht unabhängig von den Vorhersagen sind. Generell zeigen die Ergebnisse jedoch eindeutig, dass keines der Programme eine Sensitivität

und eine Spezifität von 100% erreicht. Betrachtet man z.B. die Vorhersage der Interaktion für das Gen „Wien2“ - dieser Interaktion konnte mittlerweile eine konkrete Funktion im Organismus zugewiesen werden (pers. Mitteilung G. Schratt) - so sagt das Programm miRANDA diese Interaktion nicht vorher. Bei der Vorhersage durch das Programm TargetScan steht diese Interaktion an 69. Stelle des *Rankings* für diese miRNA, bei dem Programm PicTar sogar nur an 195. Stelle, wohingegen sie bei dem Programm RNAhybrid an 1. Stelle steht. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass das Programm RNAhybrid sehr wertvoll für die Vorhersage von miRNA-Zielgenen ist, zumindest für die Kategorie „klassische Vorhersage“.

5.1.6 Mögliche Funktionen der validierten Interaktionen

In diesem Kapitel sollen die biologischen Funktionen der validierten miRNA-vermittelten Regulationen diskutiert werden.

5.1.6.1 *Ptdsr*:miR-96

Ptdsr ist bei der Embryonalentwicklung wichtig. Mäuse, denen dieses Gen fehlt, zeigen während der Embryonalentwicklung eine Wachstumsstörung, und die Entwicklung der Leber, der Niere, der Lunge und des Darms ist gestört. Die meisten Tiere versterben aufgrund dieser schweren Schäden perinatal (Böse *et al.*, 2004). Es scheint ebenfalls bei der Makrophagen-vermittelten-Entfernung toter Zellen eine Rolle zu spielen (Fadok *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die miR-96 in ES-Zellen exprimiert wird (Houbaviy *et al.*, 2003). Somit könnte die miR-96 an der Feinregulierung von *Ptdsr* bei der Embryonalentwicklung beteiligt sein.

5.1.6.2 *FutIV*-miR-412

FutIV codiert für eine Fucosyltransferase und ist an der Aktivierung von Selektin-Liganden beteiligt, u.a. auch an der Modifikation von PSGL1, einem Liganden für P-Selektin (Zöllner und Vestweber 1996; Klaus Gossens pers. Mitteilung). Dieser Vorgang ist beim *homing* von Lymphozyten wichtig, also bei der Rückkehr von T-Zellen zur Milz oder zu den Lymphknoten. Die miR-412 wurde in embryonalem Gewebe entdeckt (Seitz *et al.*, 2004). Darüber hinaus sind in der Literatur keine offensichtlichen Hinweise über das Expressionsprofil dieser miRNA zu finden. *Gcnt3*, eine Glykosyltransferase, scheint ebenfalls beim *homing* von Lymphozyten beteiligt zu sein (Chen *et al.*, 2005), und ist auch ein vorhergesagtes Zielgen für die miR-412.

Diese Interaktionen geben einen Hinweis, dass die miR-412 bei der Regulierung des *homings* von Lymphozyten eine Rolle spielen.

5.1.6.3 *Mapk7*:miR-143

Mapk7, häufig auch *Erk-5* bezeichnet, ist durch Wachstumsfaktoren aktivierbar, und die hierdurch aktivierte Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Zell-Proliferation und der Zell-Differenzierung (Nishimoto und Nishida 2006). Die miR-143 ist während der Adipozyten-Differenzierung verstärkt exprimiert (Esau *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung dieser miRNA zu einer Erhöhung der Proteinmenge von MAPK7 führt (Esau *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde der Nachweis erbracht, dass die miRNA-143 direkt auf das Zielgen *Mapk7* wirkt und nicht über sekundäre Wege. Kürzlich wurden Studien veröffentlicht, die ebenfalls *Mapk7* als Zielgen miR-143 validieren (Akao *et al.*, 2007, Akao *et al.*, 2006). Gleichzeitig zeigen diese Studien, dass die miR-143 bei kolorektalen Tumorgeweben stark runterreguliert ist und als Tumormarker fungieren könnte.

5.1.6.4 *Isl2*:miR-375

Isl2 (*insulin gene enhancer 2*) ist ein Transkriptionsfaktor mit hoher Homologie zu *Isl1*. Beide spielen in der Entwicklung von Neuronen eine wichtige Rolle (Hutchinson und Eisen 2006). *Isl1* spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Inselzellen der Bauchspeicheldrüse (Ahlgren *et al.*, 1997). Es ist in allen endokrinen Zellen der Bauchspeicheldrüse exprimiert (Dong *et al.* 1991, Thor *et al.* 1991) und kann die Transkription des Insulin-Gens anschalten (Eeckhoute *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2005; Karlson 1990). Für *Isl2* fehlen detaillierte Analysen in der Bauchspeicheldrüse, es konnte jedoch gezeigt werden, dass es ebenfalls in Zellen des Pankreas exprimiert ist (Drognitz *et al.*, 2006). Aufgrund der hohen Homologie und der Konservierung der Domänenstruktur kann jedoch eine ähnliche Funktion wie für ISL1 angenommen werden. Mir-375 ist eine pankreasspezifische miRNA, welche die Insulinsekretion durch die Inhibierung des Zielgens *Mtpn* (Myotrophin) negativ reguliert (Poy *et al.*, 2004; Krek *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch *Isl2* negativ von der miR-375 reguliert wird. Diese Daten geben den Hinweis, dass die miR-375 den Insulinmetabolismus bzw. die Insulin-Biogenese gleichzeitig auf mehreren Ebenen reguliert und lassen die Vermutung zu, dass die

miR-375 einer der Hauptregulatoren der Insulinproduktion und –sekretion sein könnte.

5.1.6.5 Plk2:miR-27b

Plk2 wird während des Zellzyklus bei dem Übergang von der G₁- zur S-Phase aktiviert und bei der Centriolen-Duplikation benötigt (Warnke *et al.*, 2004). Auch wenn das Fehlen von PLK2 in *Knock-Out*-Mäusen anscheinend kompensiert wird und das postnatale Wachstum nicht beeinträchtigt wird, so zeigen embryonale Fibroblasten dieser Mäuse ein verlangsamtes Wachstum und einen verzögerten Eintritt in die S-Phase (Ma *et al.*, 2003). Ebenso wird Plk2 bei DNA-Schäden hochreguliert (Winkles und Alberts 2005). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Plk2 bei Brustkrebs stark exprimiert ist (Sayed *et al.*, 2006). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass die miR-27b bei humanen Brustkrebspatienten runterreguliert ist und ihr Zielgen CYB1b1, welches die Aktivierung verschiedenerer Protoonkogene katalysiert, somit hochreguliert ist (Tsuchiya *et al.*, 2006). Weiterhin zeigen unterschiedliche humane Krebszellen, bei denen durch eine siRNA PLK2 herunterreguliert wurde, bei zusätzlicher Taxol-Behandlung eine erhöhte Apoptose-Rate, wahrscheinlich aufgrund von Spindel-Schäden (Burns *et al.*, 2003). Somit könnte die verringerte Expression und die damit einhergehende verstärkte Expression von PLK2 bei Brustkrebs dazu führen, dass die Spindelschäden ausbleiben und die Centriolen-Duplikation korrekt durchgeführt wird, wodurch das apoptotische Signal unterdrückt wird.

5.1.6.6 Vim:miR-17-3p

Vimentin ist ein Typ-III Intermediärfilament und somit an der Ausbildung des Zytoskeletts beteiligt. Es wird vorwiegend in mesenchymalen Zellen exprimiert, die genaue Bedeutung von Vimentin ist jedoch bislang nicht genau verstanden. So zeigen Tiere, in denen Vimentin ausgeschaltet ist, keinen offensichtlichen Phänotypen (Colucci-Guyon *et al.*, 1994). Vimentin konnte jedoch auch mehrfach mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden (Byun *et al.*, 2001; Moisan und Girard 2006; Yang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Die miR-17-3p ist Teil eines miRNA-Clusters, bestehend aus den miRNAs miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a und miR92-1 (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Tanzer und Stadler 2004; Zhao *et al.*, 2006). Dieses Cluster wurde in HeLa-Zellen entdeckt

(Lagos-Quintana *et al.*, 2001), konnte aber auch in embryonale Stammzellen und neuronalen Zellen nachgewiesen werden (Houbaviy *et al.*, 2003; Dostie *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Cluster bei Lungenkrebs, CML (*chronic myeloid leukemia*) und B-Zell-Lymphomen verstärkt exprimiert wird (Hayashita *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2005; Venturini *et al.*, 2007). Die Expression des Clusters kann hierbei durch c-Myc, einem Proto-Onkogen, das die Zellproliferation, Zellwachstum und Apoptose reguliert, aktiviert werden (He *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2005). Tumore mit c-Myc-Überexpression weisen eine erhöhte Apoptoserate auf, während durch die Aktivierung des miR-17-Clusters in hoch malignen Lymphomen resultiert (He *et al.*, 2005). Die Blockierung der Apoptose erfolgt wahrscheinlich durch die Inhibierung von *Pten* durch miR-19a (Lewis *et al.*, 2003) und *E2f1* durch miR-20a und miR-17-5p (O'Donnell *et al.*, 2005). Die Inhibierung von Vimentin durch die miR-17-3p könnte diese anti-apoptotische Wirkung unterstützen.

5.2 Charakterisierung und Funktionsanalyse von miRNAs

5.2.1 Charakterisierung der miR-138

Die miR-138 ist eine Neuronen-spezifische miRNA, die vorwiegend im Cerebrum, Cerebellum und im Hippocampus adulter Mäuse exprimiert wird. Dieses Expressionsprofil zeigt sich auch während der Embryonalentwicklung. Interessanterweise wird sie aber auch in der fötalen Leber exprimiert (Obernosterer *et al.*, 2006). Es sind zwei pre-miRNAs für die miR-138 annotiert, jedoch wurde im Gehirn und in der fötalen Leber nur der *precursor* miR-138-2 nachgewiesen. Vergleicht man die annotierten *precursor*-Sequenzen der miR-138-1 und miR-138-2 mehrerer Spezies, so fällt auf, dass stromaufwärts des 5'-Endes der miRNA ein zusätzliches Nukleotid hoch konserviert ist. Es sollte geklärt werden, ob dieses Nukleotid Teil der reifen miRNA sein kann, z.B. durch alternative Drosha-Prozessierung. Diese Information ist besonders wichtig, da eine Änderung des 5'-Bereichs der miRNA, also des *seed*-Bereichs, bei vielen Vorhersageprogrammen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, dass in der fötalen Leber und im adulten Gehirn das zusätzliche konservierte Nukleotid nicht Teil der reifen miRNA ist. Diese Information schließt jedoch nicht aus,

dass dies in anderen Geweben oder zu anderen Zeitpunkten der Fall ist, z.B. wenn die miR-138-1 exprimiert wird.

Bei der Vorhersage von Zielgenen der miR-138-2 befanden sich unter den 15 signifikantesten Treffern einige interessante Gene, wie z.B. *Lypla1*, *Calb2*, *Plekhhb1*, oder *EfnB3*, denen eine Funktion in Neuronen zugeordnet wird. Einige dieser Gene wurden von unseren Kooperationspartnern im Reporter-Assay untersucht, und für ein Gen konnte gezeigt werden, dass sich miR-138-vermittelte Inhibierung des Gens auf die Größe der dendritischen Fortsätze auswirkt (pers. Mitteilung G. Schrott, Manuskript in Vorbereitung).

Um die Funktion dieser miRNA jedoch vollständig erfassen zu können, sollte diese miRNA in einer Maus ausgeschaltet werden. Der *Knock-Out*-Vektor wurde in Bielefeld fertig gestellt, und gegenwärtig wird in Dänemark versucht, diesen ortsspezifisch in ES-Zellen zu integrieren, um *Knock-Out*-Mäuse zu generieren.

5.2.2 Einfluss von Vimentin in der Wobbler-Maus

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die miR-17-3p durch die Interaktion mit der vorhergesagten Zielsequenz der Vimentin-3'UTRs eine negative Regulation des Gens bewirkt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich diese Regulation sowohl auf das Protein-Niveau von Vimentin als auch auf das mRNA-Niveau auswirkt. Die Frage, ob die miR-17-3p zu einer Spaltung der Vimentin-Zielsequenz nach dem siRNA-Mechanismus führt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Auf der einen Seite führte die 5'RACE der Spaltstelle mit Hilfe einer Adapterligation nur bei der Positivkontrolle zu einem Ergebnis. Weiterhin wiesen die 5'RACE Experimente mit Hilfe des Systems der Firma Roche auf eine Spaltung an Position 3 oder 4 hin und nicht wie erwartet zwischen Position 10 und 11 (Martinez *et al.*, 2004). Dies weist entweder auf eine Variation der Spaltung durch Ago2 hin, auf die Beteiligung anderer Endonukleasen, oder es ist ein experimentelles Artefakt. Auf der anderen Seite trat dieses Spaltprodukt nur bei Zellen, auf die mit der miR-17-3p transfiziert wurden und nicht bei der Kontroll-RNA. Für den Nachweis der Spaltung könnten 3'RACE Experimente der Spaltstelle, also für das Produkt das stromaufwärts der Spaltstelle liegt, Aufschluss geben. Weiterhin zeigt sich in der Ratte und im Huhn eine leichte Variation der Hybridisierungsstruktur. 5'RACE Experimente zum Nachweis des Spaltproduktes in diesen Organismen wären ebenfalls hilfreich, denn hat die Spaltung der Vimentin-mRNA eine wichtige funktionale Bedeutung, so kann man davon ausgehen, dass sie auch in diesen Organismen auftritt.

In unserer Arbeitsgruppe konnte durch Northern-Blot-, Microarray-, Western-Blot und qRT-PCR-Experimente gezeigt werden, dass Vimentin im Rückenmark von Wobbler-Tieren ca. 3-fach stärker exprimiert wird als in Wildtyp-Tieren (Carsten Drepper 2005; pers. Mitteilung Carsten Drepper). Die SOD1^{G93A}-Maus (*superoxide dismutase*) und die *pmn*-Maus (*progressive motor neuronopathy*), zwei weitere Mausmodelle die eine Degeneration von Motoneuronen aufweisen, zeigen die gleiche Regulierung (Perrin *et al.*, 2006). Ebenso wurde eine Protein-Akkumulation von Vimentin in Motoneuronen nachgewiesen (Mussmann 2006). Ich konnte durch Northern-Blot-Experimente für die miR-17-3p und durch *in situ* Hybridisierungen durch unseren Kooperationspartner aus Wien (Gregor Obernosterer) zeigen, dass diese miRNA in Wobbler-Tieren gegenüber den Wildtyp-Tieren eine verringerte Expression zeigt. Diese Daten geben den Hinweis, dass die miR-17-3p direkt an einer Regulation von Vimentin im Rückenmark beteiligt ist. Die Bedeutung der verstärkten Genexpression von Vimentin bei Wobbler-Tieren ist jedoch unklar.

Um zu klären, ob die Akkumulation von Vimentin ein Grund oder eine Folge für die Degeneration von Motoneuronen ist, sollten Wobbler-Tiere, in denen Vimentin ausgeschaltet ist, mit Wobbler-Tieren, in denen Vimentin intakt ist, in Bezug auf den Phänotyp verglichen werden. C57Bl6/6J^{Vim^{-/-}; Vps54^{wr/wr}}-Tiere zeigten jedoch weder eine Verschlechterung noch eine Verbesserung bei der Greifkraft gegenüber den C57Bl6/6J^{Vim^{+/+}; Vps54^{wr/wr}}-Tieren. Ebenso zeigte sich keine Änderung bei der Gewichtsentwicklung. Somit ist die Akkumulation von Vimentin eine Konsequenz der Erkrankung und nicht der Grund. Aus welchem Grund Vimentin jedoch hoch reguliert ist, ist bislang immer noch unklar.

Es wurde eine Studie veröffentlicht, bei der Vimentin mit der retrograden Signalantwort von MAP-Kinase bei Verletzungen von Neuronen in Verbindung gebracht wird (Perlson *et al.*, 2005). Hierbei werden die MAP-Kinase ERK1 und ERK2 phosphoryliert (pERKs) und durch den Dynein-Motor-Komplex retrograd zum Perikarion transportiert, wobei eine durch Calpain gespaltene lösliche Form von Vimentin die pERKs vor Dephosphorylierung schützt. Es hätte sein können, dass dieses pERK-Verletzungssignal, durch die Punktmutation im Gen *Vps54* und dem dadurch wahrscheinlich entstehenden Transportdefekt, nicht mehr zum Perikarion transportiert werden kann, und die Regenerationsantwort somit ausbleibt. Jedoch konnte in unserer Arbeitsgruppe weder eine signifikante Erhöhung an pERKs noch die lösliche Form von Vimentin nachgewiesen werden.

Es wird vermutet, dass verstärkt exprimiertes Vimentin einen positiven Effekt bei der Regeneration, Differenzierung und beim Wachstum neuronaler Zellen hat (Dubey *et al.*, 2004). Bei der Kraftmessung zeigten sich jedoch weder Unterschiede bei der Kraftentwicklung, noch beim *onset* der Erkrankung. Somit ist ein möglicher positiver Effekt von Vimentin im Fall der Wobbler-Maus nur marginal, oder die Ursache für die Degeneration der Motoneuronen überwiegt diesen Effekt stark.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Vimentin mit Dynein und LC3 (*Microtubule-associated proteins 1A/B light chain 3 precursor*, ein Marker für Autophagosomen) kolokalisiert, was auf autophagocytotische Prozesse hinweist (Patrick Welz laufende Arbeit). Vimentin ist an der Bildung von Aggresomen, also Orten größerer Proteinakkumulationen, beteiligt (Johnston *et al.*, 1998), indem es Aggresome käfigartig umgibt. Aggresome werden durch Autophagozytose in Lysosomen abgebaut. Die Akkumulationen von Vimentin und Dynein im Zusammenspiel mit LC3 sind Hinweise, dass die Autophagozytose gestört oder stark überlastet ist. Da die C57Bl6/6J^{Vim^{-/-}; Vps54^{wr/wr}}-Tiere jedoch keine Verschlechterung des Phänotyps zeigen, kann das Fehlen von Vimentin entweder kompensiert werden, oder die Bildung der großen Aggresomen ist kein entscheidender Faktor für die Degeneration von Motoneuronen.

Durch den Vergleich C57Bl6/6J^{Vim^{-/-}; Vps54^{wr/wr}}-Tiere und der C57Bl6/6J^{Vim^{-/-}; Vps54^{+/+}}-Tiere, sind auf der einen Seite neue interessante Fragestellungen entstanden. Gleichzeitig konnte ich die ursprüngliche Hypothese, dass die Degeneration von Motoneuronen durch die massive Vimentin-Akkumulation bedingt ist, ausschließen. Vielmehr scheint es sich bei der verstärkten Expression um eine Antwort auf den verschlechterten Zellzustand zu handeln.

5.2.3 Einfluss von miRNAs bei der Ausprägung des Wobbler-Phänotyps

Mit dem miRNA-Microarray-Experiment konnten 67 miRNAs nachgewiesen werden, die im Rückenmark signifikant exprimiert sind. Dies ist nach meinem Kenntnisstand der zweite Ansatz von miRNA-Expressionsprofilen im Rückenmark adulter Vertebraten (Hohjoh und Fukushima April 2007).

Bei der vergleichenden miRNA-Expressions-Analyse des Rückenmarks von Wobbler- und Wildtyp-Tieren zeigten sich vier signifikant regulierte miRNAs, miR-9, miR-136, miR-195 und miR-720, die in Wildtyp-Tieren ca. 2-fach stärker exprimiert waren als bei Wobbler-Tieren. Die miRNAs miR-9, miR-136 und miR-195 wurden

bereits häufig in neuronalem Gewebe nachgewiesen (Miska *et al.*, 2004, Saba und Booth 2006, Wang *et al.*, 2007). Für die miR-720 sind bisweilen wenige Daten veröffentlicht, sie wurde aus embryonalem Gewebe kloniert (Mineno *et al.*, 2006). Gerade von der miR-9 weiß man, dass sie sehr spezifisch für neuronales Gewebe ist (Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Miska *et al.*, 2004, Saba und Booth 2006, Wang *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2006). Da die vier miRNAs in Wobbler-Tieren ca. 2-fach geringer exprimiert sind, könnte dies einerseits den generellen Verlust von Motoneuronen widerspiegeln. Andererseits sind die miRNAs miR-124a, sehr spezifisch für neuronales Gewebe, und die miR-128, ebenfalls in neuronalem Gewebe stark angereichert aber auch in der Lunge exprimiert (Sempere *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007), nicht reguliert. Dies sind Hinweise, dass die miRNAs in Wobbler-Tieren negativ reguliert sind, und dass diese Regulation nicht auf das Absterben der Motoneuronen zurückzuführen ist. Der Nachteil des in dieser Arbeit erstellten Expressionsprofils ist, dass für die microArray-Experimente total-RNA des Rückenmarks verwendet wurde und nicht einzelner Zellen, wie z.B. Motoneurone, Interneurone, Astrocyten oder Mikrogliazellen. Die Degeneration von Motoneuronen ist in Wobbler-Tieren unter anderem von einer Astrogliose begleitet (Laage *et al.*, 1988). In Smirnova *et al.* (2005) wurde die Expression einiger neuronaler miRNAs in Astrozyten und Neuronen in Zellkultur verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass z.B. die miR-23 spezifisch in Astrozyten vorkommt, die miR-124a und miR-128 in Neuronen und die miR-9 in beiden. Nach diesen Erkenntnissen hätte man somit ein verstärktes Signal der miR-23 erwartet, oder diese miRNA ist stark runterreguliert, was aber durch die erhöhte Zellzahl an Astrozyten ausgeglichen wird. Im Umkehrschluss hätte man auch eine erhöhte Expression der miR-9 in Wobbler-Tieren erwarten können, das Gegenteil ist jedoch der Fall. Somit kann man davon ausgehen, dass bei gleich bleibender Expression der miR-9 in Astrozyten die eigentlich verringerte Expression in Motoneuronen deutlicher ist, als es der Faktor 1,8 ausdrückt. Diese theoretische Analyse ist jedoch sehr vage und nicht direkt übertragbar, da in Smirnova *et al.* in Kultur genommene Zellen analysiert wurden, während in dieser Arbeit ein vergleichendes Expressionsprofil von Geweben aus dem Organismus erstellt wurde. Letztendlich müssen zelltypspezifische Nachweise der regulierten miRNAs erfolgen, um die Hypothese, dass diese in Motoneuronen negativ reguliert sind, zu bestätigen. Hierzu sind z.B. *in situ* Hybridisierungen der

regulierten miRNAs, kombiniert mit immunhistochemischen Nachweisen der einzelnen Zelltypen, gut geeignet.

Betrachtet man die Vorhersagen der Programme PicTar, miRANDA, TargetScan und RNAhybrid im Hinblick auf die Zielgene der regulierten miRNAs, so lassen sich interessante Zusammenhänge beobachten. So sind die Motorproteine DNCL1 (*dynein intermediate chain 1*) und KIF1B (*kinesine-like protein 1B*) Zielgene für die miR-195. Hier ist denkbar, dass das Neuron versucht, den gestörten Transport durch die Erhöhung der zentralen Zelltransport-Proteine zu kompensieren. Ebenso sind die Gene *synaptotagmin 1* (miR-136) und 9 (miR-9) Zielgene, und an der Bildung von Vesikeln beteiligt. *Vps54* selber wird von TargetScan und Pictar als Zielgen für die miR-18 und miR-92 vorhergesagt. Da diese miRNAs im Cluster mit der miR-17-p liegen, kann man vermuten, dass sie gleich exprimiert sind, also in Wobbler-Tieren geringer exprimiert sind. Somit könnte es ein Versuch der Motoneurone sein, das Fehlen des funktionalen Proteins zu kompensieren. Allerdings ist dies nur ein schwacher Hinweis, da dieses Cluster nicht stark exprimiert ist.

Weiterhin konnten Verknüpfungen zu apoptotischen Prozessen hergestellt werden. TUNEL-Färbungen von Rückenmarksschnitten von Wobbler-Tieren weisen zwar darauf hin, dass die Motoneurondegeneration nicht auf apoptotische Prozesse zurückzuführen ist (Rathke-Hartlieb 1999 Dissertation; Popper *et al.*, 1997), auf der anderen Seite gibt es aber auch starke Hinweise darauf, dass die Degeneration durch Apoptose induziert wird (Salcedo *et al.*, 1998; Festhoff *et al.* 2000; Dave *et al.* 2005; Eve *et al.*, 2007). In Bezug auf das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Motoneuronen ist die Familie der TRKs (*neurotrophic tyrosine kinase receptor* bzw. auch *tropomyosin-related kinase*) von entscheidender Bedeutung (zur Übersicht siehe Reichardt 2006). Diese Rezeptoren haben eine extrazelluläre Bindedomäne für Neurotrophine, eine intrazelluläre Kinasedomäne, und sie treten als Homodimere auf. Wenn sie das Neurotrophin gebunden haben, schalten sie so über PI3K (*phosphoinositid-3-kinase*) den antiapoptotischen PKB-Signalweg (*protein kinase B* oder auch AKT-Signalweg) an. Interessanterweise haben *Trk*-Gene meist eine zweite Spleißisoform ohne Kinasedomäne und mit längerem 3'UTR. Diese trunkierten Isoformen (t-TRK) können mit den *full length* Formen (fl-TRK) ebenfalls Dimere bilden, jedoch wird so die Autophosphorylierung unterbunden und das Signal geht verloren (Eide *et al.*, 1996; Postigo *et al.*, 2002, Tervonen *et al.*, 2006, Dorsey *et al.*, 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die

miR-9 die trunkierte Spleißisoform von *Trkc* als Zielgen hat, und somit das Wachstum einer humanen Neuroblastoma-Zelllinie verlangsamt, und vermutlich die Differenzierung fördert (Laneve *et al.*, 2007). Bei der Zielgen-Analyse der murinen und humanen *Trkb*-3'UTRs mit der Webbrowserversion des Programms RNAhybrid, d.h. ohne statistische Analyse, zeigte sich ein extremer Unterschied an miR-9 Zielsequenzen in den Isoformen. So weisen die fl-*Trks* keine „klassischen“ Zielsequenzen auf, während die t-*Trks* 4 (*h.s.*) bzw. 2 (*m.m.*) aufweisen. Lässt man zwei G:U Basenpaarungen zu, wird die Anreicherung an Zielsequenzen in den trunkierten Isoformen noch deutlicher. So zeigen die fl-*Trks* 5 (*h.s.*) und 3 (*m.m.*) Zielsequenzen, während die trunkierten Isoformen 29 (*h.s.*) und 28 (*m.m.*) zeigen. Somit ergibt sich ein deutlicher Hinweis darauf, dass die miR-9 am Zellüberleben beteiligt ist, indem sie die Translation der trunkierten Version blockiert und somit das stöchiometrische Verhältnis zu Gunsten des fl-*Trkb* ändert. In Wobbler-Tieren ist die miR-9 geringer exprimiert, die Anzahl der fl-*Trkb*-Dimere sinkt, und somit wird auch das antiapoptotische Signal abgeschwächt (siehe Abbildung 5-3). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass miRANDA z.B. das apoptotische Gen *Bax* als Zielgen für die miRNA-136 vorhersagt, welches gleichzeitig durch das Ausbleiben des AKT-Signalwegs aktiviert wird. Ebenso ist *Pten*, ein Antagonist zu PI3K, ein validiertes Zielgen für die miR-19-a, und vorhergesagtes Zielgen für die miR-17-5p und miR-20a (TargetScan und Pictar). Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass die progressive Degeneration der Motoneuronen bei Wobbler-Tieren einem apoptotischen Prozess unterliegt. Welche Rolle das Krankheitsverursachende Gen *Vps54* hierbei spielt, bleibt zu klären.

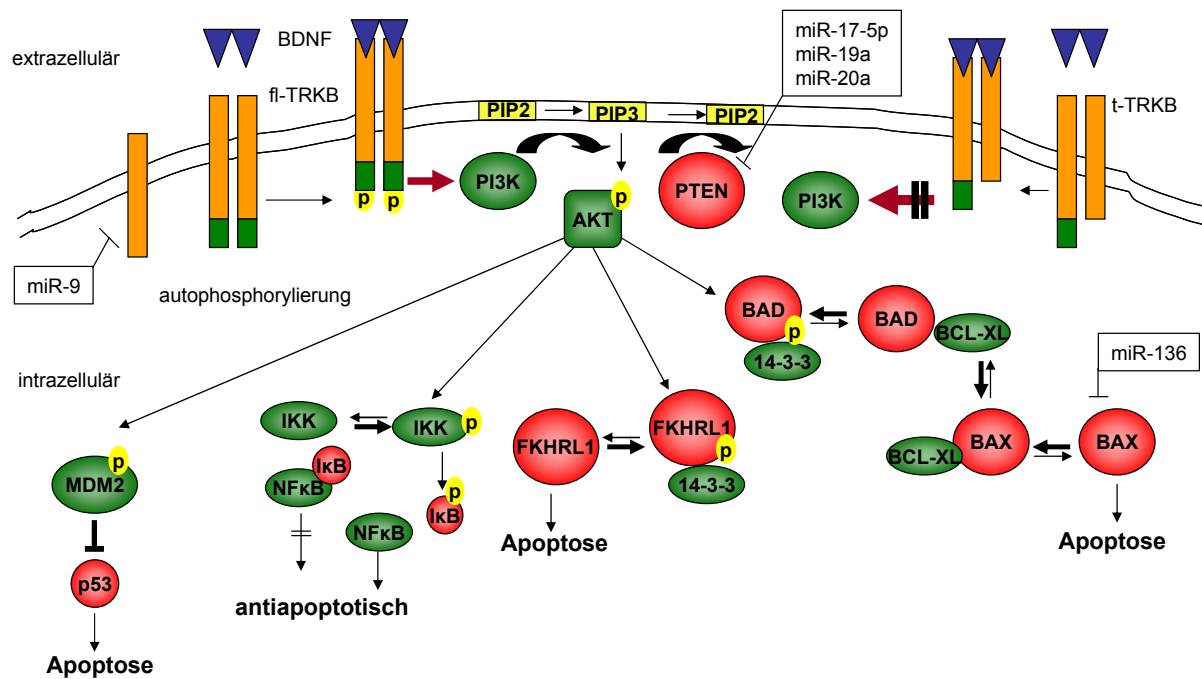


Abbildung 5-3 Schematische Darstellung der TRKB/BDNF-induzierten antiapoptotischen AKT-Signalkaskade: BDNF bindet extrazellulär an fl-TRKB Homodimere, was zu einer intrazellulären Autophosphorylierung und somit zur Rekrutierung von PI3K führt. PI3K aktiviert PIP2 (Phosphatidylinositol-di-phosphat) durch Phosphorylierung, was zur Aktivierung von AKT und somit zu einem antiapoptotischen Signal führt. Durch die Bildung von Heterodimern zwischen fl-TRKB und t-TRKB, begünstigt durch verringerte miR-9 Expression wie z.B. im Rückenmark von Wobbler-Tieren, wird PI3K nicht rekrutiert und das antiapoptotische Signal bleibt aus. Zusätzlich sind weitere miRNAs eingezeichnet, die in Wobbler-Tieren eine verringerte Expression zeigen und so apoptotische Prozesse begünstigen können.

5.3 Ausblick

Das Gebiet der Zielgenvorhersage ist für das Verständnis der Funktion von miRNAs von großer Bedeutung. Die stetige Verbesserung der Algorithmen, durch die Implementierung neuer Erkenntnisse wie z.B. der Sekundärstruktur der Zielsequenz, aber auch die Verbesserung der 3'UTR-Datenquellen werden helfen, das Wirkungsspektrum von miRNAs genauer zu erfassen. So wird der 3'UTR bei einer Vielzahl von Genen unterschiedlich gespleißt, bzw. es werden unterschiedliche Polyadenylierungssignale benutzt. Dies sind gute Hinweise auf eine miRNA-vermittelte Regulation. Weiterhin sind aber auch zusätzliche Erkenntnisse über notwendige Eigenschaften einer funktionalen miRNA-Zielgen-Interaktion von großer Bedeutung, um die Suchparameter für eine Vorhersage genauer festlegen zu können. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse helfen einerseits, die Vorhersagen des Programms RNAhybrid zu verbessern, andererseits können die erhaltenen Resultate der Interaktionen dazu verwendet werden, die Datensätze

anderer Vorhersageprogramme zu vergrößern, um sie so besser „trainieren“ zu können.

In dieser Arbeit sind nur Interaktionen getestet worden, bei denen die entsprechende miRNA Zielsequenzen in mindestens zwei der drei untersuchten Spezies aufwies. Unter den vorhergesagten Zielgenen befanden sich allerdings auch viele, die signifikante miRNA Bindestellen in nur einer Spezies aufwiesen. Es ist spannend herauszufinden, ob diese Zielsequenzen funktional sind und dieser Spezies einen Vor- oder Nachteil bringen, oder ob die Funktion dieser Interaktion in einer anderen Spezies kompensiert werden kann. So ist es z.B. möglich, dass diese miRNA ein anderes Gen des gleichen Signalwegs reguliert, so dass der Effekt nahezu gleich ist. Der *Knock-Out*-Vektor für die miR-138 konnte in dieser Arbeit fertiggestellt werden, und von großem Interesse ist es, nun zu sehen, ob die *Knock-Out*-Mäuse den gleichen Phänotypen wie die Zellkulturexperimente unseres Kooperationspartners zeigen, und vor allem wie sich dieser Phänotyp im Organismus auswirkt.

Mit Bezug auf die Wobbler-Maus konnte in dieser Arbeit zwar ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Vimentin-Akkumulation in Wobbler-Tieren zu der Degeneration der Motoneurone führt, dennoch bleibt die Frage offen, welche Funktion mit der Hochregulierung des Vimentingens einhergeht. Weiterhin haben die miRNA-microArray-Daten zu einem neuen Einblick in die Wobbler-Pathologie verholfen. Es ist nun notwendig, die erhaltenen Resultate durch weitere Experimente zu bestätigen und gleichzeitig die Zelltypen zu bestimmen, in denen die miRNAs reguliert sind. Weiterführende Experimente in diesen Zelltypen, wie z.B. Überexpression und *knock-down* der miRNAs und der Zielgene, und der Nachweis von Apoptosemarkern müssen die in dieser Arbeit hergestellten Zusammenhänge bestätigen, um letztendlich die Frage beantworten zu können, welchen Einfluss die Regulation der miRNAs auf die Pathologie von neuronalen Degenerationen hat. Diese Erkenntnisse werden ein völlig neues Licht auf neuronale Erkrankungen werfen und helfen neue Therapieansätze, wie z.B. die Applikation bestimmter miRNAs, zur Heilung von Patienten zu finden.

6 Literatur

- Ahlgren, U, Pfaff, SL, Jessell, TM, Edlund, T and Edlund, H (1997). "Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells." *Nature* 385(6613): 257-60.
- Akao, Y, Nakagawa, Y and Naoe, T (2006). "MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers." *Oncol Rep* 16(4): 845-50.
- Akao, Y, Nakagawa, Y and Naoe, T (2007). "MicroRNA-143 and -145 in Colon Cancer." *DNA Cell Biol* 26(5): 311-20.
- Ambros, V, Bartel, B, Bartel, DP, Burge, CB, Carrington, JC, Chen, X, Dreyfuss, G, Eddy, SR, Griffiths-Jones, S, Marshall, M, Matzke, M, Ruvkun, G and Tuschl, T (2003). "A uniform system for microRNA annotation." *Rna* 9(3): 277-9.
- Andrews JM, Maxwell DS (1967) Ultrastructural features of anterior horn cell degeneration in the wobbler (wr) mouse. *Anat Rec* 157:206
- Aravin, AA, Lagos-Quintana, M, Yalcin, A, Zavolan, M, Marks, D, Snyder, B, Gaasterland, T, Meyer, J and Tuschl, T (2003). "The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development." *Dev Cell* 5(2): 337-50.
- Bagga, S, Bracht, J, Hunter, S, Massirer, K, Holtz, J, Eachus, R and Pasquinelli, AE (2005). "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation." *Cell* 122(4): 553-63.
- Bartel, DP and Chen, CZ (2004). "Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs." *Nat Rev Genet* 5(5): 396-400.
- Baulac, M, Rieger, F and Meininger, V (1983). "The loss of motoneurons corresponding to specific muscles in the wobbler mutant mouse." *Neurosci Lett* 37(1): 99-104.
- Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E (2005) „Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes.“ *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):21-4
- Berezikov E, Thuemmler F, van Laake LW, Kondova I, Bontrop R, Cuppen E, Plasterk RH (2006). „Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain“. *Nat Genet*. 2006 Dec;38(12):1375-7
- Berghammer, H and Auer, B (1993). ""Easy-preps": fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *E. coli*." *Biotechniques* 14(4): 524, 528.
- Bernstein, E, Kim, SY, Carmell, MA, Murchison, EP, Alcorn, H, Li, MZ, Mills, AA, Elledge, SJ, Anderson, KV and Hannon, GJ (2003). "Dicer is essential for mouse development." *Nat Genet* 35(3): 215-7.
- Birnboim, HC and Doly, J (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.
- Bohnsack, MT, Czaplinski, K and Gorlich, D (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." *Rna* 10(2): 185-91.
- Boillee, S, Peschanski, M and Junier, MP (2003). "The wobbler mouse: a neurodegeneration jigsaw puzzle." *Mol Neurobiol* 28(1): 65-106.
- Bose, J, Gruber, AD, Helming, L, Schiebe, S, Wegener, I, Hafner, M, Beales, M, Kontgen, F and Lengeling, A (2004). "The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal." *J Biol* 3(4): 15.
- Brennecke, J, Stark, A, Russell, RB and Cohen, SM (2005). "Principles of microRNA-target recognition." *PLoS Biol* 3(3): e85.

- Brolen, GK, Heins, N, Edsbagge, J and Semb, H (2005). "Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells." *Diabetes* 54(10): 2867-74.
- Brown, JR and Sanseau, P (2005). "A computational view of microRNAs and their targets." *Drug Discov Today* 10(8): 595-601.
- Burns, TF, Fei, P, Scata, KA, Dicker, DT and El-Deiry, WS (2003). "Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells." *Mol Cell Biol* 23(16): 5556-71.
- Byun, Y, Chen, F, Chang, R, Trivedi, M, Green, KJ and Cryns, VL (2001). "Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis." *Cell Death Differ* 8(5): 443-50.
- Cai, X, Hagedorn, CH and Cullen, BR (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." *Rna* 10(12): 1957-66.
- Calin, GA, Dumitru, CD, Shimizu, M, Bichi, R, Zupo, S, Noch, E, Aldler, H, Rattan, S, Keating, M, Rai, K, Rassenti, L, Kipps, T, Negrini, M, Bullrich, F and Croce, CM (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15524-9.
- Chan, JA, Krichevsky, AM and Kosik, KS (2005). "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells." *Cancer Res* 65(14): 6029-33.
- Chang, J, Nicolas, E, Marks, D, Sander, C, Lerro, A, Buendia, MA, Xu, C, Mason, WS, Moloshok, T, Bort, R, Zaret, KS and Taylor, JM (2004). "miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1." *RNA Biol* 1(2): 106-13.
- Chen, CZ, Li, L, Lodish, HF and Bartel, DP (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." *Science* 303(5654): 83-6.
- Chen, GY, Muramatsu, H, Kondo, M, Kurosawa, N, Miyake, Y, Takeda, N and Muramatsu, T (2005). "Abnormalities caused by carbohydrate alterations in Ibeta6-N-acetylglucosaminyltransferase-deficient mice." *Mol Cell Biol* 25(17): 7828-38.
- Chendrimada, TP, Gregory, RI, Kumaraswamy, E, Norman, J, Cooch, N, Nishikura, K and Shiekhattar, R (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* 436(7051): 740-4.
- Chiu, YL and Rana, TM (2002). "RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA." *Mol Cell* 10(3): 549-61.
- Cimmino, A, Calin, GA, Fabbri, M, Iorio, MV, Ferracin, M, Shimizu, M, Wojcik, SE, Aqeilan, RI, Zupo, S, Dono, M, Rassenti, L, Alder, H, Volinia, S, Liu, CG, Kipps, TJ, Negrini, M and Croce, CM (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39): 13944-9.
- Conibear, E and Stevens, TH (2000). "Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi." *Mol Biol Cell* 11(1): 305-23.
- Dave, KR, Raval, AP, Purroy, J, Kirkinezos, IG, Moraes, CT, Bradley, WG and Perez-Pinzon, MA (2005). "Aberrant deltaPKC activation in the spinal cord of Wobbler mouse: a model of motor neuron disease." *Neurobiol Dis* 18(1): 126-33.
- Davis, E, Caiment, F, Tordoir, X, Cavaille, J, Ferguson-Smith, A, Cockett, N, Georges, M and Charlier, C (2005). "RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus." *Curr Biol* 15(8): 743-9.
- Denli, AM, Tops, BB, Plasterk, RH, Ketting, RF and Hannon, GJ (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* 432(7014): 231-5.
- Didiano, D and Hobert, O (2006). "Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions." *Nat Struct Mol Biol* 13(9): 849-51.

- Doench, JG, Petersen, CP and Sharp, PA (2003). "siRNAs can function as miRNAs." *Genes Dev* 17(4): 438-42.
- Doench, JG and Sharp, PA (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." *Genes Dev* 18(5): 504-11.
- Dong, J, Asa, SL and Drucker, DJ (1991). "Islet cell and extrapancreatic expression of the LIM domain homeobox gene *isl-1*." *Mol Endocrinol* 5(11): 1633-41.
- Dorsey, SG, Renn, CL, Carim-Todd, L, Barrick, CA, Bambrick, L, Krueger, BK, Ward, CW and Tessarollo, L (2006). "In vivo restoration of physiological levels of truncated TrkB.T1 receptor rescues neuronal cell death in a trisomic mouse model." *Neuron* 51(1): 21-8.
- Dostie, J, Mourelatos, Z, Yang, M, Sharma, A and Dreyfuss, G (2003). "Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs." *Rna* 9(2): 180-6.
- Drepper C. (2005) „Identifizierung und Charakterisierung des krankheitsauslösenden Gens in einem Mausmodell für humane Motoneuronenkrankungen“. Dissertation
- Drognitz, O, Michel, P, Koczan, D, Neeff, H, Mikami, Y, Obermaier, R, Thiesen, HJ, Hopt, UT and Loebler, M (2006). "Characterization of ischemia/reperfusion-induced gene expression in experimental pancreas transplantation." *Transplantation* 81(10): 1428-34.
- Dubey, M, Hoda, S, Chan, WK, Pimenta, A, Ortiz, DD and Shea, TB (2004). "Reexpression of vimentin in differentiated neuroblastoma cells enhances elongation of axonal neurites." *J Neurosci Res* 78(2): 245-9.
- Duchen, LW and Strich, SJ (1968). "An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant 'wobbler'." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 31(6): 535-42.
- Eeckhoutte, J, Briche, I, Kurowska, M, Formstecher, P and Laine, B (2006). "Hepatocyte nuclear factor 4 alpha ligand binding and F domains mediate interaction and transcriptional synergy with the pancreatic islet LIM HD transcription factor *Isl1*." *J Mol Biol* 364(4): 567-81.
- Eide, FF, Vining, ER, Eide, BL, Zang, K, Wang, XY and Reichardt, LF (1996). "Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling." *J Neurosci* 16(10): 3123-9.
- Elbashir, SM, Harborth, J, Lendeckel, W, Yalcin, A, Weber, K and Tuschl, T (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411(6836): 494-8.
- Elbashir, SM, Lendeckel, W and Tuschl, T (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* 15(2): 188-200.
- Enright, AJ, John, B, Gaul, U, Tuschl, T, Sander, C and Marks, DS (2003). "MicroRNA targets in *Drosophila*." *Genome Biol* 5(1): R1.
- Esau, C, Kang, X, Peralta, E, Hanson, E, Marcusson, EG, Ravichandran, LV, Sun, Y, Koo, S, Perera, RJ, Jain, R, Dean, NM, Freier, SM, Bennett, CF, Lollo, B and Griffey, R (2004). "MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation." *J Biol Chem* 279(50): 52361-5.
- Eve, DJ, Dennis, JS and Citron, BA (2007). "Transcription factor p53 in degenerating spinal cords." *Brain Res* 1150: 174-81.
- Fadok, VA, Bratton, DL, Rose, DM, Pearson, A, Ezekewitz, RA and Henson, PM (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." *Nature* 405(6782): 85-90.
- Falconer DS (1956) *Mouse News Lett* 15: 23
- Farh, KK, Grimson, A, Jan, C, Lewis, BP, Johnston, WK, Lim, LP, Burge, CB and Bartel, DP (2005). "The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution." *Science* 310(5755): 1817-21.
- Festoff, BW, D'Andrea, MR, Citron, BA, Salcedo, RM, Smirnova, IV and Andrade-Gordon, P (2000). "Motor neuron cell death in wobbler mutant mice follows overexpression of the G-protein-coupled, protease-activated receptor for thrombin." *Mol Med* 6(5): 410-29.

- Fire, A, Xu, S, Montgomery, MK, Kostas, SA, Driver, SE and Mello, CC (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-11.
- Fu, H, Tie, Y, Xu, C, Zhang, Z, Zhu, J, Shi, Y, Jiang, H, Sun, Z and Zheng, X (2005). "Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method." *FEBS Lett* 579(17): 3849-54.
- Giraldez, AJ, Mishima, Y, Rihel, J, Grocock, RJ, Van Dongen, S, Inoue, K, Enright, AJ and Schier, AF (2006). "Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs." *Science* 312(5770): 75-9.
- Gregory, RI, Yan, KP, Amuthan, G, Chendrimada, T, Doratotaj, B, Cooch, N and Shiekhattar, R (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* 432(7014): 235-40.
- Griffiths-Jones, S (2006). "miRBase: the microRNA sequence database." *Methods Mol Biol* 342: 129-38.
- Grishok, A, Pasquinelli, AE, Conte, D, Li, N, Parrish, S, Ha, I, Baillie, DL, Fire, A, Ruvkun, G and Mello, CC (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing." *Cell* 106(1): 23-34.
- Habener, JF, Kemp, DM and Thomas, MK (2005). "Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development." *Endocrinology* 146(3): 1025-34.
- Haley, B and Zamore, PD (2004). "Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex." *Nat Struct Mol Biol* 11(7): 599-606.
- Hamilton, AJ and Baulcombe, DC (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." *Science* 286(5441): 950-2.
- Hammond, SM, Boettcher, S, Caudy, AA, Kobayashi, R and Hannon, GJ (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." *Science* 293(5532): 1146-50.
- Han, J, Lee, Y, Yeom, KH, Kim, YK, Jin, H and Kim, VN (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." *Genes Dev* 18(24): 3016-27.
- Harborth, J, Elbashir, SM, Bechert, K, Tuschl, T and Weber, K (2001). "Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs." *J Cell Sci* 114(Pt 24): 4557-65.
- Heimann, P, Laage, S and Jockusch, H (1991). "Defect of sperm assembly in a neurological mutant of the mouse, wobbler (WR)." *Differentiation* 47(2): 77-83.
- Hohjoh, H, Fukushima, T (2007). "Expression profile analysis of microRNA (miRNA) in mouse central nervous system using a new miRNA detection system that examines hybridization signals at every step of washing." *Gene* 5;391(1-2):39-44
- Hornstein, E, Mansfield, JH, Yekta, S, Hu, JK, Harfe, BD, McManus, MT, Baskerville, S, Bartel, DP and Tabin, CJ (2005). "The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development." *Nature* 438(7068): 671-4.
- Hutchinson, SA and Eisen, JS (2006). "Islet1 and Islet2 have equivalent abilities to promote motoneuron formation and to specify motoneuron subtype identity." *Development* 133(11): 2137-47.
- Hutvagner, G, McLachlan, J, Pasquinelli, AE, Balint, E, Tuschl, T and Zamore, PD (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." *Science* 293(5531): 834-8.
- Ioshikhes, I, Roy, S and Sen, CK (2007). "Algorithms for mapping of mRNA targets for microRNA." *DNA Cell Biol* 26(4): 265-72.
- John, B, Enright, AJ, Aravin, A, Tuschl, T, Sander, C and Marks, DS (2004). "Human MicroRNA targets." *PLoS Biol* 2(11): e363.
- John, B, Sander, C and Marks, DS (2006). "Prediction of human microRNA targets." *Methods Mol Biol* 342: 101-13.

- Johnson, SM, Grosshans, H, Shingara, J, Byrom, M, Jarvis, R, Cheng, A, Labourier, E, Reinert, KL, Brown, D and Slack, FJ (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." *Cell* 120(5): 635-47.
- Johnston, JA, Ward, CL and Kopito, RR (1998). "Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins." *J Cell Biol* 143(7): 1883-98.
- Karlsson, O, Thor, S, Norberg, T, Ohlsson, H and Edlund, T (1990). "Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain." *Nature* 344(6269): 879-82.
- Kim, J, Krichevsky, A, Grad, Y, Hayes, GD, Kosik, KS, Church, GM and Ruvkun, G (2004). "Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 360-5.
- Kiriakidou, M, Nelson, PT, Kouranov, A, Fitziev, P, Bouyioukos, C, Mourelatos, Z and Hatzigeorgiou, A (2004). "A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets." *Genes Dev* 18(10): 1165-78.
- Klein, R, Conway, D, Parada, LF and Barbacid, M (1990). "The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain." *Cell* 61(4): 647-56.
- Krek, A, Grun, D, Poy, MN, Wolf, R, Rosenberg, L, Epstein, EJ, MacMenamin, P, da Piedade, I, Gunsalus, KC, Stoffel, M and Rajewsky, N (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." *Nat Genet* 37(5): 495-500.
- Kruger J, Rehmsmeier M. (2006). "RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible." *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue): W451-4.
- Laage, S, Zobel, G and Jockusch, H (1988). "Astrocyte overgrowth in the brain stem and spinal cord of mice affected by spinal atrophy, wobbler." *Dev Neurosci* 10(3): 190-8.
- Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227:680-685
- Lagos-Quintana, M, Rauhut, R, Lendeckel, W and Tuschl, T (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." *Science* 294(5543): 853-8.
- Lagos-Quintana, M, Rauhut, R, Meyer, J, Borkhardt, A and Tuschl, T (2003). "New microRNAs from mouse and human." *Rna* 9(2): 175-9.
- Lagos-Quintana, M, Rauhut, R, Yalcin, A, Meyer, J, Lendeckel, W and Tuschl, T (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." *Curr Biol* 12(9): 735-9.
- Lai, EC (2002). "Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation." *Nat Genet* 30(4): 363-4.
- Lai, EC (2004). "Predicting and validating microRNA targets." *Genome Biol* 5(9): 115.
- Landthaler, M, Yalcin, A and Tuschl, T (2004). "The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis." *Curr Biol* 14(23): 2162-7.
- Laneve, P, Di Marcotullio, L, Gioia, U, Fiori, ME, Ferretti, E, Gulino, A, Bozzoni, I and Caffarelli, E (2007). "The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human neuroblastoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(19): 7957-62.
- Lau, NC, Lim, LP, Weinstein, EG and Bartel, DP (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." *Science* 294(5543): 858-62.
- Leaman, D, Chen, PY, Fak, J, Yalcin, A, Pearce, M, Unnerstall, U, Marks, DS, Sander, C, Tuschl, T and Gaul, U (2005). "Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development." *Cell* 121(7): 1097-108.
- Lee, RC and Ambros, V (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." *Science* 294(5543): 862-4.

- Lee, RC, Feinbaum, RL and Ambros, V (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* 75(5): 843-54.
- Lee, Y, Ahn, C, Han, J, Choi, H, Kim, J, Yim, J, Lee, J, Provost, P, Radmark, O, Kim, S and Kim, VN (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* 425(6956): 415-9.
- Lee, Y, Jeon, K, Lee, JT, Kim, S and Kim, VN (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *Embo J* 21(17): 4663-70.
- Lewis, BP, Burge, CB and Bartel, DP (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell* 120(1): 15-20.
- Lewis, BP, Shih, IH, Jones-Rhoades, MW, Bartel, DP and Burge, CB (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell* 115(7): 787-98.
- Li, SC, Tang, P and Lin, WC (2007). "Intronic microRNA: discovery and biological implications." *DNA Cell Biol* 26(4): 195-207.
- Lim, LP, Lau, NC, Garrett-Engele, P, Grimson, A, Schelter, JM, Castle, J, Bartel, DP, Linsley, PS and Johnson, JM (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." *Nature* 433(7027): 769-73.
- Lim, LP, Lau, NC, Weinstein, EG, Abdelhakim, A, Yekta, S, Rhoades, MW, Burge, CB and Bartel, DP (2003). "The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*." *Genes Dev* 17(8): 991-1008.
- Liu, J, Valencia-Sanchez, MA, Hannon, GJ and Parker, R (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* 7(7): 719-23.
- Llave, C, Kasschau, KD, Rector, MA and Carrington, JC (2002). "Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants." *Plant Cell* 14(7): 1605-19.
- Lottspeich, F. (1998). "Bioanalytik." Spektrum-Verlag,
- Lund, E, Guttinger, S, Calado, A, Dahlberg, JE and Kutay, U (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science* 303(5654): 95-8.
- Ma, S, Charron, J and Erikson, RL (2003). "Role of Plk2 (*Snk*) in mouse development and cell proliferation." *Mol Cell Biol* 23(19): 6936-43.
- Martinez, J and Tuschl, T (2004). "RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease." *Genes Dev* 18(9): 975-80.
- Matsubara, H, Takeuchi, T, Nishikawa, E, Yanagisawa, K, Hayashita, Y, Ebi, H, Yamada, H, Suzuki, M, Nagino, M, Nimura, Y, Osada, H and Takahashi, T (2007). "Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92." *Oncogene*.
- Mineno, J, Okamoto, S, Ando, T, Sato, M, Chono, H, Izu, H, Takayama, M, Asada, K, Mirochnitchenko, O, Inouye, M and Kato, I (2006). "The expression profile of microRNAs in mouse embryos." *Nucleic Acids Res* 34(6): 1765-71.
- Miranda, KC, Huynh, T, Tay, Y, Ang, YS, Tam, WL, Thomson, AM, Lim, B and Rigoutsos, I (2006). "A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes." *Cell* 126(6): 1203-17.
- Miska, EA, Alvarez-Saavedra, E, Townsend, M, Yoshii, A, Sestan, N, Rakic, P, Constantine-Paton, M and Horvitz, HR (2004). "Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain." *Genome Biol* 5(9): R68.
- Mitsumoto, H and Bradley, WG (1982). "Murine motor neuron disease (the wobbler mouse): degeneration and regeneration of the lower motor neuron." *Brain* 105 (Pt 4): 811-34.
- Moisan, E and Girard, D (2006). "Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis." *J Leukoc Biol* 79(3): 489-98.
- Moss, EG, Lee, RC and Ambros, V (1997). "The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA." *Cell* 88(5): 637-46.

- Moumen, A, Patane, S, Porras, A, Dono, R and Maina, F (2007). "Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development." *Development* 134(7): 1443-51.
- Mourelatos, Z, Dostie, J, Paushkin, S, Sharma, A, Charroux, B, Abel, L, Rappsilber, J, Mann, M and Dreyfuss, G (2002). "miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs." *Genes Dev* 16(6): 720-8.
- Mühlhardt, C. (2002). "Molekularbiologie/Genomics." Spektrum-Verlag,
- Mussmann A. (2006) "Validierung von Vps54 als ursächliches Gen der Neurodegeneration, Wobbler der Maus, und Charakterisierung seiner Aufgabe innerhalb der Embryonalentwicklung". Dissertation
- Napoli, C, Lemieux, C and Jorgensen, R (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." *Plant Cell* 2(4): 279-289.
- Nishimoto, S and Nishida, E (2006). "MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2." *EMBO Rep* 7(8): 782-6.
- Obernosterer, G, Leuschner, PJ, Alenius, M and Martinez, J (2006). "Post-transcriptional regulation of microRNA expression." *Rna* 12(7): 1161-7.
- Oka, T and Krieger, M (2005). "Multi-component protein complexes and Golgi membrane trafficking." *J Biochem (Tokyo)* 137(2): 109-14.
- Olsen, PH and Ambros, V (1999). "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation." *Dev Biol* 216(2): 671-80.
- Orban, TI and Izaurralde, E (2005). "Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome." *Rna* 11(4): 459-69.
- Ouellet, DL, Perron, MP, Gobeil, LA, Plante, P and Provost, P (2006). "MicroRNAs in Gene Regulation: When the Smallest Governs It All." *J Biomed Biotechnol* 2006(4): 69616.
- Pekny, M, Johansson, CB, Eliasson, C, Stakeberg, J, Wallen, A, Perlmann, T, Lendahl, U, Betsholtz, C, Berthold, CH and Frisen, J (1999). "Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin." *J Cell Biol* 145(3): 503-14.
- Perlson, E, Hanz, S, Ben-Yaakov, K, Segal-Ruder, Y, Seger, R and Fainzilber, M (2005). "Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve." *Neuron* 45(5): 715-26.
- Perrin, FE, Boisset, G, Lathuiliere, A and Kato, AC (2006). "Cell death pathways differ in several mouse models with motoneurone disease: analysis of pure motoneurone populations at a presymptomatic age." *J Neurochem* 98(6): 1959-72.
- Petersen, CP, Bordeleau, ME, Pelletier, J and Sharp, PA (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." *Mol Cell* 21(4): 533-42.
- Pillai, RS, Bhattacharyya, SN, Artus, CG, Zoller, T, Cougot, N, Basyuk, E, Bertrand, E and Filipowicz, W (2005). "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." *Science* 309(5740): 1573-6.
- Popper, P, Farber, DB, Micevych, PE, Minoofar, K and Bronstein, JM (1997). "TRPM-2 expression and tunel staining in neurodegenerative diseases: studies in wobbler and rd mice." *Exp Neurol* 143(2): 246-54.
- Postigo, A, Calella, AM, Fritsch, B, Knipper, M, Katz, D, Eilers, A, Schimmang, T, Lewin, GR, Klein, R and Minichiello, L (2002). "Distinct requirements for TrkB and TrkC signaling in target innervation by sensory neurons." *Genes Dev* 16(5): 633-45.
- Poy, MN, Eliasson, L, Krutzfeldt, J, Kuwajima, S, Ma, X, Macdonald, PE, Pfeffer, S, Tuschl, T, Rajewsky, N, Rorsman, P and Stoffel, M (2004). "A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion." *Nature* 432(7014): 226-30.
- Rajewsky, N (2006). "microRNA target predictions in animals." *Nat Genet* 38 Suppl: S8-13.

- Rathke-Hartlieb, S, Schmidt, VC, Jockusch, H, Schmitt-John, T and Bartsch, JW (1999). "Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse." *Neuroreport* 10(16): 3411-6.
- Reichardt, LF (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1473): 1545-64.
- Rehmsmeier, M, Steffen, P, Hochsmann, M, Giegerich, R. (2004). "Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes." *RNA* 10(10): 1507-17.
- Reinhart, BJ, Slack, FJ, Basson, M, Pasquinelli, AE, Bettinger, JC, Rougvie, AE, Horvitz, HR and Ruvkun, G (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 403(6772): 901-6.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. (2004) „Rational siRNA design for RNA interference.“ *Nat Biotechnol.* 2004 Mar;22(3):326-30
- Robins, H, Li, Y and Padgett, RW (2005). "Incorporating structure to predict microRNA targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11): 4006-9.
- Saba, R and Booth, SA (2006). "Target labelling for the detection and profiling of microRNAs expressed in CNS tissue using microarrays." *BMC Biotechnol* 6: 47.
- Saiki, RK, Scharf, S, Faloona, F, Mullis, KB, Horn, GT, Erlich, HA and Arnheim, N (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230(4732): 1350-4.
- Salcedo, RM, Festoff, BW and Citron, BA (1998). "Quantitative reverse transcriptase PCR to gauge increased protease-activated receptor 1 (PAR-1) mRNA copy numbers in the Wobbler mutant mouse." *J Mol Neurosci* 10(2): 113-9.
- Schmitter, D, Filkowski, J, Sewer, A, Pillai, RS, Oakeley, EJ, Zavolan, M, Svoboda, P and Filipowicz, W (2006). "Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells." *Nucleic Acids Res* 34(17): 4801-15.
- Schmitt-John, T, Drepper, C, Mussmann, A, Hahn, P, Kuhlmann, M, Thiel, C, Hafner, M, Lengeling, A, Heimann, P, Jones, JM, Meisler, MH and Jockusch, H (2005). "Mutation of Vps54 causes motor neuron disease and defective spermiogenesis in the wobbler mouse." *Nat Genet* 37(11): 1213-5.
- Schratt, GM, Tuebing, F, Nigh, EA, Kane, CG, Sabatini, ME, Kiebler, M and Greenberg, ME (2006). "A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development." *Nature* 439(7074): 283-9.
- Seitz, H, Royo, H, Bortolin, ML, Lin, SP, Ferguson-Smith, AC and Cavaille, J (2004). "A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain." *Genome Res* 14(9): 1741-8.
- Sempere, LF, Freemantle, S, Pitha-Rowe, I, Moss, E, Dmitrovsky, E and Ambros, V (2004). "Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation." *Genome Biol* 5(3): R13.
- Sethupathy, P, Corda, B and Hatzigeorgiou, AG (2006). "TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets." *Rna* 12(2): 192-7.
- Sheth, U and Parker, R (2003). "Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies." *Science* 300(5620): 805-8.
- Smirnova, L, Grafe, A, Seiler, A, Schumacher, S, Nitsch, R and Wulczyn, FG (2005). "Regulation of miRNA expression during neural cell specification." *Eur J Neurosci* 21(6): 1469-77.
- Stark, A, Brennecke, J, Bushati, N, Russell, RB and Cohen, SM (2005). "Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution." *Cell* 123(6): 1133-46.
- Stark, A, Brennecke, J, Russell, RB and Cohen, SM (2003). "Identification of *Drosophila* MicroRNA targets." *PLoS Biol* 1(3): E60.

- Suh, MR, Lee, Y, Kim, JY, Kim, SK, Moon, SH, Lee, JY, Cha, KY, Chung, HM, Yoon, HS, Moon, SY, Kim, VN and Kim, KS (2004). "Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs." *Dev Biol* 270(2): 488-98.
- Syed, N, Smith, P, Sullivan, A, Spender, LC, Dyer, M, Karran, L, O'Nions, J, Allday, M, Hoffmann, I, Crawford, D, Griffin, B, Farrell, PJ and Crook, T (2006). "Transcriptional silencing of Polo-like kinase 2 (SNK/PLK2) is a frequent event in B-cell malignancies." *Blood* 107(1): 250-6.
- Takamizawa, J, Konishi, H, Yanagisawa, K, Tomida, S, Osada, H, Endoh, H, Harano, T, Yatabe, Y, Nagino, M, Nimura, Y, Mitsudomi, T and Takahashi, T (2004). "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival." *Cancer Res* 64(11): 3753-6.
- Tang, G, Reinhart, BJ, Bartel, DP and Zamore, PD (2003). "A biochemical framework for RNA silencing in plants." *Genes Dev* 17(1): 49-63.
- Tervonen, TA, Ajamian, F, De Wit, J, Verhaagen, J, Castren, E and Castren, M (2006). "Overexpression of a truncated TrkB isoform increases the proliferation of neural progenitors." *Eur J Neurosci* 24(5): 1277-85.
- Thermann, R and Hentze, MW (2007). "Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation." *Nature*.
- Thomson, JM, Parker, J, Perou, CM and Hammond, SM (2004). "A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression." *Nat Methods* 1(1): 47-53.
- Thor, S, Ericson, J, Brannstrom, T and Edlund, T (1991). "The homeodomain LIM protein Isl-1 is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat." *Neuron* 7(6): 881-9.
- Tsuchiya, Y, Nakajima, M, Takagi, S, Taniya, T and Yokoi, T (2006). "MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1." *Cancer Res* 66(18): 9090-8.
- Vella, MC, Choi, EY, Lin, SY, Reinert, K and Slack, FJ (2004). "The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR." *Genes Dev* 18(2): 132-7.
- Wang, Y, Weng, T, Gou, D, Chen, Z, Chintagari, NR and Liu, L (2007). "Identification of rat lung-specific microRNAs by microRNA microarray: valuable discoveries for the facilitation of lung research." *BMC Genomics* 8: 29.
- Warnke, S, Kemmler, S, Hames, RS, Tsai, HL, Hoffmann-Rohrer, U, Fry, AM and Hoffmann, I (2004). "Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells." *Curr Biol* 14(13): 1200-7.
- Wightman, B, Ha, I and Ruvkun, G (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." *Cell* 75(5): 855-62.
- Winkles, JA and Alberts, GF (2005). "Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues." *Oncogene* 24(2): 260-6.
- Wu, L and Belasco, JG (2005). "Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells." *Mol Cell Biol* 25(21): 9198-208.
- Wu, L, Fan, J and Belasco, JG (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11): 4034-9.
- Yang, X, Wang, J, Liu, C, Grizzle, WE, Yu, S, Zhang, S, Barnes, S, Koopman, WJ, Mountz, JD, Kimberly, RP and Zhang, HG (2005). "Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." *Am J Pathol* 167(3): 705-19.
- Yekta, S, Shih, IH and Bartel, DP (2004). "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA." *Science* 304(5670): 594-6.
- Yi, R, Qin, Y, Macara, IG and Cullen, BR (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev* 17(24): 3011-6.
- Yu, Z, Raabe, T and Hecht, NB (2005). "MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage." *Biol Reprod* 73(3): 427-33.

- Yuan, YR, Pei, Y, Chen, HY, Tuschl, T and Patel, DJ (2006). "A potential protein-RNA recognition event along the RISC-loading pathway from the structure of *A. aeolicus* Argonaute with externally bound siRNA." *Structure* 14(10): 1557-65.
- Zamore, PD, Tuschl, T, Sharp, PA and Bartel, DP (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." *Cell* 101(1): 25-33.
- Zeng, Y and Cullen, BR (2003). "Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells." *Rna* 9(1): 112-23.
- Zeng, Y, Wagner, EJ and Cullen, BR (2002). "Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells." *Mol Cell* 9(6): 1327-33.
- Zhang, MH, Lee, JS, Kim, HJ, Jin, DI, Kim, JI, Lee, KJ and Seo, JS (2006). "HSP90 protects apoptotic cleavage of vimentin in geldanamycin-induced apoptosis." *Mol Cell Biochem* 281(1-2): 111-21.
- Zhao, JJ, Hua, YJ, Sun, DG, Meng, XX, Xiao, HS and Ma, X (2006). "Genome-wide microRNA profiling in human fetal nervous tissues by oligonucleotide microarray." *Childs Nerv Syst* 22(11): 1419-25.
- Zhao, Y, Ransom, JF, Li, A, Vedantham, V, von Drehle, M, Muth, AN, Tsuchihashi, T, McManus, MT, Schwartz, RJ and Srivastava, D (2007). "Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2." *Cell* 129(2): 303-17.
- Zhao, Y, Samal, E and Srivastava, D (2005). "Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis." *Nature* 436(7048): 214-20.
- Zollner, O and Vestweber, D (1996). "The E-selectin ligand-1 is selectively activated in Chinese hamster ovary cells by the alpha(1,3)-fucosyltransferases IV and VII." *J Biol Chem* 271(51): 33002-8.
- Zuker, M and Stiegler, P (1981). "Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information." *Nucleic Acids Res* 9(1): 133-48.

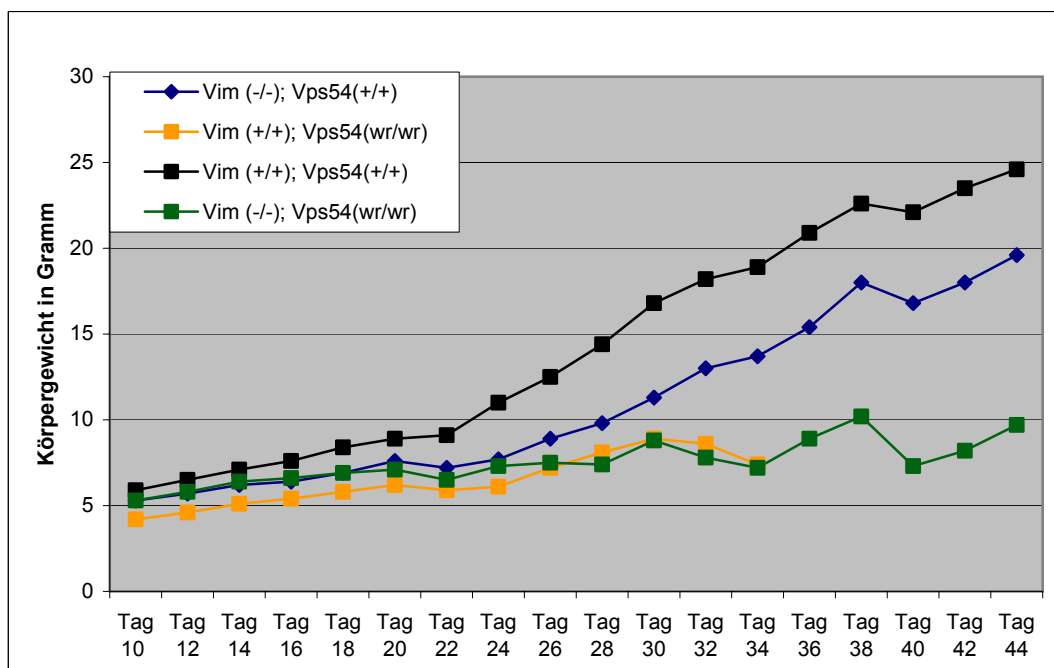
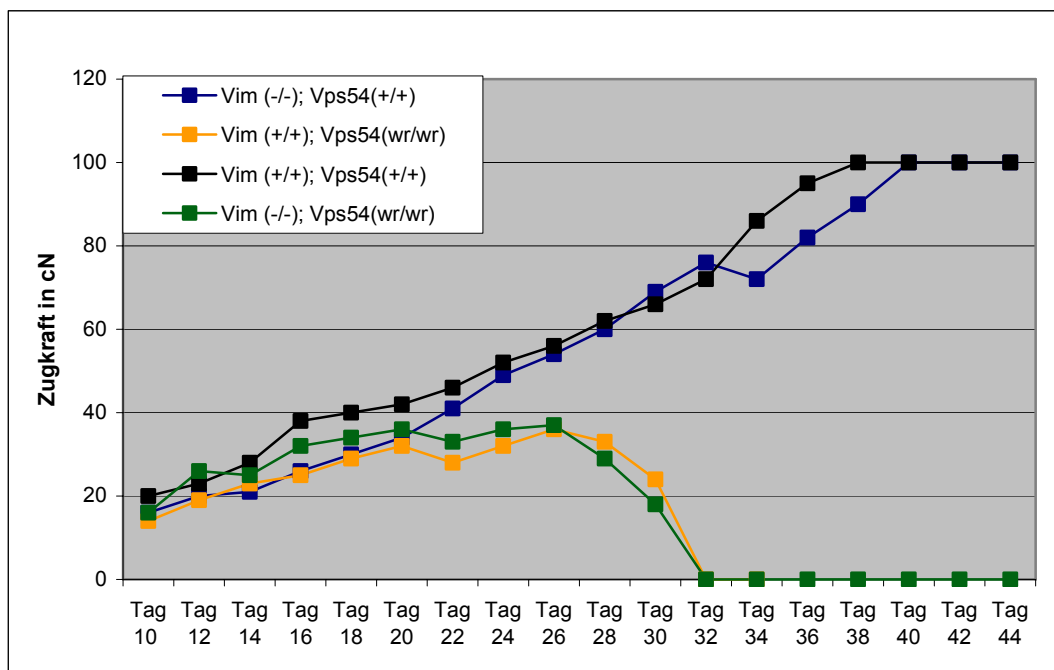
7 Anhang

7.1 Daten der Gewichts- und Kraftmessungen

Die Kraft und das Gewicht von Tieren mit den Genotypen C57Bl6/6J^{Vim^{-/-}; Vps54^{wr/wr}}, C57Bl6/6J^{Vim^{-/-}; Vps54^{+/+}}, C57Bl6/6J^{Vim^{+/+}; Vps54^{wr/wr}} oder C57Bl6/6J^{Vim^{+/+}; Vps54^{+/+}} wurden postnatal vom Tag 10 bis 46 alle zwei Tage ermittelt.

	Genotyp <i>Vim/Vps54</i>	Tag	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46
Wurf 1																					
174 ♀	+/+ wr/wr	Kraft in cN		23	34	38	32	34	32	42	45	52	56	42	30	30	36	36	18	11	0
Wurf 2																					
185 ♂	-/- wr/wr		18	18	21	28	29	30	29	30	36	44	40	24	34	10	0	0	0	0	0
193 ♂	-/- +/+		18	18	22	28	28	24	28	34	37	42	44	52	59	68	76	80	85	95	99
180 ♀	-/- wr/wr		18	22	23	29	33	29	30	32	32	42	53	44							
Wurf 3																					
201 ♂	-/- +/+		13	22	32	38	34	35	40	45	54	58	68	72	74	70	84	95	100	100	100
203 ♂	-/- +/+		15	19	27	30	36	34	42	48	49	58	62	66	64	72	80	90	90	95	98
182 ♀	-/- wr/wr		12	19	30	38	31	26	36	36	38	36	38	34	28	20	0	0	0	0	0
Wurf 4																					
211 ♂	-/- +/+		16	20	21	26	30	34	41	49	54	60	69	76	72	82	90	100	100	100	100
213 ♂	+/+ wr/wr		14	19	23	25	29	32	28	32	36	33	24	0	0						
215 ♂	+/+ +/+		20	23	28	38	40	42	46	52	56	62	66	72	86	95	100	100	100	100	100
217 ♂	-/- wr/wr		16	26	25	32	34	36	33	36	37	29	18	0	0	0	0	0	0	0	0
184 ♀	-/- wr/wr		17	21	28	32	30	31	36	42	44	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0
188 ♀	-/- +/+		15	25	26	34	35	37	44	48	57	63	70	72	74	85	95	90	97	100	100
Wurf 1																					
174 ♀	+/+ wr/wr	Gewicht in g		5,5	6,2	7	7,2	7,1	7,2	7,3	7,3	8	8,4	9,8	8,7	8,5	8,9	11,1	9,5	8,9	10
Wurf 2																					
185 ♂	-/- wr/wr		4,4	5	5,5	5,7	5,6	5,3	5,1	5,2	6,3	7	7,5	8,2	8,1	8,2	7,6	6,8	7,2	8	9
193 ♂	-/- +/+		4,6	5,1	5,6	5,4	5,2	5,3	5,1	5,5	6,9	7,9	8,3	9,5	10	12,5	14,2	14,4	14,7	17	18,5
180 ♀	-/- wr/wr		4	4,5	5,2	5,4	5,4	5	4,8	4,9	5,4	5,7	5,8	7,2							
Wurf 3																					
201 ♂	-/- +/+		6,2	7,1	7,5	7,6	7,2	8	7,9	8,4	10,2	12,3	14,2	15,8	17,4	19,6	20,8	21,3	21,5	22,2	23
203 ♂	-/- +/+		5,1	6,1	6,9	7	6,6	7	7,4	7,6	8,3	9,5	10,4	12,1	12,3	13,6	15,2	15,8	16,4	17,3	18,8
182 ♀	-/- wr/wr		5	5,9	7,5	6,5	5,9	6,4	6,5	6,7	6,8	7	7,5	8,5	8,2	9,2	9,1	6,9	7,8	9,5	10,5
Wurf 4																					
211 ♂	-/- +/+		5,3	5,7	6,2	6,4	6,9	7,6	7,2	7,7	8,9	9,8	11,3	13	13,7	15,4	18	16,8	18	19,6	21
213 ♂	+/+ wr/wr		4,2	4,6	5,1	5,4	5,8	6,2	5,9	6,1	7,2	8,1	8,9	8,6	7,4						
215 ♂	+/+ +/+		5,9	6,5	7,1	7,6	8,4	8,9	9,1	11	12,5	14,4	16,8	18,2	18,9	20,9	22,6	22,1	23,5	24,6	25
217 ♂	-/- wr/wr		5,3	5,8	6,4	6,6	6,9	7,1	6,5	7,3	7,5	7,4	8,8	7,8	7,2	8,9	10,2	7,3	8,2	9,7	11
184 ♀	-/- wr/wr		5,4	5,9	6,5	6,9	7,3	7,3	6,8	7,2	7,9	8,2	8,1	8,7	7,3	9,2	10,2	8,4	8,8	9,9	10,5
188 ♀	-/- +/+		5,4	6	6,8	7	7,3	7,8	8,2	8,6	9,5	10,1	12,5	13,1	13,6	15,5	16,6	16,5	17,5	18,5	20

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Gewichts- und Kraftmessung von vier männlichen Wurfgeschwistern, die alle Genotypen repräsentieren, dargestellt.



7.2 Vergleichende Sequenzanalyse des murinen *Trpc3*-Gens

Die in mehreren Klonen beobachteten SNPs zwischen den murinen 3'UTRs der Stämme C57Bl/6J und 129SvJ sind rot markiert. Die vorhergesagte Zielsequenz für die miR-339 ist durch fette Schrift markiert.

```

C57Bl 1   AGCCACCTGCAGTCAAGCCTTGACTATAGCACAAACGTGGGCAATAATACTCCTAAGTATG 60
      |
129SvJ 31  AGCCACCTGCAGTCAAGCCTTGACTATAGCACAAACGTGGGCAATAATACTCCTAAGTATG 90
      |
C57Bl 61  AAATACTTGAAAACTATGGTGTAGAGCTCTAGTGTCCCTACCTTTATCATGCGAAACT 120
      |
129SvJ 91  AAATACTTGAAAACTATGGTGTAGAGCTCTAGTGTCCCTACCTTTATCATGCGAAACT 150
      |
C57Bl 121  TTTAAATTAAGCTAGGCGGTTCATGATTTCCATTACATGAAATGGTTCCAGCAGTTGACCT 180
      |
129SvJ 151  TTTAAATTAAGCTAGGCGGTTCATGATTTCCATTACATGAAATGGTTCCAGCAGTTGACCT 210
      |
C57Bl 181  CGGCACCTGTACGCAGTGAGATGCTATTGTACTTAGAAGCCCAGTATTAATGTCACTGACA 240
      |
129SvJ 211  CGGCACCTGTACGCAGTGAGATGCTATTGTACTTAGAAGCCCAGTATTAATGTCACTGACA 270
      |
C57Bl 241  GTTTTTGTTCATCTTGTCTTTATGTACCTGTTGGCCTCCAAGAGTTCCTTGGGGGACAG 300
      |
129SvJ 271  GTTTTTGTTCATCTTGTCTTTATGTACCTGTTGGCCTCCAAGAGTTCCTTGGGGGACAG 330
      |
C57Bl 301  GGTCCACAGCGATCTCATCTTCATGTCTCCACATTTAGTACAGTGCCTGATACATAGTA 360
      ||
129SvJ 331  GGAACCACAGCGATCTCATCTTCATGTCTCCACATTTAGTACAGTGCCTGATACATAGTA 390
      ||
C57Bl 361  GGTGCTTGGTGAATGTGAAACCAAATGGCCGTCCAGCCAGTTGCATCCAAGAGCAGACGA 420
      |
129SvJ 391  GGTGCTTGGTGAATGTGAAACCAAATGGCCGTCCAGCCAGTTGCATCCAAGAGACAGACGA 450
      |
C57Bl 421  GAGACCATCACTGAGTAGCATAAGTTCTCATCCAAACGCTGAAGCAGGTTTTTGTTTTTT 480
      |
129SvJ 451  GAGACCATCACTGCATAGCATAAGTTCTCATCCAAACGCTGAAGCAGGTTTTTGTTTTTT 510
      |
C57Bl 481  GTTTTTTT-AAATAGAACTGAAGATGTTTTACAACCAGCTATGACTTGTGGAGATCTTT 539
      |
129SvJ 511  GTTTTTTTAAATAGAACTGAAGATGTTTTACAACCAGCTATGACTTGTGGAGATCTTT 570
      |
C57Bl 540  CTTAGACTTTTAGATGCTGCTGACAATTCTAGGATGTTGAAATGCAAGTGAAGAATTTA 599
      |
129SvJ 571  CTTAGACGTTTAGATGCTGCTGACAATTCTAGGATGTTGAAATGCAAGTGAAGAATTTA 630
      |
C57Bl 600  ACAGGGAAATGAGCTAATTGAAAGTACGGTTACTACTACATATTTAAATTTTCATGGGGTTG 659
      |
129SvJ 631  ACAGGGAAATGAGCTAATTGAAAGTACGGTTACTACTACATATTTAAATTTTCATGGGGTTG 690
      |
C57Bl 660  TTCAAAAA 667
      |
129SvJ 691  TTCAAAAA 698

```

7.3 Hybridisierungsstrukturen der analysierten miRNA-Zielgen-Interaktionen

Nachfolgend sind die Hybridisierungsstrukturen der in dieser Arbeit untersuchten Interaktionen dargestellt, die bei der statistischen Bewertung zur Signifikanzberechnung beigetragen haben. Interaktionen die im Reporter-Assay einen Effekt zeigten sind grün, Interaktionen die keinen signifikanten Effekt oder nur einen schwachen Effekt in einer Spezies sind rot geschrieben.

Kategorie "klassische Vorhersage"

Trpc3:miR-339

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -37.5 kcal/mol position 310 target 5' C U C 3' AGUUCCU GGGGACAGGGA UCGAGGA CUCCUGUCCU miRNA 3' AC C 5'	mfe: -41.9 kcal/mol position 285 target 5' A U U 3' GAGUUCC UGGGGACAGGG CUCGAGG ACCUCCUGUCC miRNA 3' A U 5'	mfe: -44.1 kcal/mol position 294 target 5' A U C 3' GAGUUCC UGGGGACAGGGA CUCGAGG ACCUCCUGUCCU miRNA 3' A U 5'

Isl2:miR-27b

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -29.3 kcal/mol position 529 target 5' G U U U G C 3' UAUGUGAGCC CGAACAAA GUGCGCUCGG GCUUGUUU miRNA 3' A CUU 5'	mfe: -25.1 kcal/mol position 418 target 5' C U G G A G U 3' C GC AGC GGAC GAACAA G CG UCG CUUG CUUGU miRNA 3' A U G C G U 5'	mfe: -22.9 kcal/mol position 540 target 5' A G A U U U G C 3' CA UG GAGCC CGAACAAA GU GC CUCGG GCUUGUUU miRNA 3' A G CUU 5'

Mapk7:miR-143

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -24.9 kcal/mol position 1233 target 5' A CCG AU G 3' GGC GCGG UUUCAUCUCA UCG UGUC GAAGUAGAGU miRNA 3' AC A AC 5'	mfe: -29.9 kcal/mol position 101 target 5' U UC AGG G 3' UGAGUUAC UGC UUCAUCUCA ACUCGAUG ACG AAGUAGAGU miRNA 3' UC 5'	mfe: -29.9 kcal/mol position 102 target 5' U UC AGG G 3' UGAGUUAC UGC UUCAUCUCA ACUCGAUG ACG AAGUAGAGU miRNA 3' UC 5'
mfe: -24.7 kcal/mol position 111 target 5' U G G 3' CUGCAG UUCAUCUCA GAUGUC AAGUAGAGU miRNA 3' ACUC ACG 5'		

Arhgef:miR-143

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -25.9 kcal/mol position 231 target 5' A ACC ACCCGGGC G 3' GGG ACGGUG CAUCUCA CUCG UGUCAC GUAGAGU miRNA 3' A A GAA 5'		
mfe: -25.0 kcal/mol position 78 target 5' C C AG C 3' AGCUGC GC CAUCUCA UCGAUG CG GUAGAGU miRNA 3' AC UCA AA 5'		

Pms2:miR-136

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -24.2 kcal/mol position 994 target 5' A UUU C C 3' CC UCAAA CAGAUGGAG GG AGUUU GUUUACCUC miRNA 3' A UAGU U A 5'	mfe: -20.3 kcal/mol position 2372 target 5' G UAG GC GC G 3' CC CA GGCAG AUGGAGU GG GU UUGUU UACCUCA miRNA 3' A UA AGUU 5'	

Ampd3:miR-351

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -30.7 kcal/mol position 695 target 5' G AGG AGUGAGUGA G C 3' GGG GAAGGG U CUCAGGGG UCC UUUUCC A GAGUCCU miRNA 3' G GAG G 5'	mfe: -41.2 kcal/mol position 772 target 5' U AG ACC A G 3' GGG UCAg AGGG CUCCUCAGGGA UCC AGUU UCCG GAGGAGUCCU miRNA 3' G G 5'	mfe: -38.2 kcal/mol position 773 target 5' C AG ACC ACUGA A 3' CAGG UCAG AGGG CUCCUCAGGGG GUCC AGUU UCCG GAGGAGUCCU miRNA 3' G 5'
mfe: -29.5 kcal/mol position 629 target 5' A GACUAGAU U U 3' GGGUUUG GAG GGCUU UCAGGG UCCGAGU UUC CCGAG AGUCC miRNA 3' G G U 5'		

Ptdsr:miR-96

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -29.6 kcal/mol position 210 target 5' G GA AA A 3' GCAA GAAUGUG UAGUGCCAAG CGUU UUUACAC AUCACGGUUU	mfe: -31.7 kcal/mol position 135 target 5' G GC GA U 3' GGCAAAG GUGUG UGGUGCCAA UCGUUUU UACAC AUCACGGUU	
miRNA 3' G 5'	miRNA 3' G U 5'	

Kategorie "G:U zulassen"

FutIV:miR-412

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -30.0 kcal/mol position 405 target 5' C UU UUC A C 3' ACG U UGGACC AGGUGAAG UGC A ACCUGG UCCACUUC	mfe: -32.9 kcal/mol position 169 target 5' G GC UC G 3' GGCU GGUG CUGGGUGAAG CCGA UCAC GGUCCACUUC	
miRNA 3' CG UC A 5'	miRNA 3' UG CU A 5'	
mfe: -28.4 kcal/mol position 218 target 5' U U A AUCAUUGUUUAG G 3' GC GCUG UGGGC GGGUGAAG UG CGAU ACCUG UCCACUUC	mfe: -31.4 kcal/mol position 350 target 5' C GGGUUAUGAGA AGGAUUGUGCCCA U 3' CGGU UAGUGGA CAGGUGGGU GCCG AUCACCU GUCCACUUA	
miRNA 3' C C G A 5'	miRNA 3' U G 5'	
mfe: -26.7 kcal/mol position 521 target 5' U CC A A A 3' UGGCU UG GA AGGUGAGG GCCGA AC CU UCCACUUC		
miRNA 3' U UC GG A 5'		

Clcn3:miR-432*

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -29.7 kcal/mol position 94 target 5' U UG AA G 3' GG G UGGAGGAGUUGUUUG UC U ACCUCUCGGUAGGUC	mfe: -21.2 kcal/mol position 24 target 5' G GAA A U U 3' AGACA GAGG AG UCGUUUG UCUGU CUCC UC GGUAGGU	mfe: -21.2 kcal/mol position 24 target 5' G GAA A U U 3' AGACA GAGG AG UCGUUUG UCUGU CUCC UC GGUAGGU
miRNA 3' UG 5'	miRNA 3' AC C 5'	miRNA 3' AC C 5'
mfe: -24.9 kcal/mol position 2 target 5' C A C 3' UG GGGAGUCAUCUA AC UCCUCGGUAGGU	mfe: -20.5 kcal/mol position 70 target 5' C C C C 3' UG GGA UCGUCCA AC UCCU GGUAGGU	mfe: -20.5 kcal/mol position 70 target 5' C C C C 3' UG GGA UCGUCCA AC UCCU GGUAGGU
miRNA 3' UCUGU C C 5'	miRNA 3' UCUGU C C C 5'	miRNA 3' UCUGU C C C 5'

Sfrp4:miR-453

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -35.3 kcal/mol position 51 target 5' U A UG A 3' GGGC UUGCC GGACAGCCU CUUG AGUGG CCUGUUGGA	mfe: -32.2 kcal/mol position 39 target 5' G U UG A 3' G GCU GCC GGACAGCCU C UGA UGG CCUGUUGGA	mfe: -32.3 kcal/mol position 38 target 5' U U UG C 3' GG ACU GCC GGACAGCCU CU UGA UGG CCUGUUGGAG
miRNA 3' G UG G 5'	miRNA 3' G U G UG G 5'	miRNA 3' G G UG 5'

Kategorie "freie Vorhersage"

Zic1:miR-328

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -35.9 kcal/mol position 465 target 5' G A A 3' GGGAGGG GGGAGGG CCGG CCUUCCC CUCUCCC GGUC	mfe: -37.5 kcal/mol position 500 target 5' G U UGGUCUUUGCCUU A A 3' GCG GG GGGG GGGGAGGCCAG UGC CU UCCC UCUCUCCGGUC	
miRNA 3' UG GU 5'	miRNA 3' G 5'	
mfe: -35.8 kcal/mol position 484 target 5' G GC G AG G 3' AUGG GGG GGAGGGGG GG UGCC CCC UCUCUCCC UC	mfe: -37.5 kcal/mol position 544 target 5' G GA G C 3' GGAGGGG GGGGAGGG CGG CCUUCCC UCUCUCCC GUC	
miRNA 3' UU G GG 5'	miRNA 3' UG G 5'	
mfe: -34.6 kcal/mol position 505 target 5' N GU C A 3' GGGAGGG GGG GGCCG CCUUCCC CUC CCGGU	mfe: -36.4 kcal/mol position 275 target 5' A U A G A 3' GC GAAGGGCCGA GGGGU G UG CUUCCCGUCU CUCCCG U	
miRNA 3' UG GU UC C 5'	miRNA 3' C G C 5'	
mfe: -33.8 kcal/mol position 236 target 5' U UAG CGAG AG C 3' GCGG GGGGU GGGGAGG GCCA UGCC CCC UCUCUCCC CCGU		
miRNA 3' U C 5'		

Rgs4:miR-489

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -32.7 kcal/mol	mfe: -30.6 kcal/mol	mfe: -33.0 kcal/mol
position 118	position 119	position 118
target 5' U UGCC U 3'	target 5' C C U 3'	target 5' U UGCC U 3'
GCUGCC AUGUGUGA GUCACU	CUGCCG GUGUGA GUCACU	GCUGCC GUGUGUGA GUCACU
CGACGG UAUACACU CAGUGA	GACGGC UACACU CAGUGA	CGACGG UAUACACU CAGUGA
miRNA 3' CA A 5'	miRNA 3' C AUA A 5'	miRNA 3' CA A 5'

Vti1a:miR-339

Mensch	Maus	Ratte
mfe: -43.8 kcal/mol	mfe: -37.3 kcal/mol	
position 38	position 38	
target 5' A GAU A 3'	target 5' A A GCU A 3'	
UGAGCUCCUGGGGGAU GGGA	UGAGCUCCU GGGGAU GGGA	
ACUCGAGGACCUCUG CCCU	ACUCGAGGA CUCCUG CCCU	
miRNA 3' U 5'	miRNA 3' C U 5'	
	mfe: -35.3 kcal/mol	
	position 284	
	target 5' A C UUCU U 3'	
	GAGCUCU GGA GACGGGGA	
	CUCGAGG CCU CUGUCCU	
	miRNA 3' A A C 5'	

Slc23a:miR-520h

Mensch	Maus	Ratte
	mfe: -32.0 kcal/mol	mfe: -33.0 kcal/mol
	position 6	position 6
	target 5' C AAUG GUG A 3'	target 5' C UGA GG G 3'
	CUC AAAGGGAGGCACU UGU	CUCUA AAGGGAGGCAC UGU
	GAG UUUCCCUUCGUGA ACA	GAGAU UUUCCCUUCGUG ACA
	miRNA 3' U A A 5'	miRNA 3' U AA 5'

Calcb:miR-453

Mensch	Maus	Ratte
	mfe: -30.7 kcal/mol	mfe: -33.7 kcal/mol
	position 10	position 7
	target 5' A G UACAUAAGUUGA A 3'	target 5' A G UACAUAAGUUGA A 3'
	GCUCCA GAAGAAGGU ACUC	ACGCUCCA GAAGAAGGU ACUC
	CGAGGU UUUCUCCG UGAG	UGCGAGGU UUUCUCCG UGAG
	miRNA 3' UG 5'	miRNA 3' 5'

7.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca	circa
CAP	engl.: Kappe, Modifikation des 5'Endes einer mRNA
cDNA	<i>copy DNA</i>
CM	Complete Medium
cm	Zentimeter
CTP	Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
EST	Expressed Sequence Tag
FCS	fötales Kalberserum
FM	Feeder Medium
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
IPTG	Isopropyl-beta-D-1-thiogalacto-pyranoside
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Lif	Leukemia inhibitory factor
M	molar
min	engl.: minute
miRNA	microRNA
miRNP	microRibonukleoprotein
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
nt	Nukleotide
O.D.	optische Dichte
ORF	engl.: <i>open reading frame</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

pmol	Pikomol
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR
RACE	engl. <i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RISC	engl.: <i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	engl. <i>round per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	engl.: second
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i>
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	engl. <i>unit</i> , Einheit
u.a.	unter anderem
UTR	Untranslatierte Region
UV	ultraviolett
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel

7.5 Danksagung

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie der Universität Bielefeld angefertigt (Prof. Dr. Harald Jockusch). Den Nachfolgern von Herrn Jockusch, Prof. Dr. Zimmer und Prof. Dr. Kaltschmidt, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für das interessante Thema und die Unterstützung möchte ich mich bei meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. Thomas Schmitt-John und Dr. Marc Rehmsmeier bedanken. Herrn Prof. Dr. Hinssen danke ich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit durch den Wechsel von Herrn Schmitt-John an eine andere Universität. Ebenso danke ich der DFG für meine Finanzierung im GK Bioinformatik.

Dr. Peter Heimann danke ich für die technische Unterstützung bei der Anfertigung von Gewebepreparaten und für seine herzerfrischende Art. Der Firma Miltenyi und besonders Ute Bissels danke ich für die Kooperation bei der Erstellung der vergleichenden miRNA-Expressionsprofilen. Besonders möchte ich mich bei Gregor Obernosterer für die Durchführung der *in situ* Hybridisierungen, die stetige Hilfsbereitschaft und seine Freundschaft danken.

Bei Elke und Christiane möchte ich mich für die große Hilfe im Labor und bei der Mauszucht bedanken. Meinem Mitbewohner und Lehrstuhlgenossen Timo danke ich für die Hilfe W7 am Leben zu erhalten, konstruktive Kritik und die nette Atmosphäre. Meinem langjährigen Studiumskollegen Larry, danke ich für seine Freundschaft, stetige Hilfsbereitschaft und sein offenes Sorgenohr. Gleichzeitig danke ich ihm, Timo, Carsten und Carsten für die konstruktive Kritik an dieser Arbeit.

Ganz besonders hervorheben möchte ich meinen langjährigen Laborkollegen Carsten, für seine Ideen, seine motivierende und aufopferungsvolle Diskussionsbereitschaft und die großartige Atmosphäre im Labor, aber auch für die nette Gesellschaft bei dem einen oder anderen Kreativtrunk.

Zum Schluss möchte ich noch einen ganz besonderen Dank an meine Eltern und meine Schwester aussprechen, die viel Ausdauer und Geduld während meiner akademischen Ausbildung bewiesen und mich immer unterstützt haben.

7.6 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angeführten Materialien und Quellen angefertigt habe.

Bielefeld, den 13.06.2007

Robert Heinen