



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Wirkung und qPCR-basierte Quantifizierung von miRNAs
in Tumorzellen“

verfasst von

Victoria Bauer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Univ.-Prof. Dr. Ernst Urban

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ein großes Dankeschön an Univ.-Prof. Dr. Ernst Urban aussprechen, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Diplomarbeit am Department für medizinische Chemie durchzuführen.

Dankend erwähnen möchte ich auch Dr. Johannes Winkler, welcher mir mit zahlreichen Ratschlägen und Hilfestellungen bei der Ausführung der Experimente und der Datenanalyse zur Seite stand.

Weiters bedanke ich mich bei Volker Baumann M.Sc., für die umfassende und freundliche Betreuung in allen Bereichen meiner Diplomarbeit.

Abschließend möchte ich ein besonderes Dankeschön an meine Eltern richten, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich auf meinem Weg immer unterstützen.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Inhaltsangabe

Danksagung.....	1
Inhaltsangabe.....	3
Zusammenfassung.....	5
Abstract.....	6
1. Einleitung.....	7
1.1. MicroRNA.....	7
1.1.1. Entwicklung.....	7
1.1.2. Nukleare Biogenese.....	8
1.1.3. Zytoplasmatische Biogenese.....	10
1.2. MicroRNA und Krebs.....	11
1.3. siRNA.....	12
1.4. RNA-Interferenz.....	13
1.5. RNA-basierte Therapeutika.....	14
2. Ziel.....	16
3. Materialien und Methoden.....	17
3.1. MiRNA Sequenz.....	17
3.2. MiRNA Primer Design.....	18
3.3. MiRNA Synthese.....	19
3.4. RNA Abspaltung und Aufreinigung.....	19
3.5. Analyse der Oligonukleotide.....	20
3.6. Zellkultur.....	21
3.7. Zelllinienvermehrung.....	21
3.8. Reverse Transfektion.....	22
3.9. RNA Isolation.....	23
3.10. cDNA Synthese.....	24
3.11. RT-qPCR.....	25
3.12. Proliferationstest.....	26

3.13. Probidiumjodidfärbung und FACS Analyse.....	27
4. Resultate.....	28
4.1. Oligonukleotidsynthese.....	28
4.2. RT-qPCR.....	29
4.2.1. Relative Expression von miR-15a und miR-125b.....	29
4.3. Proliferationstest.....	31
4.4. FACS Versuch	35
4.5. Validierung von Referenzgenen.....	39
4.5.1. Validierung von Referenzgenen für HeLa Zellen.....	40
4.5.2. Validierung von Referenzgenen für MCF-7 Zellen.....	43
4.5.3. Validierung von Referenzgenen für KBC-1 Zellen.....	46
5. Diskussion.....	49
5.1. MicroRNAs.....	49
5.2. Oligonukleotidsynthese.....	51
5.3. Quantifizierung.....	51
5.4. Proliferationstest.....	52
5.5. Validierung von Referenzgenen.....	53
6. Liste der Abkürzungen.....	55
7. Quellenangaben.....	57
8. Anhang.....	61
Lebenslauf.....	62

Zusammenfassung

RNA Interferenz ist ein natürlicher biologischer Prozess, der besonders in den letzten beiden Dekaden in das Zentrum der Forschung vieler Wissenschaftler gerückt ist. MIRNAs und siRNAs, kurze RNA Sequenzen mit einer ungefähren Länge von 21 Basenpaaren, interferieren mit komplementärer mRNA und schalten so bestimmte Gene ab. Diese Methode gilt als besonders zukunftsversprechend im Bezug auf Krebstherapie, Autoimmunerkrankungen, und dergleichen mehr.

In dieser Diplomarbeit wurde der Blick auf das Ausmaß der miRNA Wirkung in Tumorzellen gelegt. Je nach Tumorart werden miRNAs in Tumorzellen hinauf- oder hinunterreguliert. Eine komplementäre Bindung einer anti-Tumor miRNA an die gewünschte mRNA kann schließlich Apoptose oder ein Anhalten des Zellzyklus bewirken.

Für eine aussagekräftige Bestimmung des miRNA Potentials, ist es notwendig Referenzgene zu finden, welche durch miRNA und siRNA Transfektionen nicht bzw. nur sehr wenig beeinflusst werden und eine möglichst geringe Schwankungsbreite aufweisen. Aus diesem Grund wurde eine Analyse mittels RT-qPCR mit unterschiedlichen Referenzgenen in drei verschiedenen Zelllinien durchgeführt und ihre Stabilität anhand der RefFinder-Software, ausgewertet. Dabei erwiesen sich NFATC3 (HeLa, MCF-7 und KBC-1), ZNF48 (MCF-7, KBC-1) und GOLGA1 (HeLa, KBC-1) als geeignetste Referenzgene.

Nach Synthese und Aufreinigung wurden miRNA-125b, 218, 29b-1, 29b-2 und 4731 auf ihre Effektivität in HeLa Zellen getestet. Die Expressionsrate wurde mit RT-qPCR gemessen und so die erfolgreiche Transfektion bestätigt. Die Proliferationshemmung durch die miRNA Transfektion anhand eines Formazan-basierenden Assays untersucht. Die Hemmung der Expression durch die ausgewählten anti-Tumor-miRNAs betrug maximal 7,8 % nach Behandlung mit miR-15a. Des Weiteren wurde miRNA-4731 für die Ko-Transfektion mit verschiedenen potenten siRNAs ausgewählt. Im Fall der Hemmung von PLCB-1, HSP 90 und MCL-1 konnte eine Verstärkung des Effekts durch miRNA-4731 festgestellt werden.

Mit Hilfe einer Durchflusszytometrie-Auswertung wurde die Beeinflussung des Zellzyklus von HeLa Zellen nach der Transfektion mit miRNAs getestet. Keine der miRNAs führte zu einem signifikanten Zellzyklus-Arrest. Diese Ergebnisse unterstreichen den regulatorischen Einfluss tumorrelevanter miRNAs mit deren geringen direkten Einfluss auf den Zell-Phänotyp.

Abstract

RNA interference is a natural biological process, which became the focus of attention for many scientists in the last two decades. MiRNAs and siRNAs, short sequences with a length of about 21 base pairs, interfere with complementary mRNA and silence specific genes. This method seems very promising concerning cancer therapy, autoimmune diseases and the like.

In this thesis the effects of specific miRNAs on tumor cells were investigated. Compared to healthy tissue, miRNAs are often up or down regulated in tumors. A complementary binding between an anti-tumor miRNA and its target mRNA can ultimately cause apoptosis or a cell cycle arrest.

For a significant determination of the miRNA potential, it is necessary to find reference genes with a small range of variation, which are not or just little affected by miRNA and siRNA transfections. Therefore an analysis with the RT-qPCR was performed in three cell lines and the stability was evaluated with the RefFinder software. These experiments revealed NFATC3 (HeLa, MCF-7, and KBC-1), ZNF48 (MCF-7, and KBC-1) und GOLGA1 (HeLa, and KBC-1) as most suited reference genes.

After the synthesis and purification, the efficacy of miRNA-125b, 218, 29b-1, 29b-2, and 4731 in HeLa cells was tested. The expression levels were measured with RT-qPCR and proved successful transfection of the synthetic miRNAs. The proliferation repression, caused by the miRNA transfection, was investigated with a formazan-based assay. The reduction of proliferation reached a maximum of 7.8 % after treatment with miR-15a. MiRNA-4731 was chosen for co-transfections with different potent siRNAs. In the case of PLCB-1, HSP 90 and MCL-1 an increase of inhibition with miR-4731 was observed.

By means of flow cytometry analysis, effects of the miRNA transfections on the cell cycle of HeLa cells were tested. None of the miRNAs attained a significant cell-cycle arrest. These outcomes emphasize the regulatory role of tumor-relevant miRNAs with their small direct influence on the cell-phenotype.

1. Einleitung

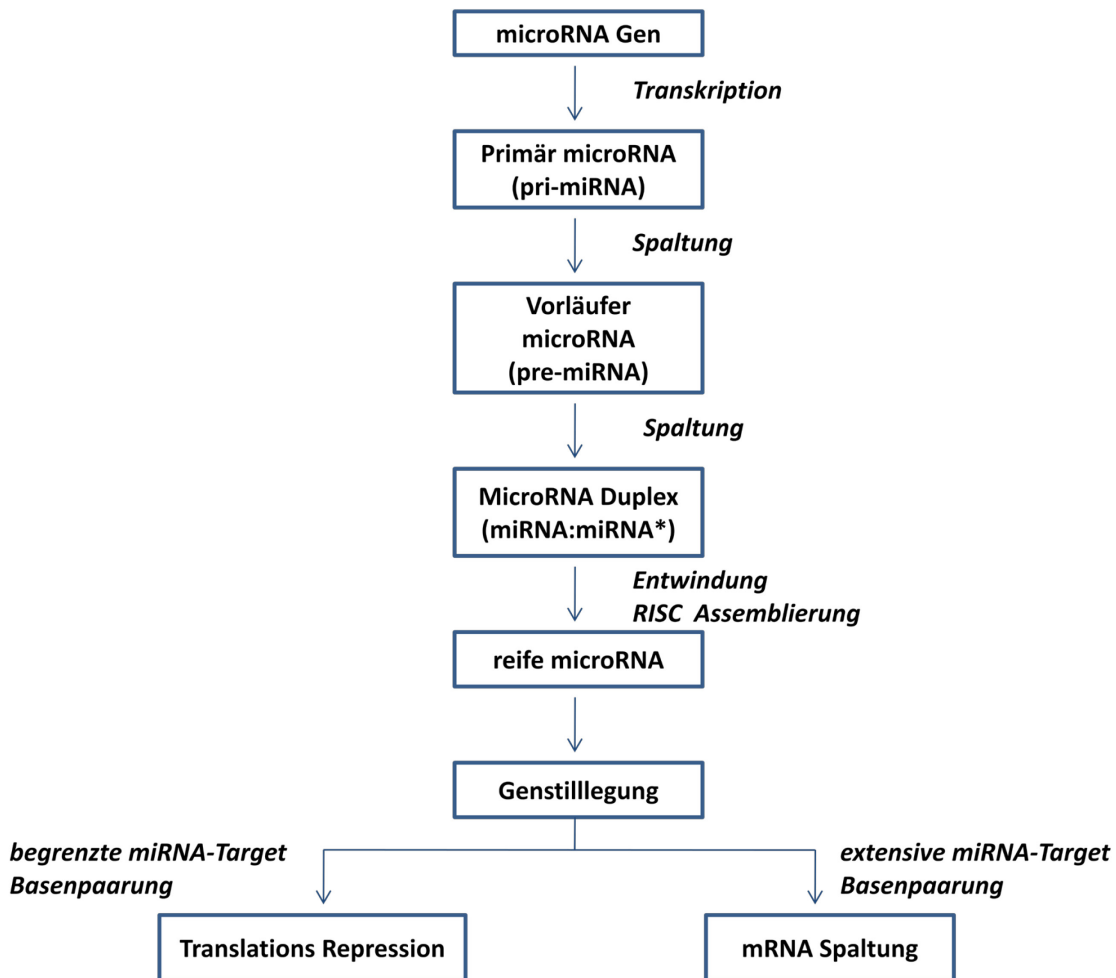
1.1. MicroRNA

MicroRNAs gehören zu einer neu-entdeckten Klasse von kleinen nicht codierenden, hoch konservierten RNAs, welche die Genexpression durch Binden an das 3' Ende nicht übersetzter Regionen ihrer Ziel-Boten-RNA unterdrücken.² In der Regel sind sie 21 - 23 Basenpaare lang und spielen eine wichtige Rolle in verschiedensten biologischen Prozessen, wie Entwicklung, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose.¹⁴ MiRNAs finden sich in 1-5% des menschlichen Genoms und regulieren etwa 30% der Protein-codierenden Gene.¹

Zum ersten Mal wurden microRNAs 1993 erwähnt. 2001 wurde der Begriff anhand des Nematoden *Caenorhabditis elegans* wissenschaftlich beschrieben und geprägt.² Untersuchungen der letzten zwei Jahrzehnte deuten stark daraufhin, dass eine Deregulierung von miRNAs zur Entwicklung von Krankheiten, inklusive Krebs führt.²¹

1.1.1. Entwicklung

MicroRNAs entwickeln sich aus einer 60-70 Basenpaare langen Haarnadel-Vorstufe. Diese Vorläufer finden sich in Form von Komplexen in den unterschiedlichsten Regionen des Genoms. Häufig sind sie in Introns Protein-codierender Gene anzutreffen. Ursprünglich wurden diese Bereiche als „junk DNA“ bezeichnet, da ihre Funktion bis dahin unklar war. Laut Studien von Lee et al. 2004 ist anzunehmen, dass die Mehrheit der miRNAs durch die RNA Polymerase II transkribiert wird. Sie ist der katalytische Teil des Proteinkomplexes, welcher DNA in mRNA umschreibt. Jedoch ist auch die RNA Polymerase III in der Lage miRNAs zu transkribieren. Die Tatsache, dass miRNAs durch die Polymerasen II und III synthetisiert werden, zeigt ihre essentielle Rolle in der Genexpression für eine korrekte Zellfunktion.^{1,6}



Micro-RNA Reifung

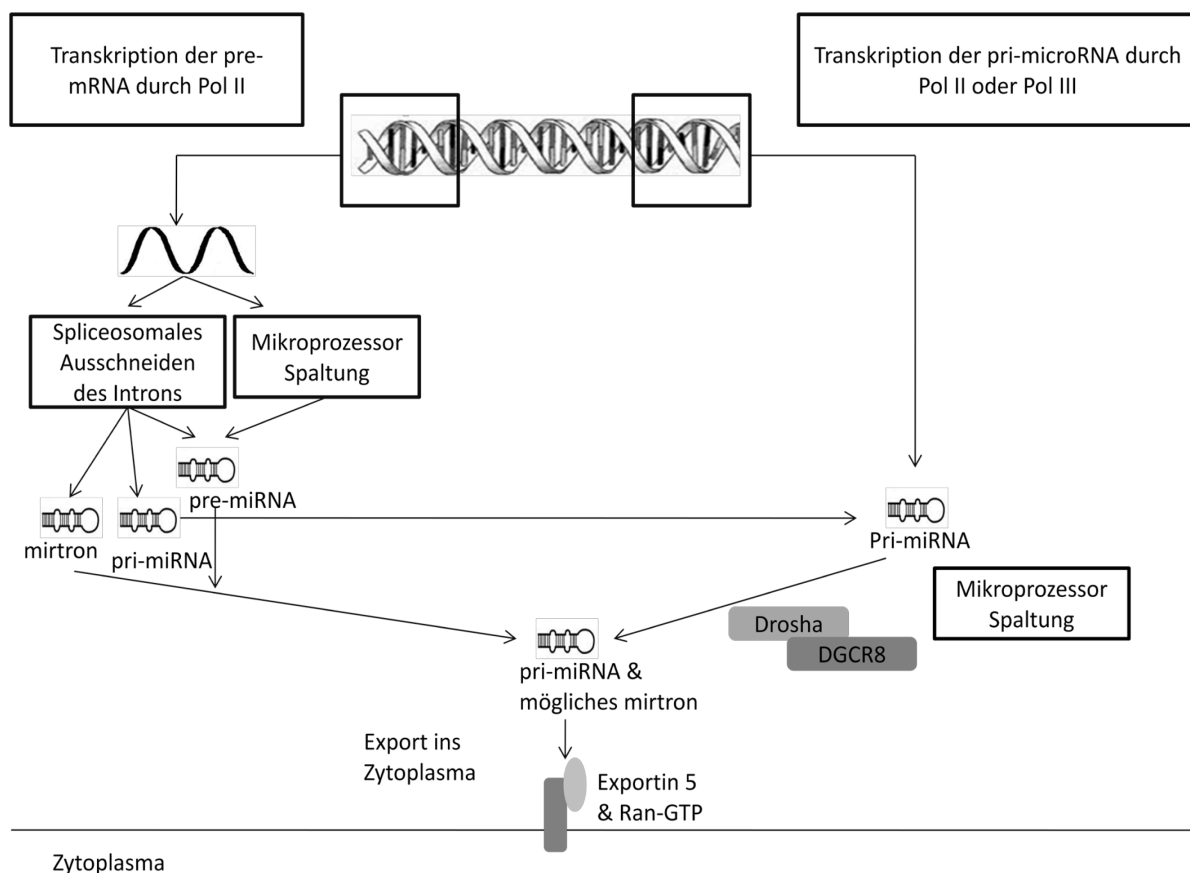
Das miRNA Gen wird im ersten Schritt durch Transkription zur pri-miRNA und durch weitere Spaltungsprozesse zur Vorläufer miRNA (pre-miRNA). Die pre-miRNA wird im Zytoplasma gespalten, der miRNA Duplex, welcher die gereifte miRNA enthält, entsteht. Die RNA-Duplex entwindet sich, die miRNA wird von RISC aufgenommen und verbindet sich basenpaarweise mit der spezifischen mRNA. Dieser Vorgang führt so zur Genstilllegung durch mRNA Spaltung oder Translationshemmung, abhängig vom Komplementaritätsgrad zwischen miRNA und mRNA.¹

1.1.2. Nukleare Biogenese

Drosha und Dicer, zwei Ribonuklease II Endonukleasen, sind verantwortlich für die Spaltungsprozesse des zweistufigen Entstehungszyklus. Welchen Entwicklungspfad die miRNA durchläuft ist abhängig von mehreren Faktoren. Der erste Bestimmungsfaktor ist ihr Ursprung. Die Unterscheidung erfolgt hier zwischen intergenischen und nicht kodierenden-intronischen miRNAs. RNA Polymerase II oder III sind die ersten Werkzeuge zur Entstehung intergenischer miRNA. Sie erzeugen eine primäre miRNA (pri-miRNA), welche durch den Mikroprozessor-Komplex in eine Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) umgewandelt wird. Die gegenseitige Kontrolle von Drosha und DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) ist ein entscheidender Regulierungsmechanismus bei der miRNA-Entstehung. DGCR8 erkennt die pri-miRNA anhand

ihrer ssRNA-dsRNA Bindung und lenkt Drosha an eine spezifische Spaltungsstelle. Drosha schneidet und legt eine 60-70 Bp lange miRNA-Haarnadel-Vorstufe frei. Ein Ende der reifen miRNA wird so definiert. Die pre-miRNA enthält die ausgereifte miRNA entweder im 3' oder 5' Arm. Die kodierende-intronische miRNA hingegen wird als Teil der pre-miRNA von Polymerase II transkribiert.¹

Pre-miRNAs werden in einem nukleozytoplasmatischen Transporter, gemeinsam mit Exportin 5 und Ran-GTP ins Zytoplasma transferiert. Die Komplexbildung mit den Transporterfaktoren schützt die miRNA vor dem Abbau.

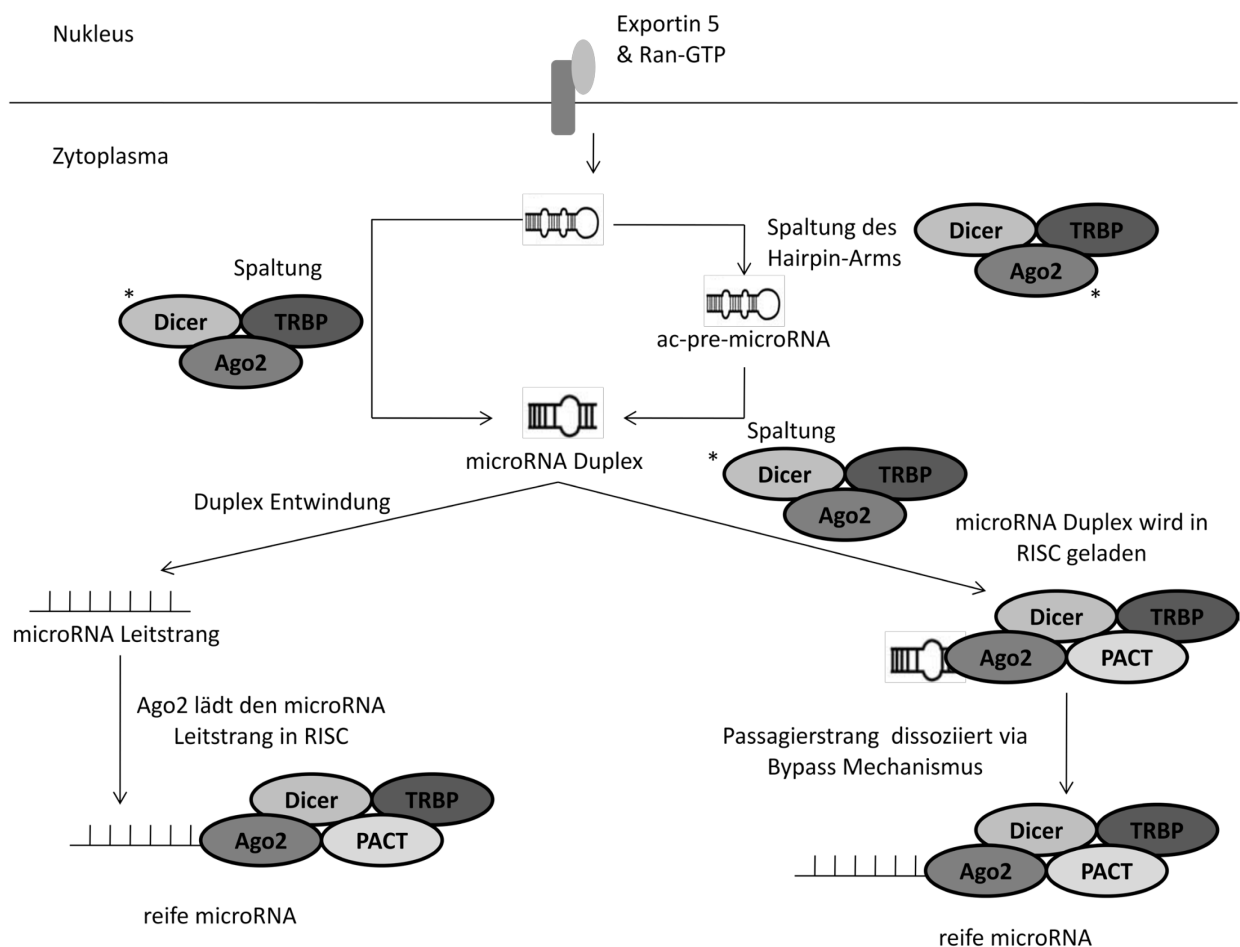


Nukleare microRNA Biogenese

Intergenische miRNAs werden von RNA Polymerase II oder III in eine primäre miRNA (pri-miRNA) umgeschrieben, diese wird durch den Mikroprozessor, bestehend aus DGCR8 und Drosha, zu einer Vorläufer miRNA prozessiert (pre-miRNA). Pre-miRNAs werden im Komplex mit Exportin 5 und Ran-GTP ins Zytoplasma exportiert. MiRNAs mit Introns werden durch RNA Polymerase II als Teil einer Vorläufer mRNA transkribiert. Die miRNA wird dann mit Hilfe von Spleißosomen oder dem Mikroprozessor von der pre-mRNA getrennt, um ein Mirtron oder eine pre-miRNA freizulegen, welche exportiert werden. Es kann auch eine primäre miRNA freigesetzt werden, welche durch Mikroprozessor-Spaltung zur pre-miRNA umgebaut wird.¹

1.1.3. Zytoplasmatische Biogenese

Im Zytoplasma, und möglicherweise auch im endoplasmatischen Retikulum, findet sich das Protein Dicer. Pre-miRNA wird im Zytoplasma in den pre-miRNA-Entstehungskomplex, der TRBP, PACT und Dicer enthält, aufgenommen. Er bildet den Kern des RISC-Ladungskomplexes. Dicer erkennt den 3'-Überhang der pre-miRNA, welcher zwei Basenpaare lang ist, und bindet daran. Ago2 spaltet einen Einzelstrang der pre-miRNA, um eine geknickte Haarnadel-Struktur zu bilden. Mit der nachfolgenden Spaltung durch Dicer wird ein doppelsträngiger miRNA Duplex generiert, der Loop wird entfernt.¹



Zytoplasmatische microRNA Biogenese

Pre-miRNA wird durch Dicer zur miRNA Duplex oder durch Ago2 zur Ago2-gespaltenen Vorläufer miRNA (ac-pre-miRNA), welche als Substrat für Dicer fungiert. Die miRNA Duplex gibt die gereifte miRNA frei, welche in den RISC aufgenommen wird. Dieser besteht aus Ago2, PACT, TRBP und Dicer. Der Freisetzungsmechanismus der miRNA ist unklar. Mögliche Theorien wie RNA Helicase A, Dicer Spaltung, Ago2 Spaltung und bislang unbekannte Proteine sind dargestellt.¹

Die doppelsträngige miRNA besteht aus einem Leitstrang und einem Passagierstrang. Die RNA Duplex wird entwunden, die einzelsträngige miRNA wird in den Proteinkomplex RISC aufgenommen und bestimmt durch seine Leitfunktion die Stilllegung der Ziel-mRNA.

Die vier Argonautenproteine 1-4 werden mit der Genausschaltung assoziiert, wobei Ago2 mit seiner Schneidefähigkeit als einziges die Spaltung von miRNAs beschleunigen kann. Die Kernbestandteile des RISC-Ladungskomplexes sind Ago2, Dicer, PACT und TRBP. Der aktivierte RISC bindet die Ziel-mRNA nach dem Modell der Watson-Crick Basenpaarung zwischen dem Leitstrang und der 3'UTR der mRNA.¹

MiRNAs binden an ihre Ziel-mRNA und beeinflussen diese negativ in ihrer Expression. Im menschlichen Genom sind miRNAs nahezu 100% komplementär mit der mRNA. Die übereinstimmende Basenpaarung ist verantwortlich für die thermische Stabilität und bestimmt so die Aktivität und Spezifität der miRNA. Eine einzige microRNA kann sowohl mehrere Ziel-Gene regulieren, jedoch kann ein Ziel-Gen auch durch verschiedene miRNAs kontrolliert werden.^{1,6}

Der RISC Ladungskomplex verlagert sich in einen p-body Bereich, der spezifisch für die Fertigstellung und Aktivierung des RISC ist. P-bodies beinhalten Kontroll-Enzyme und Faktoren für die Translation, welche mRNAs speichern können. mRNAs, welche durch Polyribosomen translatiert wurden, werden von miRISC erkannt und am Translationsbeginn bzw. an der Elongation gehindert.^{1,6}

1.2. MicroRNA und Krebs

Das bessere Verständnis für die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und die Entwicklung effektiver zielgerichteter Therapeutika, sind für viele tödlich verlaufende Krebserkrankungen nach wie vor erforderlich.¹³ Eine Krebserkrankung läuft in mehreren Schritten ab. Gesunde Zellen erfahren genetische Veränderungen, wobei sie verschiedene bösartige Vorstufen durchlaufen und schließlich zum invasiven Krebs werden. Dieser kann in Form von Metastasen in verschiedene Körperregionen streuen. Krebszellen haben die Fähigkeit sich eigenständig also unabhängig von Wachstumssignalen, massiv zu vermehren. Sie entgehen dem programmierten Zelltod (Apoptose), überschreiten intrinsische Zellvermehrungs-Grenzen, regen die Angiogenese an und formen unabhängig vom Primärtumor neue Zellkolonien.¹

Gene, die mit einer Tumorentwicklung verbunden sind, werden als Onkogene oder Tumorsuppressoren bezeichnet. Die sechs Gruppen der Onkogenprodukte sind

Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Apoptose-Regulatoren, Signal-Transduktoren und Substanzen, die Chromatin umstrukturieren. Eine Überproduktion dieser Produkte, kann zur Tumorentwicklung führen. Durch genetische Veränderungen können nun Onkogene aktiviert werden und führen zu einer Vermehrung von Genen, ändern Promotoren dahingehend, die Genexpression zu fördern oder versetzen Proteinstrukturen in einen dauerhaft aktiven Zustand. Auch der Funktionsverlust von Tumorsuppressoren kann die Krebsentstehung bedingen.¹ MicroRNAs spielen eine lebenserhaltende Rolle in zahlreichen metabolischen und zellulären Bahnen, welche regulierend auf Zellwachstum, -differenzierung und das Überleben verantwortlich sind. Ein Ungleichgewicht ihrer Ausprägung wurde in den meisten Tumorarten untersucht.¹⁵ Es ist jedoch schwer miRNAs Onkogenen oder Suppressoren zuzuordnen, da sie in unterschiedlichen Gewebsarten entweder als das eine oder das andere wirken können.^{1,9}

1.3. siRNA

Eine weitere Regulierungseinheit im eukaryotischen Genom, welche den RNA-Interferenz Mechanismus nutzt, stellen die small interfering RNAs dar. Mit ihrer Länge von 21 bis 23 Basenpaaren entsprechen sie den miRNAs. Auch ihre charakteristischen doppelsträngigen Vorläuferformen haben sie mit miRNAs gemeinsam. Differenzen ergeben sich bei der Entstehung. MiRNAs werden von Transkripten produziert, welche Stem-Loop Strukturen bilden. SiRNAs werden hingegen durch lange doppelsträngige RNA Vorstufen gebildet. Diese können endogen gebildet werden oder liegen exogen vor.⁶

Der wohl markanteste Unterschied zwischen miRNAs und siRNAs, ist die eigene Expressionshemmung. Nahezu alle siRNAs können ihren Entstehungsort stilllegen. Diese Tatsache führt zu einem ständigen Kampf um ihre eigene Produktion. In manchen Fällen ist es ihnen möglich auch andere Orte im Genom zu hemmen. Weiters ergibt sich so, dass siRNAs sehr anpassungsfähig sind und sie ihre Sequenzkonservierung gegen den Selektionsdruck behaupten können. MiRNAs hingegen hemmen nicht ihren eigenen Ursprungsort, sondern andere Gene. Zuzuschreiben ist das der Entwicklung von miRNA Vorläufer-RNAs im Kern und dem Ausschluss von gereifter, effektiver miRNA aus dem Kern. Aufgrund der Notwendigkeit einer strengen Basenpaarung, sind miRNAs weniger anpassungsfähig.⁶

Es gibt eine große Vielfalt an siRNA-Quellen. Verschiedenste Arten von Transkripten können doppelsträngige RNA Strukturen annehmen und durch Dicer in siRNAs umgewandelt werden.

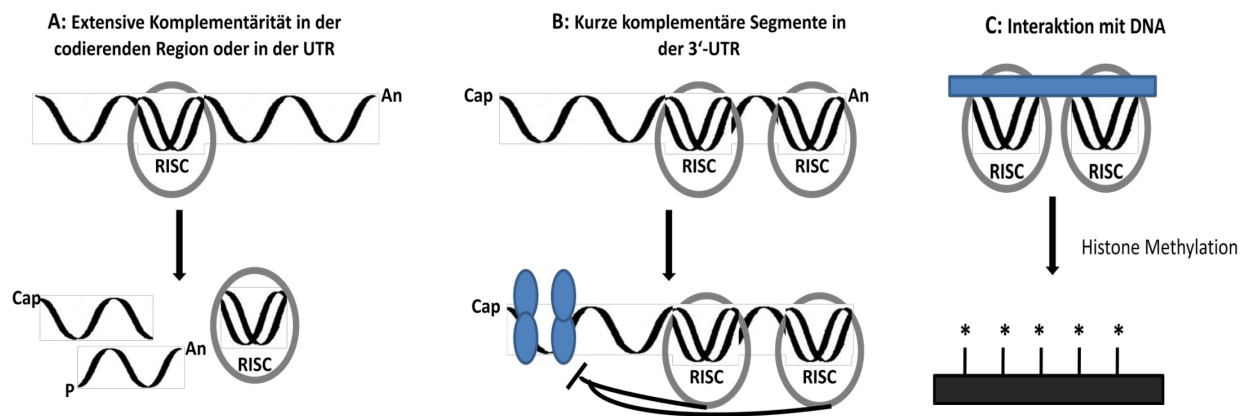
Von diesen Duplexen ist die Mehrheit perfekt gepaart. Es gibt jedoch auch Formen ohne perfekte Basenpaarung, wie die Haarnadel-RNAs.

SiRNAs bestehen aus einem Leitstrang der in den siRISC aufgenommen wird und einem Passagierstrang, welcher hingegen ausgeschieden und abgebaut wird. Ziel-RNAs werden anhand der Basenpaarung erkannt und die Stilllegung des betroffenen Gens folgt. SiRNAs, welche mit ihrem Ziel verbunden sind, können in mehreren Arten durch RNA-abhängige RNA Enzyme vermehrt werden, was zu einer verstärkten und anhaltenden Hemmung führt.⁶

1.4. RNA-Interferenz

Der Begriff RNA-Interferenz wurde erstmals 1998 von Fire A. et al verwendet. Es handelt sich um einen natürlichen biologischen Prozess bei Eukaryoten, der zur Abschaltung definierter Gene führt. Dieser Vorgang lässt sich in drei Phasen unterteilen. Dicer und Drosha, zwei Ribonuklease-Enzyme, zerschneiden doppelsträngige RNA-Moleküle in kürzere Fragmente. Danach kommt es zur Spaltung in Einzelstränge.^{10,11}

Der Prozess startet mit einer doppelsträngigen RNA, entweder in Form eines bimolekularen Duplex oder einer erweiterten Haarnadel-Struktur.¹² Diese wird von Dicer in viele 22 Basenpaare-lange siRNAs gespalten. Die Zwischenprodukte sind anfangs doppelsträngig mit 5' Phosphaten und einem zwei Basenpaare langen Überhang am 3'-Ende. Sie entsprechen somit Endonuklease III Spaltungsprodukten, werden jedoch als einzelsträngige RNAs vom RNA-induzierenden silencing complex (RISC) aufgenommen. Durch die (nahezu) perfekte Komplementarität zwischen siRNA und mRNA, erkennt RISC seine Zielobjekte. Die RISC Endonuklease spaltet die mRNA und schneidet sie. Der miRNA-Einzelstrang, der dem miRNA:miRNA* Duplex entstammt, wird von RISC aufgenommen. Ausschlaggebend hierfür ist die Stabilität. Es wird immer der Strang aufgenommen, dessen 5' Ende weniger stabil gepaart ist.⁹



Aufgaben der siRNA

(A) Spezifische mRNA Spaltung durch miRNA oder siRNA Messenger. Die schwarze Pfeilspitze symbolisiert die Spaltungsseite.

(B) Translationale Unterdrückung durch miRNAs oder siRNAs

(C) Transkriptionale Stilllegung durch heterochromatische siRNAs

Die Hinunterregulierung der Genexpression durch miRNAs kann auf zwei posttranskriptionale Arten erfolgen: mRNA-Spaltung oder translationale Unterdrückung. Die Entscheidung, welcher Mechanismus zur Anwendung kommt, ist von der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA abhängig. Bei genügender Übereinstimmung kommt es zur spezifischen Spaltung der mRNA, bei unzureichender Komplementarität, jedoch ausreichend passender Konstellation wird die produktive Translation unterdrückt. Führt eine miRNA zur Spaltung, dann ist der Schnitt an derselben Stelle, an der auch eine siRNA schneiden würde. Die miRNA bleibt nach der Spaltung intakt und kann weitere mRNAs zerstören.⁹

1.5. RNA-basierte Therapeutika

Die Entdeckung der RNA-Interferenz führte zu einem großen Durchbruch in der Entwicklung RNA-basierter Therapeutika. Das Ziel hierbei ist die Genexpression krankheitserregender Gene zu hemmen. Mehr als 50 RNA- oder RNA-abgeleitete Pharmaka sind in klinischer Testphase (Stand Jänner 2012). Eine Schwierigkeit bei der Verwendung von RNA stellt sich durch ihre Instabilität infolge großer Mengen an RNase in Zellen und im Serum. Chemische Modifikationen werden genutzt um die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zu verbessern, sowie die Immunogenität zu verringern. Es ist erforderlich natürliche oder synthetische Trägersysteme zu entwickeln um das Therapeutikum zielsicher und spezifisch an seinen gewünschten Wirkungsort zu bringen. Diese Aspekte stellen Barrieren im klinischen Fortschritt dar, welche durch weitere Untersuchungen überbrückt werden müssen. Nicht zuletzt haben in vitro Studien

Versprechungen bei Krankheiten wie Krebs, Viren, wie Hepatitis C oder HIV und Erbkrankheiten im frühen Stadium gemacht.^{7,8}

HIV war der erste infektiöse Vertreter, den man ins Auge fasste. Neben der erfolgreich induzierten Hemmung durch RNA Interferenz von HIV-codierender RNA, stellt die zielgerichtete Erfassung des Virus eine große Herausforderung im Bezug auf klinische Applikationsformen dar. Durch die hohe virale Mutationsrate entstehen Mutanten, welche wiederum schwer zu erfassen sind.

Hepatitis B und C zählen zu weiteren wichtigen Zielen der RNA Interferenz Therapie. Die Effektivität von RNAi wurde anhand der Stilllegung eines HBV Antigens in Leberzellen von Mäusen am in vivo Versuch gezeigt.^{7,20}

In vielen Studien wurden siRNAs verwendet um den zellulären Pfad, welcher zu unkontrolliertem Zellwachstum und Krebs führt, zu analysieren. RNAi wird sogar als potentielle Therapieform gegen Krebs vorgeschlagen. SiRNAs wurden mit kationischen Lipidkomplexen kombiniert und in verschiedene Zelllinien, unter anderem auch in HeLa Zellen, eingeschleust, was zu einer siRNA-abhängigen Hinunterregulierung von Tumorzielgenen führte.⁷

Ein weiterer Anwendungsbereich sind Erbkrankheiten. Es wurden siRNAs gefunden, deren Mittelteil komplementär zu polymorphen Nukleotiden ist. Dadurch werden nur mutierte Transkripte abgebaut, wohingegen die Wild-Typen, trotz einer einzigen Fehlpaarung, intakt bleiben.⁷

2. Ziel

Das grundsätzliche Ziel meiner Diplomarbeit ist die Untersuchung der Wirkung und die intrazelluläre Quantifizierung von synthetischen miRNA-Oligonukleotiden. Stabile miRNAs mit hoher Effektivität in Krebszellen und ihre Wirkung im Bezug auf Genrepression sind Gegenstand der Untersuchungen.

Um eine signifikante Aussage über die Expressionsrate machen zu können, sollte ein robustes Referenzgen identifiziert werden. Dazu wurde eine Reihe von potenziellen Referenzgenen evaluiert, welche durch siRNA-Transfektionen nicht beeinflusst werden sollen. Die Stabilität dieser Referenzgene wurde mit dem Internet-Tool RefFinder, welches die Berechnungsmethoden GeNorm, BestKeeper, NormFinder und die vergleichende Delta-Ct Methode beinhaltet, bestimmt.

Eine RT-qPCR-Methode sollte etabliert werden, welche nach erfolgreicher Transfektion zur Charakterisierung der Expressionsrate der verwendeten miRNAs zur Anwendung kommt.

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der ausgewählten miRNAs auf das Wachstum von Krebszellen mit Hilfe von Proliferationstests untersucht werden. Dazu wurden die synthetischen Sequenzen in HeLa-Zellen transfiziert. In einem weiteren Schritt wurden effektive miRNAs in Kombination mit anti-Tumor siRNAs auf ihre synergistische Wirkung getestet.

Genauere Einblicke auf die Wirkungsweise effektiver Sequenzen sollte durch Zellzyklus-Analysen der Tumorzellen, welche mit miRNAs behandelt wurden, gewonnen werden. Dazu wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

3. Material und Methoden

Alle Reagenzien, soweit nicht anders erwähnt, wurden von Sigma Aldrich, St. Louis, USA oder Serva, Heidelberg, Deutschland bezogen. Zellkulturmedien sowie Zubehör stammen von Gibco, Paysley, Großbritannien. FCS wurde von den PAA Laboratories, Pasching, Österreich verwendet. Zellkulturflaschen und –platten entstammen dem Hause Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland.

3.1. MiRNA Sequenz

MicroRNAs wurden nach sorgfältiger Literaturrecherche ausgewählt.¹⁶ Die verwendeten miRNAs sind in Tabelle 3.01 zu finden.

hsa-miR-218 5p	Leitstrang	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU
	Passagierstrang	AUGGUUAGAUCAAGCACAA
hsa-miR-125b 5p	Leitstrang	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
	Passagierstrang	ACAAGUUAGGGUCUCAGGGA
hsa-miR-29b-1 5p	Leitstrang	GCUGGUUUCAUAUGGUGGUUUAGA
	Passagierstrang	UAAACCACCAUAUGAAACCAGC
hsa-29b-2 5p	Leitstrang	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG
	Passagierstrang	AAGCCACCAUGUGAAACCAG
hsa-miR-4731 5p	Leitstrang	UGCUGGGGGCCACAUGAGUGUG
	Passagierstrang	CACUCAUGUGGCCCCCAGCA

Tabelle 3.01: Sequenzen der synthetisierten miRNAs

3.2. MiRNA Primer Design

Stem-loop Primer Design für cDNA Synthese

Stem-loop Primer werden verwendet um die miRNA mit reverser Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Der passende Unique Primer für die jeweilige miRNA und der Universal Primer werden für die Vermehrung der cDNA Sequenzen in der quantitativen PCR verwendet. Eine überarbeitete Anleitung aus der Literatur wird hierfür genutzt.³ Die letzten sechs Basen am 3' Ende des stem-loop Primers werden gegen die passende miRNA Sequenz ausgetauscht, der Rest bleibt unverändert.

Beispiel:

hsa-miR-4731 stem-loop RT Primer für die cDNA Synthese

5' Ende des stem-loop RT Primer Rückgrades – 3' Ende – 6 modifizierte Basen für miR-4731

GACGGAGTGCAGGGACGAAGATGAACACTCCGTCCACACT

miR-4731 Leitstrang

TGCTGGGGGCCACATGAGTGTG

Der Universal Primer wurde aus folgender Literatur entnommen:³

AGTGCAGGGACGAAGATG

Der Uniqueprimer besteht aus dem Rest der miRNA Sequenz (schwarz) und zusätzlichen Nukleotiden am 5' Ende (in violett dargestellt) um die Schmelztemperatur auf 60°C zu erhöhen.

miR-4731 Unique Primer:

5' CATATGCTGGGGGCCACATG 3'

Die Primer wurden unter Zuhilfenahme des Internetwerkzeuges NetPrimer¹⁷ gestaltet, welcher Sekundärstrukturen verhindert. Um Pseudogene zu finden und unspezifische Bindungen mit anderen Genen zu vermeiden, wurde Primer-BLAST angewendet.⁴

3.3. MiRNA Synthese

Mit dem Poly Gen Synthesizer werden die miRNA Sequenzen nach der Phosphoramidit-Methode synthetisiert. Die wichtigsten Punkte der Synthese sind Detritylation, Kopplung, Schutzgruppen anfügen und Oxidation.⁵ Die vollautomatische Synthese wurde anhand des Standardprotokolls für RNA Synthese mit der Kopplungszeit von 15 Minuten für ein Nukleotid und dem Aktivator Dicyanoimidazol (DCI) durchgeführt. Die Standardflüssig-Reagenzien und die Standard- β -cyanoethylphosphoramidite wurden von SAFC, Proligo Biochemie (Deutschland) bezogen.

3.4. RNA Abspaltung und Aufreinigung

Nach Beendigung der Synthese wird der feste Bestandteil aus dem Schieberegler direkt in eine sterile Glasphiole transferiert. Die Kernsequenz wird mithilfe von 1 ml AMA (eine 1:1 Mischung von 40%igem methanolischem Methylamin und konzentriertem Ammoniak) und anschließendem Erhitzen der Glasphiole auf 65°C für 10 Minuten von der Fritte abgespalten. Die Phiole wird auf Raumtemperatur abgekühlt und der Überstand in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß übergeführt. Die feste Phase wird mit Nuklease-freiem Wasser gespült und in das Reaktionsgefäß zum Überstand hinzugefügt. Die Proben werden zur Trockene eingedampft, der Trocknungsrückstand wird vollständig in 20 μ l DMSO gelöst. Danach werden 50 μ l TEA.3HF (Triethylamin-Trihydrofluorid) für die 2'-Entschützung hinzugefügt. Die Lösung wird gut durchgemischt, abzentrifugiert und für zwei Stunden auf 65°C erhitzt. Danach werden die Gefäße im Tiefkühler gekühlt. Zur Fällung der miRNA werden 23M Natriumacetat lösung in RNase-freiem Wasser hinzugefügt und gemischt. Die weitere Fällung der RNA wird durch Zugabe von 1ml Butanol und anschließendem Tiefkühlen bei -70°C für mindestens 30 Minuten oder über Nacht herbeigeführt. Die Proben werden dann zehn Minuten bei 18.000 G zentrifugiert, Butanol wird dekantiert, die Pellets zwei Mal mit 750 μ l 75%iger Ethanol gewaschen, mit dem Vortexer gemischt, zentrifugiert und luftgetrocknet. Anschließend wird der Rückstand in 100 μ l Nuklease-freiem Wasser gelöst, ein Aliquot entnommen, 1:10 verdünnt und mit dem Nanodrop Spektrophotometer die Konzentration bestimmt.

3.5. Analyse der Oligonukleotide

Gelherstellung

Die synthetisierten Oligonukleotide werden mit einem 20%igem Acrylamid TBE Gel analysiert. Die Komponenten zur Herstellung des Gels finden sich in Tabelle 3.02, jene zur Pufferbereitung in Tabelle 3.03. Harnstoff wird in 10xTBE gelöst und kurz in der Mikrowelle erwärmt, bis eine klare Lösung entsteht. Nach dem Abkühlen werden TEMED und APS hinzugefügt und die Mischung sofort in eine gelformende Apparatur gefüllt. Mit einem Kamm werden 10 oder 15 Taschen geformt. Anschließend folgt ein Vorlauf des Gels für 30 Minuten bei 150 V.

Vorbereitung der Proben

Ein Nanomol jeder Probe wird mit 10µl Formamid-Lade-Puffer verdünnt. Die Mischung wird für 3 Minuten auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis gekühlt. Als Referenz wird eine Mischung aus Bromphenolblau und Xylencyanol verwendet, um die Position der Proben während des Laufs zu überprüfen. Bei 150 V läuft das Gel für 1,5 Stunden.

Methylenblaufärbung und Detektion

Das Gel wird mit einer 2%igen Methylenblau-Lösung für 30 Minuten gefärbt. Oligonukleotide werden nun als blaue Banden sichtbar. Das Gel wird mit Wasser entfärbt und eine Aufnahme mit dem kalibrierten Imaging Densitometer GS-710 (BioRad, Österreich) gemacht. Die Analyse der Bilder erfolgt mit der Quantity One 4.6.3, 1-D Analyse Software (BioRad).

Name	Menge
40% Acrylamid Lösung (Acrylamid/Bis-acrylamid 29:1, Serva)	7,5ml
10x TBE (Trisborat-EDTA-Puffer)	1,5ml
Harnstoff	7,2g
TEMED (Serva)	7,5µl
APS (Serva)	75µl

Tabelle 3.02: Bestandteile des Acrylamidgels

Name	Menge	10x Stammlösungskonzentration
TRIS Base	108 g	890 mM
Borsäure	55 g	890 mM
EDTA	40 ml	20 mM

Tabelle 3.03: Bestandteile des 10x TBE Puffers

3.6. Zellkultur

Die verwendeten HeLa Zellen für die Messung des biologischen Effekts stammen von humanem Gebärmutterhalskrebs. Die Zellen wurden von der European Cell Culture Collection erhalten und bei 37°C mit 5 % Kohlenstoffdioxid befeuchteter Luft in DMEM + Glutamax™ (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Gibco™, Großbritannien) mit 10%igem Zusatz von fetalem Kälberserum (Gibco™) kultiviert. Zusätzlich wurden Experimente mit MCF-7 Zellen (Michigan Cancer Foundation – 7), ebenfalls von der European Cell Culture Collection und KBC-1 Zellen (Colchizin-resistente Tumorzellen) durchgeführt. Die Kultivierung entspricht der von HeLa Zellen mit der Ausnahme, dass den KBC-1 Zellen bei jedem Medienwechsel Colchicin (5µg/ml) beigemischt wird, um die Resistenz zu erhalten.

3.7. Zelllinienvermehrung

Nahezu konfluente Zellen wurden gesplittet. Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit vorgewärmtem 1x PBS (PAA Laboratories, Österreich) gewaschen und Trypsin (Gibco™, USA) hinzugefügt, um die Zellen von der Gefäßwand zu lösen. Nach fünf Minuten im Inkubator wurde neues, vorgewärmtes Medium beigefügt, die Zellsuspension gut durchmischt und ein Aliquot in eine neue 25 cm² große Zellkulturflasche (Greiner Bio-One, Deutschland) mit frischem vorgewärmtem Medium gegeben. Eine Zellkulturflasche dieser Größe enthält bei Konfluenz ungefähr 5 Millionen Zellen.

3.8. Reverse Transfektion

3.8.1. Reverse Transfektion für Proliferationstests

Es werden sterile 1,5ml Eppendorfgefäße für jede miRNA bzw. jede miRNA/siRNA-Kombination verwendet. Die miRNAs oder die miRNA/siRNA Kombinationen werden mit Optimem Medium (Gibco™, USA) auf eine Konzentration von 0,2pM verdünnt, geschüttelt, kurz zentrifugiert und mit Lipofectamin RNAiMax (Gibco™, USA), welches mit Optimem Medium (Gibco™, USA) - 0,1µl Lipofectamin in 10µl Optimem für jedes zu behandelnde Well- verdünnt wurde, gemischt. Diese Mischung wird für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wird eine Zellsuspension mit einer bestimmten Zellzahl pro ml in DMEM bereitet. 20µl des miRNA-Lipofectamin-Gemisches werden in jedes Well einer 96-Well Platte (Greiner bio-one, Deutschland) pipettiert. Anschließend werden 80µl frisch bereiteter Zellsuspension pro Well hinzugefügt, wodurch in jedem Well 2500 Zellen (HeLa) enthalten sein sollten. Die Platte wird geschüttelt um eine homogene Zellverteilung zu erzielen. Nach vier Stunden geht man davon aus, dass die miRNAs von den Zellen aufgenommen wurden. Jedes Well wird mit 100µl DMEM Medium aufgefüllt um genügend Nährstoffe für ideales Wachstum bereitzustellen.

3.8.2. Reverse Transfektion in 24-Well-Platten für RT-qPCR

Transfektionen in 24 Well Platten werden genauso durchgeführt wie anhand der 96 Well Platte beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Mengenangaben um den Faktor vier geändert werden.

3.9. RNA Isolation

Für die reverse Transfektion werden 150.000 Zellen pro Well ausgesät und für 48 Stunden mit dem Transfektionsmix wie oben beschrieben inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit sind sie nahezu 100% konfluent.

Das Medium wird entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Für die Zellyse werden 750µl TRIFast™ Reagens (1 ml Reagens für 5-10x10⁶ Zellen) direkt auf die Zellen gegeben.

Für die Phasentrennung wird das TRIFast™-Zell-Gemisch und Chloroform in vorher zentrifugierte peqGold Phase Traps pipettiert. Diese werden 15 Sekunden per Hand geschüttelt und für drei bis zehn Minuten bei Raumtemperatur oder auf Eis inkubiert. Danach werden sie fünf Minuten bei 12.000-16.000 G zentrifugiert (Zentrifuge 5180R, Eppendorf, Österreich), wodurch sich die Lösung in zwei Phasen trennte. Unter der Wachsschicht befindet sich die rote organische Phase, welche Phenole und Proteine enthält. In der oberen wässrigen Phase ist die RNA enthalten. Die wässrige Phase wird mit Chloroform gewaschen, die Fällung der RNA aus der wässrigen Phase erfolgt mit Isopropanol (0,5 ml Isopropanol pro ml TRIFast Reagens™). Für eine effektive Fällung werden die Proben im -70°C Tiefkühler gelagert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand entfernt und das RNA-Pellet zwei Mal mit 75%igem Ethanol (mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt) gewaschen.

Flüssigkeitsreste werden durch Trocknen an der Luft entfernt, das Pellet wird in Nuklease-freiem Wasser gelöst und die Konzentration mit dem Nanodrop ND-100 Spektrophotometer (peqlab Biotechnologie, Deutschland) bestimmt.

3.10. cDNA Synthese

Die cDNA Synthese wird mit dem Fermentas Revert Aid [™] First Strand synthesis Zubehör nach Anleitung aus der Literatur ³ mit kleinen Modifikationen durchgeführt. Die Proben werden mit den Reagenzien wie folgt zur qPCR bzw. Auswertung vorbereitet:

cDNA Komponenten	Menge
RNA (500 oder 250ng)	x
Random hexamer Primer	1
Nuklease-freies Wasser	auf 12,5µl
5xRT Puffer	4
Ribolock RNase Inhibitor (40U/µl)	0,5
10mM dNTP mix	2
Reverse Transkriptase 200 U/µl	1

Tabelle 3: Reagenzien für die cDNA Synthese

Nachdem 250 ng bzw. 500 ng der Proben mit dem Primer und Nuklease-freiem Wasser gemischt wurden, werden die Gefäße geschüttelt, kurz zentrifugiert und fünf Minuten bei 65°C im Eppendorf Thermocycler (Eppendorf, Österreich) erhitzt um Denaturierung und vollständige Primerbindung sicherzustellen. Danach werden sie sofort auf Eis gekühlt und mit den übrigen Reagenzien (siehe Tabelle 3) der Mastermix angefertigt. Zur Kontrolle einer effektiven cDNA Synthese, wird eine RT- Kontrolle hinzugefügt. Hier wird die Reverse Transkriptase im Gegensatz zu den übrigen Proben weggelassen. Nach Zugabe des Mastermixes werden die Gefäße geschüttelt, kurz zentrifugiert und im Thermocycler platziert. Die Synthese erfolgt mit dem Programm cDNA pulsed³. Die Methode aus der Literatur¹⁸ wird angewendet, um eine zuverlässige Umschreibung von RNA in cDNA, welche für RT-qPCR Untersuchungen benötigt wird, zu gewährleisten.

3.11. RT-qPCR

Die cDNA und die Kontrollen werden 1:10 verdünnt, um eine Beeinträchtigung der Taq Polymerase durch Substanzen der cDNA Synthese zu vermeiden. Die drei Referenzproben werden vereinigt, gemischt, wieder aufgeteilt und ebenfalls 1:10 verdünnt. Die weitere Verdünnung erfolgt laut folgender Tabelle:

	cDNA Synthese	1:10	1:80	1:640	1:5120	1:40960
Finales Verdünnungsvolumen in μl	20	200	80	80	80	80
Totale RNA-Menge	500	500	25	3,1	0,3906	0,0488
RNA Konzentration in $\text{ng}/\mu\text{l}$	25	2,5	0,3125	0,0391	0,0049	0,0006

Tabelle 3.04: Verdünnungen und Konzentrationen der cDNA

Diese Verdünnungsreihe wurde erstellt um eine Kalibrationskurve zu erhalten.

Es werden jeweils $2\mu\text{l}$ der verdünnten cDNA (Konzentration: $2,5\text{ng}/\mu\text{l}$) in eine 96 Well Platte (Affimetrix, Kalifornien) pipettiert und mit dem entsprechenden Mastermix gemischt. Die genauen Angaben hierzu finden sich in Tabelle 3.05. Dieser wird mit Solis Biodyne Reagenz und Biotium EVA Green Fluoreszenzfarbstoff aus einem offenen Setup hergestellt. Die gewünschten Primerpaare wurden von Microsynth (Schweiz) bestellt oder mit dem Poly Gen DNA Synthesizer synthetisiert.

Reaktionskomponente	μl RX	Finale Konzentration
Nuklease-freies Wasser (Quiagen, Sigma-Aldrich)	13,0	
5x Solis EVA Green Mix (2,5mM MgCl_2 , dNTPs, Puffer, Hotfire Polymerase)	4,0	1
Vorwärts Primer	0,5	250nM
Rückwärts Primer	0,5	250nM
cDNA/gDNA	2,0	18,00 μl

Tabelle 3.05: Reagenzien für die RT-qPCR

Die Platte wird mit einer Plastikklebefolie (Affimetrix, Roche, Österreich) verschlossen und die RT-qPCR mit dem Light Cycler 480 von Roche (Österreich) durchgeführt. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenzintensität steigt, wird „threshold“ (Cp) genannt. Dieser Punkt bezieht sich auf die Menge der DNA Kopien, welche sich anfangs in der Probe befanden. Normalisiert man die Cp Werte der Proben mit den Cp Werten der Referenzgene, erhält man die Rate der Genstilllegung ($\Delta\Delta\text{Cp}$ -Methode).³

Die relative Expression der Gene wird nach dem RT-qPCR Lauf mit der REST 2009 Software²² bewertet. Für die Berechnung werden die Mittelwerte der Proben-Duplikate bzw. –Triplikate sowie die Reaktionseffizienzen, welche aus der Standardkurve berechnet werden können, benötigt.

3.12. Proliferationstest

Für die Durchführung werden pro 96-Well-Platte 11 ml vorgewärmtes (37°C) Medium und das EZ4U, nicht radioaktive Zellproliferationsbestimmungs-Set (Biomedica, Österreich) benötigt.

Es werden 2,5ml Aktivatorflüssigkeit in eine braune EZ4U Substrat-Phiole gefüllt. Diese wird solange geschüttelt, bis sich das Substrat vollständig gelöst hat. 1,25 ml des gelösten EZ4U Substrats werden mit dem vorgewärmtem Medium gemischt. Das alte Medium wird von der 96-Well-Platte entfernt. In jedes Well werden nun 200µl von der Substrat-Medium-Lösung pipettiert. Zusätzlich werden 3 freie Wells, als negative Kontrollen mit der Mischung befüllt. Die Platte wird in den Tecan Scanner eingelegt und die Analyse mit der i-Control Software durchgeführt. Nach der Messung wird die Platte wieder im Inkubator platziert. Im Abstand von 15 Minuten werden nun solange Messungen durchgeführt, bis die maximale Absorption einen Wert von 1,8 – 2,2 erreicht hat.

3.13. Propidiumjodid-Färbung und FACS-Analyse

Nach der miRNA-Transfektion (siehe „Reverse Transfektion in 24-Well-Platten für RT-qPCR“) und Inkubation für 24 Stunden, wird das Medium, welches 10% FCS enthält, aus den einzelnen Wells entfernt und in sterilen Eppendorfgefäßen aufbewahrt. Jedes Well wird mit 500µl 1xPBS gewaschen, die Waschflüssigkeit wird den zugehörigen Gefäßen beigemischt. Mit 75µl Trypsin werden die Zellen lysiert.

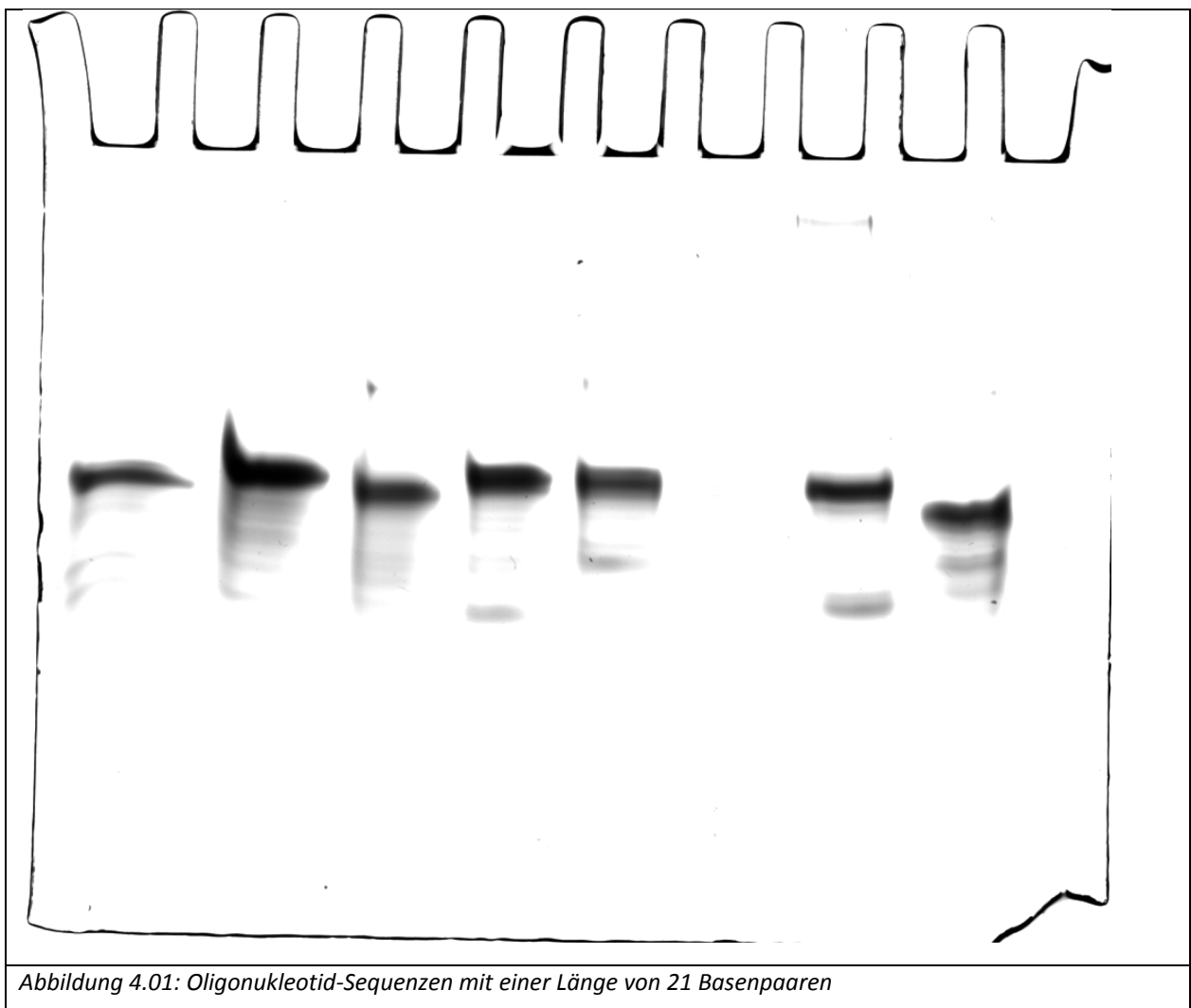
Die Wellplatte wird für zwei bis fünf Minuten bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Die Zellen werden in dem aufbewahrten Medium suspendiert, FCS stoppt die Trypsin-Reaktion. Die Proben werden für drei Minuten bei 1000 G zentrifugiert und der Überstand weggeleert.

Das Pellet wird in 500µl fertigem Propidiumjodid-Färbepuffer (1x PBS, 0,05-0,1% Triton X-100, 5µg/ml Propidiumjodid) gelöst. Alternativ kann auch Invitrogen Propidiumjodid-Puffer verwendet werden. Propidiumjodid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA interkaliert. Die Zellmembranintegrität schließt den Farbstoff aus, was die Unterscheidung zwischen funktionsfähigen und apoptotischen Zellen ermöglicht. Die Zellsuspension wird in FACS-Röhrchen gefüllt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert um etwaige Enzymreaktionen zu vermeiden. Die Messung erfolgt mit dem Durchflusszytometer FACS-Calibur (BD Biosciences, USA), für die Analyse wird das Programm Cell Quest Pro verwendet.

4. Resultate

4.1. Oligonukleotidsynthese

Die synthetisierten miRNA Leit- und Passagierstränge wurden am Polyacrylamid-Gel analysiert, um die Identität und Reinheit festzustellen. Als Referenz wurde ein Marker verwendet (Fermentas GeneRuler 50bp DNA Ladder). Synthetisiert wurden Leit- und Passagierstränge von miR-4731, miR-125b, miR-218, miR-29b-1 und miR-29b-2.



In Abbildung 4.01 sind die miRNA Sequenzen abgebildet. Im Bereich der Länge von 21 Basenpaaren ist eine dicke Bande zu sehen, was auf eine erfolgreiche Synthese schließen lässt.

Die geringfügige Verunreinigung mit unvollständig synthetisierten Sequenzen ist für die Anwendung als miRNA nicht von Bedeutung.

4.2. RT-qPCR

Die RT-qPCR wurde durchgeführt, um die miRNAs in den Tumorzellen zu quantifizieren. Dazu wurde die isolierte RNA mit den entsprechenden Stem-Loop Primern hybridisiert. Die Sensitivität und Selektivität bei der Anlagerung wurde so im Gegensatz zu linearen Primern erhöht. Nach der Isolierung wurde die miRNA revers-transkribiert und die Produkte mit den passenden Vorwärts- und Rückwärts-Primern amplifiziert. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff EVA-Green wurde die Amplifizierung sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mit der REST 2009 Software.

4.2.1. Relative Expression von miR-15a und miR-125b

Gen	Typ	Reaktions-Effizienz	Expression	Standard Fehler	Cp-Wert	Cp-Wert Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle
RNU48	Ref.	0,855	1			
miR-15a 1nM	Targ.	1	79,875	52,571-123,982	24,36	10^{-6}
miR-15a 10nM	Targ.	1	159,381	142,402-172,286	22,95	10^{-7}
miR-125b 1nM	Targ.	0,95	5,373	4,271-7,063	21,92	10^{-8}
miR-125b 10nM	Targ.	0,95	15,978	12,389-21,115	20,61	10^{-9}
Kontrolle (unbehandelte Zellen)					30,07	

Tabelle 4.01: Expressionsraten von miRNA-15a (Konzentration: 1nM, 10 nM) und miRNA-125b (Konzentration: 1nM, 10nM)

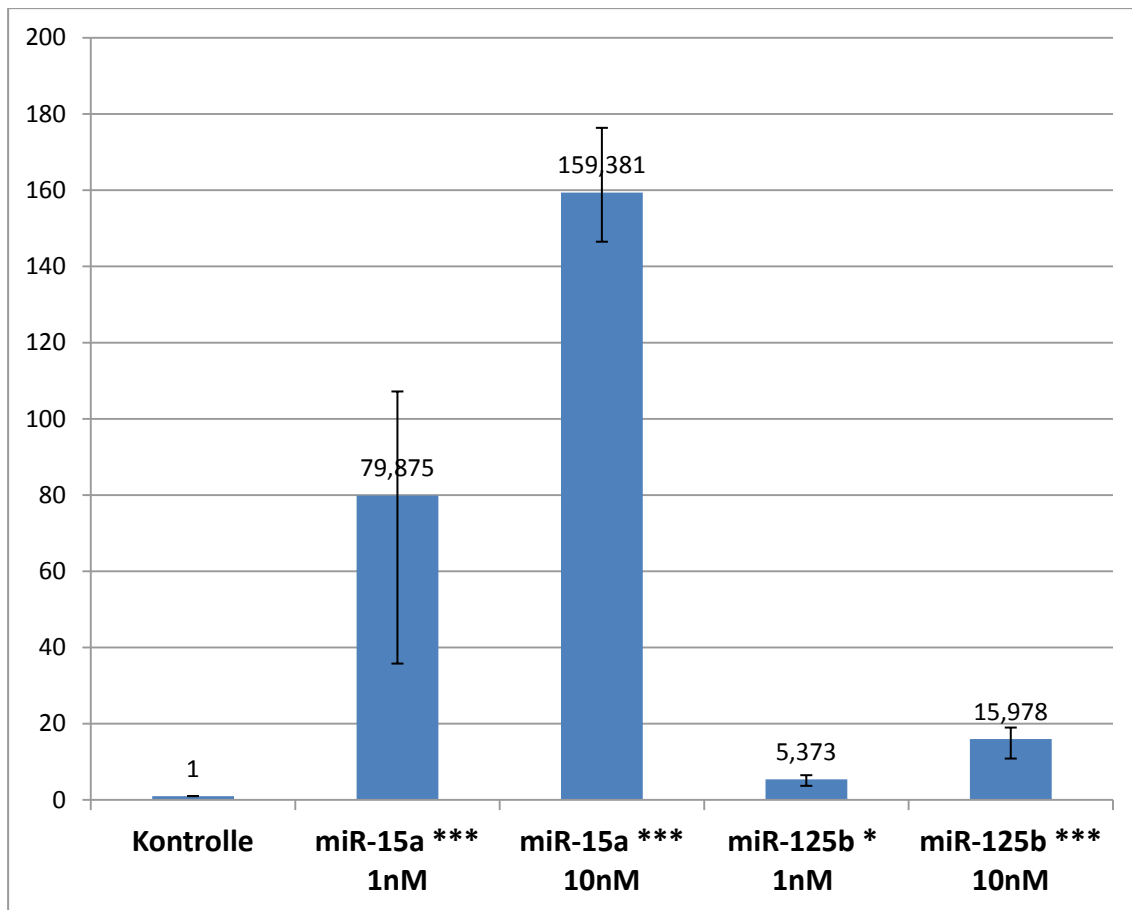


Abbildung 4.02: Quantifizierung der Expressionsrate von miR-15a (1nM, 10nM) und miR-125b (1nM, 10nM). Normalisierung der Hochregulierung im Bezug auf das Referenzgen RNU48.

Die kurze miRNA RNU48 wurde als Referenzgen verwendet um die Hochregulierung der neu synthetisierten miRNAs zu normalisieren.

4.3. Proliferationstest

Um den Einfluss der einzelnen miRNAs auf das Tumorwachstum zu bestimmen, wurden nach erfolgter Transfektion Proliferationstests durchgeführt. Dafür wurden miRNAs und/oder siRNAs in Tumorzellen transfiziert, für 72 Stunden inkubiert und somit die Genausschaltung durch siRNAs bzw. der Austausch der miRNAs gewährleistet. Das Zellwachstum wurde in diesem Test durch die Verwendung von Tetrazolium Salzen als Indikatoren angezeigt. Lebende Zellen sind in der Lage ungefärbte oder sehr wenig gefärbte Tetrazolium Salze in sehr stark gefärbte Formazan Derivate umzuwandeln. Die Absorption kann gemessen werden. Der Prozess entspricht einer chemischen Reduktion. Für diese Methode sind funktionelle Mitochondrien notwendig, welche kurz nach dem Zelltod inaktiviert werden. Eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen ist möglich. Mit dem Student T-Test kann die Signifikanz in den Unterschieden zwischen behandelten und unbehandelten Zellen berechnet werden. Die Ergebnisse wurden alle auf eine Kontroll-Probe bezogen. Dabei handelt es sich um eine negative siRNA Kontrolle, welche unspezifische Effekte, verursacht durch das Transfektionsreagenz, ausgleichen soll. Durch diese Kontrolle können auch Unterschiede in der Proliferation, wie etwa Abweichungen im Genexpressionsprofil, bedingt durch verschiedene siRNA Gewinnungsmethoden, aufgehoben werden.

Im ersten Schritt wurden die Tumorzellen mit einzelnen miRNAs behandelt, um später die Effekte auswerten zu können. Nach der Transfektion wurden die Well Platten 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Absorption mit dem Tecan Reader Infinite F 200 Pro.

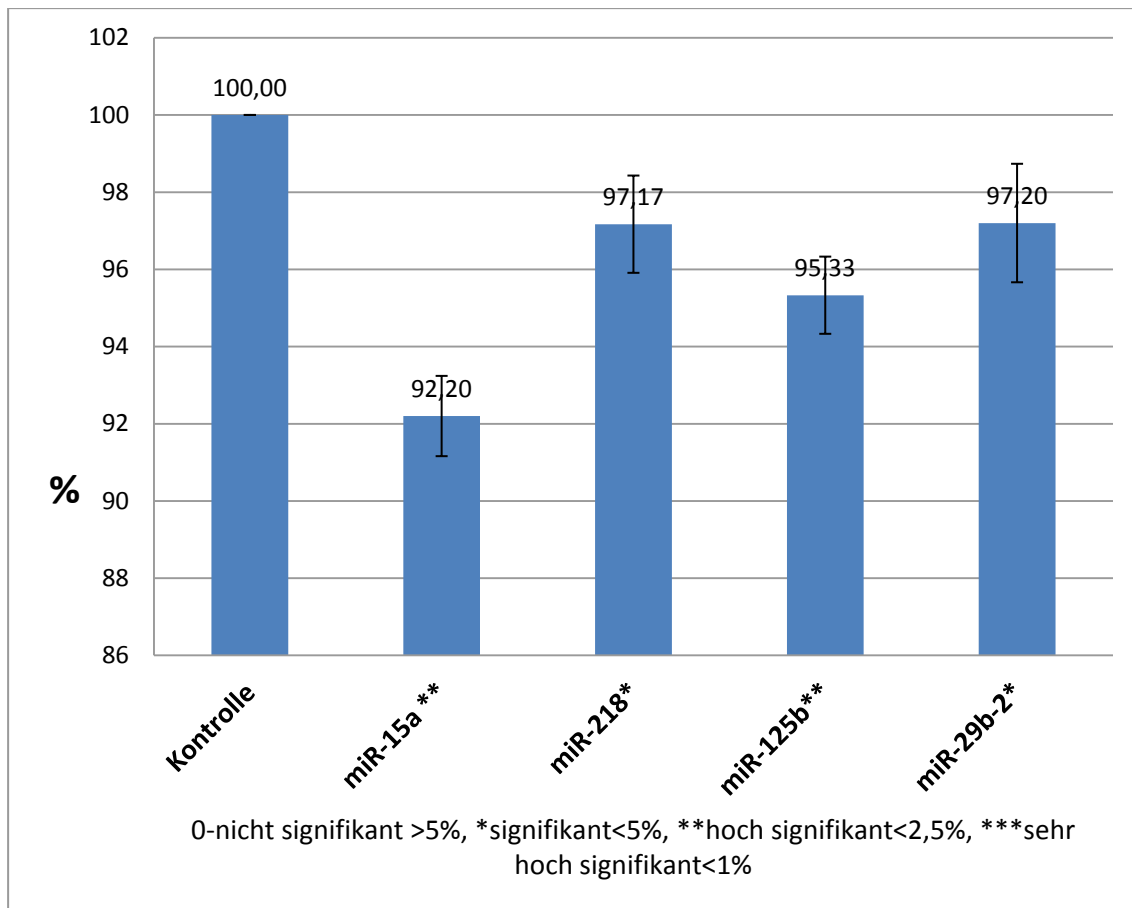


Abbildung 4.03: Prozentuelle Proliferationshemmung von HeLa Zellen bezogen auf eine unbehandelte negative Kontrolle. Alle miRNAs haben einen signifikanten (Standardabweichung <5%) oder hoch signifikanten Effekt (Standardabweichung <2,5%) gezeigt. Die wirkungsvollste miRNA war miRNA-15a.

Grundsätzlich ist zu erkennen, dass miRNAs alleine einen relativ geringen Einfluss auf die Proliferationshemmung haben. MiRNA-15a erzielte mit einer Minderung des Zellwachstums von 7,8 % die höchsten Ergebnisse, gefolgt von miRNA-125b mit einem Minus von 4,67 %. MiRNA-218 und miRNA-29b-2 reduzierten die Proliferation um 2,83 % bzw. 2,80 %. Bei miRNA-29b-1 konnten keine signifikanten Effekte gemessen werden.

In einem weiteren Experiment wurde miRNA-4731 mit verschiedenen si-RNAs kombiniert und die Wachstumshemmung überprüft. Die Menge der transfizierten miRNAs und siRNAs entspricht dem vorhergehenden Proliferationstest. Auch die Inkubationszeit nach der Transfektion betrug wieder 72 Stunden.

In der folgenden Tabelle sind die ausgewählten siRNAs dargestellt, welche aufgrund ihres zellulären Wirkmechanismus eine entsprechende Wirkung vermuten lassen.

Name der siRNA	Funktion im zellulären Pfad
CDC37	Spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion; molekulares Chaperon
CXCR4	Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren, beteiligt an Organogenese und Wundheilung, sowie pathologisch an der metastasierenden Streuung von Tumoren und Entzündungsprozessen
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül; vermittelt Zell-Zell-Kontakte
PLCB1	Schlüsselrolle in der intrazellulären Transduktion vieler extrazellulärer Signale
HSP90	molekulares Chaperon, Hitzeschockprotein; essentiell für Lebensfähigkeit von Eukaryoten
MCL1	Verhindert am Mitochondrium die Apoptose und ermöglicht so das Überleben

Tabelle 4.02: ausgewählte siRNAs und ihre Funktion im zellulären Signalweg

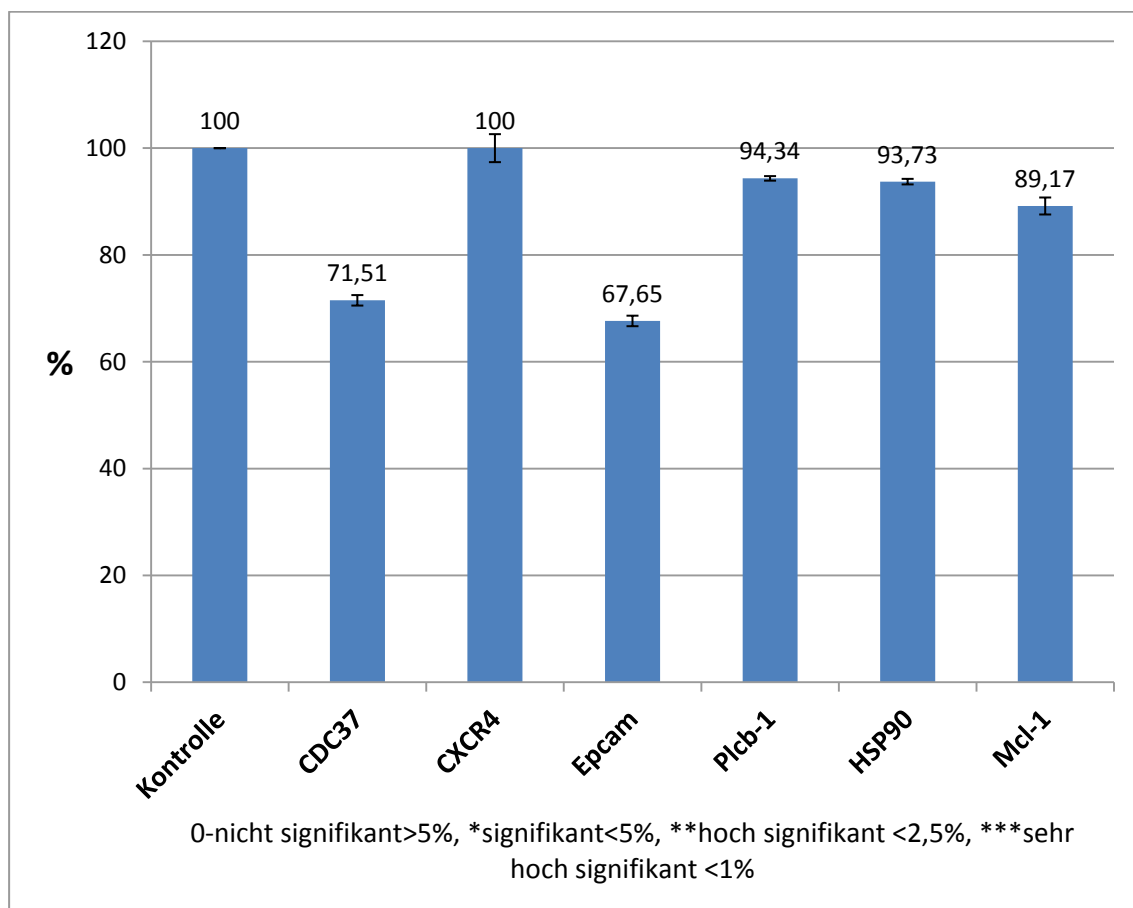


Abbildung 4.04: Proliferationshemmung von HeLa Zellen, welche mit siRNAs behandelt wurden, im Bezug auf eine Kontrolle. Die Behandlung mit EpCAM erzielte die stärkste Hemmung.

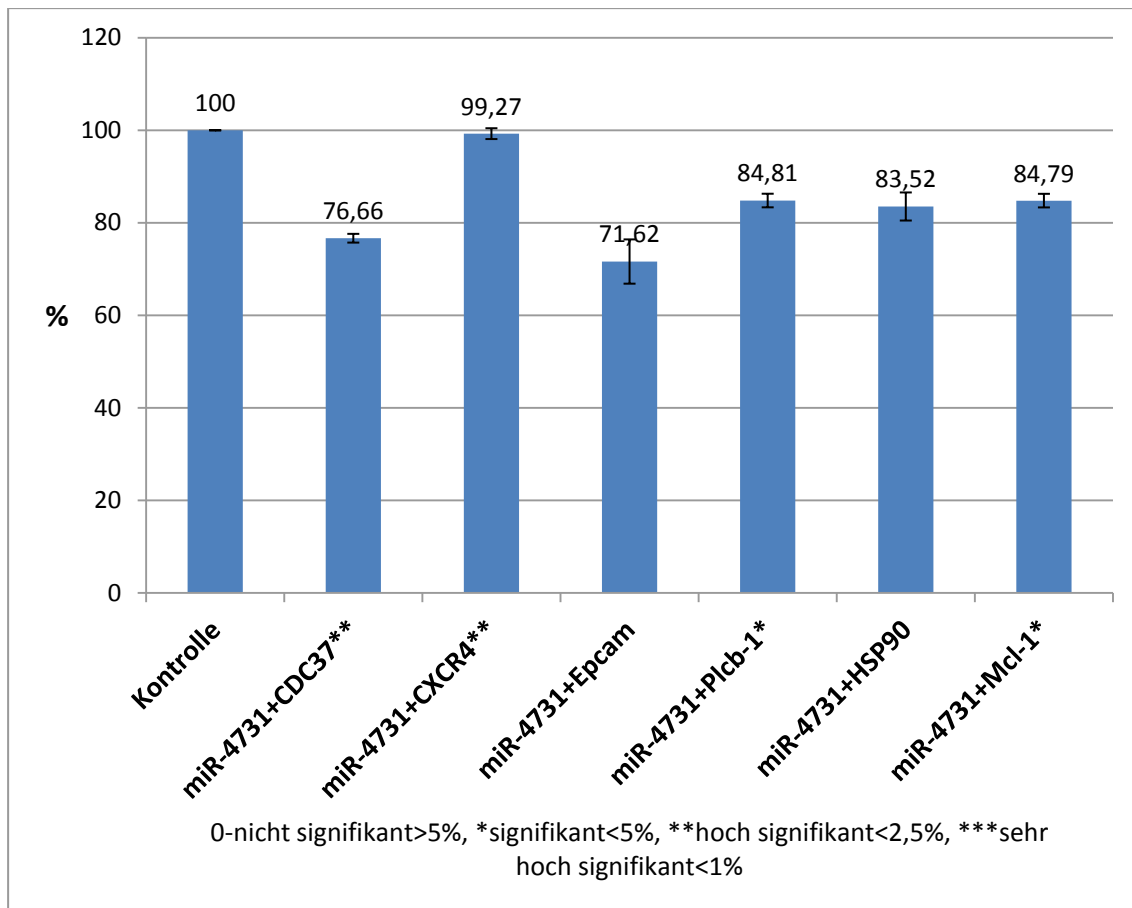


Abbildung 4.05: Proliferationshemmung von HeLa Zellen, welche mit miRNA/siRNA Kombinationen behandelt wurden, im Bezug auf eine Kontrolle. Die Kombination aus miRNA-4731 mit EpCAM erzielte die stärkste Hemmung.

Die Auswertung des Proliferationstests zeigte bei den Kombinationen miRNA-4731+PLCB1, miRNA+HSP90 und miRNA-4731+MCL1 eine deutliche Hemmungssteigerung im Vergleich zu den siRNA-Einzelbehandlungen. Am wirkungsvollsten war die Mischung aus miRNA-4731 und EpCAM mit einer Wachstumshemmung auf 71,62%, ohne aber einer statistisch signifikanten Änderung zur Behandlung mit anti-EpCAM siRNA. Auch in Verbindung von CDC37 war ein deutlicher Effekt von -23,34% zu erkennen. Jedoch zeigte hier ebenfalls eine Behandlung mit CDC37 alleine einen besseren Effekt.

4.4. FACS-Versuch

Mit den synthetisierten miRNAs 218, 29b-1, 29b-2 und 125b wurde, nach der Färbung mit Propidiumjodid, eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Auswertung darüber, welchen Einfluss die einzelnen miRNAs auf die Zellzyklusphasen der HeLa Zellen hatten, findet sich in den folgenden Tabellen.

Kombination	Konzentration	Apoptotische Zellen [3 biologische Replikate]			
		%	STD	Differenz	Signifikanz
Unbehandelte Zellen	2 nM	6,23%	1,02%	0,00%	n.s.
miR-218	2 nM	5,36%	0,43%	-0,87%	n.s.
miR-29b-1	2 nM	5,70%	0,95%	-0,53%	n.s.
miR-29b-2	2 nM	10,51%	6,35%	4,28%	n.s.
miR-125b	2 nM	5,49%	1,00%	-0,74%	n.s.

Tabelle 4.03: Prozentueller Anteil apoptotischer Zellen nach der miRNA-Behandlung.

Den größten Anteil an apoptotischen Zellen, erzielte die Behandlung mit miRNA-29b-2 mit 10,51%. Es sind jedoch keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die unbehandelten Zellen (6,23%) zu erkennen. Alle anderen miRNAs erreichen einen Wert um 5%, jedoch sind alle Ergebnisse nicht signifikant.

Kombination	G0/G1 Phase (diploider Chromosomensatz) [3 biologische Replikate]			
	%	STD	Differenz	Signifikanz
UZ	51,05%	4,18%	0,00%	n.s.
miR-218	48,36%	1,16%	-2,69%	n.s.
miR-29b-1	49,31%	1,07%	-1,74%	n.s.
miR-29b-2	47,42%	2,82%	-3,64%	n.s.
miR-125b	45,31%	1,03%	-5,75%	* < 0,05

Tabelle 4.04: Anteil der Zellen, welcher sich nach der miRNA-Behandlung in der G0/G1 Phase befindet.

In der G0/G1-Phase befindet sich die Hauptmenge der HeLa Zellen. Den höchsten Wert aller Behandlungen erreichte miRNA-29b-1 (nicht signifikant). Ein signifikantes Ergebnis konnte nur bei miRNA-125b mit einem Wert von 45,31% erzielt werden. Die prozentuellen Anteile unterscheiden sich jedoch nur wenig von den unbehandelten Zellen (5,74-1,74%).

Kombination	S Phase [3 biologische Replikate]			
	%	STD	Diff.	Sign.
UZ	28,81%	3,89%	0,00%	n.s.
miR-218	30,36%	1,30%	1,55%	n.s.
miR-29b-1	28,93%	1,74%	0,11%	n.s.
miR-29b-2	27,05%	5,26%	-1,77%	n.s.
miR-125b	32,36%	1,88%	3,55%	n.s.

Tabelle 4.05: Anteil der Zellen, welcher sich nach der miRNA-Behandlung in der S-Phase befindet.

Die Synthesephase, bei der es zur Verdopplung der DNA im Zellkern kommt, beinhaltet ungefähr ein Drittel der Zellen. Auch hier können, bis auf miRNA-29b-2 mit einer Differenz von 1,77% verglichen mit den unbehandelten Zellen, keine Hemmeffekte der Behandlungen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind erneut nicht signifikant.

Kombination	G2/M Phase (doppelt diploid) [3 biologische Replikate]			
	%	STD	Diff.	Sign.
UT	13,24%	0,88%	0,00%	n.s.
miR-218	15,20%	0,40%	1,96%	** < 0,025
miR-29b-1	15,16%	0,16%	1,92%	** < 0,025
miR-29b-2	14,31%	2,54%	1,07%	n.s.
miR-125b	15,82%	0,27%	2,58%	*** < 0,01

Tabelle 4.06: Anteil der Zellen, welcher sich nach der miRNA-Behandlung in der G2/M Phase befindet.

In der G2 bzw. Mitose-Phase erkennt man bei den mit miRNAs behandelten Zellen einen leicht erhöhten Anteil. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (13,24%) verharren mehr Zellen in dieser Phase, was auf eine Hemmwirkung der Behandlungen hindeutet. Mit sehr hoher Signifikanz kann hier die Behandlung mit miRNA-125b (15,82%) den stärksten Effekt erreichen. Auch miRNA-218 (15,20%) und miRNA-29b-1 (15,16%) erzielen geringe Hemmeffekte mit hoher Signifikanz.

Kombination	Polyploid [3 biologische Replikate]			
	%	STD	Diff.	Sign.
UT	1,07%	0,46%	0,00%	n.s.
miR-218	1,27%	0,11%	0,20%	n.s.
miR-29b-1	1,30%	0,09%	0,23%	n.s.
miR-29b-2	1,11%	0,43%	0,04%	n.s.
miR-125b	1,71%	0,08%	0,64%	* < 0,05

Tabelle 4.07: Anteil der polyploiden Zellen nach der miRNA-Behandlung.

Die Gruppe der polyploiden Zellen unterscheidet sich wenig von den unbehandelten Zellen. Ausschließlich die Untersuchung von miRNA-125b weist Signifikanz auf und erzielt mit einem Anteil von 1,71% die höchste Abweichung verglichen mit den unbehandelten Zellen (1,07%).

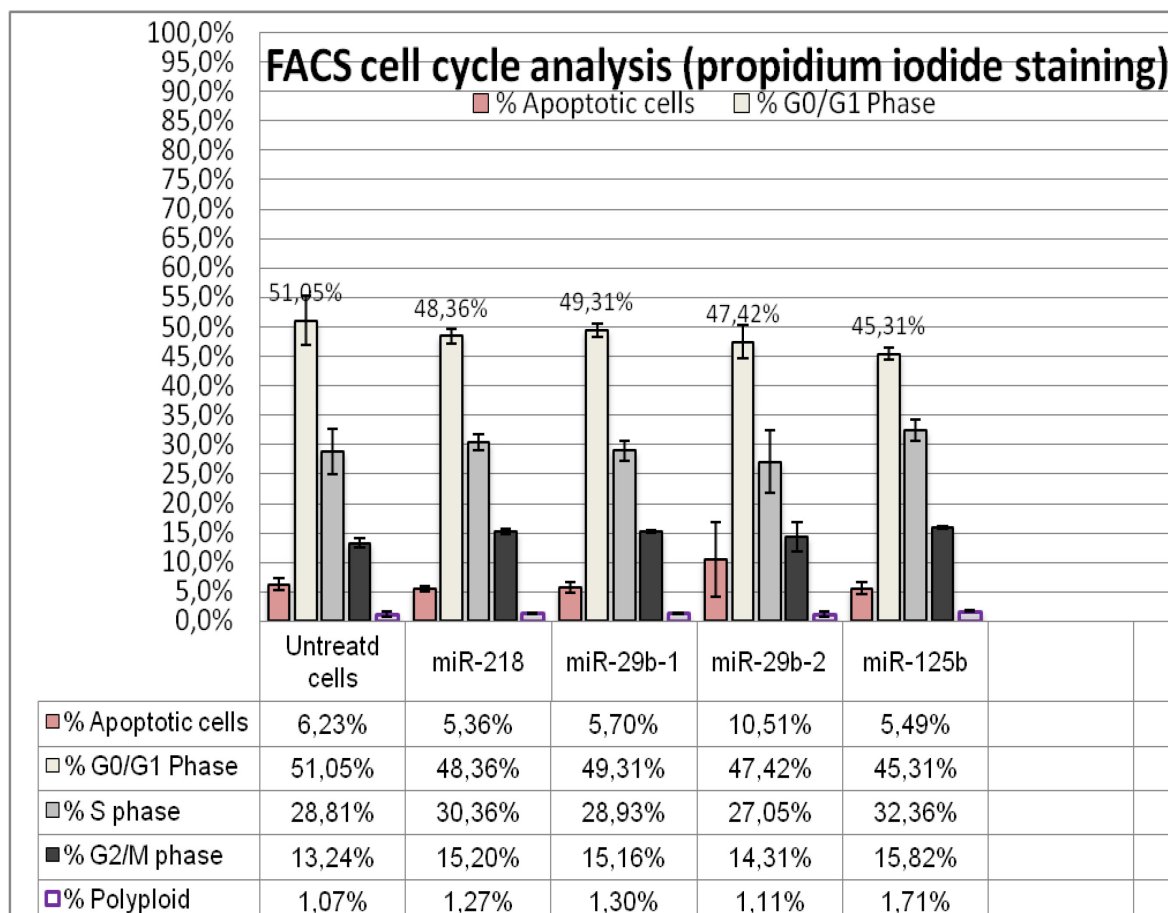


Abbildung 4.06: Schematische Darstellung der prozentuellen Anteile im Zellzyklus aller Behandlungen und der unbehandelten Zellen.

Die Zellzyklusanalyse zeigte erwartungsgemäß, dass die Behandlungen mit den miRNAs nur geringen Einfluss nehmen. MiRNA-29b-2 zeigt erhöhte Apoptose-Werte (+4,28%) und eine geringfügige Minderung der Zellen in der Synthese-Phase (-1,77%) verglichen mit unbehandelten Zellen. Die effektivste miRNA ist nach dieser Auswertung miRNA-125b. Es kommt dabei zu einer Verschiebung von der G0/G1-Phase zur G2/M-Phase und einer Erhöhung des Anteils der polyploiden Zellen. Insgesamt fallen die Einflüsse jedoch auch hier nur relativ gering aus.

4.5. Validierung von Referenzgenen

Die RT-qPCR wird als Goldstandard in der Analytik angesehen, wenn es um miRNA-Expressionsänderungen und relative Quantifizierung geht. Um jedoch vergleichende Aussagen zwischen verschiedenen miRNAs treffen zu können, ist es notwendig die Messergebnisse auf ein oder mehrere Referenzgene zu normalisieren. Diese müssen wiederum eine gewisse Stabilität aufweisen und sollten sich so wenig wie möglich durch verschiedene miRNA-Transfektionen beeinflussen lassen.

In den folgenden Experimenten wurden verschiedene Referenzgene in den drei Zelllinien HeLa, MCF-7 und KBC-1 validiert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Online-Programm RefFinder²³, welches die Referenzgene mit Hilfe der Berechnungsmethoden BestKeeper, NormFinder, Genorm und der vergleichenden Delta-Ct Methode nach ihrer Stabilität reiht.

In den folgenden Experimenten wurden die Referenzgene B2M, GAPDH, GOLGA1, HPRT1, NFATC3, OAZ1, RNA Polymerase II A und ZNF48 getestet. Die cDNA für die RT-qPCR wurde aus folgenden Proben hergestellt:

Proben	Konzentration
Unbehandelte Zellen	
siRNA-Negativ-Kontrolle	1nM
siRNA-Negativ-Kontrolle	10nM
GAPDH-siRNA	1nM
GAPDH-siRNA	10nM
miRNA-4731	1nM
miRNA-4731	10nM

Tabelle 4.08: Verwendete Proben für die Validierung der Referenzgene;

4.5.1. Validierung von Referenzgenen für HeLa-Zellen

Alle Behandlungen

GAPDH	HPRT1	B2M	GOLGA1	NFATC3	ZNF48	RNA Pol 2A	OAZ1	
24,92	24,84	22,88	24,45	29,15	30,68	23,15	20,97	UT
25,35	24,51	22,95	24,40	29,19	30,80	23,35	20,93	
25,33	24,51	22,67	24,37	29,01	30,65	23,27	20,79	
25,31	24,57	22,47	24,51	29,17	30,70	23,68	20,61	Scr. Kont. 1nM
25,24	24,65	22,97	24,50	29,09	30,55	23,32	20,88	
25,36	24,72	22,78	24,52	29,27	31,00	23,59	21,06	
25,36	24,52	22,74	24,68	29,23	30,36	23,59	20,98	Scr. Kont. 10nM
25,33	24,80	22,89	24,55	28,87	30,34	23,34	21,11	
25,29	24,71	22,59	24,51	29,94	30,57	23,65	21,19	
26,60	24,82	22,52	24,46	28,99	30,62	23,18	21,04	GAPDH 1nM
26,06	24,70	22,72	24,47	29,04	30,63	23,32	21,00	
26,23	24,81	22,63	24,39	28,91	30,61	23,75	21,12	
26,93	24,90	22,78	24,76	29,03	30,27	23,64	21,03	GAPDH 10nM
27,21	24,73	22,60	24,67	28,91	30,22	23,56	21,19	
27,60	24,64	22,57	24,73	29,09	31,64	23,56	21,07	
25,61	24,66	22,44	24,58	28,93	30,62	23,39	21,00	miR-4731 1nM
25,89	24,51	22,23	24,79	29,32	30,97	23,98	20,89	
25,31	24,55	22,45	24,53	29,41	31,14	23,93	21,12	miR-4731 10nM
25,09	24,41	22,49	24,29	29,16	31,32	23,45	20,96	
24,99	24,91	22,40	24,53	29,48	31,35	23,82	21,73	

Tabelle 4.09: Die Cp-Werte der verwendeten Referenzgene wurden nach der Behandlung gereiht und in das RefFinder-Programm eingefügt.

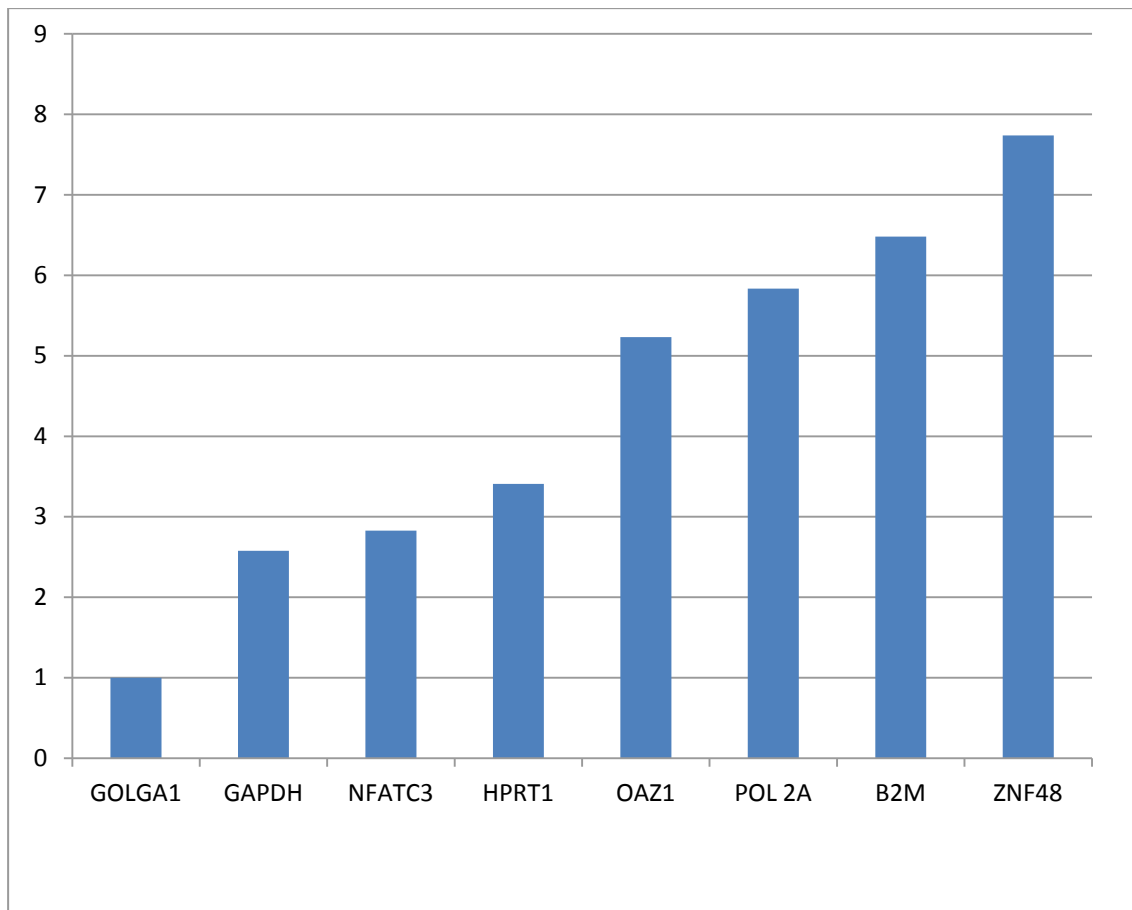


Abbildung 4.07: Auswertung der Referenzgene nach Stabilität; GOLGA1 zeigt die geringste Schwankungsbreite bei unterschiedlichen Behandlungen der HeLa-Zellen

Die besten Referenzgene aus den RTqPCRs mit den effizienzkorrigierten CP Mittelwerten wurden ausgewertet. Es wurden alle Behandlungen miteinbezogen. Durch die Verwendung der GAPDH siRNA war vorauszusehen, dass dieses Gen am schlechtesten abschneidet, was auch durch das Programm bestätigt wurde. GOLGA1 und NFATC wurden auch von Genvestigator für Brustgewebe und Zervix vorgeschlagen. Ebenso sind sie bei siRNA-Transfektionen am besten geeignet. In verschiedenen Publikationen wurde OAZ1 als Universal-Referenzgen beschrieben. Bei dieser Auswertung landet es auf Platz 3.

Unbehandelte Zellen und miRNA-4731 Transfektion

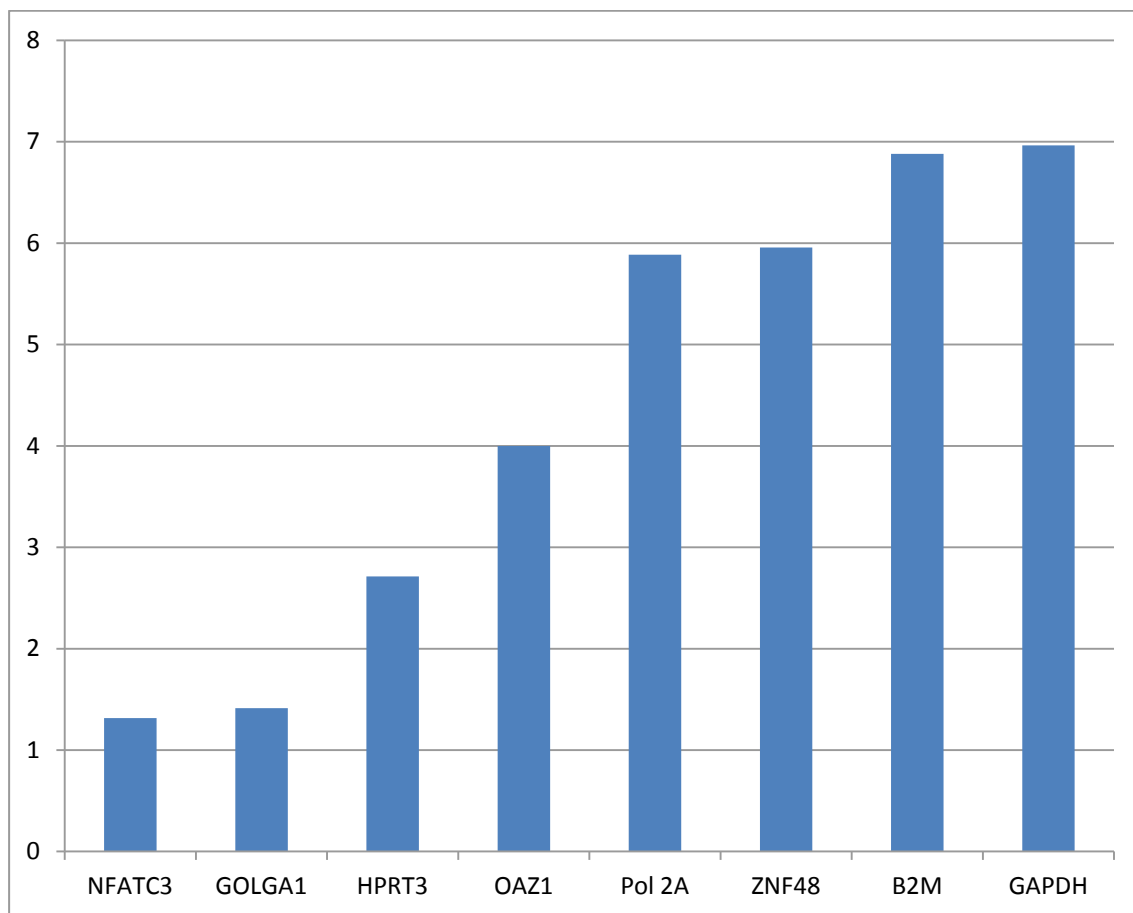


Abbildung 4.08: Bei der miRNA-4731 Transfektion war NFATC3 das stabilste Gen.

Die Reihung wurde durch die Verwendung der effizienzkorrigierten Mittelwerte für die miRNA-4731 Transfektion mit den Konzentrationen von 1 nM und 10 nM erneut verändert. NFATC und GOLGA1 belegten die ersten beiden Plätze. An der dritten Stelle befand sich HPART1, an der vierten lag OAZ1. Die Genstabilitätswerte zeigten bei GOLGA1 eine Verdopplung (1,414) im Bezug auf HPRT1 (2,711). GAPDH befand sich auf Platz acht, was auf eine starke Beeinflussung der miRNA-4731 schließen lässt. Das Online Tool „TargetScan Human Prediction of miRNA targets“ errechnete eine Bindungsstelle von miRNA-4731 in der 3'UTR von GAPDH. Der Effekt von miRNA-4731 mit einer Konzentration von 1nM zeigte einen knock-down auf 66% des Expressionsniveaus der unbehandelten Zellen. Bei einer Konzentration von 10 nM kam es zu einer Erhöhung auf 105%, was durch eine biologische Abweichung oder einen konzentrationsabhängigen miRNA-Effekt bedingt sein könnte.

Schlussfolgerung

GOLGA1 wies in allen Untersuchungen eine besonders hohe Stabilität auf und lag immer auf einem der ersten drei Plätze. Es ist somit für diese Untersuchungsreihe am besten geeignet. Auch NFATC3 kann als Referenzgen herangezogen werden, da es ebenfalls eine geringe Beeinflussbarkeit aufweist. ZNF48 zeigte sich durch die Behandlungen mit Scrambled Kontrolle und GAPDH siRNA stark beeinflusst. Es wies beide Male den achten Platz auf. Bei der Transfektion mit miRNA-4731 gelangte es auf den sechsten Platz. Die Verwendung dieses Referenzgens ist folglich nicht für eine Untersuchungsreihe mit den durchgeführten Behandlungen zu empfehlen.

4.5.2. Validierung von Referenzgenen für MCF-7 Zellen

Alle Behandlungen

B2M	GAPDH	GOLGA1	HPRT1	NFATC3	OAZ1	RNA Pol 2A	ZNF 48	
22,64	26,32	27,40	22,34	28,50	23,36	23,22	25,12	UT
22,80	26,47	27,52	22,33	28,58	23,40	23,32	25,23	
22,64	26,44	27,44	22,34	28,58	23,46	23,31	25,23	
22,53	26,16	27,12	22,11	28,38	23,28	23,01	25,08	Scr. Kont. 1nM
22,44	26,30	27,30	22,27	28,34	23,26	22,93	25,06	
22,50	26,35	27,35	22,38	28,42	23,32	23,11	25,14	
22,29	26,23	27,21	22,23	28,41	23,48	23,12	25,09	Scr. Kont. 10nM
22,51	26,40	27,33	22,22	28,38	23,38	23,13	25,16	
22,46	26,15	27,32	22,24	28,25	23,33	23,06	25,08	
22,42	26,26	27,43	22,27	28,36	23,39	23,11	25,21	GAPDH 1nM
22,33	28,35	27,35	22,23	28,11	23,34	22,82	24,96	
21,67	27,69	26,75	21,82	27,64	23,24	22,46	24,34	
22,70	30,40	27,38	22,54	28,67	23,59	23,32	25,21	GAPDH 10nM
22,65	30,37	27,49	22,33	28,52	23,39	23,25	25,17	
22,63	30,34	27,52	22,33	28,44	23,45	23,39	25,20	
22,57	26,41	27,44	22,63	28,40	23,55	23,34	25,35	miR-4731 1nM
22,53	26,25	27,57	22,68	28,32	23,47	23,29	25,28	
22,53	26,40	27,53	22,66	28,34	24,17	23,32	25,11	
22,38	25,96	27,29	23,07	28,47	23,29	23,86	25,24	miR-4731 10nM
22,53	25,97	27,20	23,06	28,34	23,27	23,77	25,21	
22,48	25,82	27,30	23,00	28,43	23,21	23,74	25,12	

Tabelle 4.10: Effizienzkorrigierte CP Mittelwerte für alle Behandlungsgruppen der MCF-7 Zellen.

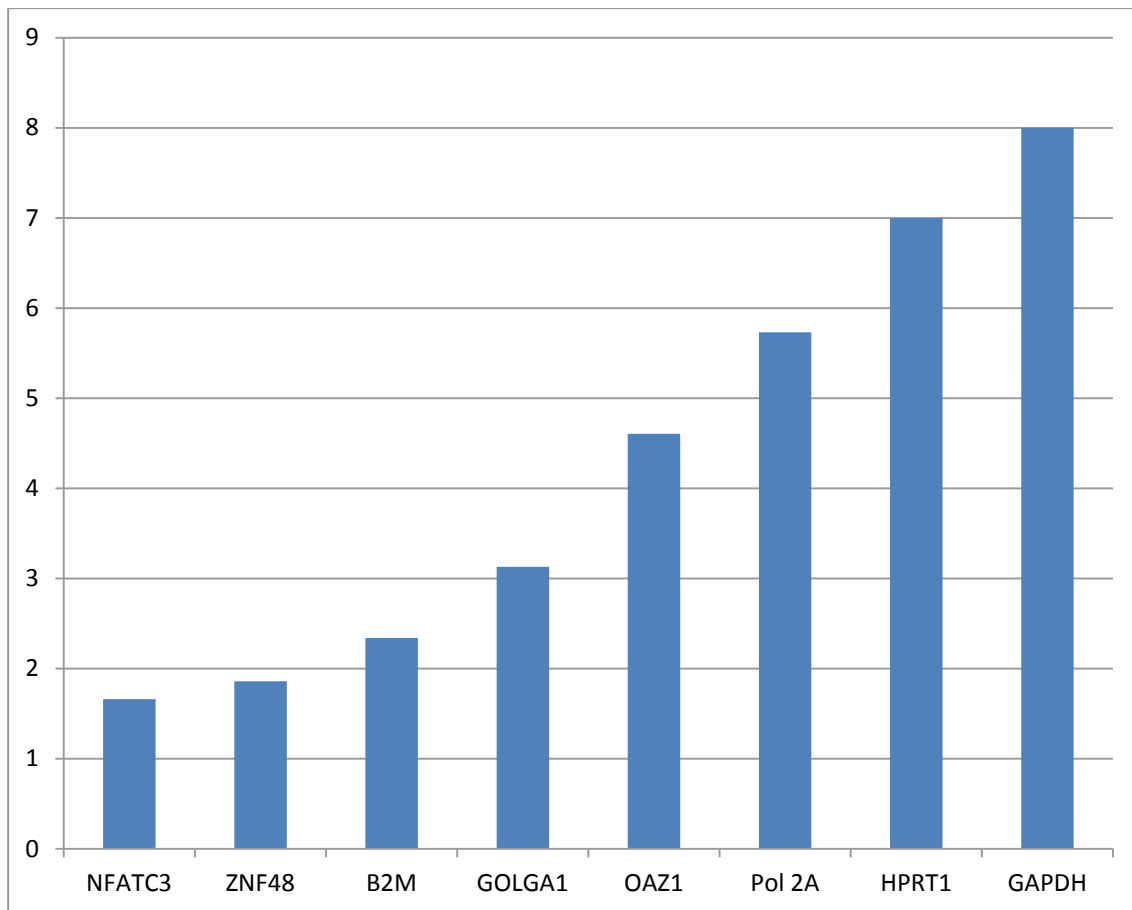


Abbildung 4.09: NFATC wird als stabilstes Referenzgen an die erste Position gereiht.

GAPDH befand sich, wie auch bei den HeLa Zellen an der letzten Position, was auch hier durch die Verwendung der GAPDH siRNA, erklärbar ist. NFATC3 belegte die erste Stelle und wies somit die geringste Schwankungsbreite auf. Da MCF-7 Zellen aus einem Brusttumor stammen, ist dies eine logische Schlussfolgerung. Auch ZNF48 war bei dieser Versuchsreihe sehr stabil (2.Position).

Unbehandelte Zellen und miRNA-4731 Transfektion

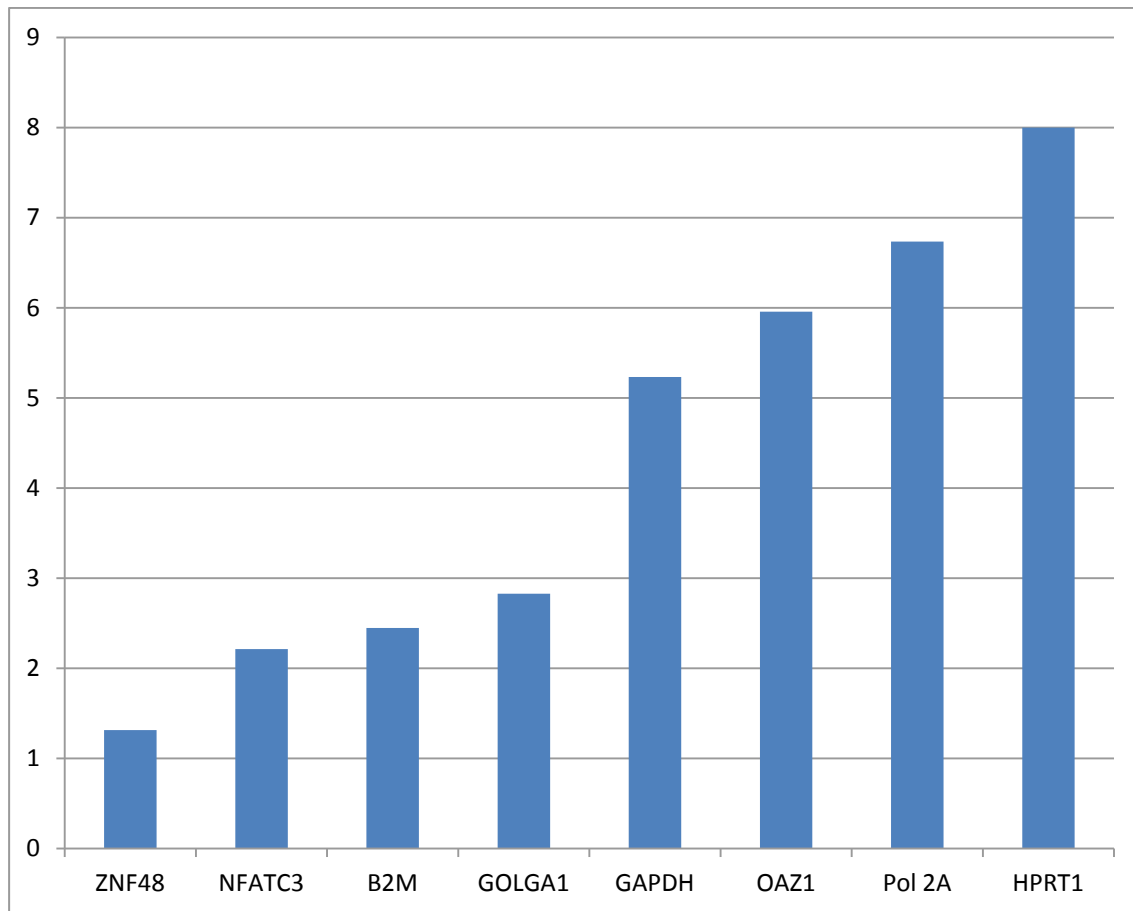


Abbildung 4.10: ZNF 48 landete bei der Behandlung mit miRNA-4731 auf dem ersten Platz.

Bei Beschränkung der Analyse auf die miRNA-Transfektion, belegte ZNF48 den ersten Platz, NFATC3 blieb unverändert auf der zweiten Position. B2M und GOLGA1 befanden sich an dritter und vierter Stelle. Mit GAPDH (fünfter Rang) kam es zu einer Verdoppelung des Stabilitätswertes.

Schlussfolgerung

Nach Auswertung aller Behandlungen teilten sich NFATC3 und ZNF48 Platz eins. Schon bei den HeLa Zellen hat NFATC3 hohe Stabilität gezeigt. ZNF 48 schnitt bei den MCF-7 Zellen jedoch deutlich besser ab. Auch die RNA Polymerase II A ist als Referenzgen gut geeignet (dritter Rang). GAPDH lag auf dem vorletzten Platz, aber auch ohne Berücksichtigung der GAPDH-siRNA ist es den oben genannten unterlegen. OAZ1 sollte, bedingt durch seine starke

Beeinflussbarkeit durch die verschiedenen Behandlungen, nicht als Bezugspunkt herangezogen werden.

4.5.3. Validierung von Referenzgenen für KBC-1 Zellen

Alle Behandlungen

B2M	GAPDH	GOLGA1	HPRT1	NFATC3	OAZ1	RNA Pol 2A	ZNF 48	
22,38	24,92	20,97	19,47	29,13	20,93	23,37	29,56	UT
22,34	24,85	21,32	19,89	29,22	20,96	23,50	30,76	
22,43	24,94	21,03	19,78	29,20	20,88	23,70	30,75	
24,32	25,25	21,24	21,97	29,51	22,45	22,82	30,92	Scr. Kont. 1nM
26,43	26,07	22,14	23,69	30,17	23,99	22,68	31,80	
24,22	25,18	20,82	21,56	29,13	22,21	22,69	30,71	
26,32	26,07	22,52	23,96	30,63	24,18	22,73	32,45	Scr. Kont. 10nM
27,43	26,79	23,29	24,82	31,31	25,24	23,01	32,93	
22,85	24,74	21,16	20,33	28,86	21,21	22,76	30,47	
23,44	25,07	20,90	20,89	28,91	21,44	22,78	30,67	GAPDH 1nM
22,34	25,08	21,22	18,20	29,13	20,65	23,04	30,66	
22,07	25,03	21,03	18,57	29,65	20,59	23,05	30,59	
22,92	24,99	20,88	19,16	29,73	21,13	23,30	30,62	GAPDH 10nM
22,62	25,22	21,28	19,68	29,35	21,01	23,24	30,68	
23,54	25,02	20,78	19,60	29,26	20,76	23,03	30,50	
22,50	26,60	21,10	19,42	29,74	20,87	23,03	30,62	miR-4731 1nM
23,32	26,44	21,15	19,57	29,59	20,93	23,07	30,86	
22,74	26,77	21,00	18,22	29,63	21,06	23,04	30,54	
22,42	24,91	21,16	19,10	29,36	20,82	23,02	30,61	miR-4731 10nM
22,64	25,31	21,99	19,97	29,73	24,44	23,49	31,13	
21,85	24,87	20,46	19,14	29,35	21,33	22,94	30,37	

Tabelle 4.11: Effizienzkorrigierte CP Mittelwerte aller Behandlungen.

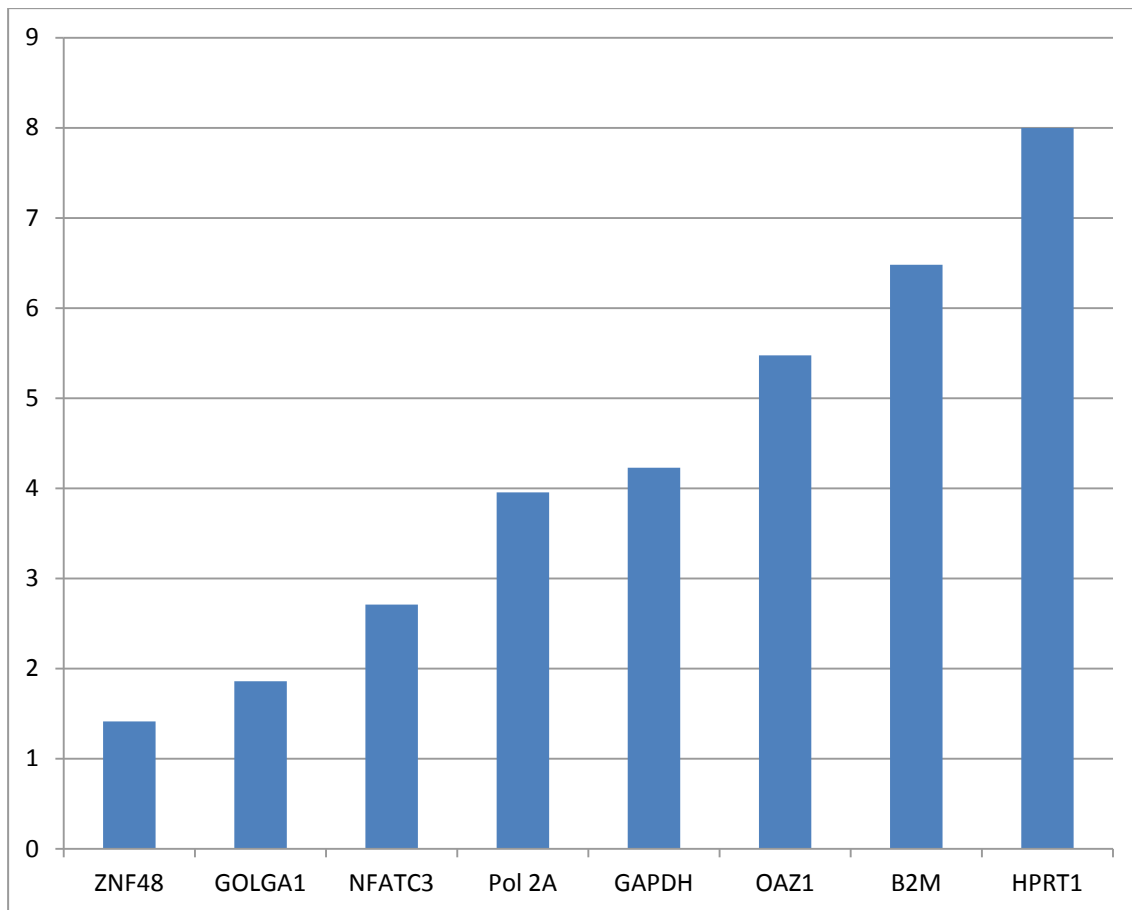


Abbildung 4.11: Die Analyse aller Behandlungen bewertete ZNF48 als stabilstes Referenzgen.

Unter Einbeziehung der unbehandelten Zellen und aller Behandlungen zeigte das Referenzgen ZNF 48 die geringste Schwankungsbreite und ist somit für diese Versuchsreihe am besten geeignet. Auch GOLGA1 und NFATC3 können verwendet werden. HPRT1 scheint nach dieser Analyse nicht geeignet zu sein, da es durch die verschiedenen Behandlungen stark beeinflusst wurde.

Unbehandelte Zellen und miRNA-4731 Transfektion

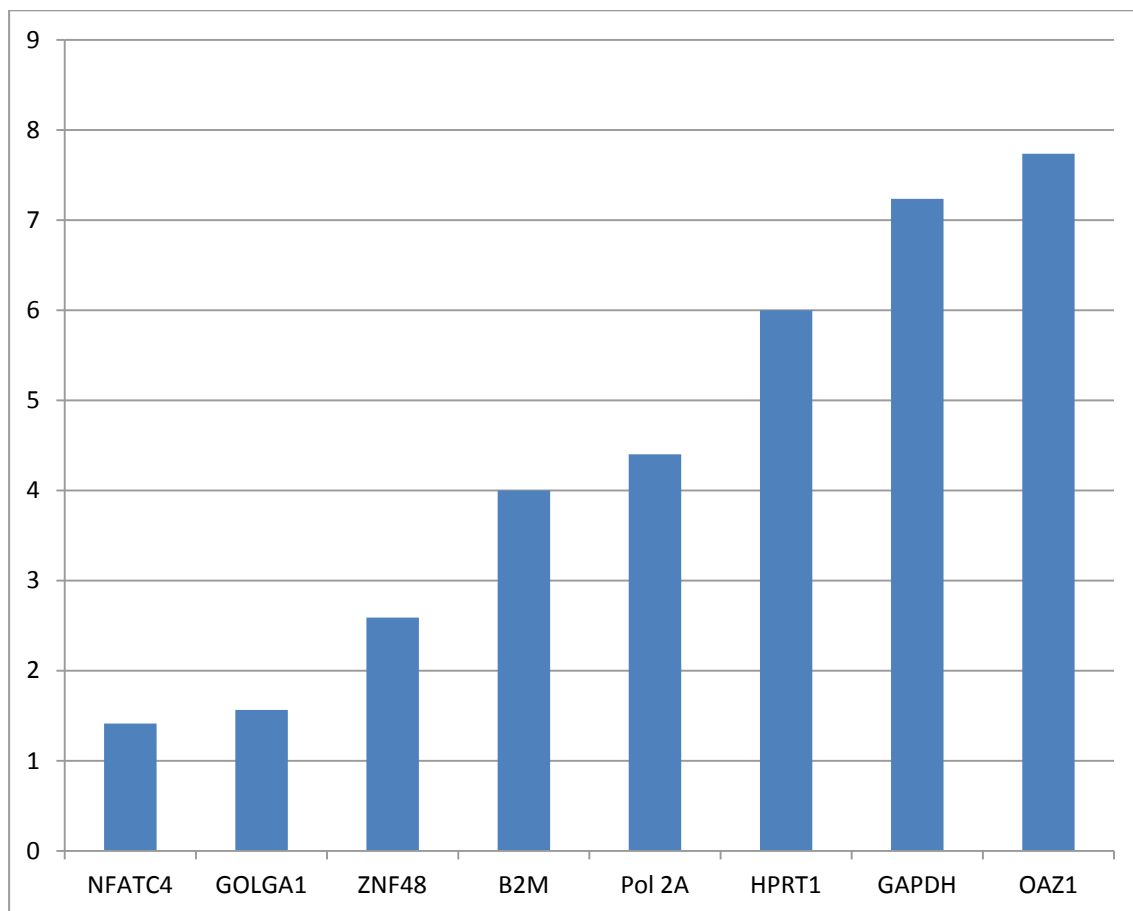


Abbildung 4.12: Stabilstes Referenzgen bei der miRNA-4731 Transfektion und unbehandelten Zellen ist NFATC3.

NFATC3 zeigte sich durch die miRNA-4731 Transfektion am wenigsten beeinflusst. GOLGA1 und ZNF48 belegten hier die Ränge zwei und drei. Die größten Schwankungen wiesen GAPDH und OAZ1 auf. B2M befand sich erneut an der vierten Position, die RNA Polymerase II A rutschte von der zweiten an die fünfte Stelle.

Schlussfolgerung

Die Auswertung aller Untersuchungen spricht NFATC3, wie auch schon bei den MCF-7 Zellen gezeigt wurde, die beste Eignung zu. Ebenso ZNF48 und GOLGA1 können bei KBC-1 Zellen und den genannten Transfektionen als Referenzgene verwendet werden. OAZ1 und HPRT1 sind aufgrund ihrer Instabilität nicht zu empfehlen. Auffallend ist der geringere Einfluss der GAPDH-siRNA auf das Zielgen, offenbar eine Konsequenz der Veränderung der Zelllinie durch die Resistenzbildung, die einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz zu haben scheint.

5. Diskussion

5.1. MicroRNAs

Es wurden jeweils die Leit- und Passagierstränge der miRNAs miR-15a miR-125b, miR-218, miR-29b-1, miR-29b-2 und miR-4731 nach der Standard RNA-Synthese Methode synthetisiert. Die Auswahl wurde anhand einer Literaturrecherche getroffen.

MiRNA-15a ist bekannt dafür als Tumorsuppressor zu wirken. Die Expression dieser miRNA hemmt die Zellproliferation, begünstigt die Apoptose von Krebszellen und unterdrückt die Entstehung von Tumoren sowohl in vitro als auch in vivo. Angriffspunkte dieser miRNA sind verschiedene Onkogene, wie BCL-2, MCL-1, CCND1 und WNT3A. Eine Hinunterregulation von mir-15a wurde im Zusammenhang mit chronischen lymphatischen Lymphomen, Hypophysenadenomen und Prostatakrebs beschrieben.³³

MiRNA-125b greift in den TNF α -stimulierten HeLa Zellen am Transkriptionsfaktor NF- κ B an. Sie ist ein zentraler Mediator im NF- κ B Pfad und verursacht eine Minderung der Expression von Plasmiden.²⁴ Des Weiteren wird miRNA-125b eine wichtige Rolle in der Hautphysiologie zugeschrieben. Sie ist ein starker Regulator in der stabilen Phase der Melanogenese. Die Expression ist umgekehrt proportional zum Pigmentierungs-Level.²⁵

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass miRNA-125b in hepatozellulärem Krebsgewebe hinunterreguliert ist. Die ektopische Expression reduziert die zelluläre Proliferation, sowie die Zellzyklus Progression der Krebszellen. Dies konnte durch eine Minderung um 12% in der S-Phase, im Vergleich zur Kontrolle, bei einer durchflusszytometrischen Analyse gezeigt werden.²⁶ Auch die eigenen Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse. Die Analyse der durchgeführten Experimente ergab eine Proliferationshemmung von 5%.

Angriffspunkte stellen Mcl-1 und IL6R dar. Tumor-suppressive Effekte von miR-125b in Leberkrebszellen, lassen einen therapeutischen Einsatz möglich erscheinen.²⁶

MiR-218 wurde vor allem im Zusammenhang mit dem Kolorektalkarzinom untersucht. Diese miRNA spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Progression jener Erkrankung. Mit RT-qPCR wurden die Expressionsspiegel bestimmt und in Beziehung mit klinisch-pathologischen

Charakteristika gesetzt. Im Vergleich zu angrenzendem gesunden Gewebe, waren die Expressionsraten von miR-218 im Kolorektalkarzinom-Gewebe vermindert. Die Expression von miR-218 ist demnach signifikant mit der TNM-Klassifikation, den Lymphknoten Metastasen und der Differenzierung assoziiert. Bei Patienten mit einer geringen miR-218 Expressionsrate war die Überlebenszeit, im Gegensatz zu Patienten mit hohen miR-218 Spiegeln, deutlich verkürzt. Weiters konnte gezeigt werden, dass die Serumspiegel von miR-218 ein Monat nach der Operation gestiegen sind. MiR-218 könnte somit als potentieller diagnostischer und prognostischer Biomarker von Kolorektalkarzinomen eingesetzt werden.²⁷

Die Hinunterregulierung von miR-218 wurde auch im Zusammenhang mit Nasenrachenkrebs beschrieben. Die Suppression der miRNA wird mit der epigenetischen Stilllegung von SLIT2 und SLIT3 assoziiert, welche Liganden des ROBO1 Rezeptors sind. Der ROBO1 Rezeptor spielt wiederum eine entscheidende Rolle in der Tumorangiogenese. Die exogene Expression von miR-218 verursachte signifikante Toxizität in Nasenrachenkrebs Zellen in vitro (ROBO1 wurde nach der miR-218 Transfektion um knappe 70% gehemmt) und verzögerte das Tumorwachstum in vivo (Steigerung des Rückfalls-freien Überlebens um bis zu 30% nach 15 Jahren). ROBO1 Überexpression wird signifikant mit einer Verschlechterung des insgesamt und nodalen Rückfalls-freien Überlebens assoziiert. Die Untersuchungen zeigten eine integrative Tumor-Suppressor Funktion von miR-218 bei Nasenrachenkarzinom, und deuteten darauf hin, dass eine Wiedereinführung der miR-218 Expression in Nasenrachenkrebs Zellen hilfreich für das klinische Management wäre.²⁸

Untersuchungen mit Northern Blot und RT-qPCR von Leberkrebszellen zeigten eine deutliche Hinunterregulierung von miR-29. Die Expressionsrate von miR-29 steht in signifikanter Beziehung mit dem Überleben von Leberkrebs Patienten. Studien, sowohl über die Zunahme, als auch über den Verlust der Funktion, ergaben, dass miR-29 in der Lage ist hapatozelluläre Krebszellen im Bezug auf Apoptose, welche durch Serumknappheit und Hypoxie oder Chemotherapeutika ausgelöst wurde, sensibilisieren kann. Die Transfektion von miR-29 unterdrückte die Fähigkeit von Leberkrebszellen Tumore in Mäusen zu bilden dramatisch. Angriffspunkte dieser miRNA stellen Bcl-2 und Mcl-1 dar. Eine Stilllegung von Bcl-2 und Mcl-1 verstärkte den proapoptotischen Effekt von miR-29b, während eine Überexpression dieser beiden Proteine zu einer Abschwächung der miR-29 Wirkung führte.²⁹

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der miR-29 Familie, miR-29a und miR-29b, an der Regulation von Osteosarkomen beteiligt sind. Hinunterregulierte Spiegel dieser beiden miRNAs konnten im Osteosarkom Gewebe nachgewiesen werden. Die Auslösung von Apoptose durch miR-29 wird durch die p53 Genaktivierung erreicht.³⁰

In einer großen Studie über Brustkrebs wurde die Expression von verschiedenen miRNAs charakterisiert, unter anderem auch miRNAs aus der miRNA-473 Familie. Die Resultate deuteten daraufhin, dass die Krebsart von einer Variation in den Expressionsraten eines üblichen miRNA-Sets bestimmt wird und nicht etwa von einer gewebespezifischen Expression. Auch ist ungefähr die Hälfte dieser miRNAs mit Ago2 in MCF-7 Zellen assoziiert. Ein Einsatz als Biomarker bei klinischen Untersuchungen wird auch hier vorgeschlagen.³¹

5.2. Oligonukleotidsynthese

Reinheit und Identität der synthetisierten miRNAs wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese bestimmt, um eine erfolgreiche Synthese sicherzustellen. Da die absolute Länge aufgrund von Migrationseffekten nicht genau bestimmt werden kann, ist ein Standard bzw. eine Referenz für die Abschätzung hilfreich. Jedoch kann bei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden durch die am Synthesizer durchgeführte Quantifizierung der Tritylabspaltung grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass das Hauptprodukt die vollständige Sequenz darstellt. Messungen der RNA Menge wurden mit dem Nanodrop-Spektrophotometer durchgeführt, um eine ausreichende Ausbeute nach der RNA Extraktion sicherzustellen.

5.3. Quantifizierung

Aus Leit- und Passagierstrang wurden die RNA-Duplexe gebildet und nach der Transfektion in HeLa Zellen die cDNA hergestellt, welche für die Quantifizierung mit der RT-qPCR notwendig ist. Messungen mit der RT-qPCR und eine Auswertung mit der REST 2009 Software bringen Aufschluss über die Expressionsrate. Quantifiziert wurden miRNA-15a und miRNA-125b nach der Transfektion jeweils mit den Konzentrationen von 1 nM und 10 nM. Das Ergebnis beider miRNAs zeigte, in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration, eine deutliche Hinaufregulation, also erfolgreiche Steigerung der intrazellulären miRNA Konzentration. Die relative Erhöhung betrug zwischen dem 5-(miR-125b, 1 nM) und dem 160fachen (miR-15a, 10

nM) der miRNA-Ausgangsmenge. Die Unterschiede der relativen Steigerung können auf die abweichenden endogenen miRNA-Konzentrationen zurückgeführt werden. Die Cp-Werte der qPCR-Analyse (ca. 25 für miR-15a, ca. 22,5 für miR-125b) verdeutlichen die fast 200fach höhere Abundanz von miR-125b in HeLa Zellen. Bei einem höheren Ausgangswert führt die gleiche Menge an exogener miRNA natürlich nur zu einer geringeren relativen Erhöhung. Die Quantifizierungsanalysen beweisen die erfolgreiche Transfektion von intakter synthetischer miRNA, aber auch die erfolgreiche Extraktion der kurzen RNA aus dem Zellkulturmaterial.

5.4. Proliferationstest

Zur Bestimmung des Hemmeffekts wurden nach der Transfektion in HeLa Zellen und einer anschließenden Inkubation von 72 Stunden, Proliferationstests mit miRNA-15a, miRNA-125b, miRNA-29b-1, miRNA-29b-2 und miRNA-218 durchgeführt. Die stärkste Wirkung erreichte hier miRNA-15a mit einer Reduktion des Zellwachstums von 7,8%. Die Untersuchung ergab aber auch, dass alle evaluierten miRNAs alleine keine großen Effekte auslösen können. Dies bestätigen auch die Literaturdaten, in welchen Proliferationshemmungen von ungefähr 10% erreicht wurden. Die Tatsache, dass miRNAs einen Einfluss auf eine Vielzahl verschiedener Gene, aber nur eine relativ geringfügige Änderung der Expressionsraten bewirken, erklärt den geringen direkten Effekt auf die Proliferation. Erst im Zusammenspiel mit anderen Faktoren werden die zellulären Signalwege und letztlich der Phänotyp stärker beeinflusst. Es ist eine tiefergehende Beeinflussung von tumorrelevanten zellulären Prozessen wie etwa die Apoptoseresistenz zu erwarten, die sich erst durch Zytostatikatherapie oder auch Kombination mit siRNAs, die ein einzelnes Gen um teilweise einen beträchtlich höheren Prozentsatz herunterregulieren, auf die Tumorpherifation auswirken.³²

Zu diesem Zweck wurde miRNA-4731 gemeinsam mit den siRNAs CDC37, CXCR4, EpCAM, PLCB1, HSP90 und MCL1 transfiziert. Die Kombination aus miR-4731 und EpCAM führte mit einer Abnahme von 28,38% zur stärksten Hemmung. Auch CDC37 konnte in Verbindung mit miRNA-4731 eine durchaus beachtliche Reduktion von 23,34% erreichen.

Eine Zellzyklusanalyse mit Hilfe des FACS-Versuches gab weiter Aufschluss über den Einfluss der miRNAs. Dazu wurde nach Transfektion der miRNAs 218, 125b, 29b-1 und 29b-2 und einer anschließenden Inkubation (37°C, 5% CO₂) von 24 Stunden eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid durchgeführt. Diese Untersuchung untermauerte

größtenteils das Ergebnis, welches durch die Proliferationstests gezeigt wurde. MiRNA-125b zeigte Effekte in der G0/G1-Phase, in der G2/M-Phase und beim Anteil der polyploiden Zellen, allerdings nur in geringem Ausmaß. Auch miRNA-29b-2 ließ in der S-Phase und bei der Rate der apoptotischen Zellen auf eine Zellpopulationsminderung schließen. Im Allgemeinen zeigen miRNAs alleine nur eine relativ geringe Wirkung auf die Wachstumshemmung. Die Ergebnisse der Proliferationstests werden demnach bestätigt.

5.5. Validierung von Referenzgenen

Der zweite Hauptaspekt dieser Arbeit war die Validierung von Referenzgenen. Eine Normalisierung der miRNAs auf ein Bezugsgen ist notwendig, um Ergebnisse vergleichen zu können und die Wirkung einzelner miRNA Behandlungen zu bewerten. Eine wichtige Anforderung an das Gen ist die Stabilität gegenüber den verschiedenen Behandlungen mit miRNAs und siRNAs, besonders gegenüber der Transfektion. Sie sollen sich durch eine möglichst geringe Schwankungsbreite auszeichnen.

Diese Untersuchungsreihe wurde mit den drei Krebszelllinien HeLa, MCF-7 und KBC-1 durchgeführt. Es wurden immer die acht Gene B2M, GAPDH, GOLGA1, HPRT1, NFATC3, OAZ1, RNA Polymerase II A und ZNF48 verwendet. Jede Zelllinie wurde in unterschiedliche Behandlungsgruppen unterteilt: unbehandelte Zellen bzw. Behandlung mit einer Scrambled Kontrolle (1nM, 10nM), miRNA-4731 (1nM, 10nM) und GAPDH siRNA (1nM, 10nM).

Bei den HeLa Zellen stellte sich GOLGA1 als stabilstes Referenzgen heraus. Auch NFATC3 wies nur eine geringe Schwankungsbreite auf und kann für diese Versuchsreihe verwendet werden.

Die Auswertung der Behandlungen mit MCF-7 Zellen schrieb NFATC3 ebenso eine geringe Schwankungsbreite zu. Hier landete auch ZNF48 im Spitzenfeld, welches bei den HeLa Zellen nur die vorletzte Position belegte.

Die Versuchsreihe mit Colchicin-resistenten KBC-1 Zellen bewertete NFATC3 mit der höchsten Stabilität. Auch ZNF48 zeichnete sich, wie schon bei den MCF-7 Zellen, mit einer engen Schwankungsbreite aus. Hier war auch GOLGA1, gleich wie bei HeLa Zellen, gut geeignet.

HPRT1 schnitt entgegen der guten Bewertung bei HeLa Zellen zuvor, sowohl bei KBC-1, als auch MCF-7 Zellen, sehr schlecht ab. Aufgrund der Tumorzellen-Behandlung mit GAPDH siRNA war hingegen zu erwarten, dass GAPDH nicht als Referenzgen geeignet ist. Interessanterweise war der Effekt der anti-GAPDH siRNA auf das Zielgen in KBC-1-Zellen deutlich geringer. Parallel durchgeführte Versuche mit anderen siRNAs ergaben schwächere Effekte als in anderen

Zelllinien, was vermutlich durch eine schlechtere Transfektionseffizienz von KBC-1 zurückzuführen ist.

Die Experimente ergaben insgesamt gesehen bei einigen Referenzgenen stark abweichende Ergebnisse, bei anderen hingegen ähnliche Bewertungen zwischen den verschiedenen Zelllinien. Am stabilsten in allen Versuchen zeigte sich NFATC3. ZNF48 schwankte in den drei Zelllinien jedoch stark. Bei den MCF-7 und KBC-1 Zellen erreicht es durchaus gute Plätze, während es sich für die HeLa Zellen nur als wenig passend erwies.

Die Auswahl eines stabilen Referenzgens sollte folglich mit den unterschiedliche Zelltypen und den verschiedenen Behandlungen abgestimmt werden. Ein Universalgen, welches für jede Versuchsreihe und Behandlung verwendet werden kann, gibt es daher nicht. Wenn sich auch die Stabilität von NFATC3 in den drei verwendeten Zelllinien bestätigt hat, ist es dennoch nötig vor jeder Untersuchung entsprechende Tests durchzuführen, um ein geeignetes Gen für die entsprechende Versuchsreihe zu finden. Die Stabilität hängt demnach sowohl von der entsprechenden Tumorart, als auch von den verwendeten miRNAs/siRNAs ab. Eine Verallgemeinerung ist nur schwer möglich.

Die Wichtigkeit der Verwendung von Referenzgenen zeigte sich in den Experimenten deutlich bestätigt und ist außer Zweifel ein essentieller Faktor für die Vergleichbarkeit von verschiedenen Untersuchungen. Diese Daten und Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien untermauern die Bedeutung der Auswahl geeigneter Referenzgene für jedes Experiment, besonders, wenn geringfügige Expressionsänderungen quantifiziert werden sollen. Neben der Beschränkung auf ein einzelnes Gen kann auch ein Panel von mehreren Genen zur noch genaueren Normalisierung verwendet werden, was allerdings den experimentellen Aufwand erhöht.

Liste der Abkürzungen

Ago2 – Argonautenprotein 2
AMA – methanolisches Methylamin/ NH₄OH; 1:1
APS – Ammoniumpersulfat
Bp – Basenpaare
CDC-37 – Zellteilungszyklus 37
CDK-1 – Zyklin abhängige Kinase 1
cDNA – komplementäre DNA
CXCR4 – CXC-Motiv Chemokinrezeptor 4
DGCR8 – DiGeorge syndrome critical region gene 8
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF – Dimethylformamid
DMSO – Dimethylsulfoxid
DNA – Desoxyribonukleinsäure
dsRNA- Doppelstrang-RNA
EDTA – Ethylendiamintetraacetat
EpCAM – Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
HBV – Hepatitis B Virus
HIV – Humanes Immundefizienz Virus
HF – Fluorwasserstoff (Flusssäure)
HSP 90 – Hitzeschockprotein 90
MCF-7 – Michigan Cancer Foundation – 7
MCL1 – myeloische Zell-Leukämie Sequenz 1
miRNA – mikro RNA
mRNA – Boten-RNA (messenger RNA)
PBS – Phosphat gepufferte Salze
PLCB1 – Phospholipase C 1
RISC - RNA-induzierter Stilllegungskomplex
RNA - Ribonukleinsäure
RNAi – RNA-Interferenz

RT-qPCR – Reverse Transkriptase quantitative Polymerasekettenreaktion

siRNA – small interfering RNA

ssRNA – Einzelstrang-RNA

TBE – Tris/Borat/Edta

TEA – Triethylamin

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylehylendiamin

7. Quellenangaben

- (1) L. MacFarlane and Paul R. Murphy "MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer", Current Genomics, 2010, no. 11, pp 537-561
- (2) J. Gong, J.-P. Zhang, B. Li, C. Zeng, K. You, M.-X. Chen, Y. Yuan and S.-M. Zhuang "MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R", Cell, 2004, Vol. 116, pp 281–297
- (3) E. Varkonyi-Gasic, R. Wu, M. Wood, E. F. Walton, and R. P. Hellens, "Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs", Plant methods, Jan. 2007, vol. 3, p. 12
- (4) NCBI. Primer-BLAST: Primer designing tool [online]. [cit. 2013-04-08] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- (5) I. Zlatev, M. Manoharan, J.-J. Vasseur, and F. Morvan, "Solid-phase chemical synthesis of 5'-triphosphate DNA, RNA, and chemically modified oligonucleotides", Current protocols in nucleic acid chemistry / edited by Serge L. Beaucage ... [et al.], vol. Chapter 1, Sep. 2012, p. Unit 1.28
- (6) R. W. Carthew and E. J. Sontheimer, "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs", Cell, 2010, vol. 136, no. 4, pp. 642–655
- (7) J.C. Burnett, J.J. Rossi "RNA-based therapeutics: current progress and future prospective", Cell, January 2012, Chemistry and Biology 19
- (8) K. DH, J.J. Rossi "Strategies for silencing human disease using RNA interference", Nature, Review, 2007, pp173-184
- (9) D.B. Bartel "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function", Cell, January 2004, Vol. 116, pp281-297

- (10) A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, Feb. 1998, pp. 806-811
- (11) G.J. Hannon "RNA Interference", *Nature*, 2002, Vol.418, pp 244-251
- (12) S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A.Yalcin, K. Weber, T. Tschl „Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells", *Nature*, 2001, Vol. 411, pp 494-498
- (13) S. P. Nana-Sinkam, C. M. Croce, "MicroRNAs as therapeutic targets in cancer", *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, Apr. 2011, vol. 157, no. 4, pp. 216–25
- (14) F. Tang, P. Hajkova, S.C. Barton, K. Lao, M. A. Surani "MicroRNA expression Profiling of single whole embryonic stem cells", *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34 No. 2
- (15) A. F. Ibrahim, U. Weirauch, M. Thomas, et al „MicroRNA Replacement Therapy for miR-145 and miR-33a Is Efficacious in a Model of Colon Carcinoma", *Cancer Research*, 2011, Vol. 71, pp5214-5224
- (16) MiRBase: miRBase: the microRNA database [online]. [cit. 2013-04-08]. <http://www.mirbase.org>
- (17) NetPrimer. PREMIER BIOSOFT. [online]. [cit. 2013-04-08]. <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>
- (18) C. Chen, D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak, and K. J. Guegler, "Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR", *Nucleic acids research*, Jan. 2005, Vol. 33, vol. 20, p. e179

- (19) K. Banno, M. Iida, M. Yanokura, I. Kisu, T. Iwata, E. Tominage, K. Tanaka, D. Aoki, "MicroRNA in Cervical Cancer: OncomiRs and Tumor Suppressor miRs in Diagnosis and Treatment.", *Scientific World Journal*, Jan. 2014, 178075
- (20) H.R. Mollaie, S.H. Monayari, S.A. Arabzadeh, M. Shamsi-Shahrabadi, M. Fazlalipour, R.M. Afshar, "RNAi and miRNA in Viral Infections and Cancers.", *Asian Pac J Cancer Preview*, 2013, Vol.14, no.12, p.7045-7056
- (21) Z. Wotschovsky, H.A. Meyer, M. Jung, A. Fendler, I. Wagner, C. Stephan, J. Busch, A. Erbersdobler, A.C. Disch, H.J. Mollenkopf, K. Jung, „Reference Genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases.", *Elsevier, Analytical Biochemistry*, Apr. 2011, Vol. 417, p.233-241
- (22) M. W. Pfaffl, G. W. Horgan, L. Dempfle, "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.", *Nucleic acids research*, Mai 2002, Vol. 30, no. 9, p. e36.
- (23) Cotton EST Database: Referenzgen-Auswertungs Software
<http://www.leonxie.com/referencegene.php>
- (24) F. Zhou, W. Wang, Y. Xing, T. Wang, X. Xu, J. Wang, „NF- κ B target microRNAs and their target genes in TNF α -stimulated HeLa Cells", *Biochem Biophys Acta*, Jan. 2014, Vol.14, p. 1874-9399
- (25) K.H. Kim, B.H. Bin, J. Kim, S.E. Dong, P.J. Park, H. Choi, B.J. Kim, S.J. Yu, H. Kang, H.H. Kang, E.G. Cho, T.R. Lee, „ Novel inhibitory function of miR-125b in melanogenesis", *Pigment Cell Melanoma Res.*, Jan. 2014, Vol. 27, p. 10.1111-12179
- (26) H.Y. Jia, Y.X. Wang, W.T. Yan, H.Y. Li, Y.Z. Tian, S.M. Wang, H.L. Zhao, „MicroRNA-125b Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma Cells", *International Journal of Molecular Science*, 2012, Vol. 13, p. 8762-8774

- (27) H. Yu, G. Gao, L. Jiang, L. Guo, M. Lin, X. Jiao, W. Jia, J. Huang, „Decreased Expression of miR-218 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer“, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2013, Vol. 12, p.2904-2911

- (28) M. Alajez, M. Lenarduzzi, E. Ito, A.B.Y. Hui, W. Shi, J. Bruce, S. Yue, S. H. Huang, W. Xu, J. Waldron, B. O’Sullivan, F.-F. Liu, „miR-218 Supresses Nasopharyngeal Cancer Progression through Downregulation of Survivin and the SLIT2-ROBO1 Pathway“, *Cancer Research*, März 2011, Vol.71, p. 2381-2193

- (29) Y. Xiong, J.-H. Fang, J.P. Yun, J. Yang, Y. Zhang, W.-H.Jia, S.M. Zhuang, „ Effects of MicroRNA-29 on Apoptosis, Tumorigenicity and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma“, *Hepatology*, 2010, Vol. 51, p. 836-845

- (30) W. Zhang, J.X. Quian, H.L. Yic, D. Yang, C.F. Wang, J.Y. Chen, X.Z. Wei, Q. Fu, H. Ma, „The microRNA-29 Plays a Central Role in Osteosarcoma Pathogenesis and Progression“, *Molecular Biology*, 2012, Vol. 46, p. 557-562

- (31) H. Persson, A. Kvist, N. Rego, J. Staaf, J. Vallon-Christersson, L. Luts, N. Loman, G. Jonsson, H. Naya, M. Hoglund, A. Borg, C. Rovira, “Identification of New MicroRNAs in Paired Normal and Tumor Breast Tissue Suggests a Dual Role for the ERBB2/HER2 Gen“, *Cancer Research*, 2011, Vol. 71, p. 78-86

- (32) Okamoto, Kinya, Murawaki, Yoshikazu, „The Therapeutic Potential of RNA Interference: Novel Approaches for Cancer Treatment“, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, September 2011, Vol. 13, p. 2235-2247

- (33) R.I. Aqeilan, G.A. Calin, C.M. Croce, “miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function, and future perspectives“, *Cell Death and Differentiation*, 2010, Vol. 17, p. 215-220

8. Anhang

Primerdesign

miRNA	miR-125b	miR-218
Leitstrang-Sequenz	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA 21bp	TTGTGCTTGATCTAACCATGT 21bp
RT-Primer Sequenz	CACGGAGTGC <u>GAGAGC</u> GAAGATGAACAC TCCGTGTCACAA, 40bp	GACGGAGTGCAGGGACGAAGATGAACACTCC GTCACATGG, 40bp
Primer Sequenz	TGCGATTCCCTGAGACCCTAAC 22bp	ATCGGCGTTGTGCTTGATCTAA 21bp
Analyse (Netprimer)	Dimere ΔG -, Cross Dimere ΔG -3,6, Tm 63,02°C	Dimere ΔG -3,84, Cross Dimere ΔG -4,74, Tm 62,37°C
Angriffspunkt		AC074289.6 Homo sapiens BAC clone RP11-207O24 from 2, complete sequence

miRNA	miR-29b-1	miR-29b-2
Leitstrang Sequenz	GCTGGTTTCATATGGTGTTTAGA 72 bp	CTGGTTTCACATGGTGCTTAG 72bp
RT-Primer Sequenz	GACGGAGTGCAGGGACGAAGATGAACAC TCCGTCTCTAAAC 41 bp	GACGGAGTGCAGGGACGAAGATGAACACTCC GTCCTAAGC 40 bp
Primer Sequenz	TCGGCTGGTTTCATATGGTGG 21 bp	AACCTATGCTGGTTTCACATGGTG 23bp
Analyse (Netprimer)	Dimere ΔG -4,65, Cross Dimere ΔG -4,35, Tm 63,00°C	Dimere ΔG -4,64, Cross Dimere ΔG -4,08, Tm 63,00°C
Angriffspunkt	> AC122132.5 Homo sapiens BAC clone RP13-744A23 from 7, complete sequence	AC124078.5 Homo sapiens chromosome 11, clone RP1-59M18, complete sequence

Lebenslauf

victoriabauer@gmx.at

Ausbildung

09/2000 – 06/2008 BG/BRG Piaristengasse 2, Krems an der Donau, Österreich

10/2008 – 04/2014 Universität Wien, Fakultät für Pharmazie, Österreich

Berufliche Erfahrung

08/2009: Ferialpraktikum, Mag- Robert Baldrian, Mohren Apotheke, Krems/Donau

09/2010: Ferialpraktikum, Mag- Robert Baldrian, Mohren Apotheke, Krems/Donau

08/2011: Ferialpraktikum, Mag- Robert Baldrian, Mohren Apotheke, Krems/Donau

10/2012 – 10/2013: Mag. Christina Kletter, Auge Gottes Apotheke, Wien, 10Std./Woche

Sonstiges: Nachhilfeunterricht für Kinder und Jugendliche: Deutsch, Englisch

Sprachen

Deutsch: Muttersprache

Englisch: Sehr gut

Französisch: Gut

Spanisch: Gut

Tschechisch: Grundkenntnisse