

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum Hamburg
Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie
Molekulare Kardiologie - Genomik und Systembiologie

Prof. Dr. rer. nat. Tanja Zeller

Die Rolle der MicroRNA miR-1279 als multi-lokus Regulator in Monozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Arius Jami
aus Nürnberg

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.04.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. Tanja Zeller

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Evaldas Girdauskas

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Koronare Herzkrankheit.....	6
1.2 Atherosklerose.....	7
1.3 Lysozym.....	9
1.3.1 Lysozym als Marker der Atherosklerose.....	10
1.4 MicroRNAs.....	11
1.4.1 MicroRNAs in kardiovaskulären Erkrankungen.....	13
1.4.2 Einfluss genetischer Varianten auf die MicroRNA Funktion.....	15
1.5 Auswirkungen von MicroRNA SNPs auf die monozytäre Genexpression: Lysozym (LYZ) und weitere Kandidatengene.....	17
 Arbeitshypothese und Zielsetzung.....	 21
 2. Material und Methoden	 22
Material.....	22
2.1 Geräte.....	22
2.2 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.3 Consumables & Kits.....	24
2.4 Vektoren, MicroRNA, Antikörper.....	25
2.5 Software / Datenbanken.....	26
 Methoden.....	 27
2.6 Zellkultur.....	27
2.7 Gentechnische Methoden.....	27
2.7.1 MicroRNA Überexpression.....	27
2.7.2 RNA Isolation.....	28
2.7.3 RNA Quantifizierung.....	29
2.7.4 RNA Integritätskontrolle.....	29
2.7.5 Reverse Transkription.....	30
2.7.6 Real Time PCR (qPCR).....	32
2.7.7 Reporter-gen-Assays.....	34

2.7.7.1 Klonierung	35
2.7.7.2 Restriktionsverdau.....	35
2.7.7.3 Agarose Gelelektrophorese.....	37
2.7.7.4 Ligation.....	37
2.7.7.5 Hitzeschock-Transformation & Bakterienkultur.....	38
2.7.7.6 Plasmid Präparation.....	39
2.7.7.7 Kotransfektion.....	39
2.7.7.8 Luciferase-Assay.....	40
2.7.8 Transkriptomanalyse.....	41
2.7.8.1 Microarray-Technologie.....	41
2.7.8.2 Hochdichte Oligonukleotid-Arrays (Affymetrix GeneChip®).....	42
2.7.8.3 Experimentelles Design der Microarray-Analyse.....	42
2.7.8.4 Target Präparation.....	42
2.7.8.5 Target Hybridisierung.....	47
2.7.8.6 Waschen und Färben der Arrays.....	49
2.7.8.7 Scannen des Genechips.....	49
2.7.8.9 Datenanalyse.....	50
2.8 Proteinbiochemische Methoden.....	50
2.8.1 Proteinextraktion.....	50
2.8.2 Proteinquantifikation.....	51
2.8.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	51
2.8.4 Proteintransfer (Semi-Dry Western Blot).....	53
2.8.5 Proteindetektion.....	53
2.8.6 2D-Gel Analyse & MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	54
3. Ergebnisse.....	56
3.1 Untersuchung der Regulation von <i>LYZ</i> durch miRNA-1279 mittels Reporter-gen-Assay.....	56
3.2 Untersuchung der Rolle von miRNA-1279 auf mRNA-Ebene als Regulator eines Genregulons.....	58
3.2.1 Überexpression von miRNA-1279 und Durchführung einer Genexpressionsanalyse	58
3.2.2 Überexpression von miRNA-1279 und Durchführung einer Microarray-	

Analyse.....	60
3.3 Untersuchung der Rolle von miRNA-1279 auf Proteinebene.....	62
3.3.1 Proteinexpression von <i>LYZ</i> nach miRNA-1279 Überexpression.....	62
3.3.2 Überexpression von miRNA-1279 und Durchführung einer Proteomanalyse.	64
4. Diskussion.....	65
4.1 Regulation von <i>LYZ</i> durch miRNA-1279.....	66
4.2 Regulation des putativen Regulons durch miRNA-1279.....	67
4.3 Limitationen.....	69
4.4 Ausblick.....	70
5. Zusammenfassung.....	73
5.1 Summary.....	74
6. Literaturverzeichnis.....	75
7. Danksagung.....	79
8. Eidesstattliche Erklärung.....	80

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit (KHK)

Als koronare Herzkrankheit (KHK) oder auch ischämische Herzkrankheit wird gemeinhin ein Krankheitszustand definiert, indem eine insuffiziente Versorgung eines Teilbereichs des Myokards mit Blut und darin enthaltendem Sauerstoff vorliegt, also eine Imbalance zwischen der myokardialen Sauerstoffnachfrage und dem vorliegenden Angebot. Die häufigste Ursache dieser Krankheit ist die im nachfolgenden Abschnitt beschriebene atherosklerotische Veränderung der Koronararterien und die daraus resultierende regionale Perfusionsstörung des Herzmuskelgewebes.

Unter normalen Umständen ist das Myokard in der Lage einer Mangelperfusion der Myozyten vorzubeugen, und auf entscheidende Faktoren der Sauerstoffnachfrage wie Herzfrequenz, myokardiale Kontraktilität und Wandspannung adäquat zu reagieren. Hierzu benötigt es sowohl eine ausreichende Sauerstofftransportkapazität des Blutes (determiniert durch die eingeatmete Menge an Sauerstoff, Lungenfunktion, Hämoglobinmenge und -Funktion) als auch einen suffizienten koronaren Blutfluss. Wird infolge von atherosklerotischer Plaques der Gefäßdurchmesser der epikardialen Arterien um ca. 50% reduziert, resultiert dies in einer reduzierten Fähigkeit den koronaren Blutfluss an eine erhöhte myokardiale Nachfrage wie zum Beispiel während körperlicher Betätigung anzupassen. Bei einer Stenose die zu einer Reduktion des Durchmessers der Koronararterie von ca. 80 % führt, kann der Blutfluss bereits im körperlichen Ruhezustand reduziert sein [1]. Im Falle einer Plaqueruptur und der darauffolgenden Aktivierung von Thrombozyten und der Gerinnungskaskade kann es gar im Rahmen einer Thrombusformation zur vollständigen Okklusion der betroffenen Arterie kommen und somit in Abhängigkeit von der Lokalisation des Gefäßverengung zu einer klinischen Manifestation der myokardialen Ischämie. Da die Menge an unterversorgtem und somit ischämischem Myokard und der klinische Schweregrad der Auswirkung des Verschlusses stark von der Lokalisation der Obstruktion abhängen, ist insbesondere die Hauptstammstenose als auch die Blockierung des proximalen Abschnitts der LAD (Left Anterior Descending coronary artery) von besonders gefährlicher Relevanz [1].

Die atherosklerotisch bedingte Perfusionsstörung führt zum Abfall des Sauerstoffpartialdrucks im myokardialen Gewebe und somit zu einschneidenden Störungen der mechanischen, biochemischen und elektrischen Funktionen des Herzmuskelgewebes. Es resultieren regionale Kontraktilitätsstörungen der vorwiegend linken Herzkammerwand, die sich als Hypokinesie, Akinesie oder in schweren Fällen gar als klinische Dyskinesie äußern und zu einer reduzierten kardialen Pumpfunktion führen. Im Falle einer Mangel durchblutung größerer ventrikulärer Bereiche (klinisch manifestierbar durch Angina pectoris – Symptomatik) kann es zu einem transienten Linksherzversagen kommen und bei Mitbeteiligung der Papillarmuskulatur gar zu einer Mitralklappeninsuffizienz. Bei anhaltender, schwerwiegender Ischämie kommt es zur irreversiblen myokardialen Nekrose und Vernarbung im Rahmen des klinischen Bildes eines akuten Myokardinfarkts [1].

Ein weiterer klinisch essentieller Aspekt der KHK-bedingten myokardialen Minderperfusion ist die daraus resultierende elektrische Instabilität des Herzmuskels. Es kann zu Arrhythmien in Form von Extrasystolen, ventrikulärer Tachykardie oder gar Kammerflimmern kommen. Die meisten Patienten, die an einem plötzlichen Herztod infolge einer koronaren Herzerkrankung versterben, tun dies in Folge einer ischämiebedingten ventrikulären Tachyarrhythmie [1].

1.2 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität. Im Jahr 2014 verstarben in Deutschland 338.056 Menschen an einer Herz-/Kreislaufkrankung, dies entspricht 38,9 % aller Sterbefälle [2]. Vor allem bei älteren Menschen führten diese Erkrankungen zum Tod, 92 % der an einer Krankheit des Herz-Kreislaufsystems Verstorbenen waren 65 Jahre alt und älter [2]. Unter den kardiovaskulären Krankheiten wiederum dominieren die direkten atherosklerotisch bedingten Folgeerkrankungen wie die chronische ischämische Herzkrankheit (ICD: I25) mit 69.890 Todesfällen (20,7 %), gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (ICD: I21) mit 48.181 registrierten Todesfällen (14,3 %) [2]. Trotz der evidenten epidemiologischen Bedeutung sind die Pathomechanismen der Atherosklerose noch nicht im Detail verstanden.

Theorien besagen, dass die Atherosklerose als entzündliche Reaktion auf eine endotheliale Verletzung definiert werden kann. Diese „response-to-injury“ Hypothese wurde als Erstes von Russell Ross et al. in den 70-er Jahren propagiert und wurde seitdem kontinuierlich weiterentwickelt [3]. Gewisse Risikofaktoren wie z.B. Rauchen, Bluthochdruck, Übergewicht, Diabetes, ein erhöhter Plasmacholesterinspiegel (LDL) oder eine positive Familienanamnese können über eine Reihe von Signalwegen zu einer endothelialen Dysfunktion führen.

Infolgedessen ist die Transmigration von Lipiden und Leukozyten in die Intima erleichtert. Nach ihrer Migration in die arterielle Wandschicht beginnen sich Monozyten in Makrophagen zu differenzieren, diese wiederum entwickeln sich nach der Aufnahme von Lipiden zu sogenannten „Schaumzellen“ [4]. Die Akkumulation dieser Schaumzellen führt zur Ausbildung leicht erhobener Läsionen, den sogenannten „fatty streaks“ (Abbildung 1), die gemeinhin als Indikator für den Beginn der Atherosklerose gelten. „Fatty streaks“ können sich zu komplexeren atherosklerotischen Läsionen entwickeln, diese werden als atherosklerotische Plaques bezeichnet [5].

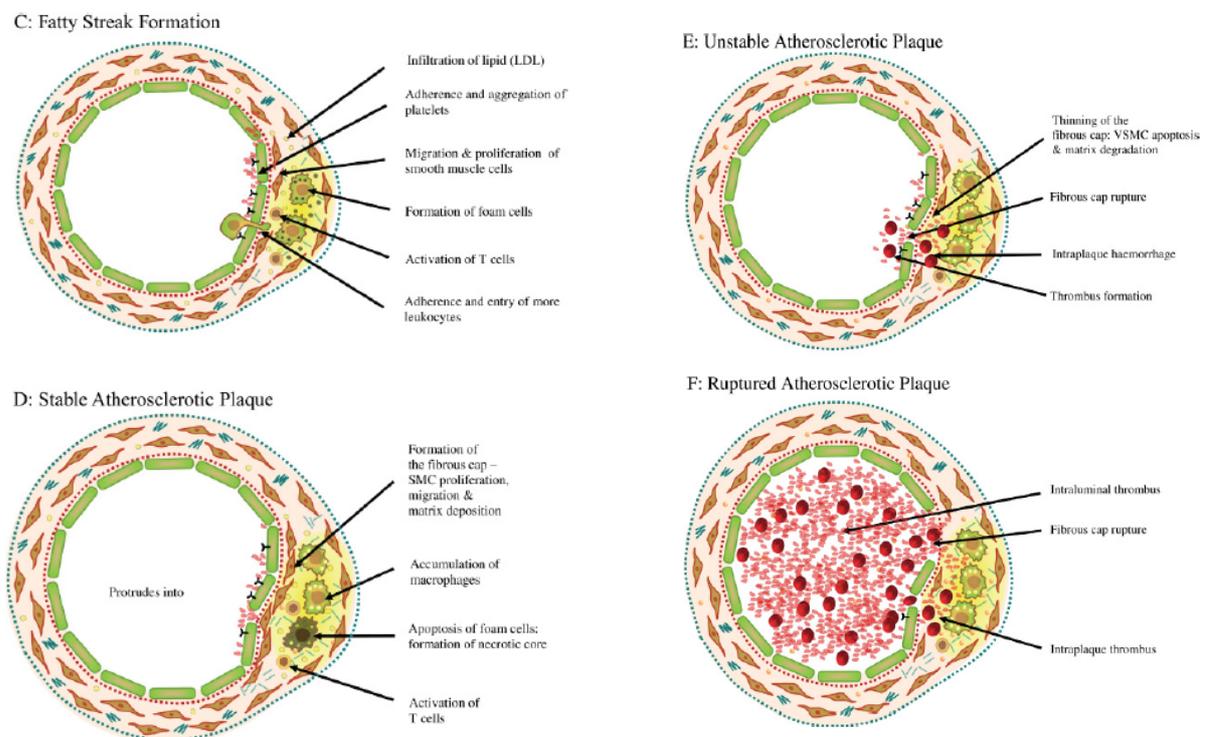


Abbildung 1: Fatty Streak & stabile, instabile und rupturierte atherosklerotische Plaque.
 Aus: Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms.
 Edited by Sarah George & Jason Johnson
 Copyright © 2010 WILEY VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Atherosklerotische Plaques können als „stabil“ und „instabil“ klassifiziert werden, abhängig von Zusammensetzung und Größe der Plaque [6]. Stabile Plaques haben im Vergleich zu instabilen Plaques einen kleineren nekrotischen Kern, beinhalten weniger inflammatorische Zellen und zeichnen sich durch eine ausgeprägtere fibröse Deckschicht aus. Die Instabilität von Plaques wird im Wesentlichen durch das Ausdünnen der fibrösen Deckschicht und einer potenziellen Blutung in der Plaque bedingt, dieser Vorgang resultiert wiederum aus der Apoptose der glatten Gefäßmuskelzellen und der Degeneration extrazellulärer Matrix [5]. Die letztgenannten Prozesse führen nicht nur zu einer Destabilisierung der Plaque, sondern erhöhen ebenfalls die Wahrscheinlichkeit einer Plaqueruptur [7]. Die Ruptur der Plaque hat die Formation eines Thrombus zur Folge, welcher zum vollständigen Verschluss des arteriellen Lumens führen und somit beispielsweise die klinischen Symptome eines Myokardinfarkts nach sich ziehen kann.

1.3 Lysozym

Lysozym ist ein Enzym, welches sich aus 148 Aminosäuren zusammensetzt (16,5 kDa) und über eine hydrolytische Funktion glykosidische Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure- (NAM) und N-Acetylglucosaminresten (NAG) von Peptidoglykanen, einem Hauptbestandteil bakterieller Zellwände, spaltet [8].

Lysozym kommt als Teil des angeborenen Immunsystems in diversen Organismen vor und besitzt eine antibakterielle Wirkung die von Alexander Fleming bereits 1922 in humanem Nasenschleim observiert wurde [9].

Humanes Lysozym wird durch das *LYZ*-Gen kodiert, welches sich auf Chromosom 12 befindet. Lysozym wird in diversen humanen Körperflüssigkeiten, die mit der Umwelt in Kontakt treten oder an der Beseitigung von Bakterien beteiligt sind, exprimiert. Darunter fallen Tränenflüssigkeit, Speichel, Bronchialsekret, Brustmilch, Urin, Blutserum, Liquor, Fruchtwasser und Zervixschleim [10]. Es wird von Geweben des respirativen Trakts, von der Darmschleimhaut, den Nieren als auch von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen produziert. Die direkte bakteriolytische Rolle von Lysozym wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen. Deckers et al. [11] wiesen beispielsweise nach, dass das Wachstum von pathogenen *E. coli*-Keimen in humanem Speichel durch Lysozym signifikant unterdrückt wird. Bei *E. coli* Mutanten denen der natürliche Lysozym-Inhibitor „Ivy“ fehlte, kam es zu einer vollständigen

Eradikation der E. coli-Bakterien, nach Entfernung von Lysozym im Speichel konnte wiederum ein starkes Wachstum der E. coli Mutanten äquivalent zum Wachstum des E. coli Wildtyps festgestellt werden. In einer weiteren Studie von Cole et al. wurde die antibakterielle Rolle von Lysozym im respirativen Trakt näher untersucht. Dabei resultierte die Entfernung von Lysozym und weiteren Polypeptiden wie Lactoferrin aus dem nasalen Sekret in den Verlust der antibakteriellen Wirkung gegen Erreger wie Escherichia coli, Listeria monocytogenes und Pseudomonas aeruginosa [12].

Die Regulation der humanen Genexpression von Lysozym ist noch nicht vollständig verstanden, es gibt jedoch ausführliche Analysen zur Struktur und Regulation des Hühner-Lysozyms. In den Eileiterzellen des Huhns wird die Lysozymexpression durch Steroidhormone reguliert [13]. Dagegen unterliegt die Genexpression von Lysozym in Makrophagen des Huhns einem komplexen Set aus regulierenden cis-Elementen der DNA, welches aus gewebespezifischen Promotern, Enhancern und Silencern besteht [14]. Dabei fungiert der Hühner-Lysozym Genlocus als eine unabhängige Regulationseinheit, da beispielsweise nach Gentransfer des Hühner-Lysozyms inklusiver cis-Elemente in einen Mausorganismus dieselbe makrophagenspezifische Genexpression im Fremdorganismus erhalten geblieben ist [15].

1.3.1 Lysozym als Marker der Atherosklerose

Aufgrund seiner antibakteriellen Funktion und der als Bestandteil des angeborenen Immunsystems verbundenen Beteiligung in inflammatorischen Prozessen ist es naheliegend eine Involvierung des Lysozymproteins in den chronisch entzündlichen Prozess der Atherosklerose und der daraus resultierenden koronaren Herzerkrankung zu postulieren. Die Arbeitsgruppe um Abdul-Salam et al. hat im arteriellen Plasma von Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung (KHK) das Lysozymprotein als einen potentiellen zugänglichen Biomarker der Atherosklerose identifiziert [16]. In ihrer Studie nutzten sie die SELDI-TOF Massenspektrometrie um im Patientenblut Proteinbiomarker für atheromatöse Veränderungen zu detektieren. Die Analyse dieser Daten zeige, dass Lysozym in der Lage sei präzise zwischen Patienten einer Kohorte (nach Geschlecht und Alter randomisiert), welche zum einen Patienten mit 3-Gefäß-KHK und zum anderen ohne jegliche koronare Gefäßerkrankung umfasst, zu diskriminieren, mit dem Resultat

einer dreifach höheren Intensität des Lysozysignals in der 3-Gefäß-KHK Gruppe ($P_{0.001}$). Der erhöhte Plasmaplysozymspiegel bei Patienten mit 3-Gefäß-KHK derselben Kohorte konnte zudem anhand eines Enzymimmunoassays repliziert werden. Ein vergleichbarer Unterschied der Lysozymexpression konnte in einer weiteren, nicht nach Geschlecht und Alter randomisierten Kohorte (3-Gefäß-KHK vs. gesunde Kontrolle) dargestellt werden. In einer größeren Kohorte wurden Patienten mit mehr Abstufungen im Ausprägungsgrad der KHK, von gesunder Kontrolle ($n=42$), über 1-Gefäß-KHK ($n=38$), 2-Gefäß-KHK ($n=36$) und 3-Gefäß-KHK ($n=46$) untersucht. Hierbei konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg des arteriellen Plasmaplysozymspiegels mit zunehmender Anzahl atherosklerotisch veränderter Koronargefäße, also bei zunehmendem Schweregrad der KHK beobachtet werden (Abb. 2). Die Zusammenschau der Resultate von Abdul Salam et al. suggeriert, dass Lysozym mit Sensitivitäts- und Spezifitätswerten von über 80% als nichtinvasiver Marker der atherosklerotisch bedingten koronaren Herzerkrankung in der klinischen Praxis von Bedeutsamkeit sein kann [16].

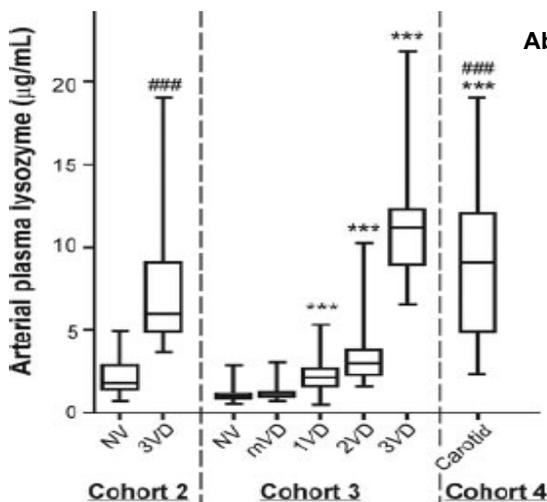


Abbildung 2: Lysozym Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHK. Der Schweregrad der koronaren Herzerkrankung wurde mittels Koronarangiographie ermittelt. 3-Gefäß- Erkrankte (3VD= 3 Vessel Disease) zeigten im Vergleich zu gesunden Probanden (NV= No Vessel Disease, mVD= mild Vessel Disease) signifikant höhere Plasma-Lysozymspiegel. Lysozym ermöglicht eine Diskriminierung analog zum Ausprägungsgrad der atherosklerotischen Erkrankung. Aus: Abdul-Salam, V. et al. Identification and Assessment of Plasma Lysozyme as a Putative Biomarker of Atherosclerosis *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1027-33 (2010)

1.4 MicroRNAs

MicroRNAs (abgekürzt: miRNAs) sind endogene, nicht-kodierende, kleine RNA Moleküle, welche regulatorischen Einfluss auf die Genexpression ausüben (post-transkriptionelle Regulation) [17]. MicroRNAs sind in die Regulation nahezu aller zellulärer Prozesse involviert [18], wie Zelldifferenzierung, Wachstum, und Entwicklung. Es wird angenommen, dass mehr als die Hälfte aller humanen mRNAs

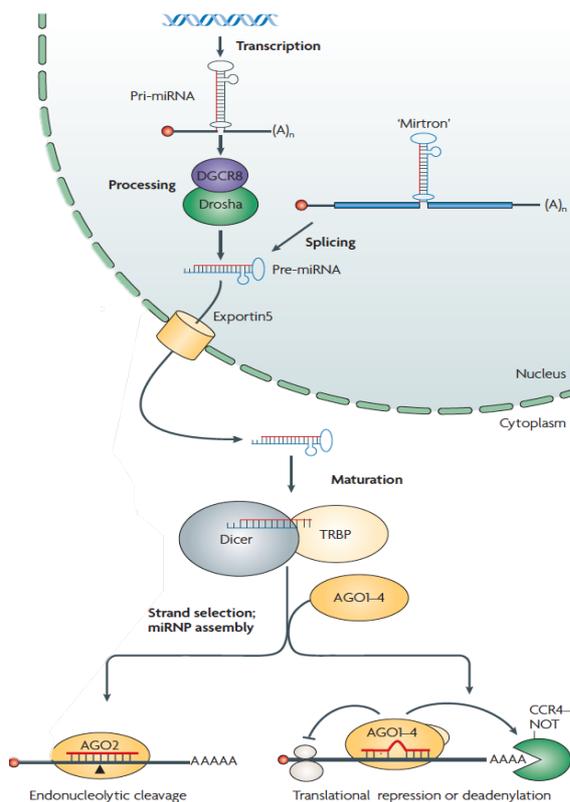
einer Beeinflussung durch MicroRNAs unterliegen [19]. Laut der letzten Veröffentlichung (release 21, Juni 2014) der miRNA Referenzdatenbank miRBase gibt es mehr als 1800 humane MicroRNAs [20]. Sie besitzen eine Größe von etwa 19-22 Nukleotiden, und üben ihre regulatorischen Funktionen durch Bindung an komplementäre Sequenzen der Ziel-mRNA Moleküle in der 3' untranslatierten Region (UTR) aus. Diese Bindung an eine protein-kodierende mRNA führt anschließend zu einer Inhibierung der Translation oder Degradierung des Zieltranskripts [21].

Die Biogenese von MicroRNAs beginnt mit der Transkription von miRNA Genen in primäre miRNAs (abgekürzt: pri-miRNAs), der ersten Vorstufe der reifen MicroRNA [22]. Pri-miRNAs variieren in Ihrer Größe von einigen hundert Nukleotiden (nt) bis hin zu mehreren Kilobasen [23]. Im Zellkern wird die pri-miRNA von der RNase „Drosha“ und Partnern eines sogenannten Mikroprozessor-Komplex in die Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) gespalten [24]. Hierbei reduziert sich ihre Länge auf ca. 70 nt. Das Enzym Exportin5 transportiert unter Hydrolyse von GTP die Pre-miRNAs zur weiteren Prozessierung aus dem Nucleus in das Zytoplasma [25]. Dort werden die pre-miRNAs durch das RNase III Enzym “Dicer” in eine 19-25 nt lange, doppelsträngige RNA gespalten [26].

Aus dieser Duplex-RNA entwickelt sich in der Regel ein Strang zur reifen microRNA, der komplementäre Strang wird degradiert [27]. Die reife miRNA wird daraufhin in den miRNA-induced silencing complex (miRISC) inkorporiert [28]. Über diesen Komplex übt die miRNA ihre regulatorische Funktion auf die Ziel-mRNAs aus. Die reife miRNA leitet den miRISC zur komplementären mRNA, bindet diese durch Watson-Crick Basenpaarung und führt abhängig vom Ausprägungsgrad der Komplementarität zur Degradation der mRNA oder zur Inhibierung der Translation [29]. In Eukaryoten kommt es aufgrund nicht hochgradiger Komplementarität eher zur inhibierten Translation und dadurch reduzierten Proteinexpression.

Es ist bekannt, dass miRNAs Einfluss auf die Entstehung und/oder Progression von kardiovaskulären Krankheiten haben, wobei das Expressionsmuster der miRNAs und damit deren regulatorischer Einfluss im Krankheitsfall verändert ist [30]. Hierbei scheinen genetische Varianten im Genom, sogenannte SNPs (single nucleotide polymorphisms) die Expression von miRNAs zu beeinflussen.

Abbildung 3: MicroRNA Biogenese.



Die von der RNA-Polymerase II transkribierte pri-miRNA wird nach Spaltung durch den Mikroprozessor Drosha/DGCR8 zur pre-miRNA, welche GTP-abhängig von Exportin5 ins Zytoplasma transportiert wird. Dort entsteht nach weiterer Prozessierung durch Dicer zunächst eine kürzere, doppelsträngige RNA, aus der ein einzelner, reifer Strang in den miRISC geladen wird. In Abhängigkeit der Komplementarität zur Ziel-mRNA erfolgt die regulierende Wirkung der miRNA über Degradierung des Zieltranskripts oder Inhibierung der Translation. Aus: Filipowicz, W. et al. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature rev genetics* 9, 102-114 (2008)

1.4.1 MicroRNAs in kardiovaskulären Erkrankungen

MicroRNAs spielen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems [31] sowie bei der Entstehung und Progression von kardiovaskulären Krankheitszuständen, wie beispielsweise der Herzinsuffizienz und der atherosklerotisch bedingten koronaren Herzkrankheit [32]. Ihnen wird dabei insbesondere eine Funktion des „Fine-Tunings“ [33] der Genexpression zugesagt, die besonders bei Stressexposition zum Tragen kommt und somit ihren Einfluss im Krankheitszustand unterstreicht. Im Zusammenhang mit der atherosklerotisch bedingten koronaren Herzkrankheit werden in der Literatur diverse MicroRNAs genannt:

Mir-21 führt zur Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) und daraus resultierend zu einer neointimalen Hyperplasie. Insbesondere bei Verletzung der endothelialen Gefäßwand (z.B. in Folge einer Angioplastie) konnten hochregulierte Mir-21 Spiegel nachgewiesen werden, die arterielle Restenose infolge der

neointimalen Hyperplasie blieb jedoch nach Mir-21 Depletion mittels Antisense-Oligonukleotiden aus [34].

Im Kontext der KHK spielt auch der Prozess der Angiogenese eine entscheidende Rolle, vor allem die Neoangiogenese als kardialer Reparaturmechanismus infolge einer KHK-bedingten Myokardischämie. Die ischämisch induzierte Angiogenese kann mittels gegen miR-92a gerichteten Antisense-Oligonukleotiden gefördert [35] oder beispielsweise durch „Knockout“ der miR-126 inhibiert werden [36]. Andere Studien weisen daraufhin, dass miR-221 und miR-222 über eine Repression von „cKit“ einen regulatorischen Einfluss in der Angiogenese ausüben [37]. Überexpression der miR-210 in endothelialen Zellen führte zu einer erhöhten kapillaren Ausbildung, bei Knockout von miR-210 blieb die hypoxisch induzierte Neoangiogenese aus [38].

Die Modifikation der endothelialen Zellfunktion ist ein weiterer Mechanismus über den MicroRNAs proatherogen wirken können. MiR-126 reguliert beispielsweise neben der Angiogenese auch die endotheliale Expression des „Vascular adhesion molecule 1“ (VCAM-1) und somit die Adhärenz von Leukozyten an der endothelialen Zellwand und die daraus resultierende vaskuläre Inflammation [39].

MiR-92a koreguliert die atheroprotektiven Transkriptionsfaktoren Krüppel-like factor 4 (KLF4) und KLF2, nach „Knockdown“ von miR-92a konnte eine reduzierte Expression proinflammatorischer Marker nachgewiesen werden [40].

Durch die Nutzung eines miR-663 spezifischen Inhibitors (miR-663-LNA) konnten Chih-Wen Ni et al. zeigen, dass bei Inhibition von miR-663 die endotheliale Monozytenadhäsion und damit die endotheliale Inflammation reduziert werden kann [41]. Ein weiterer Signalweg über den MicroRNAs in die Entwicklung der Atherosklerose involviert sind, ist die posttranskriptionelle Regulation des Lipidmetabolismus [42]. Die MicroRNA miR-33a wurde als Regulator von ABCA1 identifiziert und reguliert somit über eine Blockade der Cholesterinabgabe von Hepatozyten an Apolipoprotein A-I die Synthese von bis zu 85% des HDL-Cholesterins [43]. Wie bereits 1951 von Barr et al. als „HDL-C Hypothese“ konstatiert [44] und durch diverse Studien wie auch Befunden der Framingham Study mittlerweile untermauert [45], gilt ein erniedrigter High Density Lipoprotein (HDL) – Plasmaspiegel als kausaler Faktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit. Rayner et al. konnten nachweisen, dass mittels Inhibition von miR-33a die hepatozelluläre Expression von ABCA1, die Cholesterinabgabe an Apo-A-I und somit der Plasmaspiegel an HDL gesteigert wird

[46]. Durch den gesteigerten HDL-vermittelten reversen Cholesterintransport (RCT) von peripheren Zellen, insbesondere von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques zur Leber hin [47], ist dem Antagonismus der miR-33a eine atheroprotektive Funktion zuzuweisen [48].

Die miRNA-155 wurde ebenfalls durch ihre Rolle im vaskulären Lipidmetabolismus als proatherogen klassifiziert. Wie Du et al. herausfanden, erhöht der Knockout der miR-155 in ApoE^{-/-} Mäusen signifikant die Fähigkeit der Makrophagen, Cholesterin über Autophagie abzugeben und verhindert so eine Progression bzw. Destabilisierung der atherosklerotischen Plaque [49].

Im Folgenden findet sich exemplarisch eine Darstellung einiger im kardiovaskulären System involvierter MicroRNAs:

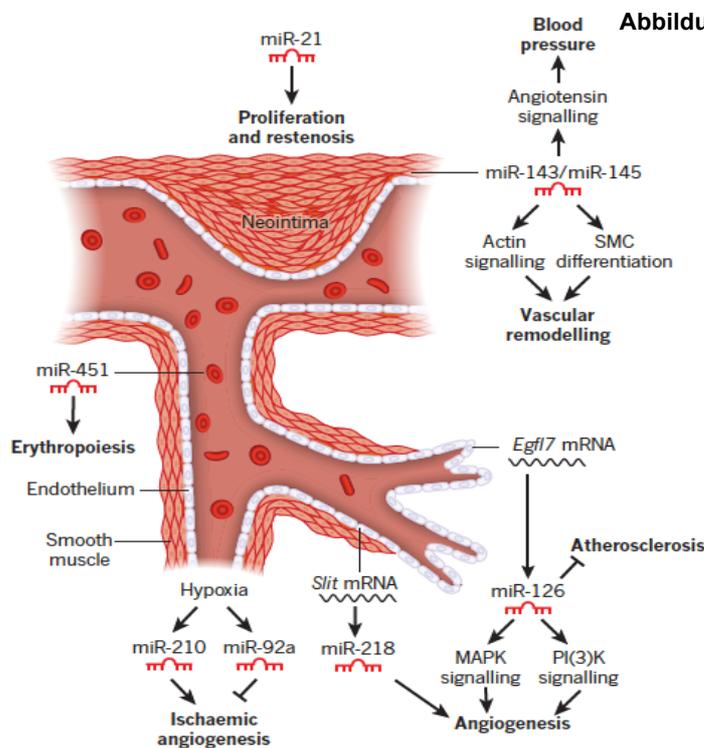


Abbildung 4: Funktionelle Rolle von miRNAs im kardiovaskulären System. Blutgefäßschema, welches die endotheliale und glattmuskuläre Schicht, sowie Erythrozyten und proliferierende glatte Muskelzellen (VSMCs) einer neointimalen Läsion darstellt. Die Expression ausgewählter miRNAs wird zusammen mit ihren beobachteten Funktionen demonstriert. Aus: Small, E. & Olson, E. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* **469**, 336-342 (2011)

1.4.2 Einfluss genetischer Varianten auf die MicroRNA Funktion

Der umfangreiche regulatorische Einfluss von miRNAs auf kardiovaskuläre Krankheiten wirft die Frage auf, ob nicht interindividuelle Polymorphismen in den miRNA Sequenzen oder in den miRNA Zielsequenzen der mRNA Transkripte eine Rolle in der kardiovaskulären Pathogenese spielen. SNPs in den pri-miRNA Gensequenzen können die Expression der jeweiligen MicroRNA , die Prozessierung

der Vorstufen zur reifen miRNA oder auch die Interaktionsmöglichkeit mit der Ziel-mRNA beeinflussen [50]. Manche Varianten reifer MicroRNAs, auch „Isomirs“ genannt, können insbesondere wenn sich der SNP in der „seed region“ befindet auch neue Ziel-Transkripte aufweisen [51]. Zwar sind Mutationen in den sogenannten „seed regions“ evolutionär konservierter miRNAs weniger üblich, dahingegen kommen gehäuft „single nucleotide polymorphisms (SNPs)“ in der 3' untranslatierten Region (UTR) der Ziel-mRNA vor [52].

Ein bezeichnendes Beispiel für einen solchen Polymorphismus ist das sich durch eine extreme Muskelhypertrophie auszeichnende „Texel-Schaf“. Hierbei sorgt ein SNP in der 3'UTR der Myostatin-mRNA für eine Bindungsstelle der mutationsbedingt komplementären miR-1, daraus resultiert über die für miRNAs typische Inhibition der Translation einer Herunterregulation der Myostatinexpression und somit ein unlimitiertes Muskelwachstum [53].

Weitere Beispiele für die Rolle von SNPs auf die von MicroRNAs vermittelte Regulation der Genexpression gibt es auch aus dem kardiovaskulären Bereich: Sethupathy et al. haben herausgefunden, dass die miR-155 nur die Expression von AGTR1 reduziert, sofern das „1166 A-Allel“ und nicht das „1166 C-Allel“ des SNPs rs5186 der 3'UTR von ATGR1 vorliegt [54]. Das in der Literatur bekanntermaßen mit Bluthochdruck assoziierte „1166 C-Allel“ des SNPs rs5186 entgeht laut Sethupathy et al. also mutationsbedingt einer Regulation durch miR-155, somit führt ein SNP in der 3'UTR von AGTR1 zu einer veränderten, elevierten Genexpression und dem daraus resultierenden pathologischen, hypertensiven Phänotyp.

Der Umstand, dass SNPs in miRNA Genen oder SNPs in den 3'UTR Zielsequenzen der MicroRNAs jedoch zu signifikanten Phänotypausprägungen führen scheint aufgrund diverser Ursachen eher eine Rarität, als die Regel zu sein. Nicht nur dass die miRNA-mRNA Interaktionen sehr degenerationsanfällig sind, die meisten 3'UTRs zeichnen sich zudem durch potentielle Bindestellen für eine hohe Anzahl an miRNAs aus, was zu einer redundanten Regulation einer individuellen mRNA durch diverse, voneinander unabhängige MicroRNAs führt [55]. Zudem können von miRNAs regulierte Gene die Expression zusätzlicher miRNAs modulieren und somit positive oder negative „Feedback Loops“ erzeugen [32].

1.5 Auswirkungen von MicroRNA SNPs auf die monozytäre Genexpression: Lysozym (LYZ) und weitere Kandidatengene

Einen Beitrag zum weiteren Verständnis des Einflusses von miRNA-SNPs auf die Genexpression hat die Arbeit von Greliche et al. geleistet. Die Grundlage für die Analysen lieferte die Gutenberg Gesundheitsstudie (GHS). Hierbei handelt es sich um eine prospektive monozentrische Populationsstudie, bei der von 15.000 gesunden Probanden mit detaillierten kardiovaskulären Phänotypen aus dem Raum Mainz / Mainz-Bingen Blutproben entnommen und unter anderem monozytäre RNA und genomische DNA isoliert wurden. Daraus wurden Omics-Datensätze generiert. Unter Nutzung eines monozytären Transkriptomdatensatzes der GHS Studie (n=1467 Probanden) wurde eine genom-weite Untersuchung des Effekts von SNPs in pri-miRNA Genen sowie von SNPs in den 3'UTR-Sequenzen in humanen Monozyten durchgeführt [56]. Die Expressionsdaten wurden unter Nutzung von Illumina Human HT-12 Expression BeadChips erhalten, die Genotypisierung der SNPs erfolgte mittels Affymetrix Genome-Wide Human SNP Arrays 6.0 [57].

In der GHS Studie wurden 294 sogenannte „miSNPs“ also SNPs in den pri-miRNA Gensequenzen oder Proxy-SNPs in starker Korrelation (linkage disequilibrium $r^2 > 0,9$) genotypisiert, diese repräsentieren 258 unterschiedliche MicroRNAs [56].

Unter Nutzung der Genexpressionsdaten wurde eine signifikante Assoziation des miSNP rs1463335 und seines Proxy-SNP rs317657 (LD: $r^2 = 1$) in der Gensequenz der MicroRNA-1279 (Chromosom 12q15) mit einer Gruppe von 11 Genen identifiziert. Die signifikantesten Assoziationen wurden hierbei in *cis* für das *LYZ* Gen gefunden ($p=1.36 \cdot 10^{-76}$, $\beta=+0,2$) und ebenfalls in *cis* für *YEATS4* ($p=1.32 \cdot 10^{-46}$, $\beta=+0,15$), welches das Nachbargen von *LYZ* ist. Die Genexpression der neun weiteren Kandidatengene ist in *trans* mit dem miSNP assoziiert : *CNTN6* ($p=1.16 \cdot 10^{-12}$, $\beta=-0,02$), *CTRC* ($p=1.39 \cdot 10^{-13}$, $\beta=-0,03$) *COPZ2* ($p=2.33 \cdot 10^{-11}$, $\beta=-0,03$), *LRRFIP1* ($p=1.50 \cdot 10^{-35}$, $\beta=-0,05$), *NOD1* ($P=7.25 \cdot 10^{-9}$, $\beta=+0,05$), *PCDHA6* ($p=9.44 \cdot 10^{-33}$, $\beta=-0,04$), *KRT9* ($p=1.15 \cdot 10^{-15}$, $\beta=-0,04$), *ST5* ($p=2.05 \cdot 10^{-18}$, $\beta=-0,06$) und *TRAF3IP2* ($p=2.74 \cdot 10^{-17}$, $\beta=-0,03$). Hierbei wurde für das seltenere rs217657-C Allel eine vermehrte Expression von *LYZ*, *YEATS4* und *NOD1* festgestellt, wohingegen die

Expression der anderen Kandidatengene verringert war. Die Assoziation zwischen dem miSNP 1463335 der miRNA-1279 und der Genexpression der Kandidatengene konnte in den monozytären Expressionsdaten einer zweiten großen Studie, der Cardiogenics Transcriptomic Study (CTS) [58], repliziert werden [56]. Bis auf die Expression des *LYZ*-Gens, dessen korrespondierendes Oligonukleotid (probe) zur Analyse in der Studie fehlte, zeigten alle weiteren Kandidatengene eine signifikante Assoziation zum Proxy-SNP rs998022 ($r^2 = 0,9$) des miSNP 1463335. Auch das Expressionsmuster war zu den GHS-Daten replizierbar mit einer zum rs998022-G Allel vermehrten Expression von *YEATS4* ($R^2 = 11.2\%$; $p = 3.21 \cdot 10^{-21}$) und *NOD1* ($R^2 = 9.82\%$; $p = 7.83 \cdot 10^{-19}$), und einer signifikant verminderten Expression der übrigen Kandidatengene [56].

Gen	Chromosom	Primärstudie (GHS)		Validierungsstudie (CTS)	
		Effektstärke β (*2)	Signifikanz p-Wert (*3)	Effektstärke β (*2)	Signifikanz p-Wert (*3)
LYZ	12	0,20	$1.36 \cdot 10^{-76}$	-	-
YEATS4	12	0,15	$1.32 \cdot 10^{-46}$	0,19	$3.27 \cdot 10^{-21}$
CTRC	1	-0,03	$1.39 \cdot 10^{-13}$	-0,06	$1.54 \cdot 10^{-15}$
LRRFIP1	2	-0,05	$1.50 \cdot 10^{-35}$	-0,12	$6.65 \cdot 10^{-32}$
CNTN6	3	-0,02	$1.16 \cdot 10^{-12}$	-0,04	$7.56 \cdot 10^{-12}$
PCDHA6	5	-0,04	$9.44 \cdot 10^{-33}$	-0,1	$2.67 \cdot 10^{-31}$
TRAF3IP2	6	-0,03	$2.74 \cdot 10^{-17}$	-0,06	$5.23 \cdot 10^{-17}$
NOD1	7	0,05	$7.25 \cdot 10^{-9}$	0,12	$7.83 \cdot 10^{-19}$
ST5	11	-0,06	$2.05 \cdot 10^{-18}$	-0,22	$2.51 \cdot 10^{-30}$
KRT9	17	-0,04	$1.15 \cdot 10^{-15}$	-0,11	$1.11 \cdot 10^{-11}$
COPZ2	17	-0,03	$2.33 \cdot 10^{-11}$	-0,1	$2.06 \cdot 10^{-18}$

Abbildung 5: Cis und trans Assoziationen des miR-1279-SNP rs1463335.

(1) Der SNP rs1463335 befindet sich auf Chromosom 12 in Position 69,667,075. Folglich handelt es sich bei den beobachteten Assoziationen mit *LYZ* und *YEATS4* um cis-Assoziationen, bei den übrigen Genen hingegen um trans-Assoziationen. (2) Regressionskoeffizient assoziiert mit dem selteneren miSNP-Allel. (3) P-Wert der Assoziation zwischen miSNP und Genexpression. Aus: Greliche N. et al. .Comprehensive Exploration of the effects of miRNA SNPs on Monocyte Gene Expression. *PLoS ONE* **7(9)**: e45863 (2012)

Mittels bioinformatischer Target Scan Analysen wurde die Position 648-654 der *LYZ* 3'UTR als potenzielle miR-1279 Bindesequenz hervorgesagt. Zusätzlich stellten Greliche et al. eine Assoziation des miSNP rs1463335 und des SNP rs710794 in der 3'UTR des *LYZ*-Gens in Bezug auf die Genexpression von *LYZ* fest ($p = 4.13 \cdot 10^{-15}$). Die Zusammenschau all dieser Befunde lässt auf die Existenz eines miRNA-1279

Regulons, also einer gemeinsamen Regulation der 11 Kandidatengene vermittelt durch die Bindung der MicroRNA-1279 an das Transkript des *LYZ*-Gens schließen.

Weitere Hinweise auf eine gemeinsame Regulation dieser Gene in Monozyten wurden in zwei folgenden, unabhängigen Publikationen beschrieben.

Fairfax et al [59] fanden Hinweise auf eine neue „*master regulatory region*“ am Chromosom 12q15 Locus (rs10784774 und assoziierte eSNPs), welche das *LYZ* Gen umfasst, und die stärkste Assoziation als monozytenspezifisches cis-eQTL (expression quantitative trait locus) zum 3'UTR Bereich des *LYZ* Gens zeigte ($p=8,9 \cdot 10^{-78}$). Neben *LYZ* umfasst die von Fairfax et al. identifizierte *Master Regulatory Region* noch weitere 62 in trans regulierte Gene (darunter sämtliche Kandidatengene aus der Arbeit von Greliche et al.) die einen Signifikanzschwellenwert von $p = 1 \cdot 10^{-11}$ überschreiten. Insbesondere konnte eine starke Korrelation der *LYZ* Expression mit der des Transkriptionsfaktors *CREB1* (CAMP responsive element binding protein 1) festgestellt werden ($p = 5.7 \cdot 10^{-107}$). Die Expression von *CREB1* wiederum korreliert mit der Mehrheit der in trans assoziierten Gene. Dieser Umstand lässt laut Fairfax et al. einen Signalweg vermuten bei dem die cis-eQTL bedingte Modulation von *LYZ* zu einer veränderten *CREB1* Expression führt, welche wiederum in einer Regulation von in trans assoziierten Genen resultiert. Diese Hypothese wird laut Fairfax bestärkt durch die transkriptionsfaktor-artigen Eigenschaften von *CREB-1* in Immunzellen [60], die es als plausiblen Kandidaten zur Regulation von downstream-Genen erscheinen lässt, ähnlich wie andere Studien über den Einfluss von eQTLs eines Locus auf Transkriptionsfaktoren vermuten lassen [61].

Durch in-silico Analysen mittels ENCODE ChIP-seq Daten identifizierten Fairfax et al. eine Bindestelle für das Protein p300 welche den Locus rs10784774 überlappt. Zudem wurde eine starke inverse Korrelation der Genexpression von *LYZ* und dem für p300 kodierendem Gen *EP300* gesehen, allerdings nur in Individuen die homozygot für das A-Allel am Locus rs10784774 waren und nicht für das G-Allel [59]. Daraus schlussfolgerten die Autoren eine allel-spezifische Regulation von *LYZ* durch das Protein p300. Eine Analyse zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von miRNAs als potenzielle Regulatoren auf die Expression des *Master Regulons* wurde von Fairfax et al. nicht durchgeführt.

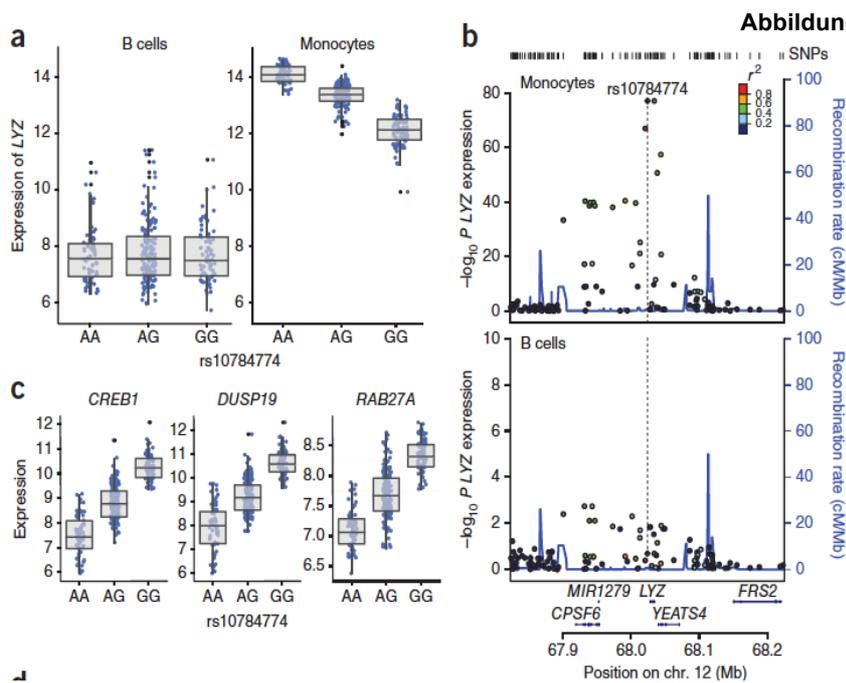


Abbildung 6: „Master regulatory region“ am Chromosom 12q15 Lokus. Der SNP rs10784774 hat einen monozytenspezifischen Effekt auf die Expression von LYZ und stellt einen monozytenspezifischen Master-Regulator multipler Gene dar. (a,b) (c) rs10784774 fungiert als eSNP gegenüber 72 arrayprobes des humanen Genoms, die höchsten Signifikanzwerte weisen neben der LYZ 3'UTR ($p = 8,9 \cdot 10^{-78}$) die Gene *CREB1* ($p = 2,0 \cdot 10^{-67}$), *DUSP19* ($p = 2,2 \cdot 10^{-59}$) und *RAB27A* ($p = 2,0 \cdot 10^{-57}$) auf. Aus: Fairfax, B. et al. Genetics of gene expression in primary immune cells identifies cell type-specific master regulators and roles of HLA alleles. *Nature Genetics*. Vol. 44 (2012)

In einer Analyse zur Untersuchung von Expressionsmustern fanden Rotival et al. [62] weitere Hinweise auf eine gemeinsame Regulation der Gene *LYZ*, *YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *KRT9*, *LRRFIP1*, *NOD1* und *ST5*. Mittels der bioinformatischen ICA-Methode [63] (Independent Component Analysis) wurden Sets koregulierter Gene innerhalb der 12808 in zirkulierenden Monozyten exprimierten Gene gesunder Teilnehmer ($n = 1490$) der GHS detektiert. Diese koexprimierten Gene wurden mit 675,350 SNPs korreliert um insbesondere potentielle trans-Regulatoren zu identifizieren. Dabei wurden am Lokus 12q15 die zwei cis eQTL *LYZ* und *YEATS4* mit dem Lead-SNP rs 11177644 detektiert. Dieser SNP zeigte eine starke Assoziation ($p = 1,1 \cdot 10^{-92}$) zu der Genexpression des korregulierten Gensets „98“ bestehend aus weiteren 34 in trans regulierten Genen (u.a. die oben genannten Kandidatengene)[62]. Die Expression der meisten dieser Gene zeigte eine negative Korrelation zu *LYZ* und *YEATS4*, dieser Umstand legt laut Rotival et al. nahe, dass die beobachteten trans- Effekte auf das Gen-Set durch die cis-Regulation von *LYZ* und *YEATS4* vermittelt sei. Die meisten identifizierten Assoziationen konnten mit den Expressionsdaten der Cardiogenics Transkriptomstudie repliziert werden [58].

Arbeitshypothese und Zielsetzung

Das antibakterielle Enzym „Lysozym“ ist ein Hauptbestandteil der Sekretionsgranula von Monozyten. Als Inflammationsmarker ist es in den Prozess der Atherosklerose involviert. Als potentielle Regulatoren des *LYZ* Gens werden genetische Varianten und MicroRNAs, wie die miRNA-1279, postuliert. Studien haben des Weiteren gezeigt, dass die Genexpression von *LYZ* mit der Expression weiterer Gene koreguliert wird. Daraus ergibt sich die Arbeitshypothese, dass ein sogenanntes „miRNA-1279 Regulon“ besteht, also eine Gruppe von Genen deren Expression einer gemeinsamen Koregulation durch eine MicroRNA unterliegt und ggf. kardiovaskulär eine Rolle spielen könnte. Da die bisherige Datenlage auf großen Transkriptomdatensätzen beruht und bisher keine experimentelle Validierung erfolgte, war es Ziel dieser Arbeit dieses potentielle Regulon experimentell zu validieren. Hieraus ergaben sich folgende Zielsetzungen:

1.) Die MicroRNA 1279 reguliert das *LYZ* Gen in *cis* durch Bindung an die 3'UTR von *LYZ* in Monozyten. Diese potenzielle Regulation durch eine Anbindung der miRNA-1279 an ein *LYZ*-Zieltranskript wurde mittels Reporter-gen-Assay überprüft.

2.) *LYZ* bildet mit weiteren Genen (*YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *LRRFIP1*, *NOD1*, *PCDHA6*, *KRT9*, *ST5*, *TRAF3IP2*) ein sogenanntes „miRNA-1279 Regulon“, welches einem gemeinsamen (*cis/trans*) Regulator untersteht. Die MicroRNA 1279 ist ein möglicher Kandidat hierfür. Aufbauend auf den oben genannten Untersuchungen der *LYZ* Regulation durch miRNA-1279 war es weiterhin das Ziel mittels Überexpression und Genexpressionsanalysen zu überprüfen, ob miRNA-1279 ein Regulator für das genannte Gen-Regulon ist.

3.) MicroRNAs wird in der Literatur ein regulatorischer Effekt auf die Translation der mRNA zu Proteinen zugeschrieben. Es war weiterhin Ziel dieser Arbeit einen potenziellen Effekt der MicroRNA 1279 auf das Proteinlevel von *LYZ* und im Weiteren auf das Proteom zu untersuchen. Letzteres sollte mögliche weitere miRNA-1279 Kandidaten identifizieren.

2. Material und Methoden

Materialien

2.1 Geräte

Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Bandelin Sonifizierungsgerät	Bochem Laborbedarf
GeneChip® AutoLoader	Affymetrix, High Wycombe
GeneChip® Scanner 3000 7G	Affymetrix, High Wycombe
GeneChip® Hybridisierungssofen 640	Affymetrix, High Wycombe
2100 Bioanalyser System	Agilent, Waldbronn
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Fluidics 450 Waschstation	Affymetrix, High Wycombe
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN®	Bio-Rad, München
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
Infinite M200 Luminometer	Tecan, Crailsheim
Leica DMIL LED Mikroskop	Leica, Wetzlar
Magnetrührer Ikamag	IKA Labortechnik, Staufen
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Scanner Scan Maker i900	Microtek, Ratingen
Spektralphotometer Nanodrop ND-2000c	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sterile Zellkulturbank Laminair HVR 2448	Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Darmstadt
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (40%)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
APS (10%)	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Braun, Melsungen
BSA (Bovines Serum Albumin)	Bio-Rad, München
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
DharmaFect	Thermo Scientific, Schwerte
Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
EDTA Lösung (0,5M)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Molecular Weight Ladder (100 BP, 1000 BP)	New England Biolabs, Frankfurt
EBM2 -Medium	Lonza, Köln
Fetales Kalbsserum (FCS)	Gibco, Darmstadt
Gel Loading Dye Blue	New England Biolabs, Frankfurt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HotStar Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LightSwitch Assay Lösung	SwitchGear Genomics, Heidelberg
Lipofectamine RNAiMAX ®	Life Technologies, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Milchpulver	BIO-RAD, München
Opti-MEM	Gibco, Darmstadt
PageRuler Unstained/Prestained	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	Gibco, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Fisher Scientific, Schwerte
Protease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
QIAzol Lysereagens	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme NHE1 und XHO1	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionspuffer CutSmart	New England Biolabs, Frankfurt
RIPA Lysepuffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
RNAse-freies Wasser	Gibco, Darmstadt

RPMI 1640 Medium	Gibco, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
SOC Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
TEMED	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.3 Consumables & Kits

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg
Filterpapier	Roth, Karlsruhe
GeneChip® Human Exon ST1.0	Affymetrix, High Wycombe (UK)
klare Zellkultur-Platten (96-Well)	Corning Inc., Kaiserslautern
Nitrozellulose Membran	Bio-Rad, München
Nunc 96-Well Platte	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
optische qPCR Platte (96-Well)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PCR Platte (96-Well)	Bio-Rad, München
Tube 0,5/1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon Tube 15 ml	Corning Inc., Kaiserslautern
Falcon Zellkulturplatte (6-Well)	Corning Inc., Kaiserslautern
Falcon Zellkulturflasche 75 cm ²	Corning Inc., Kaiserslautern
Ambion WT Expression Kit	Ambion, Schwerte
GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit	Affymetrix, High Wycombe
GeneChip® WT Terminal Labeling & Hybridization Kit	Affymetrix, High Wycombe
MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit	Ambion, Schwerte
PCR Cloning Kit	Qiagen, Hilden
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Schwerte
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Waldbronn
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.4 Vektoren, MicroRNA, Antikörper

SwitchGear Genomics 3'UTR Reportervektoren

BioCat, Heidelberg

Abbildung 7: LYZ 3'UTR -Sequenz (1197 BP).

Rot unterlegt sind die beiden bioinformatisch vorhergesagten putativen Bindestellen der MicroRNA 1279 in der 3'UTR-Sequenz von LYZ.

```
CGTCAGTATGTTCAAGGTTGTGGAGTGTAACCTCCAGAATTTTCCTTCTTCAGCTCATTTTGTCTCTCT
CACATTAAGGGAGTAGGAATTAAGTGAAAGGTCACACTACCATTATTTCCCCTTCAAACAATAAT
ATTTTTACAGAAGCAGGAGC AAAATATGC CTTTCTTCTAAGAGATATAATGTTCACTAATGTGGTT
ATTTTACATTAAGCCTACAACATTTTTCAGTTTGCAAA TAGAACTAATACTGGTGAAAATTTACCTA
AAACCTTGGTTATCAAATACATCTCCAGTACATTCCGTTCTTTTTTTTTTTGAGACAGTCTCGCTCG
TCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCAATCTCGGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCGGGTTCACGC
CATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACGGGCGCCCGCCACCACGCCCGGCTAATTT
TTTGTATTTTAGTAGAGACAGGGTTTACCCTGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTTGT
GATCCACCCACCTCGGCCCTCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACTGCGCCCGGCCACAT
TCAGTTCTTATCAAAGAAATAACCCAGACTTAATCTTGAATGATACGATTATGCCAATATTAAGT
AAAAAATATAAGAAAAGGTTATCTTAAATAGATCTTAGGCAAATAACCAGCTGATGAAGGCATCT
GATGCCTTCATCTGTTTCAGTCATCTCCAAAACAGTAAAAATAACCACCTTTTGTGG GCAATAIGA
AATTTTAAAGGAGTAGAATACCAAATGATAGAAACAGACTGCCTGAATTGAGAATTTTGATTCT
TAAAGTGTGTTTCTTCTAAATTGCTGTTCTTAATTTGATTAATTTAATTCATGTATTATGATTA
TCTGAGGCAGATGAGCTTACAAGTATTGAAATAATTAATAATCACAATGTGAAGTTATGCA
TGATGTAAAAAATACAAACATTCTAATTAAGGCTTTGCAACACATGCCTTGTCTGTTTTTATTTAG
ACTCCTATAGTGTCTCTGAAGAAAAGAATACAGATATTTGAAAAAATATGATTTGGTGCTCTTAAT
ATCTCTTATATCGTCACTTACCTCACTTAAATAGTCAGATATTGCTGGAGAAAAATTCACAAGC
```

Abbildung 8: ACTB 3'UTR-Sequenz (680 BP).

Dargestellt ist die Gensequenz der 3'UTR der Negativkontrolle ACTB ohne die LYZ-Bindestelle.

```
GGATCAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCCGGCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAGGCGG
ACTATGACTTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCAGCAAAAACAAGATGAGA
TTGGCATGGCTTTATTTGTTTTTTTTGTTTTGTTTTGGTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTGACTCAGGATT
TAAAAACTGGAACGGTGAAGGTGACAGCAGTCGGTTGGAGCGAGCATCCCCCAAAGTTCACAATG
TGGCCGAGGACTTTGATTGCACATTGTTGTTTTTTAATAGTCATTCCAAATATGAGATGCGTTGTT
ACAGGAAGTCCCTTGCCATCCTAAAAGCCACCCCACTTCTCTAAGGAGAATGGCCCAGTCCTCT
CCCAAGTCCACACAGGGGAGGTGATAGCATTGCTTTCGTGTAATATGTAATGCAAAATTTTTTTA
ATCTTCGCCTTAATACTTTTTTATTTGTTTTATTTGAAATGATGAGCCTTCGTGCCCCCCTTCCCCC
TTTTTTGTCCCCCAACTTGAGATGTATGAAGGCTTTTGGTCTCCCTGGGAGTGGGTGGAGGCAGCCA
GGGCTTACCTGTACTGACTTGAGACCAGTTGAATAAAAAGTGCACACCTTAAAAATGAGGCCAAG
TGTGACTTTGT
```

Pre-miR™ miRNA Precursor 1279 (Pre-1279)

Ambion, Schwerte

Mature miRNA Sequenz: UCAUAUUGCUUCUUUCU

miRBase ID: hsa-miR-1279

miRBase Accession: #MIMAT0005937

Spezies : Mensch

Pre-miR™ miRNA Precursor - Negative Control #2
(Negativkontrolle)

Ambion, Schwerte

TaqMan®-Assay miR-1279

Applied Biosystems, Darmstadt

TaqMan®-Assay RNU6B

Applied Biosystems, Darmstadt

TaqMan® Fast Advanced Master Mix

Applied Biosystems, Darmstadt

TaqMan® Gene Expression Master Mix

Applied Biosystems, Darmstadt

„Forward“ und „Reverse“ Primer

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3'UTR LYZ Short Forward: 5'-TTTCCTTCTTCAGCTAGCTTTGTCTCTCTC -3'

3'UTR LYZ Short Reverse: 5'-TTTTTACTGTTTCTCGAGATGACTGAACAG -3'

Antikörper:

	Anti-LYZ (monoklonal)	Anti-GAPDH (monoklonal)	Anti-Rabbit (Sekundär-AK)
Wirt	Kaninchen	Kaninchen	Ziege
Isotyp	IgG	IgG	IgG
Verdünnung	1:5.000	1:5.000	1:10.000
Lagertemperatur	-20°C	-20°C	4°C
AK-Typ, Firma	NBP1-95509, EPR2994(2), Novus Biologicals	14C10, Cell Signaling	Sc-2030, Santa Cruz

2.5 Software / Datenbanken

Serial Cloner

microRNA.org - <http://www.microRNA.org/microRNA/getMrna.do?gene=4069&utr=17355&organism=9606>

mirBase.org - http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0006426

Target Scan Human - <http://www.targetscan.org>

Uniprot/SwissProt - <http://www.uniprot.org/uniprot/P61626>

Methoden

2.6 Zellkultur

THP-1 Monozyten Vorläuferzellen wurden von der Firma CLS (Eppelheim) bezogen. Die Kultivierung erfolgte im RPMI 1640 Medium (Gibco, Darmstadt) ergänzt durch 10% hitze-inaktiviertes fetales Kalbsserum (Gibco, Darmstadt) und 1% Penicillin-Streptomycin (Fisher Scientific, Schwerte). Die Zellen wurden gemäß Herstellerangaben bis zum Erreichen der Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Falcon Zellkulturflaschen (Corning Inc., Kaiserslautern) kultiviert und anschließend auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml subkultiviert.

Humane umbilikal-venöse Endothelzellen (HUVEC) wurden von der Firma PromoCell (Heidelberg) bezogen. Es wurden ausschließlich Zellen der Passage 2–5 genutzt, die einem Pool aus 3 unterschiedlichen Individuen entstammten. Die Kultivierung erfolgte in EBM2 -Medium (Lonza, Köln) ergänzt durch 2% hitze-inaktiviertes fetales Kalbsserum und 1% Penicillin-Streptomycin.

Alle Zellkulturen wurden in einem befeuchteten 95% Luft-5% CO₂ Inkubator bei 37°C gehalten. Die Aussaat der Zellen erfolgte in Falcon 6-Well Platten (Corning Inc., Kaiserslautern). Sämtliche Arbeiten erfolgten an der sterilen Zellkulturbank mit sterilen Materialien und Lösungen.

2.7 Gentechnische Methoden

2.7.1 MicroRNA Überexpression

Beginnend mit 400.000 Zellen 24 Stunden vor der Transfektion, verdoppelte sich die Anzahl der THP-1 Zellen zum Transfektionszeitpunkt auf 800.000 pro Well. Die Zellen wurden entsprechend eines vom Hersteller vorgegebenen Ranges von 1-50nM mit der MicroRNA-1279 Vorläuferform, dem sogenannten Precursor „pre-miR-1279“ (Ambion, Schwerte) und der entsprechenden Negativkontrolle, einer scrambled nonsense Basensequenz transfiziert.

Als Transfektionsagens wurde Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, Oberhausen) verwendet und zunächst in Opti-MEM (Gibco, Darmstadt) Medium

verdünnt und nach einer Inkubation von 10 Minuten zum RPMI-Medium gegeben (Tabelle 1). Nach 24 Stunden erfolgte eine Zugabe von 1 ml frischem RPMI 1640 Medium je Well. 48 Stunden nach Transfektion wurden RNA und Proteine isoliert.

Tabelle 1: Menge an Precursor, Transfektionsagens und Medium entsprechend finaler pre-miR/ pre-neg Konzentration je Well der 6-Well-Zellkulturplatte

Finale Konz. (nM)	pre-miR/ neg. ctrl (10 μ M) [μ l]	Lipofectamine [μ l]	Opti-MEM [μ l]	finales Vol. in RPMI [ml]
10 nM	3	3	250	3
30 nM	9	9	250	3

2.7.2 RNA Isolation

Die Gesamt-RNA einschließlich der MicroRNA wurde aus den THP-1 Zellen unter Nutzung von QIAzol Lysereagens (Qiagen, Hilden) isoliert. Hierzu wurden zunächst die pelletierten Zellen mit PBS (Phosphate-Buffered Saline) gewaschen (Gibco, Darmstadt). Nach Hinzugabe von 1ml Lysereagens und 250 μ l Chloroform (AppliChem, Darmstadt) erfolgte mittels Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min. bei 4 C $^{\circ}$) die Separation in eine obere wässrige und eine untere organische Phase. 500 μ l der oberen Phase wurden anschließend in ein 1.5 ml Tube (Eppendorf, Hamburg) überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Hinzugabe von 0.8 vol. Isopropanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und einer weiteren zehnmütigen Zentrifugation. Das resultierende RNA-Pellet wurde zweimal mit 200 μ l 70% Ethanol (AppliChem) gewaschen und rezentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das RNA-Pellet 10 Minuten luftgetrocknet und abschließend in RNase-freiem Wasser (Gibco, Darmstadt) aufgelöst.

2.7.3 RNA Quantifizierung

Die RNA Menge und Reinheit wurden unter Nutzung eines Nanodrop ND-2000c Spektralphotometers (Thermo Fisher Scientific, Erlangen) bestimmt. Die RNA-Menge wurde durch die UV-Absorption bei 260 nm evaluiert. Die Reinheit der RNA Probe wurde durch das Messen der Absorptionsratio bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Ausschließlich Proben mit Werten von A_{260}/A_{280} größer als 1.8 und kleiner als 2.1 wurden als nicht durch organische Bestandteile /Proteine kontaminiert betrachtet und der weiteren Analyse zugeführt.

2.7.4 RNA Integritätskontrolle

Alle RNA-Proben für die Microarray-Analyse wurden nach ihrer Aufreinigung zunächst photometrisch mittels Spektralphotometer bezüglich ihrer Qualität und ihres RNA-Gehalts geprüft. Nach einer einheitlichen Verdünnung aller Proben mit Aqua dest. (Braun, Melsungen) auf 83,3 ng/ μ l (3 μ l = 250 ng RNA) erfolgte eine finale Qualitätskontrolle im Bioanalyser 2100 System (Agilent, Waldbronn) unter Nutzung des RNA 6000 Nano Kits (Agilent, Waldbronn). Dieses Kit zur RNA-Analyse zeichnet sich durch Nano Chips aus, welche aus mehreren miteinander verbundenen Mikrokanälen bestehen und nach dem Prinzip der Kapillarhochspannungselektrophorese Nukleinsäurefragmente ihrer Größe nach separieren. Die Analyse erfolgte im Bioanalyser anhand eines im Kit enthaltenen Leiters mit definiertem RNA-Gehalt. Nachdem im ersten Schritt die Gelmatrix für 10 min. bei Raumtemperatur mittels Zentrifugation (1500 G) durch einen Filter gesiebt wurde, erfolgte im Anschluss eine Färbung mit einem 1,5% Farbstoffkonzentrat. Das Gel wurde dann unter Druck in 30 Sekunden durch die Mikrokapillaren des Chips gepresst. Nachdem jeweils 5 μ l vom mitgelieferten RNA-Marker und jeweils 1 μ l RNA-Probe in die Wells des Chips pipettiert wurden, wurde im Bioanalyser die RNA-Integrität (RIN) der jeweiligen Probe gemessen. Diese wird durch Bestimmung des Quotienten der Signalintensitäten der ribosomalen RNA 28 und 18 (rRNA28/rRNA18) ermittelt. Es wurden ausschließlich Proben mit einer hohen Integrität (RIN > 9) der Transkriptomanalyse zugeführt.

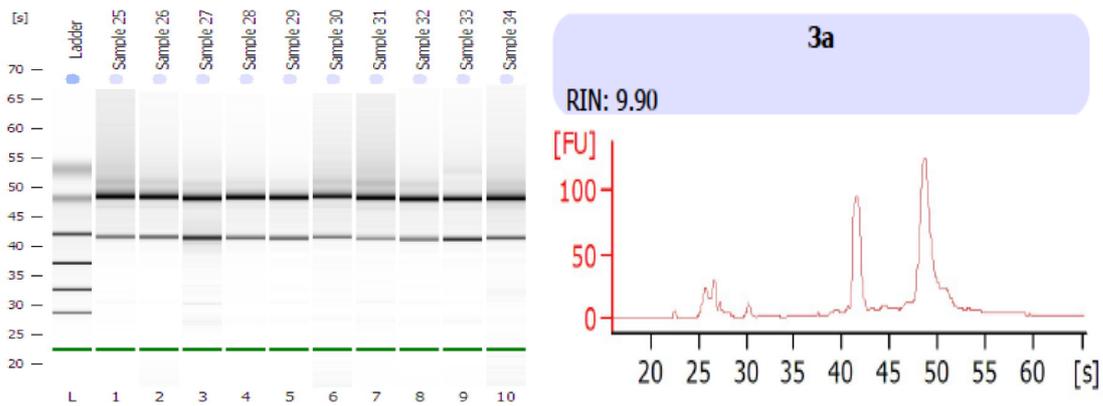


Abbildung 9: Beispiel einer Integritätskontrolle der RNA im Bioanalyzer. Beispielhaft wird in der Abbildung von der Analyse-Software nach Kapillarhochspannungselektrophorese zur RNA Integritätsbestimmung der Quotient der Signalintensitäten der ribosomalen RNAs (rRNA28/rRNA18) berechnet. Links im Bild sind die beiden ribosomalen RNAs als Gelbanden, rechts als Fluoreszenz-Peaks der Messung dargestellt. Aus: Screenshot eigener Messung unter Nutzung der Software von Agilent

2.7.5 Reverse Transkription

MicroRNA

Zur Feststellung einer erfolgreichen Überexpression der MicroRNA mittels der Transfektion von miRNA Precursoren in THP-1 Zellen, wurde aus einem Teil der isolierten RNA in einem ersten Schritt mittels eines miRNA-spezifischen TaqMan®-Assays (Applied Biosystems, Darmstadt) die komplementäre Menge an cDNA generiert. Dazu wurde das TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) gemäß Herstellerangaben verwendet.

In einem zweiten Schritt erfolgte die quantitative Bestimmung der miRNA mittels Real-Time PCR.

Tabelle 2: TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit

Master Mix (15µl):

- 0.15 µl 100mM dNTPs (mit dTTP)
- 1.00 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL
- 1.50 µl Reverse Transcription Buffer (10×)
- 0.19 µl RNase Inhibitor, 20 U/µL
- 9,41 µl Nuklease-freies H₂O
- 0,75 µl RT-Primer
- 2,0 µl RNA- Probe (25ng/µl)

Die RT-Reaktion erfolgte im Thermocycler nach folgendem Schema:

Tabelle 3: MicroRNA RT Reaktion

Zeit	Temperatur
30 min	16 C°
30 min	42 C°
5 min	85 C°
∞	4 C°

Die resultierende cDNA wurde bei -20°C bis zur Real-Time PCR aufbewahrt.

mRNA

Um einen etwaigen Effekt der MicroRNA-1279 Überexpression auf mRNA Ebene der Kandidatengene *LYZ*, *YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *KRT9*, *LRRF1P1*, *NOD1* und *ST5* zu evaluieren wurde nach Feststellung einer erfolgreichen Überexpression der miRNA-1297 in den isolierten RNA-Proben, cDNA aus selbigen Proben generiert, um im zweiten Schritt eine quantitative Analyse der Expression der Kandidatengene mittels Real-Time PCR durchzuführen. Hierzu wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) genutzt.

Tabelle 4: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Master Mix (10µl):

- 1,0 µl RT Buffer (10x)
- 0,4 µl dNTP Mix (100 mM) (25x)
- 1,0 µl RT Random Primers (10x)
- 0,5 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase
- 5,1 µl Nuklease-freies H₂O
- 2,0 µl RNA- Probe (25ng/µl)

Die RT-Reaktion erfolgte im Thermocycler nach folgendem Schema:

Tabelle 5: mRNA RT Reaktion

Zeit	Temperatur
10 min	25 C°
120 min	37 C°
5 min	85 C°
∞	4 C°

Die resultierende cDNA wurde bei -20°C bis zur Real-Time PCR aufbewahrt.

2.7.6 Real Time PCR (qPCR)

Zur Validierung einer erfolgreichen Überexpression der MicroRNA-1279 als auch zur Evaluierung eines potenziellen regulatorischen Effekts der MicroRNA auf die Transkription von sogenannten Target Genen wurden die durch reverse Transkription generierten cDNA-Proben einer quantitativen Analyse mittels Real Time PCR (alternativ: qPCR) zugeführt. Dabei wurde das cDNA-Template anhand spezifischer Primer über 40 Reaktionszyklen im 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) amplifiziert und die Amplifizierung durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung detektiert. Zur Auswertung wurde der jeweilige Ct-Wert verwendet, also derjenige Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die relative Regulation wurde mittels der Formel [64]: $2^{\Delta\Delta Ct(\text{Kontrolle}) - \Delta\Delta Ct(\text{Behandlung})}$ berechnet ($\Delta Ct = Ct(\text{Gen}) - Ct(\text{Referenzgen})$). Hierbei wird die Genexpression gegenüber einem internen Standardgen normalisiert.

MicroRNA

Die Real Time PCR zur miRNA-Detektion wurde unter Nutzung des TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Als internes Standardgen zur Normalisierung wurde RNU6B genutzt. Pro Well der 96-Well qPCR-Platte (Bio-Rad, München) galt folgendes Reaktionsschema:

Tabelle 6: TaqMan® Fast Advanced Master Mix

Master Mix (20µl):

10,00 µl TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x)
7,67 µl Nuklease-freies H₂O
1,00 µl TaqMan® Gene Expression Assay (20x)
1,33 µl cDNA

Folgendes Programm wurde im qPCR-System verwendet:

Tabelle 7: MicroRNA-1279 qPCR

Zeit	Temperatur
2 min	50 C°
0:20 min	95 C°
0:01 min (40 Zyklen)	95 C°
0:20 min (40 Zyklen)	60 C°

mRNA

Die Real Time PCR zur Überprüfung eines potenziellen regulativen Effekts der miRNA-1279 auf die Transkripte der untersuchten Kandidatengene wurde unter Nutzung des TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Als internes Standardgen zur Normalisierung wurde RPL37 genutzt. Pro Well der 96-Well qPCR-Platte (Bio-Rad, München) galt folgendes Reaktionsschema:

Tabelle 8: TaqMan® Gene Expression Master Mix

Master Mix (10µl):

5,0 µl TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x)
0,5 µl TaqMan® Gene Expression Assay (20x)
4,5 µl cDNA + H₂O

Folgendes Programm wurde im qPCR System verwendet:

Tabelle 9: Kandidatengene qPCR

Zeit	Temperatur
2 min	50 C°
10 min	95 C°
0:15 min (40 Zyklen)	95 C°
1:00 min (40 Zyklen)	60 C°

2.7.7 Reporter-Gen-Assays

Zur Validierung einer Regulation des LYZ-Gens durch Bindung der MicroRNA-1279 an die 3'untranslatierte Region der „target“ LYZ-mRNA wurden verschiedene Reporter-Gen-Plasmide bezogen bzw. kloniert (siehe Materialien bzw. Ergebnisse). Es wurden ein Reporter-Gen-Konstrukt mit der kompletten Lysozym 3'UTR (1197 Basenpaare), ein Vektor mit der 3'UTR des ACTB-Gens als Negativkontrolle als auch ein „leerer Vektor“ ohne 3'UTR Sequenz in der „Multiple-Cloning-Site“ genutzt.

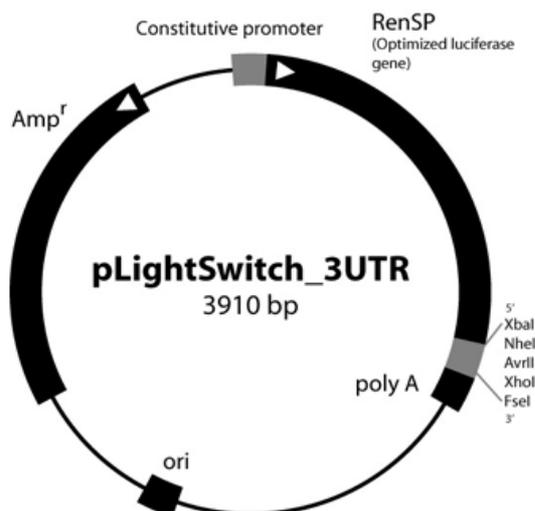


Abbildung 10: GoClone 3'UTR Reporter-Plasmid. Der Vektor enthält ein synthetisch optimiertes Renilla-Luciferase-Gen mit erhöhter enzymatischer Aktivität und Lichtproduktion. Es kann eine spezifische 3'UTR-Sequenz wie die des LYZ-Gens in die Multiple-Cloning-Site integriert werden. Kommt es zur Bindung der miRNA an die 3'UTR, wird das Ablesen des Luciferase-Gens verhindert, was in einer verringerten Lumineszenz bei der Messung resultiert. Aus: http://switchgeargenomics.com/sites/default/files/pdf/LightSwitch_Manual.pdf

2.7.7.1 Klonierung

Ein weiteres Reporter-Gen-Plasmid wurde durch Klonierung einer verkürzten LYZ 3'UTR Sequenz (738 BP) mit einer bioinformatisch vorhergesagten miRNA-1279 Bindestelle in den erworbenen „Empty 3'UTR Vektor“ generiert (siehe Ergebnisse

3.1). Dazu wurde DNA aus dem käuflich erworbenen Vektor in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mittels spezifischer „Forward“ und „Reverse“ Primer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Sequenz siehe Materialien) und der HotStar Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) gemäß folgendem Schema amplifiziert:

Tabelle 10: PCR Mix

Master Mix (50µl):

25,0 µl HotStarTaq DNA Polymerase Master Mix (2x)
 2,5 µl Forward Primer (10µM)
 2,5 µl Reverse Primer (10µM)
 20,0 µl DNA (100ng)

Folgendes Programm wurde im PCR Cycler verwendet:

Tabelle 11: PCR Ablauf

Zeit	Temperatur
15 min (40 Zyklen)	94 C°
0:30 min (40 Zyklen)	94 C°
0:30 min (40 Zyklen)	63 C°
2:30 min (40 Zyklen)	72 C°

2.7.7.2 Restriktionsverdau

PCR-Produkt

2 µl DNA wurden für 30 Minuten bei 37°C in einem Restriktionsverdau mit den beiden Restriktionsenzymen NHE1 und XHO1 (New England Biolabs, Frankfurt) inkubiert. Nach Hinzugabe von 2 µl (6x) Gel Loading Dye Blue (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte die Validierung der korrekten Größe des DNA-Fragments mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Tabelle 12: Restriktion PCR Produkt

Master Mix (10µl):

0,3 µl Restriktionsenzym NHE1
0,3 µl Restriktionsenzym XHO1
1,0 µl Restriktionspuffer CutSmart
1,0 µl BSA (10x)
0,3 µl RNase
5,1 µl H₂O
2,0 µl DNA

Plasmide

Sowohl die DNA des pDrive-Vektors (enthält kloniertes PCR Produkt) als auch die bezogene pLightSwitch *EMPTY 3UTR* DNA wurden jeweils für 90 Minuten bei 37°C in einem Restriktionsverdau mit den beiden Restriktionsenzymen NHE1 und XHO1 (New England Biolabs, Frankfurt) inkubiert. Die Inkubation des pLightSwitch *EMPTY 3UTR* Vektors wurde nach Addition einer Einheit Calf Intestine Alkaline Phosphatase zur Verhinderung einer Religation des Vektors, um 30 Minuten verlängert. Nach Hinzugabe von 20 µl (6x) Gel Loading Dye Blue erfolgte die Validierung der korrekten Größe des DNA-Fragments mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Tabelle 13: Restriktion Plasmide

Master Mix (100µl):

10 µl pDrive bzw. pLightSwitch DNA (100 ng/µl)
3 µl Restriktionsenzym NHE1
3 µl Restriktionsenzym XHO1
10 µl Restriktionspuffer CutSmart
1 µl BSA (100x)
73 µl H₂O

2.7.7.3 Agarose Gelelektrophorese

Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte in einem in 0.8 % Agarose Gel welches wie folgt hergestellt wurde:

Tabelle 14: Agarose Gel

Master Mix :

0,8 g Agarose
100 ml TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) (1x)
6 µl Ethidiumbromid (zum liquiden Gel)

Neben dem Loading Dye wurde den DNA-Proben zusätzlich eine 1KB und eine 100 BP lange molekulare Leiter hinzugefügt. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer (1x) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für 2 Stunden bei 80 Volt. Im Anschluss wurde die DNA aus dem Gel herausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kits gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.7.7.4 Ligation

PCR-Produkt

100 ng an aufgereinigtem PCR-Produkt wurden mittels des PCR Cloning Kits zwecks höherer Klonierungseffektivität (weniger falsch-positive Kolonien, geringerer Zeitaufwand als bei vergleichbaren Verfahren) in den pDrive- Vektor des Kits ligiert. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht in einem 16° C temperierten Wasserbad.

Tabelle 15: Ligation PCR-Produkt

Master Mix (10µl):

0,5 µl pDrive Vektor (25 ng)
2,0 µl PCR-Produkt (100 ng)

5,0 µl Ligation Master Mix (2x)
2,5 µl H₂O

Vektor

Das im pDrive-Vektor amplifizierte PCR-Produkt wurde als Insert in dreifachem Überschuss in den bezogenen pLightSwitch *EMPTY 3'UTR* Vektor (3910 BP) ligiert. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht in einem 16° C temperierten Wasserbad.

Tabelle 16: Ligation 3'UTR Vektor

Master Mix (20µl):

6,0 µl Insert DNA (300 ng)
2,0 µl Vektor DNA (100 ng)
2,0 µl Ligationspuffer (10x)
1,0 µl T4 DNA Ligase
9,0 µl H₂O

2.7.7.5 Hitzeschock-Transformation & Bakterienkultur

5 µl des Ligationsmixes wurden mit *E. coli* DH5alpha Zellen zunächst für 40 Minuten auf Eis inkubiert, gefolgt von einem einminütigem Hitzeschock bei 42°C im Thermomixer und einer finalen Kühlung auf Eis für 5 Minuten. Nach Hinzugabe von 400 µl SOC Medium (ohne Antibiotikum), erfolgte eine Inkubation von 50 Minuten bei 37°C im Schüttler. Die Zellen wurden auf LB-Agar Platten ausgestrichen, diese enthielten entweder zusätzlich XGAL/IPTG und Ampicillin zur pDrive-Vektor Selektion oder nur Ampicillin zur Selektion des klonierten 3'UTR Reportervektors (inklusive Insert). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Mittels der Blau-Weiß-Selektion [65] konnten die weißen transgenen DH5alpha *E. coli* Bakterien identifiziert werden. Diese weißen Kolonien bilden sich zum einen durch eine, nach Transformation des Plasmids bestehende Antibiotikaresistenz (korrespondierend zum Agarmedium) der transgenen Bakterien. Zum anderen bedingt die Weißfärbung, die Ligation eines Inserts in die Multiple Cloning Site des Vektor-Plasmids und somit eine Unterbrechung des *lacZ*-Gens im Plasmid. Dieses Gen wiederum kodiert im

intakten Zustand für eine β -Galactosidase, welche durch Hydrolyse des Zusatzes XGAL (Galactose) eine Blaufärbung der Kolonien bewirkt.

2.7.7.6 Plasmid Präparation

Mini-Präparation

Die weißen Kolonien wurden in 3 ml LB medium (inkl. Ampicillin) bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. 1,5 ml der Suspension wurden für eine Minute mit 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden 100 μ l von Lösung 1 (siehe Material) hinzugefügt, wobei sich das Pellet auflöste. Nach Addition von 200 μ l von Lösung 2 (siehe Material) einem erneuten Schütteln und der Zugabe von 150 μ l an Lösung 3 (siehe Material) erfolgte eine fünfzehnminütige Inkubation auf Eis. Diese finale Mischung wurde erneut kurz geschüttelt bis ein weißes Pellet sichtbar wurde. Es erfolgte eine zwanzigminütige Zentrifugation (13.000 rpm) bei Raumtemperatur. 400 μ l klaren Überstandes wurden in ein neues Microtube (Eppendorf, Hamburg) transferiert und mit 1ml Ethanol (99%) gemischt. Die Lösung wurde zentrifugiert (15 min. bei 13.000 rpm), das Pellet einmalig mit 150 μ l Ethanol (70%) gewaschen und rezentrifugiert (2 min. bei 13.000 rpm). Nach Abnahme des Überstands, wurde das DNA-Pellet für 10 min. luftgetrocknet und in Nuklease-freiem Wasser aufgelöst.

Midi-Präparation

Die Isolation der Plasmid DNA erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers unter Nutzung des Plasmid Plus Midi Kits (Qiagen, Hilden). Reinheit und Konzentration der DNA wurden photometrisch (A260/ A280) im Spektralphotometer bestimmt.

2.7.7.7 Kotransfektion

24 Stunden vor Transfektion wurden HUVEC Zellen in einem Volumen von 100 μ l pro Well in klare, zellkulturspezifische 96-Well Platten (Corning Inc., Kaiserslautern) gegeben, um eine Konfluenz von mehr als 80% zum Transfektionszeitpunkt zu erreichen. Die beiden erworbenen als auch der klonierte Reporter-genvektor, sowie

der spezifische MicroRNA Precursor „pre-miR-1279“ als auch die pre-miR-Negativkontrolle (scrambled control) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut.

Die Transfektion wurde nach folgendem Schema vorbereitet:

Tabelle 17: Kotransfektion miRNA & Reportergenvektoren

<u>Lösung 1 (10µl) :</u>	<u>Lösung 2 (10µl) :</u>
Finale Konz. pre-miR/ neg.: 30 nM	0,15 µl DharmaFect Duo
	9,85 µl Opti-MEM
1,5 µl pre-miR/ neg. ctrl (2µM)	
3,3 µl Vektor DNA (100 ng)	
5,2 µl Opti-MEM	

Lösung 2 wurde nach 5 Minuten Inkubationszeit des Transfektionsagens DharmaFect in einer „deep-well“ Platte zu Lösung 1 gegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, wurden 80 µL vorgewärmtes (37°C), antibiotikumfreies Opti-MEM Medium jedem Well hinzugefügt, somit resultierte ein totales Volumen von 100µL pro Transfektion. Die am Vortag vorbereiteten HUVEC Zellkulturplatten wurden aus dem Inkubator genommen und auf ausreichende Konfluenz der Zellen (min. 80%) überprüft. Das Zellkulturmedium wurde aus jedem Well vorsichtig abpipettiert und 100µl der vorbereiteten Transfektionslösung zu jedem Well der 96-well Platte gegeben. Die Zellkulturplatten wurden wieder für 48 Stunden in den Inkubator (37°C) zurückgestellt, bevor sie bei -80°C eingefroren wurden.

2.7.7.8 Luciferase-Assay

Die eingefrorenen HUVEC Zellkulturplatten wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, bevor 100µl Lysat aus jedem Well zur Lumineszenzmessung auf eine spezielle Nunc 96-Well Platte, gekennzeichnet durch maximale Reflexion und geringe Autolumineszenz, übertragen wurden. 100µL LightSwitch Assay Lösung, welche das Luciferase-Substrat und Puffer enthält, wurden in jedes Well hinzugegeben. Die Nunc-Platten wurden zum Schutz vor Lichteinfall mit Alufolie abgedeckt und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lumineszenz der Platte wurde je Well für 2 Sekunden im Infinite M200 Luminometer gemessen. Eine Minderung der

Lumineszenz wurde durch Kalkulation der Luciferasesignal-Ratio jedes LYZ-Reportergenkonstrukts transfiziert mit spezifischer miRNA-1279 gegenüber dem Signal der Proben mit nichtspezifischer miRNA-Kontrolle bemessen (Abb. 11).

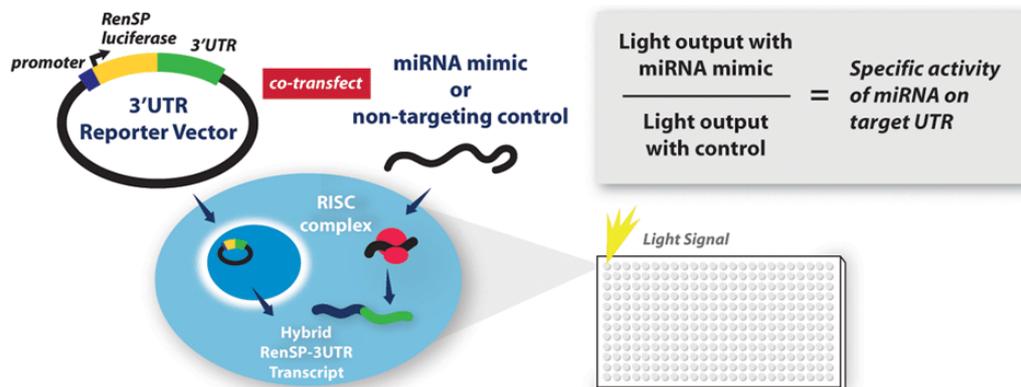


Abbildung 11: Luciferase-Assay Schema.

Eine Zelle wird mit einem Reportergenvektor, welcher neben dem Luciferase-Gen die 3'UTR Sequenz des Zielgens enthält, und einer MicroRNA kotransfiziert. Kommt es zur Bindung der miRNA an ihrer komplementären Ziel-3'untranslated region (UTR), wird das Ablesen des Luciferase-Gens inhibiert und es resultiert ein vermindertes Lumineszenzsignal. Als Negativkontrolle dient ein ACTB 3'UTR Kontrollvektor, dieser enthält keine Bindestellen, die eine komplementäre Bindung der zu untersuchenden miRNA-1279 erlauben.

Aus: <http://switchgeargenomics.com/products/utr-reporter-collection/description>

2.7.8 Transkriptomanalyse

2.7.8.1 Microarray-Technologie

Für die Analyse des Genexpressionsmusters auf mRNA-Ebene, stehen in der Molekularbiologie diverse Methoden zur Verfügung. Diese Methoden wie z.B die gebräuchlichste Methode der quantitativen RT-PCR erlauben allerdings nur die Untersuchung eines oder einiger wenige Gene pro Experiment [66], wohingegen die Anwendung von DNA-Hybridisierungsarrays synonym auch Microarrays genannt, den simultanen Durchsatz tausender Gene ermöglicht. Das zugrunde liegende Prinzip dieser Methode ist die Watson-Crick- Basenpaarung zwischen einzelsträngigen, an der Oberfläche einer Festphase (arrays) immobilisierten Oligonukleotiden (probes) und dazu komplementären im Inkubationsvolumen enthaltenden Nukleinsäuren (targets). Die zu untersuchende RNA wird hierbei zuerst in cDNA umgeschrieben, im Anschluss mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt, um nach der Hybridisierung über die jeweilige Lokalisation auf dem Chip identifiziert und anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals quantifiziert werden zu können.

2.7.8.2 Hochdichte Oligonukleotid-Arrays (Affymetrix GeneChip®)

Für die Transkriptomanalyse wurden die von der Firma Affymetrix (High Wycombe, UK) entwickelten High-Density GeneChips® Human Exon ST1.0 verwendet. Diese unterscheiden sich von anderen Microarrays durch eine bei der Chipproduktion gleichzeitige, photolithographische in-situ Synthese der Oligonukleotide (probes) auf dem Glasträger [67].

2.7.8.3 Experimentelles Design der Microarray-Analyse

Die RNA-Proben wurden entsprechend der Zellbehandlung in die beiden Zustände „mit miRNA-1279 Precursor (Pre-1279) transfiziert“ oder „mit scrambled miRNA (Pre-Neg) transfiziert“ definiert. Die Überexpression der Zellen mit „Pre-1279“ bzw. „Pre-Neg“ fand in Doppelbestimmung in den Konzentrationen 3nm, 10nm und 30nm statt, sodass sich die in Tab. 18 dargestellte Probenkonfiguration der 12 Targets ergab.

Tabelle 18: Targets der Mikroarray-Analyse

Pre-1279	Pre-Neg
3nm (Replikat A)	3nm neg. (Replikat A)
10nm (Replikat A)	10nm neg. (Replikat A)
30nm (Replikat A)	30nm neg. (Replikat A)
3nm (Replikat B)	3nm neg. (Replikat B)
10nm (Replikat B)	10nm neg. (Replikat B)
30nm (Replikat B)	30nm neg. (Replikat B)

2.7.8.4 Target Präparation

Nach Feststellung einer suffizienten Qualität der RNA-Proben erfolgte unter Nutzung des Ambion WT Expression Kits (Ambion, Schwerte) die Synthese der auf den Microarrays zu analysierenden Einzelstrang-cDNA (sense strand DNA). Diese cDNA

musste um eine erfolgreiche Hybridisierung auf den Arrays zu gewährleisten in einem zweiten Schritt unter Nutzung des WT Terminal Labeling Kits (Affymetrix, High Wycombe, UK) noch fragmentiert und mittels eines vom Hersteller gelieferten Reagens (ermöglicht kovalente Bindungen zu Biotin) markiert werden (Labeling). Zunächst wurden jeweils 250 ng RNA je Probe mittels reverser Transkription unter Nutzung von T7 Oligo(dT)Promotor-Primern gemäß des Herstellerprotokolls in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dazu erfolgte eine ca. zweistündige Inkubation der folgenden Reagenzien (Tab.19) im Thermocycler.

Tabelle 19: First-Strand cDNA Synthese

Master Mix (10µl):

- 4,0 µl First-Strand Buffer Mix
- 1,0 µl First-Strand Enzyme Mix
- 2,0 µl Poly-A RNA Control
- 3,0 µl RNA-Template

Tabelle 20: First-Strand cDNA Reaktionsschema

Heated lid temp.	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
Raumtemperatur	16°C, 60 min	65°C, 10 min	4°C, 2 min

Die Einzelstrang-cDNA wurde in doppelsträngige cDNA umgeschrieben, welche als Template der nachfolgenden in vitro Transkriptionsreaktion (IVT) zugeführt wurde. Dazu wurden zunächst folgende Reagenzien (Tab 21) zu den jeweils 10 µL an synthetisierter Erststrang-cDNA gegeben und für 70 min. im Thermocycler inkubiert (Tab.22). Wichtig bei diesem Schritt war die Präparation des Mastermixes auf Eis.

Tabelle 21: Second-Strand cDNA Synthese

Master Mix (60µl):

- 32,5 µl Nuclease-freies Wasser
- 12,5 µl Second-Strand Buffer Mix
- 5,0 µl Second-Strand Enzyme Mix
- 10,0 µl First-Strand cDNA

Tabelle 22: Second-Strand cDNA Reaktionsschema

Heated lid temp.	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
50°C	25°C, 60 min	42°C, 60 min	4°C, 2 min

Im anschließenden Schritt wurde aus der doppelsträngigen cDNA mittels der Methode der „in vitro Transkription“ [68] unter Nutzung einer T7-RNA-Polymerase und unter Einbau biotinmarkierter Nukleotide eine biotinylierte cRNA gewonnen. Anders als bei der cDNA-Synthese ist hierbei eine bis zu zweihundertfache Amplifikation des Templates möglich, da ein cDNA-Molekül mehrfach als Matrize für die Transkription genutzt werden kann. Die Inkubation der IVT-Reaktion erfolgte über Nacht (16h) bei 40 °C (Tab.24).

Tabelle 23: cRNA Synthese

Master Mix (90µl):

- 24 µl IVT Buffer Mix
- 6 µl IVT Enzyme Mix
- 60 µl Second-Strand cDNA

Tabelle 24: cRNA Reaktionsschema

Heated lid temp.	Schritt 1	Schritt 2
50°C	40°C, 16 h	4°C, hold

Nach Erhalt der cRNA wurde diese in einem nächsten Schritt noch von Salzen, Enzymen, anorganischen Phosphaten und nicht integrierten Nukleotiden aufgereinigt um die Stabilität der cRNA zu erhöhen. Hierzu wurden magnetische „Nucleic Acid Binding Beads“ und ein dazugehöriger Puffer des MagMAX™ Total Nucleic Acid

Isolation Kits (Ambion, Schwerte) verwendet, welche unter Nutzung eines Magnetständers die Separation der cRNA von den erwähnten Substanzen ermöglichen. Die erhaltene cRNA wurde mittels einer Waschlösung zweimal weiter aufgereinigt, bevor sie in eine auf ca. 55°C erhitze Elutionslösung aufgenommen wurde. Abschließend wurde photometrisch der (c)RNA-Gehalt der einzelnen Proben analysiert, bevor mit der finalen Sense-Strand cDNA-Synthese begonnen werden konnte.

Tabelle 25: cRNA Purifikation

Master Mix (210µl):

10 µl Nucleic Acid Binding Beads
50 µl Nucleic Acid Binding Buffer
90 µl cRNA
60 µl Isopropanol

2x 100 µl Nucleic Acid Wash Solution
40 µl Elution Solution

Nach Erhalt der aufgereinigten cRNA wurde diese auf eine Konzentration von 455 ng/µL (=10µg bei einem Gesamtvolumen von 22 µL) verdünnt und unter Nutzung von „Random Primers“ zu sense-strand cDNA transkribiert. Diese zeichnet sich durch den Einbau von dUTP in einer festen Relation aus, welche für die spätere Fragmentierung der cDNA von essentieller Bedeutung ist. Die Inkubation der Reaktion erfolgte für ca. 2h im Thermocycler (Tab.27), bevor die cDNA im letzten Schritt des Ambion WT Expression Kits der Aufreinigung zugeführt wurde.

Tabelle 26: Sense-Strand cDNA Synthese

Master Mix (40µl):

2 µl Random Primers
8 µl 2nd-Cycle Buffer Mix
8 µl 2nd-Cycle Enzyme Mix
22 µl cRNA (10µg)

Tabelle 27: Sense-Strand cDNA Reaktionsschema

Heated lid temp.	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
75°C	25°C, 10 min	42°C, 90 min	70°C, 10 min	4°C, 2 min

Im letzten Schritt zum Erhalt der für die Hybridisierung auf den Array-chips erforderlichen Sense-Strand cDNA wurde mittels der „RNase H“ das cRNA-template von der synthetisierten ss cDNA hydrolytisch abgespalten. Die Inkubation dieser Reaktion erfolgte für 50 min. im Thermocycler (Tab.29). Die so erhaltene einzelsträngige cDNA wurde anschließend in einem letzten Aufreinigungsschritt erneut mit magnetischen „Nucleic Acid Binding Beads“ von überschüssigen Enzymen, Salzen und nicht integrierten Nukleotidtriphosphaten entfernt.

Tabelle 28: RNase Hydrolyse & Sense-Strand cDNA Purifikation

Master Mix (42µl):

40 µl Sense-Strand cDNA

2 µl RNase H

10 µl Nucleic Acid Binding Beads

50 µl Nucleic Acid Binding Buffer

Tabelle 29: RNase Hydrolyse Reaktionsschema

Heated lid temp.	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
75°C	37°C, 45 min	95°C, 5 min	4°C, 2 min

2.7.8.5 Target Hybridisierung

Im Zuge der weiteren Prozessierung der einzelsträngigen Sense-Strand cDNA war zunächst deren Fragmentierung vonnöten, da kurze cDNA-Fragmente (targets) eine effektivere Basenpaarung zu den auf den arrays befestigten, genspezifischen Oligonukleotiden (probes) ermöglichen. Dazu wurden gemäß des „GeneChip® WT Terminal Labeling and Hybridization“-Protokolls 5,5 µg an cDNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 31.2 µL gebracht. Im Anschluss wurde der „Fragmentation Master Mix“ präpariert (Tab.30) und die gesamte Reaktionslösung eine Stunde im Thermocycler inkubiert (Tab.31). Die bei der ss-cDNA Synthese zuvor artifiziell eingebauten Uracil-Basen fungierten für die nun genutzte Uracil DNA Glycosylase (UDG) als Zielsequenzen einer hydrolytischen Abspaltung. Das ebenfalls in diesem Schritt genutzte “APE 1-Enzym” komplementierte die Fragmentierung durch eine zusätzliche Abspaltung des Phosphodiestergrundgerüsts an den von Uracil befreiten Stellen der cDNA. Somit ergaben sich am Ende dieser Reaktion Sense-Strand cDNA Fragmente mit einer Basenlänge von ca. 20-200.

Tabelle 30: Fragmentierung

Master Mix (48µl):

31,2 µl	Sense-Strand cDNA
10,0 µl	RNase-freies Wasser
4,8 µl	cDNA Fragmentation Buffer (10x)
1,0 µl	UDG, 10 U/µL
1,0 µl	APE 1, 1000 U/µL

Tabelle 31: Fragmentierung Reaktionsschema

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
37°C, 60 min	93°C, 2 min	4°C, 2 min

Bevor mit der Hybridisierung der erhaltenen cDNA-Fragmente begonnen werden konnte, mussten diese für ihre Detektion auf den Microarrays im nächsten Schritt zunächst mit der vom Hersteller gelieferten „DNA Labeling“ Reagenz „gefärbt“ bzw. markiert werden. Hierzu wurde der entsprechende Master Mix (Tab.32) präpariert und zusammen mit der fragmentierten DNA für ca. 70 min im Thermocycler inkubiert (Tab.33).

Tabelle 32: Terminal Labeling

Master Mix (60µl):

- 45 µl Fragmentierte cDNA
- 12 µl TdT Buffer (5x)
- 2 µl TdT
- 1 µl DNA Labeling Reagent (5mM)

Tabelle 33: Terminal Labeling Reaktionsschema

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
37°C, 60 min	70°C, 10 min	4°C, 2 min

Unter Nutzung der fragmentierten und markierten Targets wurde im nächsten Schritt der Hybridisierungscocktail (Tab.34) vorbereitet. Dieser wurde bei 99°C für 5 Minuten erhitzt, anschließend für weitere 5 Minuten auf 45°C heruntergekühlt und abschließend bei maximaler Geschwindigkeit eine Minute lang zentrifugiert. Die GeneChip ST Arrays wurden unmittelbar vor Nutzung bei Raumtemperatur äquilibriert. Der jeweilige Array wurde entsprechend der zu analysierenden Probe beschriftet, bevor 200 µl des Hybridisierungscocktails in den Array durch das Septum injiziert wurden. Die Hybridisierung der Arrays erfolgte für 17 Stunden bei 45°C und 60 rpm im Hybridisierungssofen 640 (Affymetrix, High Wycombe).

Tabelle 34: Hybridisierungscocktail

Master Mix (220µl):

60,0 µl	Fragmented & Labeled DNA Target (1,5 µg)
3,7 µl	Control Oligonucleotide B2 (3 nM)
11,0 µl	Eukaryotic Hybridization Controls (20x)
110,0 µl	Hybridization Mix (2x)
15,4 µl	DMSO
19,9 µl	Nuklease-freies Wasser

2.7.8.6 Waschen und Färben der Arrays

Nach der Hybridisierung wurde der Hybridisierungscocktail aus den Genechips abpipettiert und bei -20° C gelagert. Unter Nutzung des GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kits (Affymetrix, High Wycombe) wurden die Arrays in einer Fluidics 450 Waschstation (Affymetrix, High Wycombe) nach einem vorgegebenen Programm mit deionisiertem Wasser und den Puffern des Kits gewaschen sowie zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals mit den gelieferten "Stain Cocktails" inkubiert. Zwischen den einzelnen Färbeschritten als auch abschließend wurden die Arrays gewaschen, um nicht gebundene und nicht genügend komplementäre Targets zu entfernen. Die gewaschenen und gefärbten GeneChips wurden bis zum Auslesen zum Schutz vor Lichteinfall in Alufolie und bei 4°C gelagert.

2.7.8.7 Scannen des Genechips

Bis zu 48 Chips wurden zeitgleich in den GeneChip® AutoLoader (Affymetrix, High Wycombe) platziert und mittels des GeneChip® Scanners 3000 7G (Affymetrix, High Wycombe) bei 570 nm (Anregungswellenlänge: 532 nm) eingescannt und gespeichert. Hierbei wird vom Scanner anhand des Lasers, der die gefärbten Targets zum Fluoreszieren bringt und eines Detektors zuerst eine Datei mit Bilddaten erzeugt (DAT-Datei). Die Auflösung des Scanners ist größer als die Ausdehnung der einzelnen mit Target-Proben hybridisierten Zellen des Genechips. Dies begründet sich durch die auf jedem Array randständig angebrachten B2 Oligonukleotide, die mit im Hybridisierungscocktail enthaltenen, und nicht mit dem zu analysierenden Genom

homologen Oligonukleotiden, hybridisieren. Dadurch wird ein virtuelles Gitter auf die Bilddaten gelegt, welches ermöglicht für jede Zelle des Chips eine Durchschnittsintensität der Bildpixel zu ermitteln und in einer Datei mit Intensitätsdaten zu hinterlegen (CEL-Datei). Die durchschnittliche Intensität wird als Ausgangswert der nachfolgenden Datenanalyse durch die Software genutzt.

2.7.8.9 Datenanalyse

Alle Microarray-Analysen wurden in der statistischen Programmierumgebung *R* (<http://www.R-project.org>) durchgeführt. Unter Verwendung des R-Paketes *xps* wurden die Microarrays aller Proben eingelesen und prä-prozessiert. Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden die gemessenen Intensitäten aller Gene normalisiert und \log_2 -transformiert. Die differentielle Genexpression wurde mit einem *moderated t-test* nach Smyth (Smyth GK (2004) "Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments," *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*: Vol. 3 : Iss. 1, Article 3.) unter Verwendung des Paketes *limma* berechnet. Zur Berücksichtigung multipler Tests wurde die *false discovery rate* (FDR) berechnet und das Signifikanzniveau auf eine $FDR \leq 0,05$ festgelegt.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Proteinextraktion

Die THP-1 Zellen wurden aus den Zellkulturplatten in Falcon Tubes (15ml) überführt und für 3 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert (1000 rpm). Das Pellet wurde in PBS aufgenommen und in ein beschriftetes 1,5ml Tube überführt (Eppendorf, Hamburg). 300 μ l RIPA Lysepuffer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) ergänzt durch 1% Protease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) and 1% 0,5M EDTA Lösung (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) wurden hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Sonifizierung der Tubes für 12 Sekunden mit einer Intensität von 40%. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Großteil des Überstands in ein neues 1,5 ml Tube überführt und mit Protein-Ladepuffer versetzt (4x). Das Proteinlysate wurde bei -20° C eingelagert. 50 μ l des Überstands nach Sonifizierung wurden in ein separates 1,5 ml Tube aufgenommen und der Proteinkonzentrationsbestimmung zugeführt.

2.8.2 Proteinquantifikation

Die Gesamtproteinkonzentration wurde unter Nutzung des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific, Schwerte) bestimmt. Dieser beruht auf der Biuret-Reaktion, also der Reduktion von Kupfer-Kationen durch Proteine in einem alkalischen Medium. In Anwesenheit von BCA (Bicinchoninic Acid) bilden diese Kationen einen Komplex, der eine hohe Lichtabsorption, linear zum Proteingehalt der Messlösung, aufweist. Bovines Serum Albumin (BSA) wurde zur Erstellung einer Standardkurve (25µg/ml-2000µg/ml) verwendet, um den unbekanntem Proteingehalt der THP-1-Proben mittels linearer Regressionsanalyse zu berechnen. 25 µl an BSA-Standard bzw. Probe wurden auf einer 96-Well Platte (Bio-Rad, München) mit 200 µl Working Reagent des Kits pro Well für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Messung der Absorption aller Proben auf der Platte erfolgte innerhalb von 10 min im Spektralphotometer bei 562nm.

2.8.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zunächst wurden die mit Lämmli-Ladepuffer versetzten Proteinproben für 5 min. bei 95°C denaturiert. Das im Puffer enthaltene Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) verleiht den Proteinen eine negative Ladung und ermöglicht eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Masse im elektrischen Feld. Das noch liquide Trenngel (Tab. 35) wurde zwischen zwei durch Abstandhalter (1,5 mm) getrennte Glasplatten der Mini-PROTEAN® Elektrophorese-Zelle der Firma Bio-Rad (München) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Trenngels (ca. 25 min.) wurde dieses nach Entfernung des Isopropanols mit dem zubereiteten Sammelgel (Tab. 35) überschichtet, in welches zusätzlich ein Kamm zur Ausbildung der Geltaschen zwecks Probenauftragung, gesteckt wurde. Nach ca. 15 min wurde das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt, der Kamm gezogen, die Taschen mit Puffer ausgewaschen und 15 µg an Proteinprobe je Tasche aufgetragen. Zusätzlich wurden zur Bestimmung der Proteingröße die Größenmarker PageRuler Unstained/Prestained (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) in 2 Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 90 min. bei 120 V.

Tabelle 35: SDS-Gele

Trenngel 12 % (20ml):

9 ml H₂O
5 ml Separationspuffer (pH 8,8)
6 ml Acrylamid (40%)
100 µl APS (10%)
35 µl TEMED

Sammelgel 4,5% (10ml):

6,4 ml H₂O
2,5 ml Sammelpuffer (pH 6,8)
1,1 ml Acrylamid (40%)
100 µl APS (10%)
35 µl TEMED

Tabelle 36: Puffer

Separationspuffer (pH 8,8 mit HCL):

3,0 g EDTA
181,7 g Tris
4 g SDS
1 L Aqua dest.

SDS-Laufpuffer (10x):

30,2 g Tris
144 g Glycin
7,4 g EDTA
10g SDS
1 L Aqua dest.

Blockpuffer:

100 ml TBST (1x)
5 g Milchpulver

Sammelpuffer (pH 6,8 mit HCL):

3,0 g EDTA
60,6 g Tris
4 g SDS
1 L Aqua dest.

Transferpuffer (Semi-Dry):

50 ml Tris (1M)
50 ml Methanol
200 ml Glycin (0,2 M)
4 ml SDS (10%)
696 ml Aqua dest.

TBS (10x pH 7,6 mit HCL):

24,2 g Tris-Base
80,0 g NaCl
1 L Aqua dest.

2.8.4 Proteintransfer (Semi-Dry Western Blot)

Der Transfer der durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte im Semi-Dry Blotting-Verfahren mittels des Trans-Blot Semi-Dry Geräts (Bio-Rad, München). In Sandwichtechnik wurden auf die Anodenfläche des Blottingapparats zunächst 3 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Darauf wurden vorsichtig die Nitrozellulosemembran und das Gel gelegt und abschließend wieder 3 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere. Der Transfer erfolgte für 30 min. bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Membran (128 mA für 4 Gele zeitgleich). Die Effektivität des Western Blottings wurde durch eine Anfärbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau-Rot Lösung für 5 min. überprüft.

2.8.5 Proteindetektion

Die mit Ponceau gefärbte Membran wurde dreimal für ca. 15 min. mit TBST (1x) entfärbt und anschließend zweimal jeweils eine halbe Stunde mit Blockpuffer bei Raumtemperatur geblockt. Die geblockte Membran wurde über Nacht bei 4°C unter kontinuierlichem Schütteln in 5 ml Primärantikörperlösung (Tab.37) inkubiert. Nach einem Waschvorgang von 3x 15 min. in TBST (1x) wurde die Membran für 2h bei Raumtemperatur in fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörperlösung (Tab. 37) inkubiert und erneut wie beschrieben gewaschen. Nach einer fünfminütigen Inkubation der Membran mit Pierce ECL Western Blotting Substrat (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) erfolgte die Entwicklung unter Nutzung von Autoradiographiefilmen (GE Healthcare, Freiburg). Die densitometrische Analyse wurde mittels des Programms „ImageJ“ durchgeführt und das Expressionslevel von Lysozym auf GAPDH normalisiert.

Tabelle 37: Antikörperlösungen

Primärantikörperlösung (1/5000):	5 ml Blockpuffer 1 µl Anti-LYZ oder Anti-GAPDH
Sekundärantikörperlösung (1/10000):	5 ml Blockpuffer 0,5 µl Anti-Rabbit

2.8.6 2D-Gel Analyse & MALDI-TOF Massenspektrometrie

Ein potenzieller regulatorischer Effekt der MicroRNA 1279 auf die Proteinlevel der Kandidatengene als auch auf mögliche weitere Gene wurde in Kooperation mit der Pariser "Plateforme Post-génomique de la Pitié Salpêtrière - P3S" der Universität Pierre et Marie Curie (UPMC) mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht. Hierzu erfolgte in sechsfacher Ausführung eine Proteinextraktion aus THP-1 Zellen entsprechend des beschriebenen Schemas nach vorheriger Transfektion mit 10nm miRNA-1279 Precursorn respektive der miRNA-Negativkontrolle. Die eingeschickten Proteinlysate wurden vom Kooperationspartner zunächst mittels der Cyan-Farbstoffe „Fluoprobes“ der Firma Interchim (Montluçon, Frankreich) markiert (Cy2 für den internen Standard BSA, Cy3 für Kontrollproben und Cy5 für transfizierte Proben).

Die Separation der 12 Lysate erfolgte in der ersten Dimension entsprechend des pH-Werts bis zum Erreichen des isoelektrischen Punkts. Hierzu wurden 6 jeweils 24 cm lange pH 3-10 NL- Strips der Firma GE Healthcare (Uppsala, Sweden) 16 Stunden lang mit einem Mix aus einer Kontrollprobe, einer transfizierten Probe, einem Aliquot an internem Standard (BSA) und Rehydrationspuffer inkubiert. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei 20°C und insgesamt 85700 Vh unter Nutzung des Ettan II IPGphor Systems (GE Healthcare). Anschließend wurden die Strips in 12 % SDS Polyacrylamid-Gele gegeben und über Nacht unter Nutzung des Ettan DALT 6 Elektrophorese-Systems (GE Healthcare) entsprechend ihres Molekulargewichts in der zweiten Dimension separiert. Nach der Migration wurden die Gels mittels Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) gescannt, um jeweils 3 Bilder pro Gel zu generieren. Die Bildanalyse erfolgte unter Nutzung des „Differential In-gel Analysis“ (DIA) Moduls der Software „DeCyder 6.5“ (GE Healthcare). Dabei wurde zur Proteinquantifikation eine Ratio der Cy2 Bilder des internen Standards mit den Cy3 und Cy5 Signalen der Proteinspots gebildet. Zur statistischen Analyse wurde das Extended Data Analysis (EDA) Modul der Software genutzt. Dabei wurden nur Spots ausgewählt, die in 75% der Gele präsent waren. Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse sowie ein T-Test zwischen den beiden Gruppen (Kontrolle versus Transfektion) durchgeführt. Nur

Proteinspots mit einem p-Wert kleiner 0.05 im T-Test und einer Ratio höher als 1,4 wurden der Proteinidentifikation zugeführt.

Diese Identifizierung erfolgte nach einer Silberfärbung zur Visualisierung der Proteine und dem Verdau des Gels zum Erhalt einer zu analysierenden Peptidlösung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Dieses Verfahren kombiniert die **Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung** (MALDI) mit einer Analyse der Flugzeit (engl. *time of flight*, TOF) freigesetzter Ionen zur Massenspektrometrie [69]. Dabei wurden 0.8 µl Peptidprobe mit 0.8 µl des unterstützenden Matrixmaterials HCCA (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) versehen und auf einem Träger fixiert. Ein Laser-Strahl löst Moleküle aus der Probe (Desorption) wobei die Abgabe oder Annahme von Protonen die gelösten Moleküle zu Ionen wandelt [70]. Diese wurden in einem Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland) beschleunigt und ihre jeweilige TOF registriert. Diese Flugzeit (TOF) der Ionen steht in folgender Relation zu ihrer Masse (m) und ihrer Ladungszahl (z):

$$\mathbf{tof} \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Abbildung 12:

Relation TOF (time of flight) zu Masse (m) und Ladungszahl (z) der Proteinionen.

Aus:https://wikimedia.org/api/rest_v1/media/math/render/svg/1515f723f0a9593b00ebf2bd612bdd0da3d6b68e

Die Proteinidentifikation konnte mittels der massenspektrometrisch erhaltenen Daten unter Nutzung der Mascot Software 2.2.07 (Matrix Science, London, UK) und dem *Homo sapiens* Proteom-Set (Version 2013-09, mit 20346 Sequenzen) der Uniprot/SwissProt Datenbank, erfolgen.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Regulation von *LYZ* durch miRNA-1279 mittels Reporter-gen-Assay

Zur Überprüfung einer potenziellen Regulation des *LYZ*-Gens durch Bindung der miRNA-1279 an die 3'untranslatierte Region des *LYZ*-Zieltranskripts wurden zwei verschiedene *LYZ*-Reporter-genkonstrukte verwendet (Abb. 13). Zum einen der käuflich erworbene Vektor mit der gesamten *LYZ*-3'UTR Sequenz (1197 BP) und zwei putativen miRNA-1279 Bindestellen (Position siehe Material), im Folgenden als „*LYZ* Long 3'UTR“ genannt. Zur vergleichenden Analyse wurde ein zweiter Reporter-genvektor mit einer verkürzten (738 BP) *LYZ*-3'UTR Sequenz und nur einer putativen miRNA-1279 Bindestelle, im Folgenden als „*LYZ* Short 3'UTR“ definiert, kloniert.

Zur Überprüfung Vektor-unspezifischer Effekte wurde ein Negativkontrollvektor mit der 3'UTR-Sequenz des *ACTB*-Gens, benutzt. Um auf nicht miRNA-1279-spezifische Effekte zu kontrollieren, erfolgte die Kotransfektion der Reporter-genvektoren mit der miRNA-Negativkontrolle (scrambled control) analog zur „pre-miR-1279“.

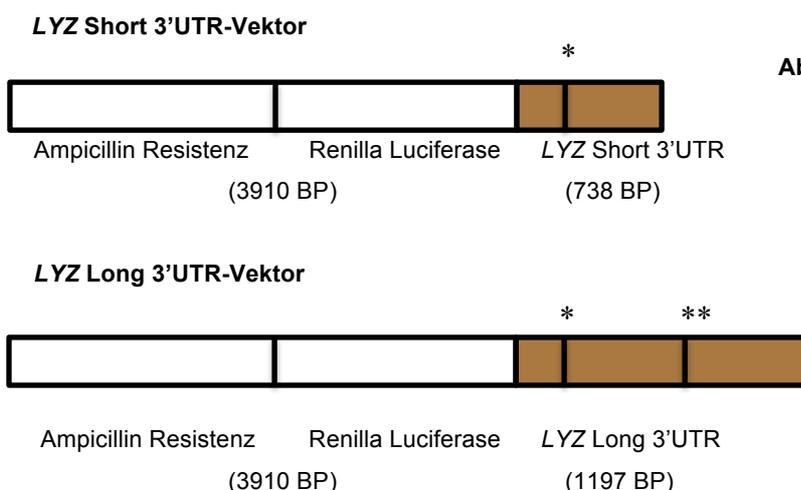


Abb. 13: *LYZ* Reporter-genkonstrukte.

Oben: Klonierter Vektor mit kurzer *LYZ* 3'UTR und einer putativen TargetScan miR-1279 Bindestelle (*). Unten: Bezogener Vektor mit kompletter *LYZ* 3'UTR und zusätzlicher in Genombrowsern postulierter miR-1279 Bindestelle (**).

Nach Kotransfektion der Reporter-genektoren und pre-miR-1279 bzw. pre-miR Negativkontrolle in HUVEC-Zellen erfolgte die Auslesung der Zellkulturplatten im Luminometer (siehe Abs. 2.7.7.8). Eine Bindung der MicroRNA-1279 an eine putative Bindestelle in der *LYZ*-3'UTR der Reporter-genektoren würde in einer Inhibition der Luciferaseexpression und somit verringerten Lumineszenz resultieren. Diese verringerte Lumineszenz ließ sich für den *LYZ* Long 3'UTR Vektor signifikant ($p=0,0002$, $n=4$) nachweisen (Abb.14). Hier zeigte sich eine Reduktion der Luciferase-Lumineszenz von 35% bei Überexpression von miRNA-1279. Dabei betrug der absolute Lumineszenzwert des *LYZ* Long 3'UTR Vektors kotransfiziert mit pre-miR-1279 durchschnittlich 661, für die Kotransfektion des gleichen Vektors mit der scrambled miRNA Negativkontrolle ergab sich im Durchschnitt ein Lumineszenzwert von 1015. Für den *LYZ* Short 3'UTR Vektor mit nur einer postulierten miR-1279 Bindestelle zeigte sich kein signifikanter Effekt der MicroRNA-1279 Überexpression. Der *ACTB*-Negativkontrollvektor zeigte wie erwartet ebenfalls keinerlei Regulation durch miRNA-1279 (absolute Lumineszenzwerte der Kontransfektion des *ACTB*-Vektors mit pre-miR-1279 bzw. scrambled Kontrolle = 1068 bzw. 1028). Aus der Messung des Luciferase-Assays ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die im Vektor *LYZ* Long 3'UTR vorhandene Sequenz GCAATATGAA als potentielle Bindestelle für miR-1279 fungiert.

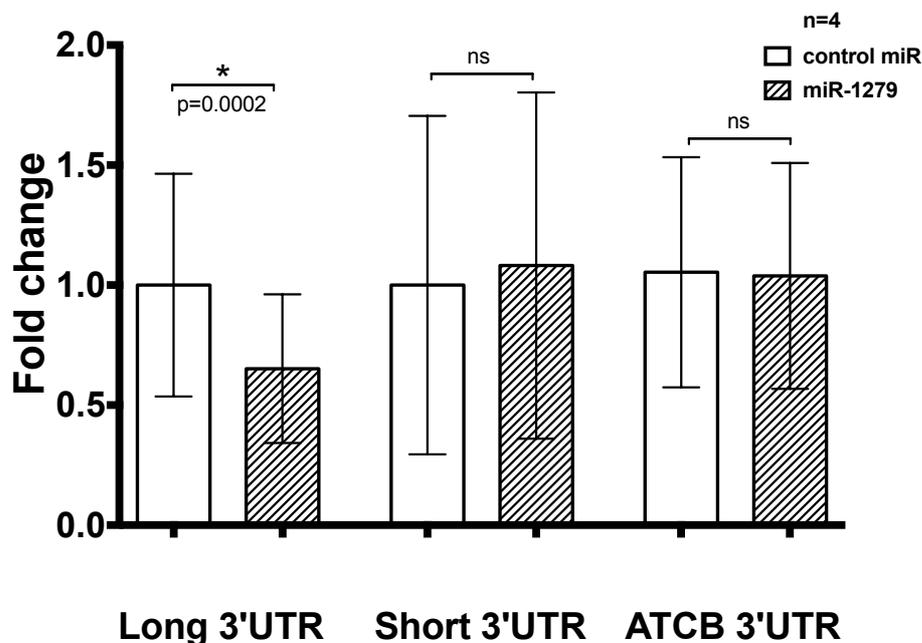


Abb. 14: Luciferase-Assay Analyse zur Untersuchung der putativen Bindung von miR-1279 an *LYZ*. Die Lumineszenzwerte wurden ins Verhältnis zum durch miR-1279 nicht beeinflussten Negativkontrollvektor *ACTB* gesetzt. Es zeigte sich eine Reduktion der Lumineszenz von 35% des *LYZ* -Long 3'UTR Vektors durch die MicroRNA-1279. Der klonierte Vektor *LYZ*-Short 3'UTR zeigte keine Beeinflussung durch miR-1279 Überexpression. Dargestellt sind die Daten aus 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ($n=4$).

3.2 Untersuchung der Rolle von miRNA-1279 auf mRNA-Ebene als Regulator eines Genregulons

3.2.1 Überexpression von miRNA-1279 und Durchführung einer Genexpressionsanalyse

Die MicroRNA 1279 zeigte im Luciferase-Assay eine potentielle Bindung an die 3'UTR von *LYZ*. In den Vorarbeiten von Greliche et al. und Fairfax et al. wurde postuliert, dass ein Genregulon, bestehend aus *LYZ*, *YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *LRRFIP1*, *NOD1*, *PCDHA6*, *KRT9*, *ST5* und *TRAF3IP2*, einer gemeinsamen Regulation untersteht. Um zu überprüfen, ob miRNA-1279 als ein solcher gemeinsamer Regulator fungiert, erfolgte zunächst eine Überexpression von miR-1279 in THP-1 Zellen. Diese erfolgte durch Transfektion der Zellen mit der Precursor-Vorstufe „pre-miR-1279“ sowie der scrambled Negativkontrolle (siehe Abs. 2.7.1). Mittels quantitativer real-time PCR wurden entsprechend eine erfolgreiche und suffiziente Überexpression mit den pre-miR Konzentrationen 10nm und 30nm nachgewiesen (Abb. 15), die anschließenden Experimente wurden ausschließlich mit diesen Konzentrationen durchgeführt.

Es konnte eine signifikante ($p \leq 0,01$) Erhöhung der relativen Genexpression von miRNA-1279 auf das über 300 fache - im Vergleich zu den mit der Negativkontrolle transfizierten THP-1-Zellen - festgestellt werden. Die Methode der liposomalen Transfektion von MicroRNA Precursoren eröffnete schlussfolgernd eine valide Möglichkeit, mittels Überexpression die Rolle der miRNA-1279 als multi-lokus Regulator in Genexpressionsstudien zu untersuchen.

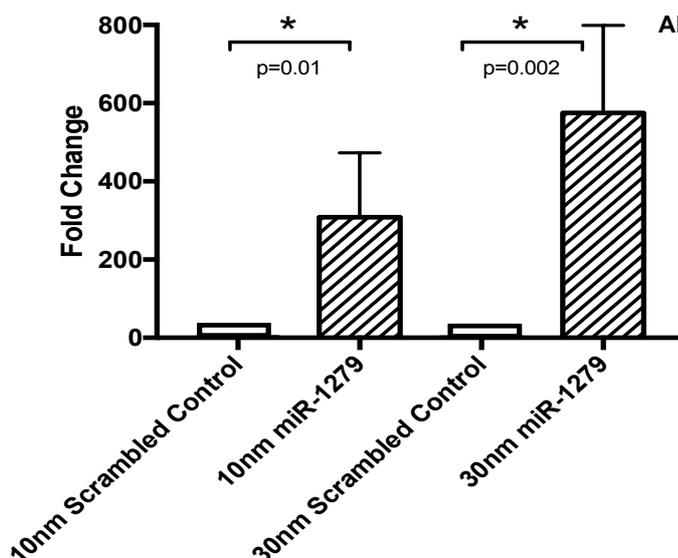


Abb.15: Überexpression von miR-1279. Nach Transfektion der Zellen mittels Precursor bzw. Negativkontrolle zeigt sich in der qPCR-Auswertung eine mehr als 300fache höhere Expression von miR-1279 bei den mit 10nm pre-miR transfizierten Zellen im Vergleich zur Scrambled Kontrolle. Bei Transfektion von 30nm pre-miR war eine ca. 600- fache Überexpression zu beobachten.

Um die postulierte gemeinsame Regulation der Kandidatengene durch miRNA-1279 zu untersuchen, wurden aus den mit 10nm und 30nm pre-miR-1279 überexprimierten Zellen die RNA isoliert und die Proben einer quantitativen Analyse mittels RT-PCR zugeführt (Abs. 2.7.5 & 2.7.6). Sollte die MicroRNA, wie in Säugerzellen üblich, zu einer Translationsinhibierung anstelle einer Degradierung der mRNA führen, würde dies in einer auf mRNA-Ebene unveränderten Genexpression von *LYZ* resultieren. Es würden sich weiterführende Analysen auf Proteinebene empfehlen, um einen Effekt der miRNA-1279 auf die Translation zu evaluieren. Weiterhin könnten in der Genexpressionsanalyse den Vorarbeiten entsprechend, trans-regulatorische Effekte auf die Expression der anderen Kandidaten des miRNA-1279 Genregulons beobachtet werden.

Nach Durchführung der qPCR konnten nach 40 Zyklen 4 der 11 Gene des Regulons (*CNTN6*, *KRT9*, *ST5* und *TRAF3IP2*) nicht detektiert werden, sie weisen dementsprechend eine zu niedrige Expression in dem monozytären Vorläuferzelltyp "THP-1" aus. Für die detektierbaren Gene des Regulons (*LYZ*, *YEATS4*, *COPZ2*, *NOD1*, *LRRF1P*, *CRTC* und *PCDHA6*) konnte nach Normalisierung auf die *RPL37*-mRNA (Housekeeper) keine signifikant veränderte Expression nach miRNA-1279 Überexpression nachgewiesen werden (Abb.16 & 17).

Schlussfolgernd ergab sich auf mRNA-Ebene kein nachweisbarer regulatorischer Effekt der miRNA-1279 für das Genregulon. Die weiteren Analysen zur Rolle der miRNA-1279 als multi-lokus Regulator fanden auf Proteinebene statt.

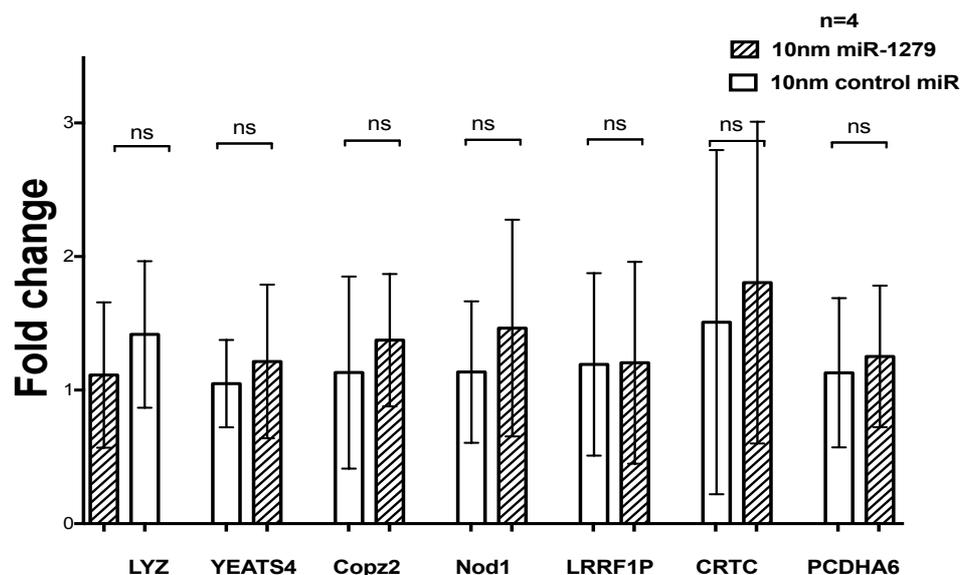


Abb. 16: qPCR Expressionsprofil der Kandidatengene nach 10nm pre-miR-1279 Überexpression. Die Expressionsdaten wurden auf den durch miRNA1279 nicht regulierten Housekeeper *RPL37* normalisiert. Für kein Kandidatengen zeigte sich eine signifikante Regulation der Expression im Vergleich von pre-miR 1279- und scrambled Kontrollproben. Dargestellt sind die Daten aus 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n=4).

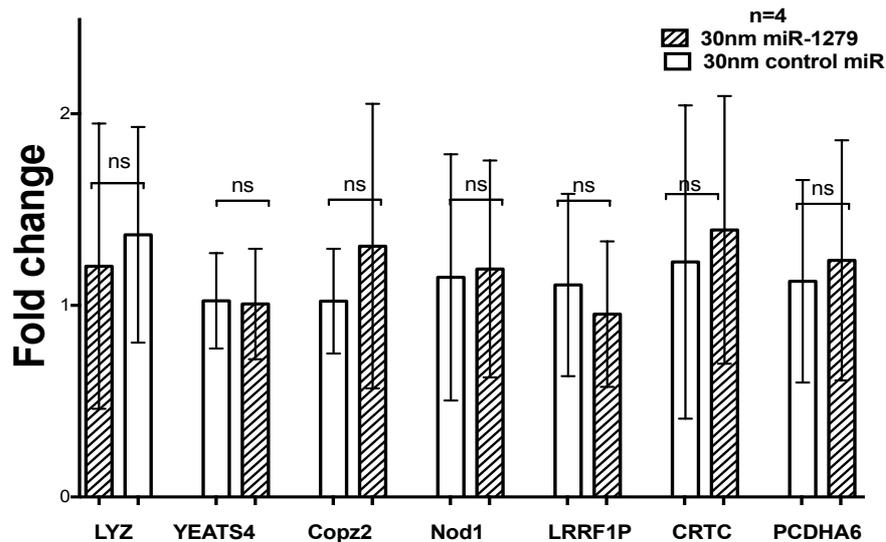


Abb. 17: qPCR Expressionsprofil der Kandidatengene nach 30nm pre-miR-1279 Überexpression. Die Expressionsdaten wurden auf den durch miRNA1279 nicht regulierten Housekeeper *RPL37* normalisiert. Für kein Kandidatengenen zeigte sich eine signifikante Regulation der Expression im Vergleich von pre-miR 1279- und scrambled Kontrollproben. Dargestellt sind die Daten aus 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n=4).

3.2.2 Überexpression von miRNA-1279 und Durchführung einer Microarray-Analyse

Um potentielle weitere Kandidatengene der miRNA-1279 zu identifizieren, als auch um die Befunde der qPCR-Analyse bezüglich der postulierten Kandidatengene des miRNA-1279 Regulons zu validieren, wurde eine genomweite Transkriptomanalyse mittels Microarray-Chips durchgeführt (Details Abs. 2.7.8).

Dazu erfolgte zunächst wie bereits in der Genexpressionsanalyse die Überexpression von miR-1279 in den THP-1 Zellen mit 10nm und 30nm „pre-miR-1279“ bzw. der scrambled Negativkontrolle (s. Abb. 15).

In der Datenanalyse zeigten sich für das *LYZ*- Gen in den THP-1 Zellen die höchsten Expressionswerte (Durchschnittsexpression = 12) im Vergleich zu den übrigen Kandidaten (Signifikanzniveau $p=0,05$). Es konnte allerdings für keins der postulierten Kandidatengene eine signifikant differentielle Expression zwischen den pre-miR-1279 transfizierten Proben und der jeweiligen Negativkontrolle nachgewiesen werden, unabhängig von der Konzentration der pre-miR-1279 Überexpression. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden der qPCR-

Expressionsanalyse des Genregulons, wo sich ebenfalls keine miR-1279 vermittelte Regulation auf mRNA-Ebene zeigte.

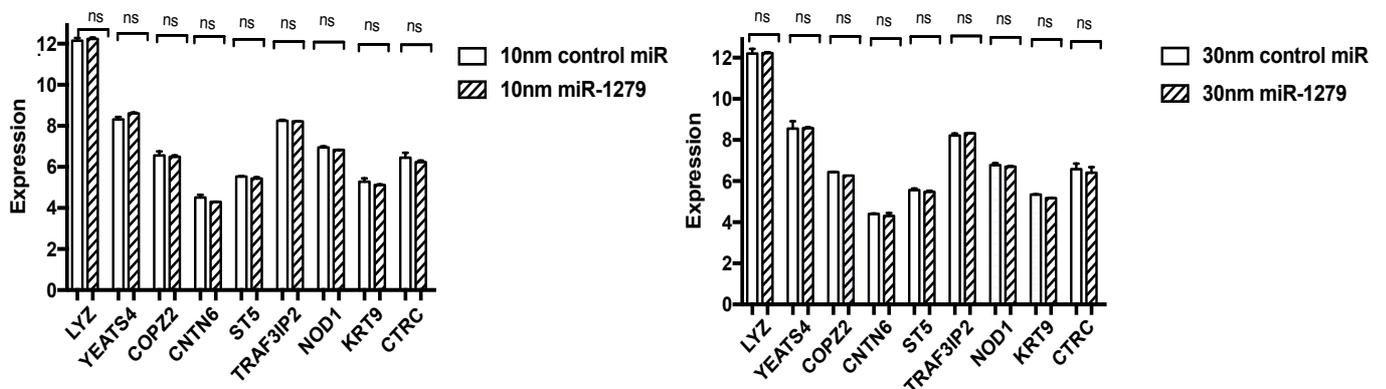


Abb.18: Micro-Array Expressionsprofil der Kandidatengene. Nach Überexpression mit 10 und 30nm pre-miR-1279 bzw. scrambled Negativkontrolle zeigte sich keine signifikante Regulation der Kandidatengene in der Auswertung der Transkriptomdaten.

Die Auswertung der Microarray-Daten zeigte für die mittels pre-miR-1279 transfizierten Zellen eine differentielle Expression von 35 Genen (Signifikanzniveau $p=0,05$), welche nicht dem in den Vorarbeiten postulierten miR-1279-Genregulon angehören. Dabei wurde bei 22 Genen (63%) eine vermehrte Expression (positiver Fold Change) und bei 13 Genen (37%) eine herunterregulierte Expression festgestellt (Abb. 19). Die höchste statistische Signifikanz zeigten dabei die Gene *LYRM5*, *ZDHHC20*, *MIA3* und *C3ORF51* mit p -Werten $< 10^{-5}$. Für einige Gene war ein dosisabhängiger Effekt erkennbar, die Höhe der differentiellen Genexpression korrelierte hier mit der Höhe der pre-miR-1279 Überexpression (30nm>10nm). Dies war der Fall bei *HIST1H2BB*, *MCART1*, *MIA3* & *PRKRIR*. Eine höhergradige differentielle Expression (Fold Change >2) zeigte sich insbesondere bei den Genen *CHAC1*, *SPP1* und *TDO2* (Abb.19). Diese Gene zeichneten sich, ob direkt oder indirekt durch die miR-1279 Überexpression vermittelt, durch einen mehr als doppelt veränderten Expressionsgrad bezogen auf die Kontrollproben aus.

P-Wert	Fold Change	Gen	Genbeschreibung
$2,56 \cdot 10^{-06}$	1,628	LYRM5	LYR motif containing 5
$3,56 \cdot 10^{-06}$	1,853	ZDHHC20	zinc finger, DHHC-type containing 20
$4,75 \cdot 10^{-06}$	1,587	MIA3	melanoma inhibitory activity family, member 3
$5,49 \cdot 10^{-06}$	-1,592	C3ORF51	chromosome 3 open reading frame 51
$1,13 \cdot 10^{-05}$	1,655	VANGL1	vang-like 1 (van gogh, Drosophila)
$2,20 \cdot 10^{-05}$	1,634	GCFC1	chromosome 21 open reading frame 66
$2,30 \cdot 10^{-05}$	-1,527	DSCR10	Down syndrome critical region gene 10

2,57*10 ⁻⁰⁵	1,512	GTF2B	general transcription factor IIB
4,45*10 ⁻⁰⁵	-1,533	AHSP	erythroid associated factor
5,77*10 ⁻⁰⁵	1,577	ZNF706	zinc finger protein 706
6,65*10 ⁻⁰⁵	-1,571	DEFB132	defensin, beta 132
7,08*10 ⁻⁰⁵	-1,508	GHRH	growth hormone releasing hormone
9,01*10 ⁻⁰⁵	1,566	PRKRIR	protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor)
9,53*10 ⁻⁰⁵	1,601	TAS2R43	taste receptor, type 2, member 43
1,96*10 ⁻⁰⁴	1,618	MCART1	mitochondrial carrier triple repeat 1
2,89*10 ⁻⁰⁴	-2,019	CHAC1	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)
2,97*10 ⁻⁰⁴	-1,530	PACS2	phosphofurin acidic cluster sorting protein 2
3,21*10 ⁻⁰⁴	1,513	HIST1H2BB	histone cluster 1, H2bb
6,27*10 ⁻⁰⁴	-1,553	KRTAP20-2	keratin associated protein 20-2
9,90*10 ⁻⁰⁴	-1,581	SESN2	sestrin 2
1,26*10 ⁻⁰³	1,723	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
1,84*10 ⁻⁰³	-1,533	OR2K2	olfactory receptor, family 2, subfamily K, member 2
2,03*10 ⁻⁰³	-1,549	DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4
3,19*10 ⁻⁰³	-1,514	STAP1	signal transducing adaptor family member 1
3,35*10 ⁻⁰³	1,512	EIF4B	similar to eukaryotic translation initiation factor 4H; eukaryotic translation initiation factor 4B
7,96*10 ⁻⁰³	2,469	SPP1	secreted phosphoprotein 1
1,10*10 ⁻⁰²	-1,518	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11
1,20*10 ⁻⁰²	1,583	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6
1,62*10 ⁻⁰²	1,745	OLR1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
1,64*10 ⁻⁰²	2,387	TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase
1,77*10 ⁻⁰²	1,555	SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
2,22*10 ⁻⁰²	1,781	FN1	fibronectin 1
2,60*10 ⁻⁰²	1,987	MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
2,99*10 ⁻⁰²	1,650	GPNMB	glycoprotein (transmembrane) nmb
3,10*10 ⁻⁰²	1,574	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30

Abb.19: Differenziell exprimierte Gene nach Durchführung der Microarray-Analyse. Die Mehrheit der 35 Gene wies eine erhöhte Expression nach miRNA1279-Überexpression auf. Dargestellt sind die gemittelten Expressionswerte für die 10nm & 30nm pre-miR-1279 Überexpression im Vergleich zur scrambled Kontrollbehandlung (P-Wert < 0,05 im T-Test).

3.3 Untersuchung der Rolle von miRNA-1279 auf Proteinebene

3.3.1 Proteinexpression von *LYZ* nach miRNA-1279 Überexpression

Nachdem auf mRNA-Ebene keine regulatorischen Effekte der miRNA-1279 auf *LYZ* und die weiteren Kandidatengene des bioinformatisch postulierten miRNA-1279 Regulons nachweisbar waren, wurden weitere Analysen auf Proteinebene durchgeführt. Um die in der Literatur beschriebene, potentiell translationsinhibierende

Rolle von MicroRNAs wie miR-1279 auf ihr postuliertes Zielgen (*LYZ*) zu evaluieren, wurden die Lysozym-Proteinspiegel von miR-1279 überexprimierten THP-1 Zellen untersucht. Dabei erfolgte die Transfektion und Überexpression der Zellen mit 10nm und 30nm pre-miR-1279 respektive der scrambled Negativkontrolle in selbiger Konzentration. Nach erfolgter Proteinextraktion und Proteinquantifizierung (Abs. 2.8.1-2.8.2), wurde zur Bestimmung der Proteinexpression von *LYZ* eine quantitative Western Blot Analyse durchgeführt (Abs. 2.8.4). In der densitometrischen Auswertung der antikörpermarkierten Proteinbanden (Abb.20) und Normalisierung der jeweiligen Dichtewerte von Lysozym auf das als Referenzprotein (House-Keeper) genutzte Enzym GAPDH zeigten sich keine signifikant veränderten Lysozym Proteinlevels nach miRNA-1279 Überexpression (Abb. 21). Schlussfolgernd war auf Proteinebene kein Effekt der miRNA-1279 auf die Expression von *LYZ* nachweisbar.

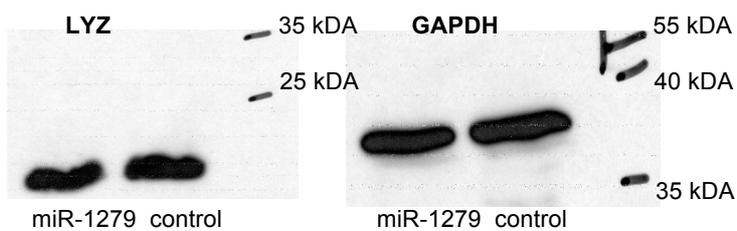


Abb. 20: Exemplarischer Western Blot. Links sind die mit Antikörper markierten Lysozymproteinbanden (16,5 kDa) dargestellt, rechts die des Referenzproteins GAPDH (37 kDa). Zwischen den pre-miR-1279 überexprimierten Zellen und der scrambled Kontrolle bestehen keine signifikanten Dichteunterschiede. Es wurden jeweils 15 µg an Proteinprobe verglichen. (Verdünnung 1. AK Anti-LYZ / Anti-GAPDH= 1:5.000, 2. AK Anti-Rabbit: 1:10.000)

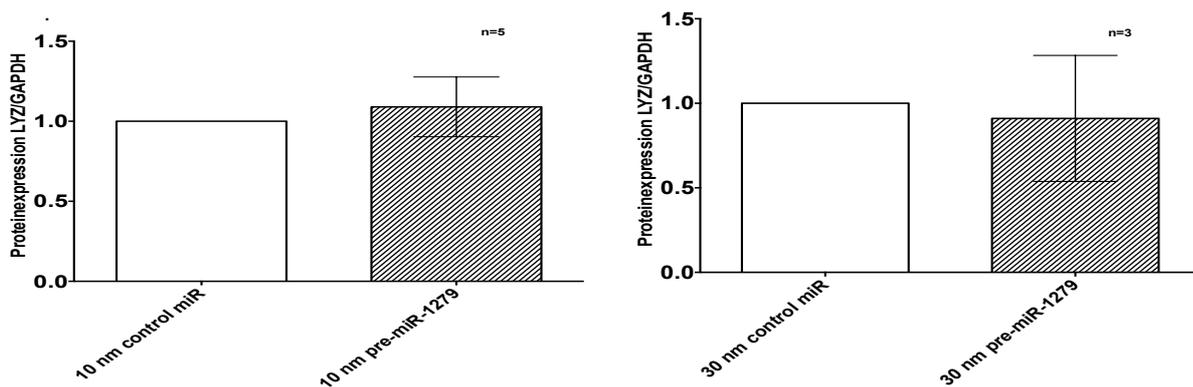


Abb. 21: Proteinexpression von *LYZ*. Die Lysozym Proteinexpression wird auf GAPDH normalisiert. In der densitometrischen Auswertung zeigt sich kein signifikanter Effekt der miR-1279 Überexpression im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.2 Überexpression von miRNA-1279 und Durchführung einer Proteomanalyse

Die Identifizierung neuer Zielproteine der miRNA-1279, als auch die Überprüfung einer gemeinsamen Regulation der postulierten Kandidatengene auf Proteinebene durch miR-1279 erfolgte mittels 2D-Gel Analyse und anschließender MALDI-TOF Massenspektrometrie (Details s. Abs. 2.8.6). Dabei erfolgte die Transfektion und Überexpression der THP-1 Zellen mit 10nm pre-miR bzw. 10nm scrambled Kontrolle (aufgrund der in den Genexpressionsstudien beobachteten suffizienten Überexpression haben wir uns auf diese Konzentration beschränkt), sowie die Proteinextraktion vor Ort. Die elektrophoretische Separation, MALDI-TOF Massenspektrometrie und Datenauswertung wurde durch unseren Kooperationspartner "Plateforme Post-génomique de la Pitié Salpêtrière - P3S" der Universität Pierre et Marie Curie (UPMC) in Paris durchgeführt. Nachdem dort die Proteomanalyse erfolgreich durchgeführt worden war, zeigten die erhobenen Daten keinen signifikanten Effekt der miRNA-1279 Überexpression auf die Lysozymexpression in THP-1 Zellen. Auch wiesen die weiteren Kandidatengene des miRNA-1279 Regulons (*YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *LRRFIP1*, *NOD1*, *PCDHA6*, *KRT9*, *ST5*, *TRAF3IP2*) keine alternierende Proteinexpression zwischen den miR-1279 überexprimierten Proben und den scrambled Negativkontrollen auf. Als neue potentielle Zielmoleküle der miRNA-1279 wurden 8 Proteine (Abb. 22) identifiziert, die eine signifikant erniedrigte Expression nach miR-1279 Überexpression vorweisen. Dabei weist das Protein „Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1“ (UniProt AC: P22626) die um den Faktor -1,51 (fold change) am stärksten herunterregulierte Proteinexpression auf. Der statistisch signifikanteste Effekt (Signifikanzniveau: 0,05) wurde für das Protein „T-complex protein 1 subunit beta“ mit einem p-Wert von 0,00292 beobachtet (Abb.22).

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse der Proteomanalyse, im Einklang mit den Befunden der durchgeführten Western-Blot-Analyse, keinen regulatorischen Effekt der miRNA-1279 auf Lysozym. Ebenfalls konnte auf Proteinebene eine Rolle von miR-1279 als Regulator des postulierten Regulons bestehend aus 11 Kandidaten nicht nachgewiesen werden. Es wurden 8 neue potentielle Zielproteine der MicroRNA-1279 identifiziert.

Ratio (Fold change)	T-test (p-Wert)	Proteinname	UniProt AC	Molekulargewicht (kDA)	pI (isoelektrischer Punkt)
-1,51	0,0242	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	P22626	29	9,3
-1,32	0,00982	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	P63244	30	8,9
-1,48	0,0195	Thymidylate synthase	P04818	31,8	6,6
-1,39	0,00292	T-complex protein 1 subunit beta	P78371	49,4	6
-1,33	0,00375	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P14618	59,3	9
-1,33	0,00375	Protein RCC2	Q9P258	59,3	9,9
-1,45	0,0419	T-complex protein 1 subunit zeta	P40227	62,4	6,2
-1,4	0,0158	Elongation factor 2	P13639	96,6	6,4

Abb. 22: Differentielles Proteinexpressionsprofil.

8 Proteine zeigen in der 2D-Gel Analyse eine signifikant reduzierte Expression nach Überexpression von THP-1 Zellen mit 10nm pre-miR-1279. Das statistische Signifikanzniveau liegt bei 0,05. Der isoelektrische Punkt (pI) ist derjenige pH-Wert an dem die Gesamtladung des elektrophoretisch separierten Proteins „Null“ beträgt, das Protein somit an diesem Punkt in der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese akkumuliert.

4. Diskussion

MicroRNAs spielen eine entscheidende regulatorische Rolle in der humanen Genexpression. Dies gilt sowohl für Gene des gesunden Organismus als auch für Entstehung und Progression von Krankheiten. Auf der Grundlage bioinformatischer Analysen wurde ein Genregulon bestehend aus *LYZ*, *YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *LRRFIP1*, *NOD1*, *PCDHA6*, *KRT9*, *ST5*, *TRAF3IP2* prognostiziert, für welches vermutet wurde, dass es einer gemeinsamen Regulation durch miRNA-1279 untersteht. Dabei ist aus kardiovaskulärer Sicht insbesondere die Regulation der Lysozymexpression (*LYZ*) von Interesse, da Lysozym als Marker der Atherosklerose diskutiert wird.

Die in dieser Arbeit durchgeführte experimentelle Validierung konnte keinen regulativen Zusammenhang zwischen der MicroRNA 1279 und der Expression von *LYZ* bzw. des Genregulons bestätigen. Weder auf mRNA-Ebene mittels qPCR-Genexpressionsstudien und Microarray-Analyse, noch auf Proteinebene durch Western-Blot-Analysen und einer 2D-Gel Proteomuntersuchung konnte der postulierte Effekt von miRNA-1279 detektiert werden. Jedoch wurden neue potentielle Zielstrukturen der MicroRNA 1279 identifiziert. Im Folgenden werden die erhobenen Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert.

4.1 Regulation von *LYZ* durch miRNA-1279

Die postulierte Regulation des *LYZ*-Gens durch Bindung der miRNA-1279 konnte im Luciferase-Assay signifikant unter Nutzung eines Reporter-genkonstrukts mit 2 putativen miRNA-1279 Bindestellen beobachtet werden (Abb.14). Es zeigte sich eine Reduktion der Luciferase-Lumineszenz von 35% bei Überexpression von miRNA-1279, wohingegen unter Nutzung eines zweiten Reporter-genvektors mit verkürzter *LYZ* 3'UTR-Sequenz und nur einer putativen Bindestelle keine signifikante Regulation durch die MicroRNA 1279 detektierbar war. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die nur im „*LYZ* Long 3'UTR“ Vektor vorhandene und bioinformatisch als Bindestelle postulierte Sequenz GCAATATGAA einen regulatorischen Effekt von miR-1279 ermöglicht.

Allerdings konnte der im Reporter-gen-Assay beobachtete regulative Effekt der miR-1279 Überexpression auf *LYZ* weder auf mRNA-Ebene in der qPCR-Genexpressionsanalyse und Microarray-Analyse noch auf Proteinebene in der Western-Blot und 2D-Gel Analyse, repliziert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die artifiziell erhöhte Konzentration der miR-1279 Bindesequenz in den mit „*LYZ* Long 3'UTR“ Reporter-genvektoren transfizierten Zellen im Vergleich zu den sonst nur mittels miR-1279 Precursor überexprimierten THP-1 Zellen. Diese höhere Konzentration des miR-1279 Zieltranskripts könnte eine Bindung der MicroRNA an ihre putative Bindestelle erleichtern und einen ansonsten in vitro geringfügigen Effekt, artifiziell signifikant steigern.

Des Weiteren geht aus der Literatur hervor, dass MicroRNAs in Ausübung ihrer „Feintuning“-Funktion Stellglieder zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts der Genexpression innerhalb einer Zelle darstellen [71]. Zu starke Auslenkungen der Expression eines Zielgens können folglich in einem Stopp der Expression einer für die Auslenkung ursächlichen, endogenen MicroRNA resultieren. Auch könnte eine mittels MicroRNA-Überexpression induzierte starke Änderung der Genexpression durch andere MicroRNAs im Sinne eines Feedbackmechanismus zur Aufrechterhaltung eines mittleren Expressionsniveaus, abgemildert oder gänzlich verhindert werden.

Für die Regulation von *LYZ* durch die MicroRNA-1279 würde dies bedeuten, dass die im Reporter-gen-Assay beobachtete Herunterregulation der Expression

beispielsweise in vivo durch einen Feedbackmechanismus anderer MicroRNAs revidiert wird. Dieser Umstand könnte die ausbleibende Regulation von *LYZ* auf Proteinebene, also das konstante Lysozymniveau nach miR-1279 Überexpression im Vergleich zur scrambled Negativkontrolle, erklären. Zudem wird in Säugerzellen üblicherweise eine Translationsinhibierung durch unvollständige Komplementarität zum Zieltranskript anstelle einer pflanzentypischen Degradierung der mRNA [71] beobachtet. Diese Gegebenheit könnte auch erklären warum weder in der Genexpressionsstudie noch in der Microarray-Analyse eine Regulation von *LYZ* auf mRNA-Ebene durch miRNA-1279 nachweisbar war.

Des Weiteren geht aus der Literatur hervor, dass selbst unter evolutionär hochgradig konservierten MicroRNAs nur eine Minderheit die Expression ihrer oftmals hundertfachen potentiellen Zieltranskripte um mehr als 50% reduziert, die meisten Effekte fallen moderat bis geringfügig aus [19].

4.2 Regulation des putativen Regulons durch miRNA-1279

Gemäß der bioinformatischen Vorarbeiten wurde postuliert, dass miRNA 1279 als (cis/trans) Regulator die Genexpression eines sogenannten „miRNA-1279 Regulons“ bestehend aus *LYZ*, *YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *LRRFIP1*, *NOD1*, *PCDHA6*, *KRT9*, *ST5* und *TRAF3IP2* reguliert. Die experimentelle Validierung konnte diese Hypothese nicht bestätigen (Abs. 3.2.1 & 3.3.2). Auf mRNA-Ebene konnte nach miR-1279 Überexpression und qPCR-Genexpressionsanalysen kein signifikanter Effekt der miRNA-1279 auf die Kandidatengene des Regulons beobachtet werden. Ein solcher Effekt war auch bei der transkriptomweiten Analyse mittels Affymetrix-Microarrays nicht detektierbar.

Daraufhin erfolgte die Validierung auf Proteinebene, auf der ein regulatorischer Effekt der MicroRNA 1279 eher vermutet wurde. Die diesbezüglich durchgeführte 2D-Gel Proteomanalyse konnte allerdings ebenfalls nicht die Hypothese eines gemeinsam regulierten Genregulons bestätigen. Es zeigte sich weder für Lysozym (*LYZ*) noch für die weiteren Kandidaten *YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *LRRFIP1*, *NOD1*, *PCDHA6*, *KRT9*, *ST5* und *TRAF3IP2* ein differentielles Proteinlevel nach miRNA-1279 Überexpression.

Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in den generellen Limitationen prädiktiver bioinformatischer Analysen (Abs. 4.3). Die Autoren um Greliche et al. postulieren aufgrund einer Assoziation zwischen eines SNPs in der miR-1279 Gensequenz und der Genexpression der 11 Kandidaten sowie einer mittels „Targetscan“ identifizierten putativen Bindestelle von miR-1279 in der *LYZ* 3'UTR eine gemeinsame Regulation des Genregulons durch miR-1279 [56]. Sie formulieren in Ihrer Publikation zugleich als Limitation ihrer in-silico Analyse die Nutzung „häufiger“ SNPs was zum Einschluss von nur 258 MicroRNAs führte (von mehr als 1800 bekannten humanen MicroRNAs). Des Weiteren werden aufgrund der diversen Bindungsziele einer einzelnen MicroRNA und der Eignung einer 3'UTR als Bindesequenz für zahlreiche MicroRNAs bereits von den Autoren für die molekularbiologisch-experimentelle Validierung geringfügige Effekte vorhergesagt und eine sehr große Probenzahl gefordert um die statistische Power zur Detektion eines potentiellen regulativen Effekts zu generieren [56]. Trotz mehrerer Versuchsreihen mit größtmöglich realisierbarer Probenzahl konnte dieses Ziel zur Messung des Effekts der MicroRNA 1279 nicht erreicht werden.

Für die postulierten Gene des miRNA-1279 Regulons konnte keine gemeinsame Regulation durch die MicroRNA1279 nachgewiesen werden, jedoch konnten neue potentielle Zielstrukturen von miR-1279 identifiziert werden. In der Microarray-Analyse zeigte sich auf mRNA-Ebene eine differentielle Expression von 35 Genen (Abs. 3.2.2), in der Proteomanalyse waren nach miR-1279 Überexpression 8 Proteine signifikant niedriger exprimiert (Abs. 3.3.2).

Somit scheint eine regulative Wirkung der MicroRNA 1279 auf die neu identifizierten Zielmoleküle möglich. Jedoch müssen auch diese Befunde kritisch betrachtet werden und bedürfen einer weiteren experimentellen Validierung. Die Microarray-Analyse gilt zwar noch als populärste Methode der Transkriptomforschung, da sie eine vergleichsweise günstige genomweite „high-throughput“ Analyse tausender Transkripte ermöglicht, jedoch unterliegt diese Methode und die dadurch erzielten Ergebnisse einigen Limitationen [72]. Qualität und Menge der zu untersuchenden RNA stellen immer noch einen bedeutenden limitierenden Faktor dar. Weiterhin limitierend sind ein begrenztes dynamisches Intervall der Microarray-Analyse zur Quantifikation und der Umstand, dass nur prädefinierte Transkripte, analog zu den auf dem Array vorhandenen Oligonukleotiden, detektiert werden können [73]. Auch

entgehen kleine RNAs wie MicroRNAs meist aufgrund des begrenzten Auflösevermögens der Arrays einer Detektion [73]. Mittels den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Affymetrix Genechip Microarrays könnte ein verändertes Expressionsprofil von MicroRNAs, die beispielsweise über einen Feedbackmechanismus der miR-1279 Überexpression entgegenwirken, nicht identifiziert werden.

Auch die Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie weist Limitationen auf, die eine weitere Validierung der 8 identifizierten, potentiell von miR-1279 regulierten Kandidaten, erfordern. Die 2D-Gelelektrophorese weist Schwierigkeiten in der Visualisierung geringfügig exprimierter Proteine einer Zelle auf, insbesondere in Anwesenheit stärker vorhandener Proteine wie z.B. Albumin [74].

Auch die Separation sehr großer oder hochgradig hydrophober Proteine, sowie sehr basischer bzw. saurer Proteine stellt ein Hindernis dar [74]. Des weiteren müssen zur Generierung statistisch signifikanter Daten mehrere 2D-Gele verwendet werden, allerdings ermöglicht die neuere 2D-DIGE Methode die Separation von 2-3 Proteinproben im selben Gel und reduziert somit im Vergleich zur klassischen 2D-PAGE die experimentelle Gel-zu-Gel Variation [75].

Schlussfolgernd bleibt festzustellen, dass die mittels bioinformatischer Vorarbeiten postulierte gemeinsame Regulation der 11 Kandidatengene des Regulons durch miRNA-1279 in dieser Arbeit weder auf mRNA noch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Es konnten jedoch mittels transkriptom- und proteomweiter Omics-Analysen neue putative Zielmoleküle der MicroRNA 1279 identifiziert werden, die einer weiteren individuellen experimentellen Validierung bedürfen.

4.3 Limitationen

Putative Bindestellen von MicroRNAs an der 3'UTR ihrer Zielgene werden mittels Algorithmen berechnet. Zur Vorhersage potentieller Bindestellen analysiert solch ein Algorithmus primär die Komplementarität einer MicroRNA zur 3'UTR. Als weitere Filter dienen Daten über die Struktur der MicroRNA Seedsequenzen (7- oder 8mer), die Bindungsenergie (Thermodynamik) oder die evolutionäre Konservierung der Zielsequenz in orthologen Genen mehrerer Spezies [76]. Zur Prognose von miRNA Bindestellen existieren verschiedene Datenbanken, deren Algorithmen sich in der Verwendung und Gewichtung der einzelnen Kriterien unterscheiden und folglich auch zu unterschiedlichen Resultaten kommen. Auch ist die Anzahl an falsch positiven

oder falsch negativen Ergebnissen ein Problem bei der Vorhersage von Bindestellen [77]. Somit wird deutlich, dass die Aussagekraft rein bioinformatischer Analysen noch beschränkt ist und schon die initialen bioinformatischen Vorarbeiten eine mögliche Limitation der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse darstellen.

Eine weitere potentielle Limitation stellt die zur experimentellen Validierung der Hypothesen genutzte THP-1 Zellkultur dar. Dabei handelt es sich um eine monozytäre Vorläuferform, die sich durch eine im Vergleich zu peripheren Monozyten gute Kultivierbarkeit auszeichnet und somit eine Reproduzierbarkeit der Experimente ermöglicht. Das für diese Arbeit wichtige Protein Lysozym wird in THP-1 Zellen stark exprimiert [78]. Allerdings beruht die von Greliche et al. identifizierte Assoziation zwischen einer genetischen Variante der MicroRNA 1279 (miSNP rs1463335) und der Genexpression der Kandidatengene des postulierten miRNA-1279 Regulons auf Genexpressionsdaten von peripher isolierten Monozyten der Gutenberg Gesundheitsstudie und nicht von kultivierten THP-1 Zellen. Weitere Untersuchungen sollten daher auch die Vergleichbarkeit zwischen peripher isolierten Monozyten und kultivierbaren Monozytenformen wie THP-1 evaluieren.

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit überprüften Hypothesen, dass miR-1279 das *LYZ*-Gen reguliere und als multi-lokus Regulator eines sogenannten miRNA-1279 Regulons fungiere, konnten experimentell nicht bestätigt werden. Dennoch wurde in drei unabhängigen Arbeiten ([56], [59], [62]) eine Assoziation der Genexpression von *LYZ*, *YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *LRRFIP1*, *NOD1*, *PCDHA6*, *KRT9*, *ST5* und *TRAF3IP2* zu genetischen Varianten am Chromosom 12q15 Locus festgestellt. Insbesondere die Regulation der Expression von *LYZ* ist von kardiovaskulärem Interesse. Als Inflammationsmarker ist Lysozym in den Prozess der Atherosklerose involviert. Es konnte gezeigt werden, dass Lysozym je nach Anzahl atherosklerotisch veränderter Koronargefäße zuverlässig zwischen den Ausprägungsgraden der KHK diskriminieren kann [16]. Lysozym könnte folglich als zugänglicher, nichtinvasiver Biomarker der koronaren Herzerkrankung in der klinischen Praxis von Bedeutsamkeit sein.

Weiterführende zukünftige Arbeiten könnten anstelle der MicroRNA1279 andere potentielle Regulatoren von *LYZ* und der gemäß Vorarbeiten gemeinsam regulierten

Gene evaluieren. Fairfax et al. identifizierten beispielsweise durch in-silico Analysen eine Bindestelle für das Protein p300 welche mit der in dieser Arbeit untersuchten Region am Chromosom 12 überlappt. Des Weiteren wurde in Individuen, die homozygot für das A-Allel am Locus rs10784774 waren, eine starke inverse Korrelation der Genexpression von *LYZ* und dem für p300 kodierendem Gen *EP300* gesehen [59]. Daraus postulierten die Autoren eine allel-spezifische Regulation von *LYZ* durch das Protein p300. Ein möglicher weiterführender Schritt zu dieser Arbeit wäre folglich die experimentelle Validierung einer Regulation von *LYZ* sowie des Genregulons durch p300.

Eine weitere mögliche Option wäre, dass die Gene nicht einem gemeinsamen regulierenden Molekül wie beispielsweise dem Protein p300 oder der MicroRNA 1279 unterstehen, sondern dass die beobachtete veränderte Expression der Kandidaten indirekt als trans-Effekt über eine veränderte Expression eines oder mehrerer Kandidatengene vermittelt wird. Rotival et al. haben in Ihrer Arbeit für die beiden cis eQTLs *LYZ* und *YEATS4* am Locus 12q15 mit dem Lead-SNP rs11177644 eine stark signifikante Assoziation ($p = 1,1 \cdot 10^{-92}$) zu der Genexpression eines korregulierten Gensets bestehend aus weiteren 34 in trans regulierten Genen (u.a. auch die Kandidatengene des postulierten „miRNA-1279 Regulons“) festgestellt. Dies würde bedeuten dass eine veränderte zelluläre Expression von Lysozym oder Yeats4, einem Protein involviert in Chromatinmodifikationen und transkriptioneller Regulation [79], in trans über einen oder mehrere unbekannte Signalwege Einfluss auf die Expression der übrigen Kandidaten ausübt. Es wäre Ziel einer weiterführenden Arbeit mögliche involvierte Moleküle und Signalwege zu eruieren.

Weiterhin sollten zukünftig in einem ersten Schritt die in dieser Arbeit mittels Omics-Analysen identifizierten neuen putativen Zielmoleküle der MicroRNA 1279 mittels qPCR-Expressionsstudien oder Western-Blot-Analysen in-vitro genauer evaluiert werden. In einem zweiten Schritt wären in-silico Netzwerk/ Pathway-Analysen zu den neu identifizierten Kandidaten ein sinnvoller weiterführender Ansatz, um mögliche kausale oder regulative Zusammenhänge zwischen den Kandidaten festzustellen. Sollte der regulative Effekt der miRNA-1279 aus den Omics-Analysen in-vitro für die einzelnen putativen Kandidatengene mittels weiterer molekularbiologischer Methoden repliziert werden und in-silico pathway/network Analysen ebenfalls funktionelle oder regulative Zusammenhänge signalisieren, wären die Translation in

ein geeignetes Tiermodell und die Durchführung von in-vivo Studien die nächst denkbaren Schritte.

Im Rahmen eines systembiologischen Ansatzes (Abb. 23) könnte die Kombination der bioinformatisch und experimentell gewonnen Erkenntnisse über die unterschiedlichen biologischen Entitäten (Genomik, Transkriptomik, Proteomik etc.) umfassende Erkenntnisse über kardiovaskulär relevante Kandidatengene / -moleküle und die Netzwerke / Signalwege in denen sie agieren, ergeben.

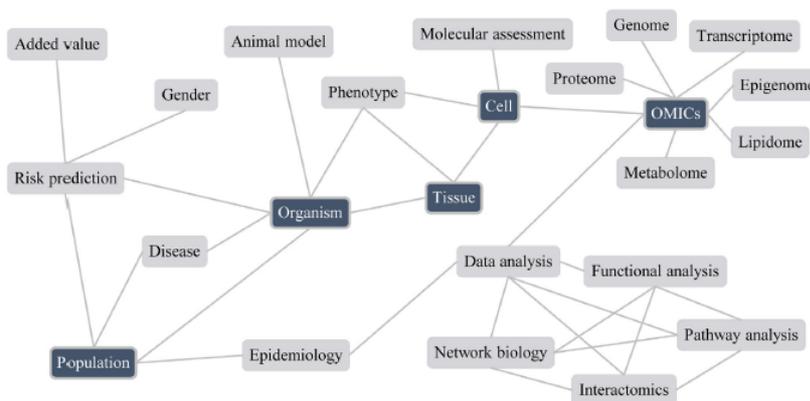


Abbildung 23: Systembiologie. Der systembiologische Ansatz kombiniert in-silico Analysen und experimentelle Daten diverser biologischer Ebenen (Genomik, Transkriptomik, Proteomik etc.) um potentiell krankheitsrelevante Zielstrukturen zu identifizieren. Modifiziert aus: Haase, T., Zeller, T. et al. . Systems Medicine as an Emerging Tool for Cardiovascular Genetics. *Front. Cardiovasc.. Med.* **3:27** (2016)

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der MicroRNA 1279 als multi-lokus Regulator in Monozyten untersucht. Dabei stand die experimentelle Validierung einer bioinformatisch postulierten Regulation der Genexpression von *LYZ* (Lysozym), eines in die Atherosklerose involvierten Inflammationsmarkers, im Vordergrund.

In-silico Analysen unterschiedlicher Vorarbeiten suggerieren, dass *LYZ* mit den Genen *YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *LRRFIP1*, *NOD1*, *PCDHA6*, *KRT9*, *ST5*, *TRAF3IP2* ein Regulon bildet. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher zu überprüfen, ob miR-1279 als gemeinsamer (*cis/trans*) Regulator eines sogenannten „miRNA-1279 Regulons“ fungiert.

Die molekularbiologische Validierung der, auf großen Transkriptomdatensätzen beruhenden Arbeitshypothesen, konnte eine regulatorische Funktion der MicroRNA 1279 auf die Expression der Kandidatengene nicht bestätigen.

Die im Reporter-gen-Assay nachgewiesene potenzielle Regulation von *LYZ* durch die MicroRNA 1279, konnte in weiteren Analysen weder auf mRNA- noch Proteinebene reproduziert werden. Auch war nach Überexpression von miR-1279 weder in den qPCR-Genexpressionsanalysen, noch in der 2D-Gel Proteomanalyse ein regulativer Effekt auf das „miRNA-1279 Regulon“, detektierbar.

Es konnten in dieser Arbeit jedoch anhand der durchgeführten Omics-Analysen neue potentielle Zielstrukturen der MicroRNA 1279 identifiziert werden. In der Microarray-Analyse zeigte sich auf mRNA-Ebene eine differentielle Expression von 35 Genen, in der Proteomanalyse waren nach miR-1279 Überexpression 8 Proteine signifikant niedriger exprimiert.

Als zukünftiger, auf die vorliegende Arbeit aufbauender Schritt, gilt es diese neuen putativen Zielmoleküle der MicroRNA 1279 individuell, mittels weiterer experimenteller Analysen, zu evaluieren.

Weiterhin sollte die Untersuchung alternativer Regulatoren von *LYZ* und der koregulierten Kandidatengene erfolgen. Als solcher könnte das Protein p300 in Frage kommen. In einer Vorarbeit wurde eine genetische Variante auf Chromosom 12q15 identifiziert, welche mit der Expression der Kandidatengene assoziiert ist. Diese Sequenz überlappt mit einer Bindestelle von p300, somit erscheint eine zukünftige experimentelle Validierung von p300 als Regulator des Genregulons anstelle der MicroRNA 1279, als sinnvoll.

5.1 Summary

The role of microRNA 1279 as a multi-locus regulator in monocytes was examined in this thesis. Thereby the experimental validation of a bioinformatically postulated regulation of *LYZ* (Lysozyme), an inflammation marker involved in the process of atherosclerosis, was of major interest.

In-silico analyses of different preliminary studies suggest that *LYZ* together with the genes *YEATS4*, *CNTN6*, *CTRC*, *COPZ2*, *LRRFIP1*, *NOD1*, *PCDHA6*, *KRT9*, *ST5*, *TRAF3IP2* constitutes a so called „regulon“. A further aim of this study was to assess whether microRNA 1279 functions as a (*cis/trans*) regulator of a „miRNA-1279 regulon“.

Molecular biological validation of the hypotheses, mainly based on large transcriptomic data sets, could not reveal a regulatory function of microRNA 1279 on the expression of candidate genes.

A significantly displayed potential regulation of *LYZ* by microRNA 1279 in a reporter gene experiment could not be reproduced in further analyses, neither at a mRNA or protein level. Also after overexpression of miR-1279, there was no regulatory effect on the „miRNA-1279 regulon“ detectable, neither in qPCR gene expression studies, nor in 2D gel proteomic analysis.

However, in this study new potential targets of microRNA 1279 could be identified by performing omics- analyses. The microarray analysis resulted in a differential expression of 35 genes on mRNA level, the proteomic analysis presented 8 significantly downregulated proteins.

A subsequent step to this work should be the further experimental evaluation of these new putative targets of microRNA1279.

Furthermore, alternative regulators of *LYZ* and the co-regulated candidate genes should be investigated. The protein p300 could come into consideration as a potential alternative regulator. In a preliminary study to this thesis a genetic variant on chromosome 12q15 was identified, which was also associated with the candidate genes' expression. The variant sequence overlaps with a binding site of p300, indicating that an experimental validation of p300 instead of miRNA-1279 as a regulator of the gene regulon can be reasonable.

6. Literaturverzeichnis

1. Dan Longo , A.F., Dennis Kasper, Stephen Hauser , J. Jameson , Joseph Loscalzo *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18 ed. Vol. 1. 2011: The McGraw-Hill Companies, Inc. 7122.
2. Statistisches Bundesamt, W., *Todesursachen in Deutschland 2014*. Fachserie 12 Reihe 4 - 2014, 2016.
3. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
4. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
5. George, S.J., Johnson, J., *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*. 2010, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. 422.
6. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
7. van der Wal, A.C. and A.E. Becker, *Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(2): p. 334-44.
8. UniProt. UniProtKB - P61626 (LYSC_HUMAN). 2016; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P61626 - publications>.
9. Fleming, A., *On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character, 1922. **93**(653): p. 306-317.
10. Callewaert, L. and C.W. Michiels, *Lysozymes in the animal kingdom*. Journal of Biosciences, 2010. **35**(1): p. 127-160.
11. Deckers, D., et al., *Role of the Lysozyme Inhibitor Ivy in Growth or Survival of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa Bacteria in Hen Egg White and in Human Saliva and Breast Milk*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(14): p. 4434-4439.
12. Cole, A.M., et al., *Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 6985-91.
13. Schütz, G., *Gen-Struktur und Gen-Expression*. Naturwissenschaften, 1981. **68**(4): p. 170-176.
14. Bonifer, C., et al., *Evolution of gene regulation as revealed by differential regulation of the chicken lysozyme transgene and the endogenous mouse lysozyme gene in mouse macrophages*. Eur J Biochem, 1994. **226**(1): p. 227-35.
15. Bonifer, C., et al., *Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice*. EMBO J, 1990. **9**(9): p. 2843-8.
16. Abdul-Salam, V.B., et al., *Identification and assessment of plasma lysozyme as a putative biomarker of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(5): p. 1027-33.
17. van Rooij, E., *The art of microRNA research*. Circ Res, 2011. **108**(2): p. 219-34.
18. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
19. Bartel, D.P., *MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-233.
20. miRBase, *The miRBase Sequence Database -- Release 21*. 2014.
21. Pillai, R.S., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1573-6.

22. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
23. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
24. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
25. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
26. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
27. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
28. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 597-610.
29. Yekta, S., I.H. Shih, and D.P. Bartel, *MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA*. Science, 2004. **304**(5670): p. 594-6.
30. O'Hara, S.P., et al., *MicroRNAs: key modulators of posttranscriptional gene expression*. Gastroenterology, 2009. **136**(1): p. 17-25.
31. Zhao, Y., et al., *Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2*. Cell, 2007. **129**(2): p. 303-17.
32. Small, E.M., R.J. Frost, and E.N. Olson, *MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease*. Circulation, 2010. **121**(8): p. 1022-32.
33. Liu, N. and E.N. Olson, *MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development*. Dev Cell, 2010. **18**(4): p. 510-25.
34. Ji, R., et al., *MicroRNA Expression Signature and Antisense-Mediated Depletion Reveal an Essential Role of MicroRNA in Vascular Neointimal Lesion Formation*. Circulation Research, 2007. **100**(11): p. 1579-1588.
35. Bonauer, A., et al., *MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice*. Science, 2009. **324**(5935): p. 1710-3.
36. van Solingen, C., et al., *Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8A): p. 1577-85.
37. Poliseno, L., et al., *MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3068-71.
38. Fasanaro, P., et al., *MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3*. J Biol Chem, 2008. **283**(23): p. 15878-83.
39. Harris, T.A., et al., *MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1516-21.
40. Fang, Y. and P.F. Davies, *Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(4): p. 979-87.
41. Ni, C.W., H. Qiu, and H. Jo, *MicroRNA-663 upregulated by oscillatory shear stress plays a role in inflammatory response of endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(5): p. H1762-9.
42. Rayner, K.J., et al., *Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides*. Nature, 2011. **478**(7369): p. 404-7.
43. Timmins, J.M., et al., *Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(5): p. 1333-1342.

44. David P. Barr, M.D., Ella M. Russ, B.S. and Howard A. Eder, M.D., *Protein-lipid-relationships-in-human-plasma-II-In-atherosclerosis-and-related-conditions.pdf*>. The-American-Journal-of-Medicine, 1951.
45. Tavia Gordon, W.P.C., M.D. , Marthana C. Hjortland, Ph.D., William B. Kannel, M.D., Thomas R. Dawber. M.D., *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease - The Framingham study.pdf*>. The American Journal of Medicine, 1977.
46. Rayner, K.J., et al., *MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis*. Science, 2010. **328**(5985): p. 1570-3.
47. Rayner, K.J., et al., *Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2921-31.
48. Rayner, K.J. and K.J. Moore, *MicroRNA control of high-density lipoprotein metabolism and function*. Circ Res, 2014. **114**(1): p. 183-92.
49. Du, F., et al., *MicroRNA-155 deficiency results in decreased macrophage inflammation and attenuated atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(4): p. 759-67.
50. Slaby, O., et al., *Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2012. **16**(1): p. 8-21.
51. Morin, R.D., et al., *Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells*. Genome Research, 2008. **18**(4): p. 610-621.
52. Chen, K. and N. Rajewsky, *Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data*. Nat Genet, 2006. **38**(12): p. 1452-6.
53. Clop, A., et al., *A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep*. Nat Genet, 2006. **38**(7): p. 813-8.
54. Sethupathy, P., et al., *Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(2): p. 405-13.
55. Small, E.M. and E.N. Olson, *Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 336-42.
56. Greliche, N., et al., *Comprehensive exploration of the effects of miRNA SNPs on monocyte gene expression*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45863.
57. Zeller, T., et al., *Genetics and Beyond – The Transcriptome of Human Monocytes and Disease Susceptibility*. PLoS ONE, 2010. **5**(5): p. e10693.
58. Heinig, M., et al., *A trans-acting locus regulates an anti-viral expression network and type 1 diabetes risk*. Nature, 2010. **467**(7314): p. 460-464.
59. Fairfax, B.P., et al., *Genetics of gene expression in primary immune cells identifies cell type-specific master regulators and roles of HLA alleles*. Nat Genet, 2012. **44**(5): p. 502-10.
60. Wen, A.Y., K.M. Sakamoto, and L.S. Miller, *The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(11): p. 6413-6419.
61. Small, K.S., et al., *Identification of an imprinted master trans-regulator at the KLF14 locus related to multiple metabolic phenotypes*. Nature genetics, 2011. **43**(6): p. 561-564.
62. Rotival, M., et al., *Integrating genome-wide genetic variations and monocyte expression data reveals trans-regulated gene modules in humans*. PLoS Genet, 2011. **7**(12): p. e1002367.
63. Liebermeister, W., *Linear modes of gene expression determined by independent component analysis*. Bioinformatics, 2002. **18**(1): p. 51-60.

64. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
65. Chaffin, D.O. and C.E. Rubens, *Blue/white screening of recombinant plasmids in Gram-positive bacteria by interruption of alkaline phosphatase gene (phoZ) expression*. Gene, 1998. **219**(1-2): p. 91-9.
66. Freeman, W.M., D.J. Robertson, and K.E. Vrana, *Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis*. Biotechniques, 2000. **29**(5): p. 1042-6, 1048-55.
67. Lipshutz, R.J., et al., *High density synthetic oligonucleotide arrays*. Nat Genet, 1999. **21**(1 Suppl): p. 20-4.
68. Gelder, V., *Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA*. PNAS, 1990.
69. Karas, M. and R. Krüger, *Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism*. Chemical Reviews, 2003. **103**(2): p. 427-440.
70. Tanaka, K., *The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture)*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(33): p. 3860-3870.
71. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
72. Haase, T., et al., *Systems Medicine as an Emerging Tool for Cardiovascular Genetics*. Front Cardiovasc Med, 2016. **3**: p. 27.
73. Siemelink, M.A. and T. Zeller, *Biomarkers of coronary artery disease: the promise of the transcriptome*. Curr Cardiol Rep, 2014. **16**(8): p. 513.
74. Marouga, R., S. David, and E. Hawkins, *The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology*. Anal Bioanal Chem, 2005. **382**(3): p. 669-78.
75. Bylund, D. and A.E. Henriksson, *Proteomic approaches to identify circulating biomarkers in patients with abdominal aortic aneurysm*. Am J Cardiovasc Dis, 2015. **5**(3): p. 140-5.
76. Ivashchenko, A.T., A.S. Issabekova, and O.A. Berillo, *miR-1279, miR-548j, miR-548m, and miR-548d-5p binding sites in CDSs of paralogous and orthologous PTPN12, MSH6, and ZEB1 Genes*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 902467.
77. Hamzeiy, H., J. Allmer, and M. Yousef, *Computational Methods for MicroRNA Target Prediction*, in *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*, M. Yousef and J. Allmer, Editors. 2014, Humana Press: Totowa, NJ. p. 207-221.
78. Helal, R. and M.F. Melzig, *New aspects in the synthesis and secretion of lysozyme by cultured human monocyte cell lines*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. **46**(6): p. 492-6.
79. Schulze, J.M., A.Y. Wang, and M.S. Kobor, *YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription*. Biochem Cell Biol, 2009. **87**(1): p. 65-75.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf verschiedenen Stationen bei der Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben und ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Diese Arbeit wurde im molekularbiologischen Labor der Klinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Zuerst gilt mein Dank deshalb Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg, dem Direktor der Klinik.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. rer. nat. Tanja Zeller. Von Ihr stammt die Idee zu dieser Arbeit und dank ihrer unterstützenden Betreuung konnte diese Arbeit fertiggestellt werden. Vielen Dank für das Vertrauen in mich, die Bereitstellung des Labors und der Materialien sowie die fortdauernde Motivation.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch gegenüber Dr. Henri Weidmann. Er stand mir jederzeit tatkräftig mit seinem konstruktiven Rat insbesondere bei der Etablierung der Transfektionsmethode als auch bei der Durchführung vieler Experimente wie der Western-Blot Analyse oder den Genexpressionsstudien zur Seite. Auch war er an der Vorbereitung der 2D-Gel Proteomanalyse entscheidend beteiligt und unterstützte mich bei der Kommunikation mit dem Pariser Kooperationspartner.

Des weiteren möchte ich an dieser Stelle auch herzlich Christian Müller für seine Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung der Microarray-Analyse danken.

Allen nicht eigens erwähnten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Molekulare Kardiologie – Genomik und Systembiologie" unter der Leitung von Prof. Zeller danke ich ebenfalls für wichtige Anregungen, Ratschläge und die angenehme gemeinsame Zeit.

Schließlich möchte ich mich bei den mir wichtigsten Menschen, meinen Eltern, für ihre kontinuierliche Unterstützung, Geduld und Motivation bedanken. Ohne sie wäre weder das Medizinstudium noch diese Dissertation möglich gewesen.

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens) und Band des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: