

Untersuchungen von RNA-Liganden- Interaktionen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt im Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Markus Steber
aus Augsburg

Frankfurt, den 14.06.2011
(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. Beatrix Süß
Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Datum der Disputation: 06.09.2011

**...ein Blick ins Buch und zwei ins Leben,
das wird die rechte Form dem Geiste geben.
(Johann Wolfgang Goethe)**

Meinem Opa

Mein größter Dank gilt **Prof. Dr. Beatrix Süß** am Institut für Molekulare Biowissenschaften für die einmalige Möglichkeit meine Doktorarbeit hier in Frankfurt bearbeiten zu können, die interessanten, interdisziplinären Projekte sowie das große Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und ihre immer freundliche, unterstützende Art.

Prof. Dr. Dieter Steinhilber am Institut für Pharmazeutische Chemie danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie die stetige, hilfreiche Unterstützung meiner eukaryotischen Arbeiten und die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis einen Großteil meiner Experimente machen zu können.

Außerdem möchte ich mich bedanken für die Aufnahme in das Stipendiatenprogramm des Graduiertenkollegs **GK1172 *Biologicals***, die daraus resultierende Finanzierung sowie die Zusatzqualifikationen im Rahmen des FIRST-Curriculums.

Prof. Dr. Wolfgang Hillen danke ich für die anfängliche fachliche und finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie in Erlangen.

Mein herzlichster Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des **Suesslabs** für die tolle Atmosphäre, die gemeinsamen Unternehmungen und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei **Karl, Alex, Flo, Shemsi, Philip** und **Amir** für die gemeinsamen Mittags- und Kaffeepausen bedanken sowie die vielen Abenteuer, Anekdoten und Analysen rund ums Unileben. Ebenso möchte ich mich beim kompletten **AK Steinhilber** für die nette Aufnahme in die Gruppe und die immer freundliche Unterstützung bedanken. **Meike** und **Saskia** danke ich für die gemeinsamen 5-LO-Besprechungen, **Melania Dovizio** für die gute Zusammenarbeit rund um COX-2.

Tristan, Ruth, Iván, Helge, Karl, Anna, Alex, Biggi, Flo, Suzan, Ronny, Philip, Amir, den **Augsburgern Moni, Flo, Susi, Gaugi, Kumpfi, Weber, Alex, Lochi** und **Johannes** aus Erlangen danke ich für ihre Freundschaft. Ohne euch wär's nicht gegangen.

Meinen **Eltern**, meinen verstorbenen **Großeltern** sowie meiner kompletten **Familie** danke ich für ihre Liebe und die moralische sowie finanzielle Unterstützung meiner Studenten- und Doktorandenzeit.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| 2 | EINLEITUNG | 3 |
| 2.1 | RNA - Informationsträger und Regulator | 3 |
| 2.2 | Regulation der Genexpression | 4 |
| 2.2.1 | RNA-basierte Genregulation in Prokaryoten | 6 |
| 2.2.2 | RNA-basierte Genregulation in Eukaryoten | 8 |
| 2.3 | Regulation genetischer Aktivität durch Aptamere | 11 |
| 2.3.1 | Aptamere | 11 |
| 2.3.2 | Proteinbindende Aptamere | 13 |
| 2.4 | TetR und das TetR-bindende Aptamer | 14 |
| 2.4.1 | Der Tetracyclinrepressor TetR | 14 |
| 2.4.2 | Das TetR bindende Aptamer 12-1 | 16 |
| 2.5 | Regulation von Entzündungsprozessen | 18 |
| 2.5.1 | Eicosanoide | 18 |
| 2.5.1.1 | Biosynthese von Leukotrienen durch 5-LO | 19 |
| 2.5.1.2 | Biosynthese von Prostanoiden durch COX-1 und COX-2 | 20 |
| 2.5.2 | Regulation der Expression von 5-LO, COX-1 und COX-2 | 21 |
| 2.5.2.1 | Regulation der 5-LO | 21 |
| 2.5.2.2 | Regulation von COX-1 und COX-2 | 22 |
| 2.5.3 | Über die Rolle von 5-LO und COX-2 in Entzündungsprozessen und Krebs | 23 |
| 2.6 | Zielsetzung der Arbeit | 24 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 25 |
| 3.1 | Materialien | 25 |
| 3.1.1 | Chemikalien | 25 |
| 3.1.2 | Hilfsmittel | 27 |
| 3.1.3 | Geräte | 29 |
| 3.1.4 | Kommerzielle Systeme | 31 |
| 3.1.5 | Enzyme und Proteine | 31 |
| 3.1.6 | Oligonukleotide | 33 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 3.2 Plasmide und Bakterienstämme | 36 |
| 3.2.1 Bakterienstämme | 36 |
| 3.2.2 Verwendete und hergestellte Plasmide | 37 |
| 3.2.3 Medien für prokaryotische Zellen | 38 |
| 3.3 Eukaryotische Zelllinien und Zellkultur..... | 38 |
| 3.3.1 Zelllinien | 38 |
| 3.3.2 Medien für eukaryotische Zelllinien | 39 |
| 3.4 Puffer und Lösungen | 40 |
| 3.4.1 Puffer für DNA..... | 40 |
| 3.4.2 Puffer für RNA..... | 40 |
| 3.4.3 Puffer für Proteine | 41 |
| 3.4.4 Sonstige verwendete Lösungen..... | 42 |
| 3.5 Methoden | 43 |
| 3.5.1 Allgemeine Methoden | 43 |
| 3.5.1.1 Autoklavieren | 43 |
| 3.5.1.2 Sterilfiltration | 43 |
| 3.5.2 Methoden mit prokaryotischen Zellen | 44 |
| 3.5.2.1 Anzucht, Ernte und Aufbewahrung von Bakterien | 44 |
| 3.5.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> | 44 |
| 3.5.3 Methoden mit eukaryotischen Zelllinien..... | 46 |
| 3.5.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen..... | 46 |
| 3.5.3.2 Trypsinierung | 46 |
| 3.5.3.3 Transiente Transfektion..... | 47 |
| 3.5.3.4 Dualer Luziferase-Assay | 48 |
| 3.5.3.5 Isolation von Thrombozyten aus humanem Vollblut | 49 |
| 3.5.4 Methoden mit DNA..... | 49 |
| 3.5.4.1 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> | 49 |
| 3.5.4.2 Sequenzierung | 50 |
| 3.5.4.3 Nachweis und Quantifizierung..... | 50 |
| 3.5.4.4 Restriktionsendonukleolytische Spaltung von DNA..... | 50 |
| 3.5.4.5 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden | 50 |
| 3.5.4.6 Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden..... | 51 |
| 3.5.4.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden..... | 51 |
| 3.5.4.8 Ligation von DNA | 51 |
| 3.5.4.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten | 51 |
| 3.5.4.10 Polymerase-Kettenreaktion | 52 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.5.5 | Methoden mit RNA..... | 53 |
| 3.5.5.1 | Präzipitation und Aufreinigung von RNA | 53 |
| 3.5.5.2 | Extraktion von RNA aus humanen Zellen | 54 |
| 3.5.5.3 | <i>In vitro</i> Transkription | 55 |
| 3.5.5.4 | Denaturierende Gelelektrophorese..... | 55 |
| 3.5.5.5 | Markierung von RNA..... | 56 |
| 3.5.5.6 | Gelverzögerungsexperimente (EMSA, <i>electrophoretic mobility shift assay</i>)..... | 58 |
| 3.5.5.7 | Northern Blot..... | 59 |
| 3.5.5.8 | LILBID (<i>laser induced liquid beam ionization/desorption</i>) | 59 |
| 3.5.5.9 | Quantitative <i>Real-time</i> Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) | 59 |
| 3.5.6 | Methoden mit Proteinen..... | 62 |
| 3.5.6.1 | Proteinmengenbestimmung..... | 62 |
| 3.5.6.2 | Dialyse von TetR-Proteinen | 62 |
| 3.5.6.3 | SDS-Gelelektrophorese und Western Blot..... | 63 |
| 4 | ERGEBNISSE..... | 65 |
| 4.1 | Untersuchungen von TetR-Aptamer Interaktionen | 65 |
| 4.1.1 | Bindestudien von TetR und dem Aptamer 12-1KΔA durch Gelverzögerungsexperimente..... | 65 |
| 4.1.2 | Quantifizierung der Bindeaffinität und K_D -Berechnungen..... | 69 |
| 4.1.3 | Analyse der Bindungsspezifität mit unterschiedlichen TetR-Mutanten | 71 |
| 4.1.4 | Kompetitions- und Disruptionsstudien zwischen Aptamer, <i>tetO</i> -DNA und TetR..... | 73 |
| 4.1.5 | Bestimmung der Bindungsstöchiometrie durch LILBID..... | 75 |
| 4.2 | Regulation von 5-LO und COX-2 durch miRNAs..... | 77 |
| 4.2.1 | Etablierung einer miRNA spezifischen Extraktionsmethode von RNA aus humanen Zellen..... | 77 |
| 4.2.2 | Identifizierung und Charakterisierung von 5-LO spezifischen miRNAs..... | 79 |
| 4.2.2.1 | Expressionsanalyse von miRNAs in verschiedenen Zelllinien durch Microarraytechnik | 79 |
| 4.2.2.2 | Bioinformatische Vorhersage von miRNAs im 3'-UTR von 5-LO..... | 83 |
| 4.2.2.3 | Validierung und Expressionsanalyse von 5-LO spezifischen miRNAs..... | 86 |
| 4.2.2.4 | Zeit- und differenzierungsabhängige Expression von miRNAs in Mono-Mac-6-Zellen | 90 |
| 4.2.3 | Untersuchungen von COX-2 spezifischen miRNAs in HT-29-Zellen | 92 |
| 4.2.3.1 | Bioinformatische Suche von miRNA-Bindestellen im COX-2 3'-UTR..... | 93 |
| 4.2.3.2 | Stabilitätsanalyse des 3'-UTR der COX-2 mRNA | 95 |
| 4.2.3.3 | Expressionsanalyse von miRNAs in Thrombozyten co-kultivierten HT-29-Zellen | 96 |
| 4.2.3.4 | Nachweis von miRNAs aus Thrombozyten-Mikropartikeln | 97 |
| 4.2.3.5 | PDGF-BB stimulierte Expression von miRNAs in HT-29-Zellen..... | 98 |
| 4.2.3.6 | Expressionsanalyse von miR-199a und miR-199a* in HT-29-Zellen | 100 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5 | DISKUSSION | 107 |
| 5.1 | Bindungsstudien der TetR-Aptamer-Bindung | 107 |
| 5.1.1 | TetR bindet mit hoher Affinität an das Aptamer..... | 107 |
| 5.1.2 | TetR weist überlappende Bereiche für die DNA- und RNA-Erkennung auf..... | 108 |
| 5.1.3 | Ein TetR-Dimer bindet ein Aptamermolekül..... | 109 |
| 5.1.4 | Das Aptamer kompetitiert mit <i>tetO</i> um die TetR-Bindung..... | 109 |
| 5.2 | Regulation von Entzündungsprozessen durch miRNAs | 111 |
| 5.2.1 | Bioinformatische Vorhersage von miRNA-Bindestellen..... | 111 |
| 5.2.2 | Vor- und Nachteile einer miRNA-Microarrayexpressionsanalyse | 113 |
| 5.2.3 | Über den Einfluss von miRNAs auf 5-LO | 113 |
| 5.2.4 | COX-2 wird durch miRNAs reguliert..... | 115 |
| 5.2.5 | PDGF beeinflusst die Expression verschiedener miRNAs | 116 |
| 5.3 | Fazit und Ausblick | 117 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 119 |
| 7 | ANHANG | 133 |
| 7.1 | Rohdaten der miRNA-Microarrayexpressionsanalyse | 133 |
| 7.2 | SignificanceScoreAssignment des 3'-UTR der COX-2 mRNA | 137 |
| 7.3 | Abkürzungsverzeichnis | 157 |

1 Zusammenfassung

RNA hat neben der Rolle als Informationsüberträger wichtige Aufgaben in regulatorischen Prozessen. Sie kann komplexe Strukturen ausbilden und ähnlich wie Proteine Liganden binden oder enzymatische Reaktionen katalysieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Beispiele von RNA-Liganden-Interaktionen untersucht werden.

Im ersten Abschnitt wurde die Interaktion des TetR-bindenden Aptamers 12-1 mit dem Tetracyclin-Repressorprotein (TetR) biochemisch charakterisiert. Über Gelverzögerungsexperimente wurde gezeigt, dass das Aptamer 12-1K Δ A TetR mit hoher Affinität und Spezifität bindet. Es wurde ein K_D von 22 nM bestimmt. Die Bindung ist dabei ebenso stark wie die Bindung von TetR an die Operatorsequenz *tetO*. In Anwesenheit von Tetracyclin (Tc) nimmt die Affinität des TetR/Aptamer-Komplexes um das sechsfache ab. Des Weiteren konnten die Bindeepitope des Aptamers durch eine Analyse von verschiedenen TetR-Mutanten im DNA-Bindebereich bestimmt werden. Die Aminosäuren T27, N47 und K48 sind dabei essentiell für die RNA-Bindung und führen bei einem Austausch zum Verlust der RNA-Bindung. Der Bindebereich des Aptamers überlappt mit Aminosäureresten, die für die *tetO*-Bindung essentiell sind. Die Stöchiometrie der TetR/Aptamer-Bindung wurde durch LILBID-Messungen auf eine molare Verteilung von 2:1 festgelegt. Ein TetR-Dimer bindet dabei ein Aptamermolekül. Durch die umfassende biochemische Analyse der TetR/Aptamer-Bindung kann das Aptamer 12-1 nun als Expressionssonde für RNAs in bakteriellen Zellen genutzt werden. Des Weiteren kann das Aptamer als alternativer, artifizieller Transkriptionsregulator im *tet on / tet off*-System verwendet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten miRNAs identifiziert werden, die an der posttranskriptionellen Regulation der 5-Lipoxygenase (5-LO) und der Cyclooxygenase-2 (COX-2) beteiligt sind. Mit bioinformatischen Vorhersageprogrammen wurden die 3'-UTR-Bereiche von 5-LO und COX-2 nach putativen Bindestellen abgesucht. Im Fall der 5-LO wurden durch eine zusätzliche Microarray-Expressionsanalyse miRNAs ausgewählt, welche in 5-LO positiven Zellen hoch exprimiert sind und Bindestellen im 3'-UTR aufweisen. Es konnten verschiedene miRNAs detektiert werden, jedoch keine Regulation der 5-LO Aktivität beobachtet werden.

Für COX-2 wurde neben der Suche nach putativen miRNA-Bindestellen zudem die Stabilität des 3'-UTR untersucht. Mit Hilfe des auf Perl basierenden Programms

SignificanceScoreAssignment (Florian Groher, Diplomarbeit 2011) konnte der 3'-UTR von COX-2 als generell destabilisierend analysiert werden. In Colonkarzinom-spezifischen HT-29-Zellen wurden miRNAs untersucht, welche Bindestellen im 3'-UTR von COX-2 aufweisen. In diesem Kontext sollte der Einfluss einer Interaktion von HT-29-Zellen mit aktivierten Thrombozyten sowie daraus isolierten Bestandteilen wie Mikropartikeln und PDGF analysiert werden. MiR-16, miR-26b, miR-199a und miR-199a* konnten in HT-29-Zellen nachgewiesen werden. Bei einer Stimulation von HT-29-Zellen mit PDGF-BB werden miR-16 und miR-26b konzentrationsabhängig stärker exprimiert, während die Expression von miR-199a und miR-199a* signifikant abnimmt. Eine direkte Regulation von COX-2 durch die untersuchten miRNAs konnte durch Überexpressions- und Reporteranalysen jedoch nicht festgestellt werden.

Die Analysen der 5-LO- und COX-2-Regulation durch miRNAs stellen Vorarbeiten dar. Die etablierten Methoden können nun für eine detaillierte Betrachtung weiterer miRNAs verwendet werden.

2 Einleitung

2.1 RNA - Informationsträger und Regulator

Die klassische Rolle der RNA ist die Informationsübertragung zwischen Transkription und Proteinbiosynthese in Form der *messenger*-RNA (mRNA). Verschiedene Viren tragen als Erbinformation anstatt DNA einzel- oder doppelsträngige RNA-Moleküle (Domingo and Holland, 1997). Analog zu Proteinen besitzt RNA allerdings ebenso wichtige Aufgaben in katalytischen und regulatorischen Prozessen. Die Aufgaben umfassen transkriptionelle und translationale Kontrollfunktionen sowie enzymatische Aktivitäten. Das ist möglich, indem verschiedene Sekundärstrukturelemente ähnlich wie bei Proteinen komplexe Bindetaschen ausbilden oder reaktive Gruppen der Basen oder der Ribose für Spaltreaktionen genutzt werden können (Morozova et al., 2006).

Ein entscheidendes Kriterium dafür stellt der einfache Bauplan der RNA dar. Durch die Kombination aus den vier Basen Adenosin, Uracil, Cytosin und Guanosin kann die Sequenz abhängig von der Länge in 4^n Möglichkeiten auftreten. Die Variabilität der RNA-Sequenz wird durch ungewöhnliche Basen wie Pseudouridin, Ribothymidin oder Hypoxanthin erweitert.

Die Sequenz bestimmt zudem entscheidend die Sekundärstruktur der RNA-Helix, welche aufgrund der 2'-OH-Gruppe im Gegensatz zur DNA in der A-Form vorliegt. Die freie Hydroxylgruppe beeinflusst auch in strukturell flexiblen Bereichen die Stabilität der RNA, indem das Phosphatrückgrat chemisch attackiert werden kann. Durch kanonische GC- und AU-Basenpaare sowie nichtkanonischen Basenpaarungen wie GG, GU und UU kann es zur Ausbildung von Stammschleifen, symmetrischen und asymmetrischen Ausbuchtungen sowie Pseudoknoten kommen (Feigon et al., 1996; Tinoco and Bustamante, 1999; Tuerk et al., 1988). Ausgebuchtete Bereiche einer RNA-Sekundärstruktur stellen häufig Bindemotive für Liganden dar (Hermann and Patel, 2000).

Bei RNA-Liganden-Interaktionen spielen neben der Sekundärstruktur der RNA elektrostatische Wechselwirkungen, π - π -Wechselwirkungen durch Basenstapelungen (*stacking interaction*) sowie sekundäre und tertiäre Wasserstoffbrückenbindungen zwischen funktionellen Gruppen der Liganden und den RNA-Basen eine wichtige Rolle.

Die strukturelle Stabilisierung des Ribose-Phosphatrückgrats wird über elektrostatischen Wechselwirkungen mit mono- und bivalenten Kationen wie K^+ , Na^+ oder Mg^{2+} erreicht (Shiman and Draper, 2000).

2.2 Regulation der Genexpression

Die Regulation genetischer Aktivität kann in der Zelle auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die Veränderung der Chromatinstruktur erfolgt durch Acetylierung, Deacetylierung und Methylierung der Histone. Histon-Acetyltransferasen übertragen Acetylreste auf N-terminale Lysinreste der Histone. Dadurch wird die Chromatinstruktur gelockert und DNA-Bereiche werden für den Transkriptionsapparat zugänglich gemacht (Sternier and Berger, 2000). Histon-Deacetylasen (HDAC) wirken reprimierend auf die Transkription, indem sie Acetylgruppen von acetylierten Lysinen am N-terminalen Histoneende entfernen und so für eine Verdichtung des Chromatins sorgen (de Ruijter et al., 2003). Histonmethyltransferasen übertragen Methylgruppen auf Histonseitenketten und fördern die Bindung der DNA an die Histone. Dadurch wird die Verdichtung des Chromatins zusätzlich verstärkt (Shilatifard, 2006).

Die Transkription wird am häufigsten durch Proteine kontrolliert, welche vermittelt durch die Bindung an spezifische DNA-Sequenzmotive die Transkriptionsmaschinerie positiv oder negativ beeinflussen können. Der Regulationsmechanismus stellt ein konzertiertes Zusammenspiel aus RNA-Polymerase, allgemeinen Transkriptionsfaktoren und spezifischen Aktivatoren bzw. Repressoren dar.

In bakteriellen Zellen werden alternative Stoffwechselwege häufig durch Transkriptionsrepressoren kontrolliert. Die Transkription der Strukturgene für den Laktoseabbau wird beispielsweise durch den Laktose-Repressor (LacR) gesteuert. LacR bindet als Tetramer an seine Operator-DNA-Sequenz und verhindert in Abwesenheit von Laktose die Transkription der Lac-Gene (Friedman et al., 1995). Ist Laktose im Medium vorhanden, dann wird Laktose zu Allolaktose konvertiert und bindet in der Form an LacR. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Repressors, wodurch dieser nicht mehr binden kann und von der DNA abdiffundiert. Dadurch wird der Promotorbereich für die RNA-Polymerase zugänglich (Gilbert and Muller-Hill, 1966; Jarema et al., 1980).

Im *Recruiting*-Modell in eukaryotischen Zellen sorgen DNA-bindende Aktivatoren mit Hilfe von akzessorischen Proteinen für die Rekrutierung der RNA-Polymerasen (Ptashne

and Gann, 1997; Soutourina et al., 2011). Allgemeine Transkriptionsfaktoren haben dabei eine Gerüstfunktion und sorgen für die richtige Positionierung der RNA-Polymerase am Präinitiationskomplex der Transkription.

Als Beispiel für einen spezifischen, eukaryotischen Transkriptionsaktivator kann NF- κ B genannt werden. NF- κ B steuert in nahezu allen tierischen Zellen die Regulation der Immunantwort und der Zellproliferation. Eine fehlerhafte Regulation ist verbunden mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Krebs. NF- κ B bindet als Heterodimer in verschiedenen Kombinationen aus NF- κ B und Rel-Proteinen an spezifische DNA-Sequenzbereiche. Je nach Zusammensetzung des Dimers wirkt NF- κ B aktivierend oder reprimierend auf die Transkription (Gilmore, 2006).

Die Translationsrate wird in den meisten Fällen durch die Stabilität der mRNA kontrolliert. Die 5'-Cap-Struktur der mRNA ist durch die Initiationsfaktoren eIF-4E und eIF-4G gebunden. Dadurch ist die mRNA vor dem Angriff durch die *Decapping*-Enzyme DCP1A und DCP2 geschützt (Piccirillo et al., 2003). Der Poly(A)-Schwanz wird gebunden durch Poly(A)-bindende Proteine und schützt die zu translatierende mRNA durch Interaktion mit den Initiationsfaktoren eIF-4E und eIF-4G vor Angriff durch Nukleasen. Die Halbwertszeit der mRNA wird dabei wesentlich bestimmt durch die Länge des Poly(A)-Schwanzes. Haushaltsgene wie β -Globin haben eine mRNA-Halbwertszeit von 20 h, während die mRNA von c-myc nur 10 min stabil bleibt (Hollams et al., 2002).

Die Stabilität der mRNA kann auch durch *cis*-Elemente beeinflusst werden. Es konnten verschiedene Sequenzmotive identifiziert werden, welche die Halbwertszeit der mRNA positiv oder negativ beeinflussen. Ein Beispiel ist das *iron responsive element* (IRE), welches abhängig von der Bindung des IRE-bindenden Proteins (IRP) zur Degradation der mRNA führt (Leipuviene and Theil, 2007). Weitere Bindemotive für RNA-Bindeproteine wie HuR konnten mittlerweile identifiziert und charakterisiert werden (Lunde et al., 2007).

Auf Proteinebene wird die Lokalisierung wie auch die Stabilität durch posttranslationale Modifikation gesteuert. Bei der Ubiquitinierung ist die Anzahl der Ubiquitinreste entscheidend für das Schicksal des Proteins (Pickart and Eddins, 2004). Proteine, welche zum Abbau freigegeben sind, tragen mindestens fünf Ubiquitinreste und werden so durch das Proteasom oder Lysosom abgebaut. Monoubiquitinierungen dienen dagegen nicht als Abbausignal, sondern zur intrazellulären Verteilung und Interaktion mit anderen Proteinen (Polo et al., 2002). Daneben gibt es weitere Ubiquitin-ähnliche Proteine wie

SUMO oder NEDD8, welche die gleiche Proteinfaltung (Ubiquitin-*fold*) aufweisen und die intrazelluläre Kommunikation und Abbausignale steuern (Seet et al., 2006).

Neben der Expressionskontrolle durch DNA-bindende Proteine konnten sowohl auf Transkriptions- wie auch auf Translationsebene verschiedene natürlich vorkommende RNA-basierte Regulationsmechanismen identifiziert und charakterisiert werden.

2.2.1 RNA-basierte Genregulation in Prokaryoten

Bakterien benutzen die Möglichkeiten, durch alternative RNA-Strukturen die Genexpression zu kontrollieren. Durch Stammschleifen können entweder Antiterminationsstrukturen ausgebildet oder die Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) maskiert werden. Die Signalaufnahme kann dabei an verschiedenen Stellen erfolgen.

Bei der Attenuation ist das Ribosom der Sensor für eine RNA-abhängige Transkriptionsregulation. Bei der Tryptophansynthese von *E. coli* wird zunächst ein regulatorisches Trp-reiches *Leader*-Peptid gebildet und dann am Ribosom die Tryptophan-Verfügbarkeit überprüft. Bei Tryptophanüberschuss wird die RNA-Polymerase durch Ausbildung einer Terminatorstruktur blockiert und so die Tryptophansynthese beendet (Hopcroft et al., 2004). Dieser Mechanismus wird in der bakteriellen Zelle durch die räumliche und zeitliche Kopplung von Transkription und Translation erreicht.

Die Ausbildung einer GC-reichen Haarnadelschleife beendet die Transkription in *E. coli* intrinsisch ohne enzymatische Interaktion (von Hippel et al., 1995). Eine Terminatorstruktur kann ohne Beteiligung von Proteinen durch Ausbildung von Antiterminationsstrukturen nur auf Basis der mRNA aufgelöst werden. In *Bacillus subtilis* wird eine Antiterminatorstruktur auf der mRNA abhängig vom Phosphorylierungszustand des Regulatorproteins GlcT ausgebildet (Stulke et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit der Genregulation in bakteriellen Zellen sind die Riboswitche. Riboswitche sind RNA-Elemente im untranslatierten Bereich, welche mit einer Aptamerdomäne spezifisch Liganden erkennen und auf Transkriptions- oder Translationsebene die Expressionsplattform regulieren. Je nach An- bzw. Abwesenheit des Liganden werden durch Konformationsänderung auf Transkriptionsebene Terminations- und Antiterminationsstrukturen ausgebildet. Die Translation kann reguliert

werden, indem die Ribosomenbindestelle oder das Startcodon in der Aptamerdomäne der Riboswitche maskiert werden (Sashital and Butcher, 2006). Dabei sind Liganden häufig kleine Moleküle des bakteriellen Metabolismus, wie Aminosäuren, Purinbasen oder Nukleotide (Breaker, 2010). In eukaryotischen Zellen sind bis jetzt die TPP-Riboswitche aus *Arabidopsis thaliana* (Thore et al., 2008; Thore et al., 2006), *Aspergillus oryzae* (Kubodera et al., 2003) und *Neurospora crassa* (Cheah et al., 2007) bekannt. Diese Riboswitche kontrollieren auf unterschiedliche Weise den Spleißprozess (Wachter, 2010). Für die konditionale Expressionskontrolle durch synthetische Riboswitche konnten bereits mehrere aktive Schalter beschrieben werden (Weigand and Suess, 2009).

Physiologische Signale können von Liganden-unabhängigen RNA-Schaltern erkannt werden und Einfluss auf die Genexpression haben. RNA-Thermometer erkennen Temperaturunterschiede und steuern durch Konformationsänderung die Expression von Hitzeschock und Virulenzgenen. In *Yersinia pestis* und *Salmonella typhimurium* konnten bereits derartige RNA-Schalter identifiziert werden (Kortmann et al., 2010; Waldminghaus et al., 2007).

Ein weiterer Mechanismus sind die T-Box-Riboswitche aus *Bacillus subtilis*. Dabei agieren tRNAs abhängig von ihrem Beladungszustand mit einer Aminosäure als Stabilisatoren von Antiterminationsstrukturen. Die Gene für *tyrS* werden in Anwesenheit von Tyrosin durch eine Terminatorsequenz inhibiert. Bei Tyrosinmangel bindet die unbeladene tRNA mit dem Anticodon an die Leaderregion im 5'-UTR der mRNA. Zusätzlich wird die Antiterminatorsequenz mit den ersten vier Nukleotiden des 3'-Endes der tRNA gebunden und lösen so die Terminatorstruktur auf (Fauzi et al., 2009; Grundy and Henkin, 2003).

In Bakterien konnten neben *cis*-aktiven RNA-Schaltern auch kleine, nicht kodierende RNAs (sRNAs) identifiziert werden, welche die Expression anderer Gene regulieren. Die Regulation erfolgt entweder in *cis* als Antisense-Transkript oder in *trans*, indem andere Ziel-mRNAs inhibiert werden. Diese sRNAs zeichnen sich durch eine Länge von 50-250 Nukleotiden aus und spielen eine wichtige Rolle in der bakteriellen Substratanpassung, der Stressantwort sowie der Pathogenese (Viegas and Arraiano, 2008; Vogel and Wagner, 2007). Als Beispiel kann die Regulation der Porine OmpC und OmpF genannt, welche für den Transport von Metaboliten und Toxinen zuständig sind und deren Expression unter Stressbedingungen von den sRNAs MicC und MicF kontrolliert werden (Chen et al., 2004b; Delihias and Forst, 2001).

2.2.2 RNA-basierte Genregulation in Eukaryoten

In eukaryotischen Zellen konnten ebenso nicht translatierte RNAs gefunden werden, welche in *trans* die Expression anderer Gene regulieren. Man kann dabei zwischen kleinen, nicht kodierenden RNAs (microRNAs) und langen, nicht kodierenden RNAs (*long non-coding* RNAs) unterscheiden.

MicroRNAs (miRNA; miR) sind nicht-kodierende RNA-Moleküle und besitzen eine Länge von 18 bis 23 Nukleotiden. MiRNAs werden als lange Primärtranskripte (*primary*-miRNAs; pri-miRNAs) von der RNA-Polymerase II bzw. III transkribiert und wie mRNAs durch Capping und Polyadenylierung prozessiert (Bartel, 2004).

Dabei kann die Länge der Primärtranskripte zwischen einigen hundert und mehreren tausend Nukleotiden variieren (Du and Zamore, 2005; Lee et al., 2004; Liu et al., 2008).

Die Primärtranskripte werden im Zellkern von den RNase III Endonukleasen Drosha und DGCR8 zu 60 bis 70 nt langen Vorläufer-miRNAs (*precursor*-miRNA; pre-miRNA) prozessiert, welche durch komplementäre Sequenzbereiche eine Stammschleifenstruktur einnehmen können und am 3'-Ende einen Überhang von zwei Nukleotiden aufweisen.

(Basyuk et al., 2003; Gregory et al., 2004). Die pre-miRNAs werden über Exportin-5 und Ran-GTP ins Cytoplasma transportiert (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003) und durch die RNase III Endonuklease Dicer zu doppelsträngigen, nicht vollständig komplementären miRNA/miRNA*-Duplexen geschnitten (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Lau et al., 2001). Der Duplex wird anschließend durch Helikasen aufgetrennt, so dass in

Abhängigkeit der thermodynamischen Stabilität der 5'-Enden (Schwarz et al., 2003) ein Einzelstrang (miRNA, *guide strand*) erhalten bleibt, während der andere Einzelstrang (miRNA*, *passenger strand*) inaktiv ist und degradiert wird (O'Toole et al., 2006). Der vorhandene Einzelstrang wird dann in einen Multiproteinkomplex, den RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut und zur Ziel-mRNA geführt (Filipowicz et al., 2008; Gregory et al., 2005). Die posttranskriptionelle Regulation erfolgt dann durch Bindung der Zielsequenz im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) einer mRNA. In Abbildung 2.1 ist der Biosyntheseweg von miRNAs dargestellt.

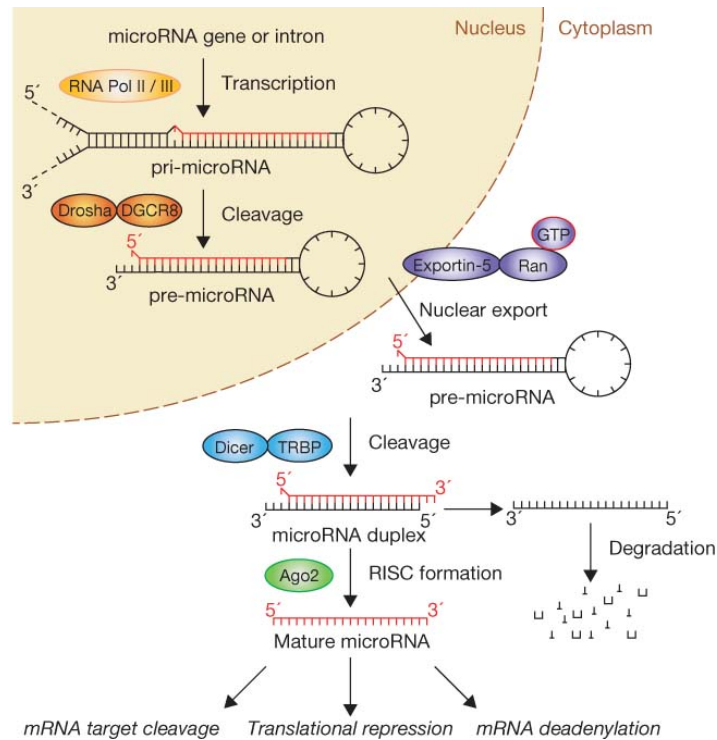


Abb. 2.1 Biosynthese von miRNAs. MiRNAs werden durch die RNA-Polymerasen II oder III im Nucleus transkribiert und durch die RNase III-Endonukleasen Drosha und DGCR8 zu etwa 70 nt langen Vorläufermolekülen (pre-miRNA) prozessiert. Der Export ins Cytoplasma erfolgt vermittelt durch Ran-GTP und Exportin-5. Im Cytoplasma werden die pre-miRNAs durch die RNase III-Endonuklease Dicer zu etwa 20 nt langen miRNA-Duplexen prozessiert. Die Strangtrennung erfolgt in Abhängigkeit der thermodynamischen Eigenschaften des 5'-Endes der miRNA-Stränge. Der stabilere Strang wird in den RISC-Komplex eingebaut und führt durch die Interaktion mit AGO2 zum Abbau der mRNA bzw. zur Repression der Translation (Abbildung aus *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*, Winter et al., 2009).

Die Bindung erfolgt durch die *seed*-Region am 5'-Ende (Nukleotide 2-8) und einer Ankerregion (Nukleotide 13-16) der miRNA sowie zusätzlichen kanonischen und nicht-kanonischen Basenpaaren (Guo and Lu, 2010). Abbildung 2.2 zeigt eine schematische Darstellung des miRNA/mRNA-Duplex (Filipowicz et al., 2008).

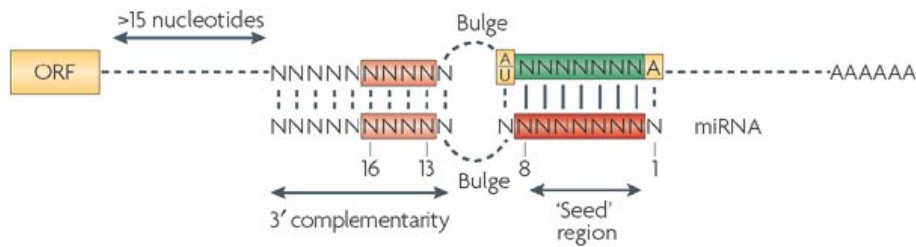


Abb. 2.2 Bindeeigenschaften des miRNA/mRNA-Duplex. MiRNAs binden im 3'-UTR der mRNA mit der *seed*-Region, welche die Nucleotide 2-8 umfasst. Die Affinität der miRNA wird erhöht, wenn die Position 1 ein A und Position 9 ein A oder U aufweist. Danach erfolgt eine Ausbuchtung durch ungepaarte Nucleotide, die die Spezifität für AGO2 gewährleistet. Nach der Ausbuchtung folgen mindestens vier weitere Basenpaare zwischen miRNA und mRNA (Abbildung aus *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?*, Filipowicz et al., 2008).

Die Bindung der mRNA erfolgt in einem Zusammenspiel verschiedener konservierter Argonautproteine. Dabei besitzt das Argonautprotein AGO2 endonukleolytische Aktivität, während die anderen AGO-Proteine lediglich Gerüstfunktionen besitzen (Meister et al., 2004). Durch Bindung der miRNA wird entweder die Translation inhibiert oder die mRNA degradiert (Valencia-Sanchez et al., 2006). Neueste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die Degradation der mRNA in vielen eukaryotischen Zellen der vorwiegende Mechanismus der Translationskontrolle darstellt (Guo et al., 2010).

Die ersten bekannten miRNAs *lin-4* und *let-7* wurden im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt, welche die Genexpression während der postembryonalen Entwicklung regulieren (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000). Mittlerweile sind über 1200 humane miRNAs bekannt und die Zahl steigt weiter an. Man vermutet, dass etwas ein Drittel aller humanen Gene durch miRNAs reguliert werden können (Lewis et al., 2005). In zahlreichen Entzündungsprozessen sowie bei der Krebsentstehung konnten miRNAs als wichtige Modulatoren der Genexpression identifiziert werden. (Kundu and Surh, 2008; Tili et al., 2011).

Das System der RNA-Interferenz (RNAi) wurde beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als natürliches RNA-Silencing erstmals entdeckt (Fire et al., 1998) und findet seither Anwendung in verschiedenen Modellen zur gezielten Inhibierung der Genexpression (Plasterk, 2002). Durch Bindung von exogenen siRNAs (*small interfering RNAs*) an komplementäre Bereiche der mRNA wird der Proteinkomplex RISC rekrutiert, der diese doppelsträngigen Bereiche erkennt und die mRNA abbaut (Elbashir et al., 2001; Fire et al., 1998; Tuschl, 2001).

Lange, nicht kodierende RNAs (long ncRNA, lncRNA) werden von der RNA-Polymerase III transkribiert und zeichnen sich durch eine Länge von mehr als 200 Nukleotiden aus (Hung and Chang, 2010). Im Gegensatz zu kleinen RNAs sind lncRNAs nur schwach konserviert unter Vertebraten sowie Invertebraten. Man vermutet, dass dies auf einen unterschiedlichen Selektionsdruck unter den Spezies zurückzuführen ist (Pang et al., 2006). Die Regulation erfolgt dabei hauptsächlich als Antisense-Transkript durch Repression des Zielgenes.

Ein bedeutsames Beispiel epigenetischer Regulation durch lange, nicht kodierende RNA-Moleküle ist die Inaktivierung des X-Chromosoms. Eine lange, nicht kodierende RNA Xist (*X inactive specific transcript*) bindet an als XIC (*X inactivation center*) bezeichnete DNA-Bereiche des X-Chromosoms und inhibiert durch Histon-Deacetylierung und Methylierung von Promoterregionen die Expression zahlreicher Genen (Brown et al., 1991; Payer and Lee, 2008). Das inaktivierte X-Chromosom wird zum dichteren Heterochromatin verpackt (Barr-Körper). Xist wird auf dem aktiven X-Chromosom durch ein komplementäres Transkript Tsix mittels RNA-Interferenz kontrolliert (Lee et al., 1999). Eine fehlerhafte Inaktivierung führt zum Vorhandensein von zusätzlichen X-Chromosomen und demzufolge zu verschiedenen Krankheitssymptomen (Triple-X-Syndrom; Klinefelter-Syndrom).

2.3 Regulation genetischer Aktivität durch Aptamere

2.3.1 Aptamere

Aptamere (von lat. *aptus* = passend) sind künstlich selektierte, einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle mit einer Länge von 25 bis 75 Nukleotiden, welche mit hoher Affinität und Spezifität Liganden binden können. Die Selektion der spezifischen Aptamersequenzen erfolgt *in vitro* durch einen Prozess der exponentiellen Anreicherung bindender Sequenzen, welcher als SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) bezeichnet wird (Ellington and Szostak, 1990). Der SELEX-Prozess ist schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt.

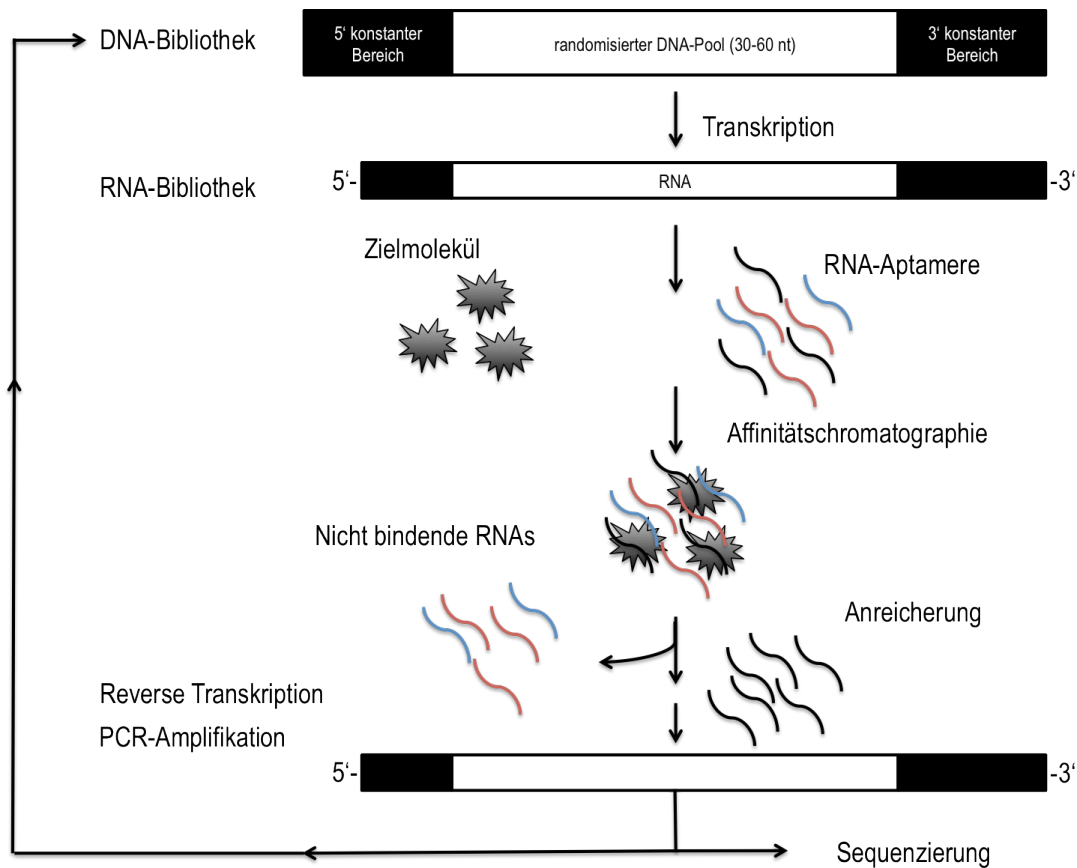


Abb. 2.3 Darstellung des SELEX-Prozesses. Ein randomisierter DNA-Pool wird *in vitro* zu einem RNA-Pool transkribiert. In einer Affinitätschromatographie gegen ein spezifisches Zielmolekül werden bindende RNA-Moleküle von nicht bindenden getrennt. Die angereicherten RNA-Aptamere werden revers transkribiert und sequenziert. Die weitere Anreicherung bindender Aptamere wird durch mehrere Zyklen von PCR-Amplifikation, Affinitätschromatographie und reverser Transkription erreicht (Abbildung angelehnt entnommen aus *Aptamers and SELEX: the technology*, Sampson, 2003).

Die Spezifität der Bindung wird dabei intrinsisch durch die Sequenz und die daraus resultierende Sekundär- und Tertiärstruktur erreicht. Die Bindungsaffinitäten liegen im pico- bis nanomolaren Bereich und setzen sich aus der Kombination von Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und π - π -Wechselwirkungen durch Basen-*Stacking* zusammen (Feigon et al., 1996; Mayer, 2009).

Das Spektrum der Liganden zeigt eine hohe Diversität und reicht von niedermolekularen Substanzen, wie Aminosäuren (Majerfeld et al., 2010; Mashima et al., 2009; Yang et al., 2011c), Antibiotika (Berens et al., 2001; Cowan et al., 2000; Rowe et al., 2010) oder Nukleotiden (Carothers et al., 2006; Dieckmann et al., 1996; Huizenga and Szostak, 1995), über Peptide (Bala et al., 2011; Takahashi et al., 2009) und Proteine (Jellinek et al.,

1993; Lee et al., 2005; Long et al., 2008) bis hin zu Viren (Nitsche et al., 2007) und kompletten Zellen (Goringer et al., 2003; Ramos et al., 2010).

Das Anwendungsgebiet ist aufgrund der hohen Selektivität und Stabilität sowie der günstigen Herstellung im Vergleich zu Antikörpern ebenso weit gefächert. Die Anwendung umfasst die molekularbiologische Diagnostik (Tombelli et al., 2007) und Umwelt- und Lebensmittelanalytik (Yang et al., 2011a) sowie den Einsatz als Therapeutika (Bunka et al., 2010; Yang et al., 2011d). Gerade die therapeutische Anwendung wird durch Modifikationen der RNA-Basen sowie Entwicklung von Spiegelmeren (Vater et al., 2003; Vater and Klussmann, 2003) immer zuverlässiger.

2.3.2 Proteinbindende Aptamere

Nukleinsäuren-bindende Proteine sind häufig wichtige Schalter bei der Regulation der Genexpression in pro- und eukaryotischen Zellen und sind dadurch interessante Zielmoleküle für *in vitro*-Selektionsprozesse (Cox and Ellington, 2001; Cox et al., 2002). Es wurden Aptamere gegen natürlich vorkommende DNA- oder RNA-bindende Proteine identifiziert. Das Aptamer gegen das *E. coli*-Protein SelB, einem RNA-bindenden Co-Regulator der Translation, verhindert *in vivo* den Einbau von Selenocystein in Proteine (Klug et al., 1999; Klug et al., 1997).

Es konnten ebenso Aptamere gegen die RNA Polymerase II (RNAP) aus *E. coli* selektiert werden. RNAP II wird durch die Aptamer-RNA gebunden, so dass dadurch die DNA-Bindung inhibiert wird. (Kulbachinskiy et al., 2004). RNA-Aptamere gegen die RNA-Polymerase II aus *S. cerevisiae* blockieren spezifisch die Transkription und diskriminieren gegen die anderen RNA-Polymerasen I und III (Thomas et al., 1997). Ein Aptamer gegen den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIB aus *S. cerevisiae* inhibiert spezifisch die Interaktion von TFIIB mit dem TATA-bindenden Protein (TBP) oder der RNA-Polymerase II (Sevilimedu et al., 2008).

TBP-bindende Aptamere wurden selektiert, die spezifisch zwischen dem freien TBP (Aptamere der Klasse 1) und dem gebundenen Zustand an der TATA-Box (Aptamere der Klasse 2) diskriminieren können. Aptamere der Klasse 2 konkurrieren dabei mit der TATA-Box (Shi et al., 2007).

In höheren eukaryotischen Zellen konnten Aptamere selektiert werden, die gegen verschiedene intra- und extrazelluläre Proteine binden (Mayer, 2009). Macugen

(Pegaptanib) ist das erste therapeutisch angewandte Aptamer, welches gezielt eine Spleißisoform von VEGF inhibiert. Diese führt bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) zu einer gesteigerten, pathologischen Gefäßneubildung. Macugen bindet die VEGF-Isoform und reduziert somit die degenerative Gefäßentwicklung (Apte, 2008).

Weitere Aptamere gegen therapeutisch interessante Zielmoleküle wie Wachstumsfaktoren oder HIV-spezifische Proteine konnten gegenwärtig in ihrer Struktur und Funktion beschrieben werden und befinden sich in verschiedenen Phasen der klinischen Testung (Keefe et al., 2010).

2.4 TetR und das TetR-bindende Aptamer

2.4.1 Der Tetracyclinrepressor TetR

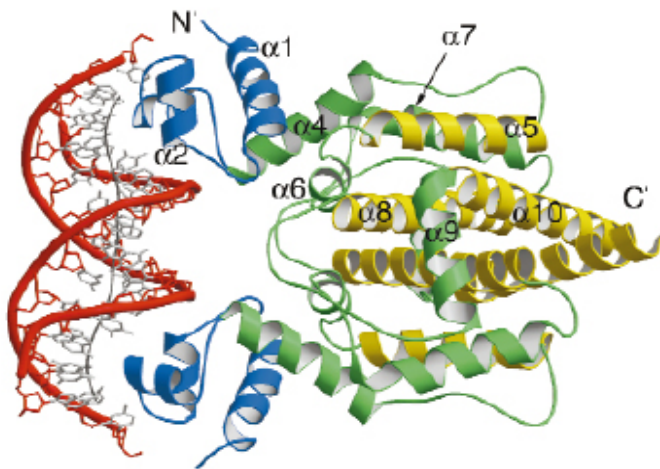


Abb. 2.4 Kristallstruktur des *tetO*-gebundenen TetR. Die DNA-Bindung des TetR-Dimers wird durch die Helices $\alpha 1$ bis $\alpha 3$ (blau) vermittelt. Die Dimerisierung (gelb) sowie die Induktorenerkennung (grün) von TetR erfolgt über die Helices $\alpha 5$ bis $\alpha 10$. Die Operator-DNA *tetO* ist in rot dargestellt (Abbildung aus *Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system*, Orth et al., 2000).

Der Tetracyclinrepressor (TetR) kontrolliert die Tetracyclin (Tc)-Resistenzdeterminante des Transposons *Tn10* (Hillen et al., 1983) und stellt ein natürlich vorkommendes Regulatorprotein dar (Aramaki et al., 1995). Die Resistenzdeterminante setzt sich aus den Genen *tetA* und *tetR* zusammen. TetA ist ein in der Cytoplasmamembran verankertes

Protein mit 12 Transmembranhelices und für den aktiven Export von Tc zuständig (McMurry et al., 1980; McMurry et al., 1983). Die Expression von TetA wird stringent reguliert, da die konstitutive Expression toxisch für die Zelle wäre (Eckert and Beck, 1989). Das *tetR*-Gen kodiert für das 23 kDa große Regulatorprotein TetR, das die Expression von *tetA* und seine eigene reguliert (Hillen et al., 1983). Die Regulation der divergent angeordneten Gene *tetA* und *tetR* erfolgt in der dazwischenliegenden Kontrollregion. Die darin positionierten Promotoren P_A (Promotor von *tetA*) und P_R (Promotor von *tetR*) überlappen mit zwei Operatorsequenzen *tetO1* und *tetO2*. In Abwesenheit von Tc bindet TetR an die Operatoren und verhindert so die Expression der beiden Gene (Hillen and Berens, 1994). Die Induktion von TetR wird im natürlichen System durch Bindung von Tc im Komplex mit Magnesium ausgelöst. Gelangt Tc durch passive Diffusion in die Zelle (Sigler et al., 2000), bildet es einen Komplex mit zweiwertigen Metallionen und wird mit hoher Affinität von TetR gebunden. Die Bindekonstante von [TcMg]⁺ liegt bei $3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Scholz et al., 2000) und ist um den Faktor 1000 höher als die Bindung von Tc an das Ribosom (Takahashi et al., 1986). Dadurch erfolgt die Induktion von TetR durch Tc schon bei nanomolaren Konzentrationen (Hillen and Berens, 1994). Durch Bindung von Tc erfolgt eine Konformationsänderung des TetR (Orth et al., 1998) und TetR dissoziiert von der DNA, so dass *tetR* und *tetA* exprimiert werden können (Hillen et al., 1983). Die Struktur des *tetO* gebundenen TetR-Dimers ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

TetR ist in Struktur und Funktion sehr gut untersucht. Von den zwölf bekannten Klassen sind die Repressoren TetR(B) (Chopra and Roberts, 2001) und TetR(D) (Saenger et al., 2000) am besten untersucht. TetR(B) und TetR(D) sind zu 63% identisch (Hillen and Berens, 1994; Hillen et al., 1984). Aus beiden Klassen wurde eine Proteinchimäre TetR(BD) hergestellt, die sich in zehn Positionen von TetR(D) unterscheidet und den DNA-Bindekopf von TetR(B) trägt (Orth et al., 1998). TetR(BD) ist das Repressormolekül mit den besten Regulationseigenschaften (Schnappinger et al., 1999). Neben dem natürlichen Induktor Tc können auch Derivate wie Anhydrotetracyclin (Atc) oder Doxycyclin (Dox) (Henssler et al., 2004; Scholz et al., 2003) TetR effizient induzieren. Zudem konnte ein Transkription induzierendes Peptid (TiP) charakterisiert werden, das über Protein-Protein-Kontakte auch nicht induzierbare TetR-Mutanten erkennen und binden kann (Klotzsche et al., 2005).

Es konnten bereits mehrere konditionalen Genexpressionssysteme basierend auf dem TetR-Regulationsmechanismus etabliert werden. Die Aktivität der RNA-Polymerase III

kann in *Saccharomyces cerevisiae* gezielt durch das TetR-*tetO*-System reguliert werden (Dingermann et al., 1992). In humanen Zellen konnte durch Fusion von TetR mit der Transkriptionsaktivator-domäne VP16 ein konditionales System entwickelt werden, durch welches spezifisch und effizient *in vivo* die Genexpression reguliert werden kann (Gossen et al., 1995).

2.4.2 Das TetR bindende Aptamer 12-1

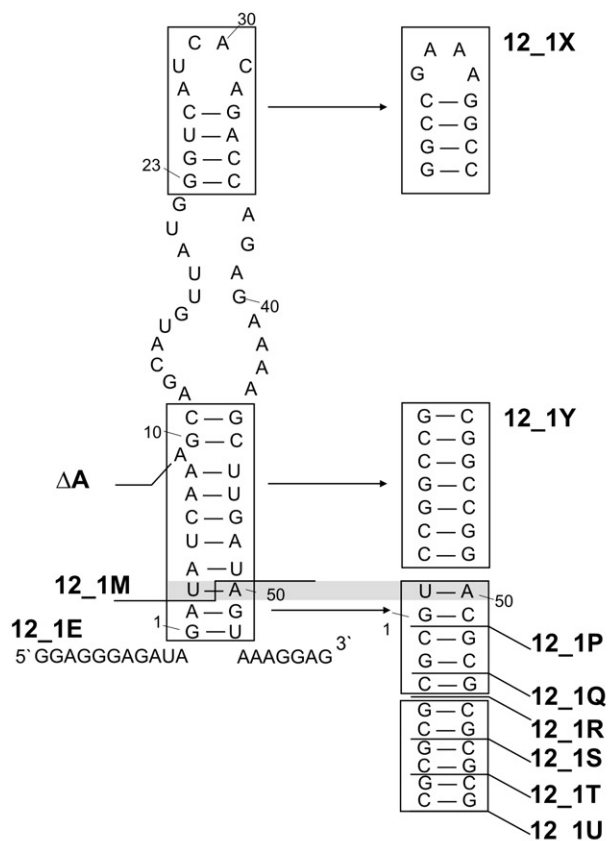


Abb. 2.5 Sekundärstruktur der Konstrukte des TetR-bindenden Aptamers 12-1. Die vorhergesagte Sekundärstruktur des Konstrukts 12-1E sowie des Minimalmotivs 12-1M ist schematisch dargestellt. Die Deletion des ausgebuchteten A9 ist durch das Konstrukt ΔA gekennzeichnet. Die Verlängerung des Konstrukts 12-1MΔA durch GC-Basenpaare führt zu den Konstrukten 12-1P-U. Ein kompletter Austausch der terminalen Stammschleife (12-1X) bzw. des Stammbereichs (12-1Y) konnte ebenfalls gezeigt werden (Abbildung aus *An RNA aptamer that induces transcription*, Hunsicker et al., 2009).

Das TetR bindende Aptamer wurde über einen zweistufigen Prozess aus *in vitro* Selektion und *in vivo* Screening identifiziert (Hunsicker et al., 2009). In Abbildung 2.5 ist die Sekundärstruktur der Aptamerkonstrukte ab 12-1E mit den Variationen der terminalen

und distalen Stammbereiche dargestellt. Der *in vitro* Selektionsprozess (SELEX, *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) (Tuerk and Gold, 1990)) umfasste 12 Runden, bei dem ein randomisierter RNA-Pool (N50) gegen das bakterielle Tetracyclin-Repressorprotein (TetR) selektiert wurde. Das aus dem Ausgangspool NC12 isolierte Aptamerkonstrukt 12-1 wurde anschließend durch schrittweise Deletion der konstanten Bereiche zu einem Minimalmotiv 12-1M verkürzt. Zudem konnte durch Deletion eines ungepaarten Adenosins (12-1K Δ A) sowie durch Stabilisierung des Stammbereiches mit GC-Basenpaaren (12-1P bis 12-1U) die Aktivität *in vivo* weiter gesteigert werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass ein kompletter Austausch des terminalen Stammschleifenbereichs bzw. des Stammbereichs möglich ist (12-1X bzw. 12-1Y), während die asymmetrische Ausbuchtung hoch konserviert ist und von 14 Basen nur an zwei Positionen Mutationen toleriert werden. Dieser Bereich konnte durch *footprint*-Experimente anschließend als Bereich der Proteinbindung mit TetR bestätigt werden. Eine Analyse verschiedener TetR-Mutanten im Proteinkörper und im DNA-Bindebereich ergab, dass die Bindebereiche des Aptamers mit Positionen der DNA-Bindung überlappen (Dissertation Anke Hunsicker, 2009). In *in vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass die Induktionsstärke des Aptamers mit der thermodynamischen Stabilität der Stammbereiche und der Wachstumstemperatur von *E. coli* korreliert.

Das Aptamer wurde mit verschiedenen RNA-Molekülen fusioniert. Für alle Fusionskonstrukte war eine stabil bleibende Aktivität *in vivo* zu beobachten (Meitert et al., in Vorbereitung). Das Aptamer kann somit als Sonde benutzt werden, um die Expression von RNAs unter verschiedenen Bedingungen untersuchen zu können.

2.5 Regulation von Entzündungsprozessen

2.5.1 Eicosanoide

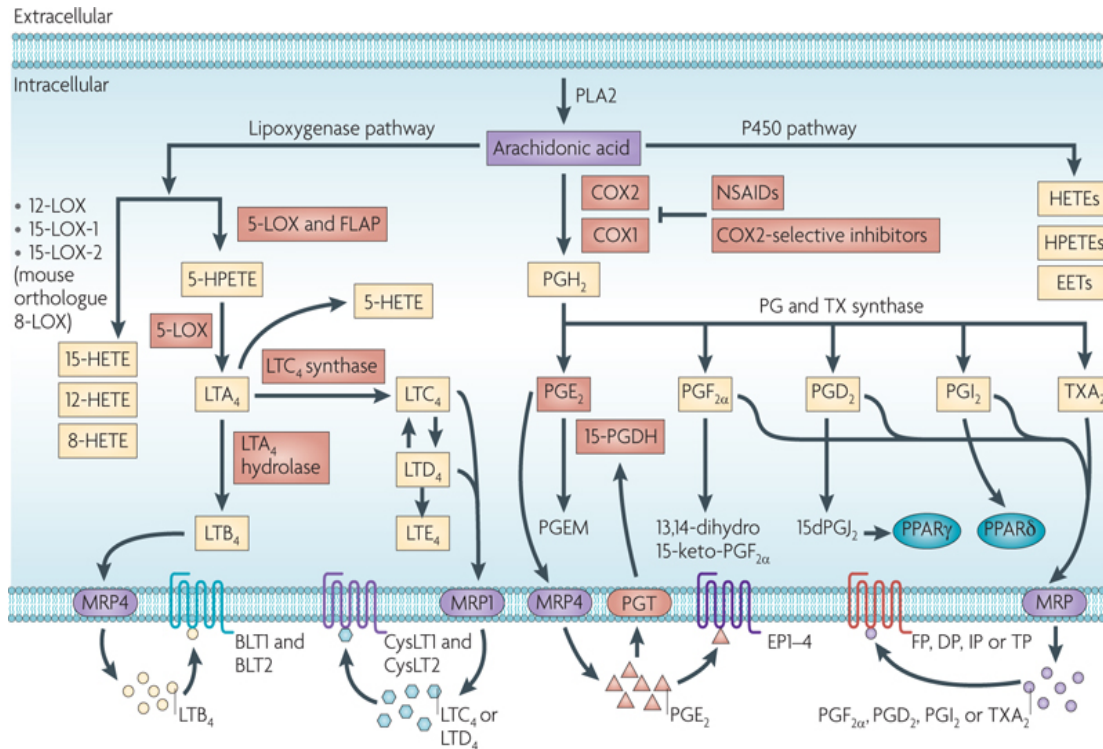


Abb. 2.6 Biosynthesewege von Eicosanoiden. Arachidonsäure wird durch PLA₂ aus Phospholipiden freigesetzt und dient als Substrat für die Signalwege der Lipoygenasen, Cyclooxygenasen und der Cytochrom P450 Monooxygenase. Im Lipoygenaseweg wird Arachidonsäure zu Leukotrienen umgebaut. Die Cyclooxygenasen konvertieren Arachidonsäure zu Prostaglandinen und Thromboxanen. Die Cytochrom-P450-Monooxygenase oxygeniert Arachidonsäure zu Epoxyeicosatriensäuren (EETs) (Abbildung aus *Eicosanoids and cancer*, Wang & DuBois, 2010).

Eicosanoide (von griech. *είκοσι* = zwanzig) sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einer Länge von 20 Kohlenstoffatomen, welche als Lipidhormone Signalüberträger der Immunantwort sind (Wang and Dubois, 2010). Man unterscheidet mit Prostaglandinen, Prostacyclinen, Thromboxanen und Leukotrienen vier verschiedene Klassen, welche alle von essentiellen Omega-3-oder Omega-6-Fettsäuren abstammen. Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane werden in den meisten Zellen *de novo* von den Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 synthetisiert. Leukotriene werden dagegen nur in inflammatorischen Zellen wie polymorphonukleären Monozyten, Macrophagen oder

Mastzellen von der 5-Lipoxygenase (5-LO) hergestellt (Funk, 2001; Steinhilber, 1994). Die mehrfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure dient als Ausgangsmolekül für alle Eicosanoide, welche von 5-LO, COX-1 und COX-2 und der Cytochrom-P450-Monooxygenase synthetisiert werden. Arachidonsäure wird durch die cytoplasmatische Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Phospholipiden der Zellmembran herausgelöst (Khanapure et al., 2007). Die Cyclooxygenasen können durch nicht-steroidale Antirheumatika (*non steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) inhibiert werden. Seit etwa 10 Jahren sind zudem COX-2 spezifische Inhibitoren wie Celecoxib erhältlich, welche die physiologisch wichtigen Funktionen von COX-1 nicht beeinflussen. In Abbildung 2.6 sind die verschiedenen Wege der Eicosanoidbiosynthese dargestellt.

2.5.1.1 Biosynthese von Leukotrienen durch 5-LO

Die 5-LO wurde 1976 als ein 78 kDa großes Protein entdeckt, welches ausgehend von Arachidonsäure die Biosynthese von bioaktiven Leukotrienen katalysiert (Borgeat et al., 1976). Die Biosynthese erfolgt assoziiert mit dem 5-LO aktivierenden Protein (FLAP) an der Cytoplasmamembran. FLAP sorgt dabei für die Bindung der Arachidonsäure an 5-LO. In zwei Oxygenierungsschritten wird Arachidonsäure zu 5(S)-Hydroperoxy-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraensäure (5-HPETE) und anschließend zum Allylepoxyd Leukotrien A₄ (LTA₄) umgebaut. Durch enzymatische Hydrolyse von LTA₄ durch die LTA₄-Hydrolase entsteht das Leukotrien B₄ (LTB₄). Die Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ werden durch Konjugation von Glutathionresten erhalten (Radmark et al., 2007). Der Biosyntheseweg der verschiedenen Leukotriene ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

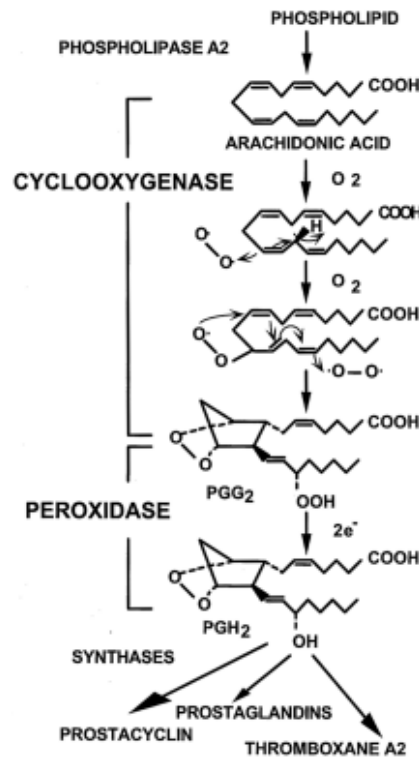


Abb. 2.8 Biosynthese von Prostanoiden. Cyclooxygenasen katalysieren die Biosynthese von Prostanoiden ausgehend von Arachidonsäure. Prostaglandin G₂ (PGG₂) wird reduziert zu PGH₂. Durch spezifische Synthasen werden weitere bioaktive Prostaglandine, Prostacyclin und Thromboxan A₂ erhalten (Abbildung aus *Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology*, Smith et al., 2000).

2.5.2 Regulation der Expression von 5-LO, COX-1 und COX-2

2.5.2.1 Regulation der 5-LO

Das 5-LO Gen besitzt eine Länge von 82 kb, wobei 14 Exons von 13 Introns unterbrochen sind. Die Initiation der Transkription findet über fünf SP1-Tandemsequenzen in einer GC-reichen Region stromaufwärts des Promoters statt, welcher ähnlich zu Haushaltsgenen keine TATA- oder GCAAT-Sequenzen aufweist. Der 5-LO Promoter trägt außerdem einen Konsensus-Sequenzbereich für verschiedene Transkriptionsaktivatoren der Egr-, Sp1-, NF- κ B-, GATA-, myb-, und AP-Familien (Hoshiko et al., 1990; Romano and Claria, 2003; Samuelsson et al., 1991). Die Promoteraktivität wird des Weiteren über Methylierung der GC-reichen Region reprimiert (Katryniok et al., 2010; Uhl et al., 2002; Uhl et al., 2003). Die Stimulation von 5-LO positiven Monozyten mit *transforming growth factor* β (TGF β) und 1,25-

Dihydroxy-Vitamin D3 (Calcitriol) führt zu einem akkumulierten mRNA-Level und einer gesteigerten Enzymaktivität, bei der das Methylierungsmuster anscheinend keine Rolle spielt (Brungs et al., 1995). Die Aktivierung der 5-LO-Expression durch TGF β wird über die Regulatorproteine Smad3 und Smad4 gesteuert (Seuter et al., 2006). TGF β und Calcitriol stimulieren außerdem die Transkriptionselongation der RNA-Polymerase II durch Modifizierung der Chromatinstruktur. Die Regulation erfolgt dabei Promoter unabhängig durch Vitamin D3-*response*-Elemente (VDRE) im kodierenden Bereich. Dadurch werden die Elongationsmarker H3K36me3 und H4K20me1 aktiviert und die RNA-Polymerase II in der Elongationsform rekrutiert (Stoffers et al., 2010).

2.5.2.2 Regulation von COX-1 und COX-2

COX-1 und COX-2 sind membrangebundene ER-Proteine, welche beide als Homodimere auftreten und etwa 60% Sequenzidentität in der Primärstruktur aufweisen (Yuan et al., 2006). COX-1 wird in vielen Zellen und Geweben konstitutiv exprimiert und besitzt einen Promoter, welcher ähnlich zu Haushaltsgenen einen GC-reichen Sequenzbereich ohne TATA- oder CAAT-Boxen aufweist (Wang et al., 1993). Die konstitutive Expression wird durch SP1-Bindestellen gewährleistet (Xu et al., 1997).

Die Expression von COX-2 wird dagegen in unterschiedlichen Zelltypen durch eine Kombination verschiedener *cis*-aktiver Elemente reguliert. Die Promoterregion von COX-2 weist je nach Zelltyp E-Box-, *cAMP-response*-, *Serum-response*- und *Peroxisome-proliferator-response*-Elemente auf sowie Bindestellen für die Transkriptionsaktivatoren NF- κ B, AP-1 und C/EBP (Kang et al., 2007; Tanabe and Tohnai, 2002).

Das Ausmaß der Regulation unterscheidet sich ebenfalls zwischen COX-1 und COX-2. Die COX-1 mRNA ist mit einer Halbwertszeit von mehr als 12 h sehr stabil, während die COX-2 mRNA mit etwa 13 min Halbwertszeit sehr instabil ist. Der 3'-UTR von COX-2 weist im Gegensatz zu COX-1 zahlreiche AU-reiche Elemente auf, welche durch Sequenzwiederholungen eines AUUUA-Motives charakterisiert sind (Young and Dixon, 2010). Diese AU-reichen Elemente (ARE) wirken destabilisierend auf die mRNA und bewirken den schnellen mRNA-Abbau (Chen and Shyu, 1994; Chen and Shyu, 1995).

RNA-bindende Proteine können an die AU-reichen Sequenzen binden und die mRNA-Stabilität sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Für COX-2 sind mittlerweile 16

trans-agierende Regulatorproteine bekannt, die an AU-reiche Sequenzen binden und entweder die mRNA stabilisieren bzw. destabilisieren oder die Translation inhibieren (Young and Dixon, 2010). Insbesondere HuR und CUGBP2 können mit gleicher Affinität im 3'-UTR von COX-2 binden und wirken antagonistisch auf die Stabilität der mRNA (Murmu et al., 2004; Sureban et al., 2007).

2.5.3 Über die Rolle von 5-LO und COX-2 in Entzündungsprozessen und Krebs

Für verschiedene Entzündungskrankheiten konnte gezeigt werden, dass 5-LO eine wichtige Rolle spielt. Bei Asthmapatienten konnte eine erhöhte Genexpression in peripheren Blutleukozyten beobachtet werden (Koshino et al., 1998). In alveolaren Macrophagen wurde eine erhöhte 5-LO Aktivität im Vergleich mit Monozyten entdeckt (Bigby and Holtzman, 1987; Pueringer et al., 1992). Antileukotriene konnten bereits erfolgreich als Therapeutika für Asthmapatienten entwickelt und angewendet werden (Dahlen, 2006).

In kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von 5-LO hochreguliert ist und einen Einfluss auf die Pathologie hat (Grainger, 2004; Spanbroek et al., 2003). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die 5-LO Aktivität direkt mit der Entstehung von arteriellen Gefäßläsionen korreliert (Mehrabian et al., 2002). Außerdem steht der TGF β -Metabolismus in direktem Zusammenhang mit der Entstehung arteriosklerotischer Gefäßerkrankungen (Grainger, 2004).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass 5-LO auch eine Rolle in verschiedenen Krebserkrankungen trägt (Furstenberger et al., 2006). In Prostatakrebszellen konnte gezeigt werden, dass Arachidonsäure mittels 5-LO zu 5-HETE konvertiert wird und dadurch die Zellproliferation ansteigen lässt. Werden 5-LO spezifische Inhibitoren zugegeben, kann der proliferative Effekt der Arachidonsäure wieder aufgehoben werden (Ghosh and Myers, 1997).

Die Kontrolle der Genexpression von COX-2 steht im Zusammenhang mit einer Vielzahl unterschiedlicher Entzündungskrankheiten und Krebsarten. COX-2 ist in Brustkrebszellen überexprimiert und wird durch HER2/neu, einem Marker für proliferierendes Wachstum,

induziert. Die Überexpression von COX-2 und HER2/neu führt zu einer erhöhten Metastasierung und Gefäßneubildung (Williams et al., 1999).

Bei Colonkarzinomen und –adenokarzinomen konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Tumorentstehung und der COX-2 Expression festgestellt werden. In colorektalen Tiermodellen, wie Min-Mäusen (*multiple intestinal neoplasms mice*) und AOM (Azoxyethan) behandelten Ratten, konnte eine stark erhöhte COX-2 Expression beobachtet werden (Hull et al., 2006; Kwon and Magnuson, 2007).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei Entzündungsprozessen die Interaktion von Monozyten und aktivierten Thrombozyten zu einer rapiden Ausschüttung von IL-1 β und verschiedener Wachstumsfaktoren führt und dadurch die COX-2 mRNA durch das RNA-bindende Protein HuR (*human antigen R*) stabilisiert wird (Dixon et al., 2006).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit wurde thematisch in zwei große Blöcke aufgeteilt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die biochemische Interaktion zwischen TetR und dem TetR-bindenden Aptamer 12-1 charakterisiert. Dabei wurde die Bindung von TetR an das Aptamer durch Gelverzögerungsexperimente analysiert und die Bindungsaffinität (K_D) quantifiziert. Des Weiteren wurde die kompetitive Bindung zwischen Aptamer-RNA, TetR und *tetO*-Operator-DNA analysiert und die Stöchiometrie der Bindung zwischen TetR und Aptamer-RNA bestimmt. Das Ziel der Experimente sollte eine umfassende Darstellung der TetR-Aptamer-Interaktion sein, um einen gezielten Einsatz des Aptamers als Expressionssonde oder alternativen Transkriptionsaktivator zu gewährleisten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die posttranskriptionelle Regulation von 5-LO und COX-2 durch miRNAs untersucht. Im 3'-UTR-Bereich wurden mit Hilfe bioinformatischer Vorhersageprogramme Bindestellen für bekannte miRNAs identifiziert sowie in verschiedenen 5-LO exprimierenden Zellen das Expressionsniveau bekannter humaner und viraler miRNAs mittels Microarraychip-Technologie analysiert und validiert. Mögliche regulatorisch aktive miRNAs sollten anschließend weiter charakterisiert werden. In Colonkarzinom-spezifischen HT-29-Zellen wurden miRNA untersucht, die bioinformatisch vorhergesagte Bindestelle auf der COX-2 mRNA tragen und unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit Thrombozytenbestandteilen einen regulatorischen Effekt auf COX-2 haben.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Tab. 3.1 Chemikalien

| Material | Bezugsquelle |
|--|-----------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese 40% | Roth, Karlsruhe |
| Adenosintriphosphat (ATP) | Roth, Karlsruhe |
| Agar | OXOID, Heidelberg |
| Agarose pegGold Universal | pegLab, Erlangen |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Roth, Karlsruhe |
| Ampicillin | Roth, Karlsruhe |
| β -Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| Borsäure | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Roth, Karlsruhe |
| Calciumchlorid (CaCl_2) | Roth, Karlsruhe |
| Chloroform (CHCl_3) | Roth, Karlsruhe |
| Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) | pegLab, Erlangen |
| Dextran | Sigma-Aldrich, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Finnzymes, Finnland |
| Dulbecco's PBS without Ca und Mg 10 x | PAA, Cölbe |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium | Invitrogen, Karlsruhe |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol, 99,98% | Merck, Darmstadt |
| Ethanol, technisch | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) | Roth, Karlsruhe |
| Formamid, deionisiert | Roth, Karlsruhe |
| Fötale Kälber Serum (FCS) | Biochrom AG, Berlin |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Guanidiniumthiocyanat | Sigma-Aldrich, USA |

Material und Methoden

| | |
|-------------------------------------|--|
| Harnstoff | Roth, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | OXOID, Heidelberg |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Lipofectamine 2000 | Invitrogen, Karlsruhe |
| LSM Lymphozyten-Separations-Medium | PAA, Cölbe |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat | Roth, Karlsruhe |
| McCoy's 5A Medium | Invitrogen, Karlsruhe |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| Natriumacetat | Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth, Karlsruhe |
| Natronlauge (NaOH) | Roth, Karlsruhe |
| NTPs | Sigma-Aldrich, USA |
| Odyssey Blocking Buffer | LI-COR, Bad Homburg |
| Opti-MEM | Invitrogen, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin | PAA, Cölbe |
| Phenol (für RNA-Isolationen) | Roth, Karlsruhe |
| Phenol/Chlorform/Isoamylalkohol | Roth, Karlsruhe |
| Saccharose | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure (HCl) | Roth, Karlsruhe |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Roth, Karlsruhe |
| Spermidin | SERVA, Heidelberg |
| TaqMan Universal PCR Master Mix 2 x | Applied Biosystems by Life Technologies, Darmstadt; vertrieben durch Roche, Mannheim |
| TEMED | Roth, Karlsruhe |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Affymetrix/USB, USA |
| Trypsin/EDTA 10 x | PAA, Cölbe |
| Trypton | Roth, Karlsruhe |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, USA |
| Universal Probe Library #21 | Roche, Mannheim |
| Xylencyanol | Roth, Karlsruhe |

3.1.2 Hilfsmittel

Tab. 3.2 Hilfsmittel

| Material | Bezugsquelle |
|--|--|
| 24-well Platte, durchsichtig | Greiner, Nürtingen |
| 6-well Platte, durchsichtig | Greiner, Nürtingen |
| 96-well Platte, durchsichtig | Greiner, Nürtingen |
| 96-well Platte, weiß | Greiner, Nürtingen |
| Becher, Glas | Schott Duran, Jena |
| Becher, Kunststoff | Vitlab, Großostheim |
| Drigalski-Spatel | A. Rösch, FAU Erlangen-Nürnberg |
| Einmal-Dispenserspritzen | Greiner, Nürtingen |
| Einmal-Spritze | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Einmalhandschuhe, Latex | VWR, Darmstadt |
| Einmalhandschuhe, Nitril | VWR, Darmstadt |
| Gewebekulturflaschen (50 ml / 250 ml / 650 ml) | Greiner, Nürtingen |
| Glaspipetten | Whatman, England |
| Messzylinder | Vitlab, Grossostheim |
| MicroAmp Fast Optical 96-well Reaktionsplatte | Applied Biosystems by Life Technologies, Darmstadt |
| MicroAmp™ 96-Well optisches adhäsiver Film | Applied Biosystems by Life Technologies, Darmstadt |
| MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, 0,1 ml | Applied Biosystems by Life Technologies, Darmstadt |
| MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip | Applied Biosystems by Life Technologies, Darmstadt |
| Mikrotiterplatte | Greiner, Nürtingen |
| Neubauerzählkammer | Marienfeld, Lauda-Königshof |
| Northern Blot-Membran Hybond-N+ | GE Healthcare, USA |
| Northern Blot Tankelektroblotter | peqLab, Erlangen |
| Pasteurpipetten | Brand, Wertheim |
| PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml | peqLab, Erlangen |
| Petrischalen, Kunststoff | Greiner, Nürtingen |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| Pipetten (2, 20, 200, 1000 µl) | Gilson, Frankreich |
| Pipettenhelfer, macro | Brand, Wertheim |
| Pipettenspitzen, Kunststoff | Greiner, Nürtingen |
| Pipettierhilfe Pipetboy accu | IBS Integra Biosciences, Fernwald |
| Pipettierhilfe Pipetman | IBS Integra Biosciences, Fernwald |
| Reagenzgläser | Schott Duran, Jena |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml / 2,0 ml) | Greiner, Nürtingen |
| Reaktionsgefäße (15 ml / 50 ml) | Greiner, Nürtingen Sarstedt, Nürnberg |
| Schikanekolben | Schott Duran, Jena |
| Schraubflaschen | Schott Duran, Jena |
| Skalpellklinge | Roth, Karlsruhe |
| Sephadex Illustra MicroSpin G-25 Columns | GE Healthcare, USA |
| Spannungsnetzteil | Bio-Rad, USA |
| Stericup | Millipore, Frankreich |
| Sterilfilter Filtropur S 0,2 | Sarstedt, Nürnberg |
| Western Blot-Membran Hybond-P PVDF | GE Healthcare, USA |
| Whatman-Papier | GE Healthcare, USA |
| Zentrifugenbecher (JA10) | Beckmann, München |

3.1.3 Geräte

Tab. 3.3 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| Autoklav | Getinge, Schweden |
| Autoklaviertopf | Sitram, Frankreich |
| Biofuge (Fresco17, Pico17, PrimoR) | Heraeus Christ, Osterode |
| Brutschrank (37°C) | Heraeus Christ, Osterode |
| Bunsenbrenner | VWR, Darmstadt |
| Eismaschine | Scotsman Ice System, USA |
| Electrophoresis Power Supply Consort | peqLab, Erlangen |
| Elektrophorese-Kammern | C.B.S. Scientific, Del Mar Markus Müller, FAU Erlangen- Nürnberg peqLab, Erlangen Roth, Karlsruhe |
| Feinwaage | Acculab, USA |
| Geldokumentation | INTAS, Göttingen |
| Heizblock | VWR, Darmstadt |
| Hybridisierungssofen HC 300c Hybricycler | UVP Laboratory Product, USA |
| IKA VORTEX Genius3 | IKA, Staufen |
| Infinite® M200 PRO | Tecan, Männedorf, Schweiz |
| Inkubationsschüttler Multitron | Infors AG, Bottmingen |
| Kochplatte | Rommelsbacher GmbH, Dinkelsbühl |
| Kühlschrank | Liebherr, Schweiz |
| Kulturschüttler Mixer 5432 | Eppendorf AG, Hamburg |
| Magnetrührer IKA RET basic | IKA, Staufen |
| Mikrowelle | AEG, Frankfurt am Main |
| Mini Protean System für SDS-PAGE | Bio-Rad, München |
| Multifuge 1L-R | Heraeus Christ, Osterode |
| NanoDrop ND-1000 Spektrophometer | peqLab, Erlangen |
| Odyssey Infrared Imaging System | LI-COR Biosciences, Bad Homburg |
| PCR-Maschinen | peqLab, Erlangen |
| pH-Meter 766 Calimatic | Knick, Berlin |
| Phosphoimager Typhoon 9400 | GE Healthcare, USA |

Material und Methoden

| | |
|-------------------------------------|--|
| Proteingelelektrophoreseapparatur | Bio-Rad, USA |
| Spannungsnetzgerät | Bio-Rad, USA |
| StepOnePlus Real-time PCR System | Applied Biosystems by Life Technologies, Darmstadt |
| TC-10 Automated Cell Counter | Bio-Rad, München |
| Thermocycler Primus 25 | peqLab, Erlangen |
| Thermomixer comfort | Eppendorf AG, Hamburg |
| ThermoStat plus | Eppendorf AG, Hamburg |
| Tiefkühltruhe (-80°C) | Heraeus Christ, Osterode |
| Trockenschrank | Heraeus Christ, Osterode |
| Ultrazentrifuge Optima L-90 K | Beckman Coulter, Krefeld |
| UV-Schirm 254 nm | INTAS, Göttingen |
| Variofuge 3.0R Sepatech | Heraeus Christ, Osterode |
| Videodokumentationsanlage | INTAS, Göttingen |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries, USA |
| Waage | Acculab, USA |
| Wärmeschrank | EHRET, Emmendingen |
| Wasserbad | Julabo, Seelfeld |
| Wasservollentsalzungsanlage Synergy | Millipore, Frankreich |
| Western Blotting System | Bio-Rad, USA |
| Zellkulturinkubator Binder | VWR, Darmstadt |

3.1.4 Kommerzielle Systeme

Tab. 3.4 Kommerzielle Systeme

| System | Hersteller | Verwendung |
|--|--------------------|--|
| DNA-Ladepuffer (6 x) | peqLab, Erlangen | Auftragen von DNA auf Agarosegele |
| MaXtract High Density (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml) | Qiagen, Hilden | Nukleinsäureauf-reinigung von organischen Lösungsmitteln |
| miRNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden | Aufreinigung von microRNAs und Komplet-RNA |
| MISSION microRNA Mimic miR-199a-5p / miR-199a-3p | Sigma-Aldrich, USA | Reife miRNA-Sequenz zur Transfektion |
| pegGold Ultra Low Range DNA-Leiter II | peqLab, Erlangen | Größenabschätzung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen |
| pegGold 1kb DNA-Leiter | peqLab, Erlangen | Größenabschätzung von DNA-Fragmenten |
| QIAfilter Plasmid Mini/Maxi/Giga Kit | Qiagen, Hilden | Plasmidpräparation |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden | DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden | Nukleinsäure-Aufreinigung |

3.1.5 Enzyme und Proteine

Tab. 3.5 Enzyme und Proteine

| Enzym/Protein | Bezugsquelle |
|------------------------|--------------------------|
| | |
| Polymerasen | |
| Taq DNA-Polymerase | New England Biolabs, USA |
| Phusion DNA-Polymerase | Finnzymes, Finnland |

Material und Methoden

| | |
|--|--------------------------------|
| Restriktionsendonukleasen | |
| HindIII | New England Biolabs, USA |
| SacI | New England Biolabs, USA |
| SpeI | New England Biolabs, USA |
| EcoRI | New England Biolabs, USA |
| XbaI | New England Biolabs, USA |
| | |
| Primärantikörper | |
| COX-2 IgG, monoklonal aus Maus | Cayman, USA |
| β -Actin IgG, monoklonal aus Ziege | Cayman, USA |
| PDGF, monoklonal aus Maus | Cayman, USA |
| | |
| Sekundärantikörper | |
| IRDye 680 donkey-anti-mouse | LI-COR, Bad Homburg |
| IRDye 800 CW donkey-anti-goat | LI-COR, Bad Homburg |
| | |
| Sonstige Enzyme | |
| T4 DNA-Ligase | New England Biolabs, USA |
| T4 Polynukleotidkinase | New England Biolabs, USA |
| CIP (Calf Intestinal Phosphatase) | New England Biolabs, USA |
| Alkalische Phosphatase | Roche, Mannheim |
| SuperScript II Reverse Transkriptase | Invitrogen, USA |
| TurboDNase | Applied Biosystems/Ambion, USA |
| | |
| Sonstige Proteine | |
| TetR(B) | FAU Erlangen-Nürnberg |
| TetR(BD) | FAU Erlangen-Nürnberg |
| TetR(B) verschiedene Mutanten | FAU Erlangen-Nürnberg |
| CcpA | FAU Erlangen-Nürnberg |
| PDGF-BB | R&D Systems, Wiesbaden |

3.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon, Purimex, Sigma-Aldrich bezogen.

Tab. 3.6 Oligonukleotide.

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Verwendung |
|-------------------|--|---|
| 199a*_SpeI_fwd | ATATATACTAGTTTTAAAAACAA AACCAAATGATATCTAAGTAG | Klonierung miR- 199a* Bindestelle aus genomischer DNA |
| 199a*_HindIII_rev | ATATATAAGCTTACATAACAAA AAAAAATCAATGATTGTAGG | Klonierung miR- 199a* Bindestelle aus genomischer DNA |
| 199a*_mut | CTCTGCCATGTATTCGCTACCGG | Mutation der miR- 199a* Bindestelle |
| BS199_perfect_fwd | CGAGGTAACCAATGTGCAGACT ACTGTACGGGA | Komplementäre Bindestelle für miR- 199a* |
| BS199_perfect_rev | AGCTTCCCGTACAGTAGTCTGCA CATTGGTTACCTCGAGCT | Komplementäre Bindestelle für miR- 199a* |
| BS199_3x_fwd1 | CTTGTCACTGACATTTAATGGTA CTGTATATTAAGCTTTTGTCACT GACATTTAATGGTACTG | Hybridisierung einer miR_199a* Bindestelle (3x) |
| BS199_3x_fwd2 | TATATTACGCGTTTGTCACTGAC ATTTAATGGTACTGTATATTA | Hybridisierung einer miR_199a* Bindestelle (3x) |
| BS199_3x_rev1 | AGCTTAATATACAGTACCATTAA ATGTCAGTGACAAACGCGTAAT ATACAGTACCATTAAATGTCAGT GA | Hybridisierung einer miR_199a* Bindestelle (3x) |
| BS199_3x_fwd1 | CAAAGCTTAATATACAGTACC ATTAAATGTCAGTGACAAGAGC T | Hybridisierung einer miR_199a* Bindestelle (3x) |

Material und Methoden

| | | |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Forward_miR101 | GCGGCGGTACAGTACTGTGATA | miR-101 Sequenz für qRT-PCR |
| Forward_miR15b | GCGGTAGCAGCACATCATGG | miR-15b Sequenz für qRT-PCR |
| Forward_miR16 | CGGCGGTAGCAGCACGTAAATA | miR-16 Sequenz für qRT-PCR |
| Forward_miR199a | GCGGCCAGTGTTTCAGACTAC | miR-199a Sequenz für qRT-PCR |
| Forward_miR199a* | CGGCGGACAGTAGTCTGCACAT | miR-199a* Sequenz für qRT-PCR |
| Forward_miR19b | GGCGGTGTGCAAATCCATGCAA | miR-199a Sequenz für qRT-PCR |
| Forward_miR26b | GCGGCGGTTCAAGTAATTCAGG | miR-26b Sequenz für qRT-PCR |
| Forward_miR542-3p | GCGGCGGTGTGACAGATTGATA A | miR-542-3p Sequenz für qRT-PCR |
| Forward_U48 | GAGTGATGATGACCCAGGTAA | snoRNA U48 Sequenz für qRT-PCR |
| Sonde_human5S | GTCTCCCATCCAAGTACTAAC | Northern Blot-Sonde für 5S RNA |
| Sonde_miR101 | CTTCAGTTATCACAGTACTGTA | Northern Blot-Sonde für miR-101 |
| Sonde_miR125a-5p | TCACAGGTTAAAGGGTCTCAGG GA | Northern Blot-Sonde für miR-125a-5p |
| Sonde_miR125b | TCACAAGTTAGGGTCTCAGGGA | Northern Blot-Sonde für miR-125b |
| Sonde_miR128 | AAAGAGACCGGTTCACTGTGA | Northern Blot-Sonde für miR-128 |
| Sonde_miR143 | GAGCTACAGTGCTTCATCTCA | Northern Blot-Sonde für miR-143 |
| Sonde_miR15 | TGTAAACCATGATGTGCTGCTA | Northern Blot-Sonde für miR-15 |

Material und Methoden

| | | |
|------------------|--|---|
| Sonde_miR155 | ACCCCTATCACGATTAGCATTA | Northern Blot Sonde für miR-155 |
| Sonde_miR16 | CGCCAATATTTACGTGCTGCTA | Northern Blot-Sonde für miR-16 |
| Sonde_miR199a | GAACAGGTAGTCTGAACACTGG G | Northern Blot-Sonde für miR-199a |
| Sonde_miR199a* | TAACCAATGTGCAGACTACTGT | Northern Blot-Sonde für miR-199a* |
| Sonde_miR19a | TGTGCAAATCTATGCAAAACTG A | Northern Blot- Sonde für miR-19a |
| Sonde_miR19b | TGTGCAAATCCATGCAAAACTG A | Northern Blot-Sonde für miR-19b |
| Sonde_miR26b | CTGCCAAGAGGCCTGGCCAGAC A | Northern Blot-Sonde für miR-26b |
| Sonde_miR34a | ACAACCAGCTAAGACACTGCCA | Northern Blot-Sonde für miR-34a |
| Sonde_miR455-5p | CGATGTAGTCCAAAGGCACATA | Northern Blot Sonde für miR-455-5p |
| Sonde_U6 | CGTTCCTTTTAGTATATGTGCTG C | Northern Blot-Sonde für snRNA U6 |
| Stemloop_miR101 | GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACCAGAGCCAAC TTCAGT | First Strand cDNA-Synthese für miR-101 |
| Stemloop_miR15b | GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACCAGAGCCAAC TGTA | First Strand cDNA-Synthese für miR-15b |
| Stemloop_miR16 | GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACCAGAGCCAAC CGCCAA | First Strand cDNA-Synthese für miR-19b |
| Stemloop_miR199a | GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACCAGAGCCAAC GAACAG | First Strand cDNA-Synthese für miR-199a |

| | | |
|--------------------|--|---|
| Stemloop_miR199a* | GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACCAGAGCCAAC TAACCA | First Strand cDNA-Synthese für miR-199a* |
| Stemloop_miR19b | GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACCAGAGCCAAC TCAGTT | First Strand cDNA-Synthese für miR-19b |
| Stemloop_miR26b | GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACCAGAGCCAAC ACCTAT | First Strand cDNA-Synthese für miR-26b |
| Stemloop_miR542-3p | GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACCAGAGCCAAC TTTCAG | First Strand cDNA-Synthese für miR-542-3p |
| Stemloop_U48 | GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACCAGAGCCAAC GGTCAG | First Strand cDNA-Synthese für snoRNA U48 |
| tetO1A | GGGTGTGCCGACACTCTATCATT GATAGAGTTATTATAACC | Hybridisierung der <i>tetO</i> -Sequenz |
| tetO1B | CGGTATAATAACTCTATCAATGA TAGAGTGTCGGCACACC | Hybridisierung der <i>tetO</i> -Sequenz |
| Universal_qPCR | GTGCAGGGTCCGAGGT | Reverse Sequenz für qRT-PCR |

3.2 Plasmide und Bakterienstämme

3.2.1 Bakterienstämme

Tab. 3.7 Verwendete Bakterienstämme

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|---|---|-----------------|
| <i>E. coli</i> DH5 α | <i>hsdR17</i> (r _K -, m _K -), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i> | Sambrook et al. |
| <i>E. coli</i> WH207 λ <i>tet50</i> | <i>galK2</i> , <i>rpsL</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA13</i> | Wissmann et al. |

3.2.2 Verwendete und hergestellte Plasmide

Tab. 3.8 Verwendete Plasmide

| Plasmid | Charakteristika | Referenz |
|---------------------------|---|-----------------------------------|
| pMIR-REPORT | Reporterplasmid zur quantitativen Messung intrazellulärer microRNA-Expression, CMV Promoter, Puromycin ^R , <i>Firefly</i> -Luziferase, SV40 pA signal, MCS, Amp ^R , SV40 Poly(A), ColE1 Origin, SV40 Promoter | Ambion |
| pMIR_BS199a*_perfectmatch | pMIR-REPORT-Derivat der komplementären Sequenz zur miR-199a* | Kap. 4.2.3.6.3 |
| pMIR_BSmir199a* | pMIR-REPORT-Derivat mit der natürlichen Bindestelle der miR-199a* aus dem COX-2 3'-UTR | Kap. 4.2.3.6.3 |
| pMIR_BSmir199a*_3x | pMIR-REPORT-Derivat mit der natürlichen Bindestelle der miR-199a* aus dem COX-2 3'-UTR in 3x Wiederholung | Kap. 4.2.3.6.3 |
| pMIR_BSmir199a*_mut | pMIR-REPORT-Derivat mit mutierter Bindestelle der miR-199a* aus dem COX-2 3'-UTR | Kap. 4.2.3.6.3 |
| pSP64_12-1KΔAhh | pSP64-Derivat mit der Sequenz des TetR-bindenden Aptamers 12-1 KΔA hinter einen T7-Promotor zur <i>in vitro</i> Transkription | Dissertation Anke Hunsicker, 2009 |
| SV40_Renilla | Renilla-Luziferase-Gen unter der Kontrolle des P _{SV40} , Amp ^R | Promega |

3.2.3 Medien für prokaryotische Zellen

Tab. 3.9 Verwendete Medien für *E. coli*

| Medium | Komponenten | Anmerkung |
|---------------------|---|--|
| LB (Luria Broth) | 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl | Autoklaviert |
| LB-Agar | 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 15 g/l Agar | Autoklaviert |
| TB (Terrific Broth) | 12 g Trypton 24 g Hefeextrakt 4 ml Glycerin ad 900 ml mit MQ | Nach dem Autoklavieren 100 ml sterilfiltriertes 0,17 M KH_2PO_4 und 0,72 M K_2HPO_4 zugegeben |

3.3 Eukaryotische Zelllinien und Zellkultur

3.3.1 Zelllinien

HeLa-Zellen

Die adhärent wachsenden HeLa-Zellen stammen von epithelialen Zervixkarzinomzellen ab und sind die erste etablierte immortale Zelllinie. Sie gehen auf die Patientin Henrietta Lacks aus dem Jahre 1951 zurück. Spätere Diagnosen stuften diese Zellen als Adenokarzinomzellen ein, welche einschichtig wachsen und keinen direkten Zell-Zell-Kontakt benötigen. Die Zellen wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erhalten (Nummer: ACC 57).

Cos-7-Zellen

Cos-7 Zellen wachsen wie HeLa-Zellen adhärent und stammen ursprünglich aus einer Affen-Zelllinie ab. Durch Transduktion mit einem replikations-defizienten SV-40 Mutanten wird das Wachstum des SV40-Virus unterstützt. Die Zelllinie wurde nach der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) in die Sicherheitskategorie 1 eingestuft. Die Zellen wurden von der DSMZ (Nummer: ACC 60) erhalten.

HT-29-Zellen

HT-29-Zellen wurden erstmalig 1964 aus humanen Zellen eines colorektalen Karzinoms isoliert. HT-29 sind adhärent wachsende, schwach differenzierte und stark proliferierende Zellen. Die Zellen wurden von der DSMZ (Nummer: ACC 129) erhalten.

Mono-Mac-6-Zellen

Mono-Mac-6-Zellen sind in Suspension wachsende, humane Zellen, die aus peripherem Blut eines 64-jährigen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie isoliert wurden. Mono-Mac-6-Zellen exprimieren konstitutiv phänotypische und funktionale Eigenschaften reifer Monozyten. Die Behandlung von Mono-Mac-6 mit TGF β und 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 führt zur Steigerung der 5-LO- Expression und einer erhöhten Enzymaktivität. Die Zellen waren bereits im AK Steinhilber in Kultur.

3.3.2 Medien für eukaryotische Zelllinien

HeLa- und Cos-7-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) versetzt mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 100 μ g/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

HT-29-Zellen wurden in McCoy's 5A Medium mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin kultiviert. Ideale Wachstumsbedingungen waren 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Zur Stimulierung mit PDGF-BB wurde McCoy's 5A Medium mit 0,5% fötalem Kälberserum, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin sowie 1 bis 5 ng/ml PDGF-BB gelöst in 4 mM HCl versetzt und die Zellen für 20 Stunde bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert.

Mono-Mac-6-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 2 mM L-Glutamin, 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 100 μ g/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 1mM Oxalacetat, 1 x MEM Aminosäuren und 10 μ g/ml Humaninsulin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Mono-Mac-6 Zellen wurden undifferenziert mit einer Zelldichte von 0,3 x 10⁶ ausgesät. Zur Differenzierung wurden Mono-Mac-6-Zellen mit einer Zelldichte von 0,2 x 10⁶ ausgesät und mit 1 ng/ml TGF β und 50 nM 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 für 12 h bzw. 1-4 Tage behandelt.

3.4 Puffer und Lösungen

Alle Medien und Puffer sind mit deionisiertem MQ-H₂O angesetzt, sofern nicht anders erwähnt. Falls erforderlich wurde der pH-Wert entsprechend eingestellt.

3.4.1 Puffer für DNA

Tab. 3.10 Puffer für DNA

| Puffer | Komponenten | Anmerkung |
|----------------|---|---|
| 50 x TAE | 2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA | pH 8,3 (kein Einstellen erforderlich) Autoklaviert |
| DNA-Ladepuffer | 50% Glycerin 0,25% Xylencyanol 0,25% Bromphenolblau | Lagerung bei 4°C |

3.4.2 Puffer für RNA

Tab. 3.11 Puffer für DNA

| Puffer | Komponenten | Anmerkung |
|--------------------------|--|---|
| 2 x Bandshift-Ladepuffer | 10% Glycerin 1 x TB | Autoklaviert Lagerung bei 4°C |
| 5 x RNA-Ladepuffer nativ | 50% Glycerin 0,2% Bromphenolblau 0,5 x TB(E) | Lagerung bei -20°C |
| 10 x Bandshift-Puffer | 100 mM Tris pH7,5 250 mM MgCl ₂ 150 mM NaCl 25 µg/ml Hefe tRNA | Autoklaviert Lagerung bei 4°C |
| 10 x TBE | 0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 10 mM Na ₂ -EDTA | pH 8,3 (kein Einstellen erforderlich) Autoklaviert |
| Crush-Soak-Puffer | 200 mM Na-Acetat 100 mM Tris-Cl pH 7.5 1 mM EDTA pH 8.0 | Autoklaviert Lagerung bei 4°C |

| | | |
|-----------------------|---|---|
| RNA-Extraktionspuffer | 10 mM Na-Acetat 150 mM Saccharose | pH 4.8 eingestellt mit Essigsäure Autoklaviert Lagerung bei 4°C |
| Polyacrylamid-Mix | 6-15% Acrylamid 1 x TBE 8 M Harnstoff | Sterilfiltriert Lagerung bei 4°C |

3.4.3 Puffer für Proteine

Tab. 3.12 Puffer für DNA

| Puffer | Komponenten | Anmerkung |
|---------------------------------|---|-----------------------------|
| Protein-auftragepuffer | 0,1% Glycerin 50% (v/v) Bromphenolblau 10% (v/v) β -Mercaptoethanol ad 1 ml mit MQ | Lagerung bei 4°C |
| Lysepuffer für Proteine | 1 x PBS 0,1% Triton-X 1 mM PMSF | Lagerung bei -20°C |
| Laufpuffer für SDS-PAGE | 14,4 g Glycin 3,03 g Tris 1 g SDS ad 1 l mit MQ | Lagerung bei Raumtemperatur |
| Transferpuffer für Western Blot | 37,9 g Tris 180 g Glycin 20% Methanol | Lagerung bei Raumtemperatur |

3.4.4 Sonstige verwendete Lösungen

Tab. 3.13 Sonstige Lösungen

| Lösung | Komponenten | | Anmerkung |
|----------------------------|--|---|---|
| Agarose-Gele | 1%, 2%, 3% (w/v) Agarose in 1x TAE | | Autoklaviert |
| Ampicillin-Stocklösung | 100 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz in 70% EtOH | | Sterilfiltriert Lagerung bei -20°C |
| CaCl ₂ -Lösung | 2,5 M CaCl ₂ 0,1 M CaCl ₂ | | Autoklaviert |
| dNTP-Stocklösung (10-fach) | 10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP | | Lagerung bei -20°C |
| EtOH | 70% EtOH p.A. | | Nur einige Wochen verwendbar |
| NaAc-Lösung | 3 M NaAc | | pH 6,5 mit Essigsäure Autoklaviert |
| TE (Trypsin-EDTA) | 5 ml Trypsin/EDTA 10 x 45 ml PBS 1 x | | Unter sterilen Bedingungen hergestellt sterilfiltriert |
| TGFβ-Lösungen | Stammlösung 10 ng/μl TGFβ 1% BSA 25% Acetonitril 0,1% TFA in H ₂ O | Gebrauchslösung 0,1 ng/μl TGFβ 25% Acetonitril in H ₂ O | Lagerung von Stamm- und Gebrauchslösung bei -20°C. Zur längerfristigen Lagerung wurde der Stammlösung 1% BSA und 0,1% TFA zugefügt. Die TGFβ-Aufreinigung aus Blutkonserven erfolgte im AK Steinhilber |

3.5 Methoden

3.5.1 Allgemeine Methoden

Tab. 3.14 Allgemeine Methoden

| Methoden | Referenz |
|---|-----------------------|
| Absorptionsmessung | Maniatis et al., 1989 |
| Autoradiographie | Maniatis et al., 1989 |
| Ethidiumbromidfärbung von DNA | Maniatis et al., 1989 |
| Gelelektrophorese von DNA | Maniatis et al., 1989 |
| Gelelektrophorese von Proteinen | Laemmli, 1970 |
| Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | Hanahan et al., 1985 |
| Ligation von DNA-Fragmenten | Maniatis et al., 1989 |
| Polymerasekettenreaktion | Mullis, 1983 |
| Präzipitation von DNA mit Ethanol | Maniatis et al., 1989 |
| Quantifizierung von Proteinen | Bradford et al., 1976 |
| Restriktionsendonukleasespaltung von DNA | Maniatis et al., 1989 |
| Sequenzierung von DNA nach der Kettenabbruchmethode | Sanger et al., 1977 |
| Transfektion von eukaryotischen Zellen | Graham et al., 1973 |
| Transformation von <i>E. coli</i> | Hanahan et al., 1985 |

3.5.1.1 Autoklavieren

Sterilisierung von Medien, Puffer und Hilfsmitteln wurde durch Autoklavieren für 20-30 min unter einem Druck von 2 bar bei 121°C feuchter Hitze erreicht.

3.5.1.2 Sterilfiltration

Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten wurden durch einen 0,2 µm Sterilfilter Filtropur S sterilfiltriert, um die entsprechenden Lösungen von Mikroorganismen zu befreien.

3.5.2 Methoden mit prokaryotischen Zellen

3.5.2.1 Anzucht, Ernte und Aufbewahrung von Bakterien

3.5.2.1.1 Anzucht in Flüssigmedium

Zur Anzucht in Flüssigmedium wurden Reagenzgläser bzw. Schikanekolben mit LB-Medium befüllt und mit den notwendigen Antibiotika bzw. Induktoren versetzt. Für Übernachtkulturen (ÜNK) wurde das Medium mit einer einzelnen Kolonie des gewünschten *E. coli*-Stamms beimpft und ca. 16 h inkubiert. Übertagkulturen (ÜTK) hingegen wurden 1:100 mit einer ÜNK angeimpft und bis zur gewünschten oD_{600} herangezogen. Alle Kulturen wurden bei 37°C auf einem Luftschüttler inkubiert. Die Ernte wurde mittels Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm durchgeführt und das erhaltene Zellpellet je nach Methode weiterbehandelt.

3.5.2.1.2 Anzucht auf Festmedium und Aufbewahrung

Verschiedene Volumina von Transformationsansätzen und Vereinzlungen wurden auf Platten mit agarhaltigem LB-Medium ausplattiert bzw. ausgestrichen. Kulturen wurden 16-24 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

3.5.2.2 Transformation von *E. coli*

3.5.2.2.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden alle Schritte nach Anzucht der Bakterien bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. 500 ml LB-Flüssigmedium (gegebenenfalls mit Antibiotikum als Selektivmarker) wurden mit 2 ml einer ÜNK angeimpft und bei 37°C bis zu einer oD_{600} von 0,4 – 0,5 inkubiert. Um das Wachstum der Zellen zu stoppen, wurden sie für 30 min auf 4°C gestellt und anschließend in JA10-Bechern durch Zentrifugation für 5 min bei 6000 rpm (4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde mit 250 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und nochmals für 5 min bei 6000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der gewaschene Niederschlag wurde dann in 50 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und für mindestens 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellsuspensionen mit 15% Glycerin versetzt, zu je 1 ml in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

3.5.2.2.2 Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

50-100 ng Plasmid-DNA oder ein Ligationsansatz wurde mit 200 µl langsam auf Eis aufgetauten CaCl₂-kompetenten Zellen versetzt und für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Nach 90 sec Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und weiteren 10 min Inkubation auf Eis wurden 800 µl auf 37°C vorgewärmtes LB-Flüssigmedium zugegeben. Bei 37°C wurden sie im Thermomixer bei 850 rpm für 30 min geschüttelt und anschließend verschiedene Volumina (50 µl bis gesamter Ansatz) auf LB-Platten (mit benötigten Antibiotika) ausplattiert.

3.5.2.2.3 Kolonie-PCR

Mittels Kolonie-PCR wurden rekombinante Bakterienkolonien auf Vorhandensein und richtige Orientierung der eingebrachten Nukleotidsequenzen überprüft. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet, die außerhalb der betreffenden Sequenz binden. Um die richtige Größe und Orientierung festzustellen, wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass eines der beiden Oligonukleotide außerhalb und das gegenläufige innerhalb der Nukleotidsequenz bindet. Als Negativkontrolle für die Größenbestimmung wurde der Vektor ohne Insert verwendet. Es wurden zunächst je 25 µl eines Mastermix für die Kolonie-PCR in ein PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurde eine einzelne Bakterienkolonie mit einem sterilen Holzstäbchen in das Reaktionsgefäß resuspendiert und die PCR-Reaktion gestartet. Der Mastermix und das PCR-Programm sind in Tabelle 3.15 dargestellt.

Tab. 3.15 Kolonie-PCR Mastermix und PCR-Programm

| Kolonie-PCR Mastermix | | PCR-Programm | | | |
|--------------------------|--------------|---------------|------------|------|--------|
| | | Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklen |
| MQ | 20,2 µl | Denaturierung | 96°C | 4' | 25 x |
| 10 x ThermoPol-Puffer | 2,5 µl | Denaturierung | 96°C | 30" | |
| dNTPs (je 10 mM) | 0,5 µl | Annealing | 54°C | 30" | |
| vorw.-Oligonukl. (5 µM) | 0,75 µl | Elongation | 72°C | 30" | |
| rückw.-Oligonukl. (5 µM) | 0,75 µl | Elongation | 72°C | 7' | |
| Taq-Polymerase (5 U/µl) | 0,25 µl | Lagerung | 8°C | ∞ | |
| Summe | 25 µl | | | | |

3.5.3 Methoden mit eukaryotischen Zelllinien

3.5.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Sämtliche Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Kulturen wurden regelmäßig mittels genspezifischer PCR auf Mycoplasmen getestet (van Kuppeveld et al., 1994). Zur dauerhaften Kultivierung der Zellen mussten optimale Wachstumsbedingungen bereitgestellt werden. Hierzu zählten die richtige Zelldichte, ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und ein physiologischer pH-Wert des Mediums. Dazu wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert und Phenolrot als Indikatorfarbstoff im Medium verwendet. Phenolrot ändert seine Farbe von rot nach gelb, wenn das Medium durch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte einen sauren pH-Wert hat. Die Passage von nichtadhärent wachsenden Mono-Mac-6 Zellen erfolgte durch Aufwirbeln mit einer sterilen Pipette. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde eine 1:5 Verdünnung der Zellsuspension in frisches Medium überführt. Das Passagieren adhärent wachsender HeLa-, HT-29- und Cos-7-Zellen erfolgte durch Trypsinierung.

3.5.3.2 Trypsinierung

Zur Ernte und zur Passage wurden adhärent wachsende Zellen, welche bei hoher Konfluenz und hohen Passagen Kontaktinhibitor und Transformation des Stoffwechsels aufweisen können, mit Trypsin-EDTA behandelt. Die in 650 ml Gewebekulturflaschen gewachsenen Zellen wurden durch Absaugen mit einer an eine Pumpe angeschlossenen Pasteurpipette vom alten Medium befreit. Der Zellrasen wurde anschließend mit 5 ml TE-Puffer (Trypsin-EDTA) gewaschen und mit 5 ml TE-Puffer für 10 min bei 37°C inkubiert. Durch Klopfen am Boden der Gewebekulturflasche bzw. zweimaliges Auf- und Abpipettieren der Gewebekulturflasche wurden die Zellen anschließend in Suspension gebracht und mit 5 ml Zellkulturmedium abgestoppt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl der lebenden Zellen bestimmt. Die Zellsuspension wurde anschließend 1:7 mit frischem Medium (mit Phenolrot) verdünnt und in eine neue, sterile 650 ml Gewebekulturflasche überführt. Die Ernte von adhärent wachsenden Zellen aus 6- und 24-well-Platten erfolgte analog mit entsprechend geringeren Mengen TE-Puffer.

3.5.3.3 Transiente Transfektion

Durch transiente Transfektion wurden verschiedene DNA- und RNA-Sequenzen für wenige Tage in eukaryotische Zellen eingebracht. Für Co-Transfektionen von DNA- und RNA-Sequenzen wurde ausschließlich die Transfektion mit Lipofectamin 2000 verwendet. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion trypsinisiert und in 24-well-Platten ausgesät. Die Zelldichte wurde entweder mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt oder automatisch gezählt mit dem TC10 *automated cell counter*. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde die Zellsuspension mit einer 0,4%igen Trypanblaulösung angefärbt. Lebende Zellen nahmen auf Grund intakter Zellmembran kein Trypanblau auf und leuchteten hell unter dem Mikroskop, wobei abgestorbene Zellen blau angefärbt waren. HeLa-, Cos-7- und HT-29 Zellen wurden zu einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Auf Verwendung von Phenolrot wurde verzichtet. Für die Transfektion wurde eine Konfluenz von 60-80% vorausgesetzt.

3.5.3.3.1 DNA- und RNA-Konzentrationen für die Transfektion

Tab. 3.16 Konzentrationen eingesetzter DNA und RNA für Transfektionen

| Plasmid | Konzentration [pro well] |
|----------------------------|--------------------------|
| pMIR (Firefly-Luziferase) | 150 ng |
| pSV40-Renilla | 20 ng |
| miR-199a | 5 μ M |
| miR-199a* | 5 μ M |
| Negative control #1 und #2 | 5 μ M |
| Neomycin bindendes Aptamer | 5 μ M |

3.5.3.3.2 Transfektion mit Lipofectamin 2000

Die Lipofektion wurde 1987 beschrieben und erreicht im Vergleich zur Calciumphosphatpräzipitation eine deutlich höhere Transfektionseffizienz (Felgner et al., 1987). Heutige Formulierungen wie Lipofectamin 2000 tragen neben dem kationischen Lipid ein ungeladenes Helferlipid (Rose et al., 1991) und weitere DNA-verpackende Substanzen. Das Prinzip der Lipofektion besteht darin, dass die DNA in Lipide verpackt wird. So ist sie in der Lage, mit der Plasmamembran der Zelle zu verschmelzen und die DNA gelangt in die Zelle bzw. bis in den Zellkern in dem die Transkription stattfindet. Nachteile der Transfektion mit Lipofectamin bestehen in der richtigen Formulierung des

Lipofektionsreagenz, der geeigneten Menge an DNA bzw. RNA und unterschiedlichen Effizienzen in Abhängigkeit der Zelllinie. Außerdem wirken Lipofektionsreagenzien deutlich zytotoxischer als die Transfektion der Zellen mittels Calciumphosphat-Präzipitation. Die Transfektionseffizienz wird durch den Einsatz von Medien ohne Serum- und Selektionsmarker während der Lipofektion erhöht.

Für die Durchführung wurde DNA, RNA oder DNA-/RNA-Mischungen in 50 bis 250 µl OptiMEM aufgenommen, sowie in einem weiteren Ansatz 2 bis 5 µl Lipofectamin mit 48 bis 245 µl OptiMEM gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden beide Gemische vereinigt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der komplette Ansatz von 100 bis 500 µl wurde auf die Zellen gegeben. Nach 2 bis 6 h Lipofektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen wieder mit Medium und Wachstumsfaktoren versorgt. Nach dem Medienwechsel erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation. Anschließend wurden die Zellen abtrypsinisiert und für RNA- oder Proteinanalysen lysiert oder zur Luziferasemessung verwendet.

3.5.3.4 Dualer Luziferase-Assay

Zur Quantifizierung der Regulationsstärke von beliebigen Nukleotidsequenzen wurde ein dualer Luziferase-Assay von Promega verwendet. Dabei wurden regulatorische Sequenzen aus untranslatierten Bereichen von mRNAs hinter ein Reporter gen gebracht, welche dann über ein einfaches Messsystem nachgewiesen werden können. Im Luziferase-Assay wurden zum Nachweis die *Firefly*-Luziferase aus *Photinus pyralis* und die *Renilla*-Luziferase aus *Renilla reniformis* eingesetzt. Um die Regulationsstärke zu messen wurden die Nukleinsäuresequenzen in einen Expressionsvektor mit *Firefly*-Luziferase eingebracht. Zur Normalisierung der Messung wurde ein Plasmid co-transfiziert, welches konstitutiv die *Renilla*-Luziferase exprimiert. Hierauf wurden dann die ermittelten *Firefly*-Luziferase-Werte normalisiert. Die Anzucht der transfizierten Zellen erfolgte stets in 24-well Platten, die Luziferase-Messung in weißen Lumitrac 96-well Platten. Die Angaben beziehen sich jeweils auf eine Vertiefung und wurden unter unsterilen Bedingungen durchgeführt. Nach Absaugen des Mediumüberstandes wurde zu den Zellen 100 µl frisches Medium sowie 100 µl Dual-Glo[®] Luziferase Reagenz gegeben. Dieses enthielt neben dem *Firefly*-Luziferase-Substrat auch zellaufschließende Substanzen. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde das Zelllysat aus der 24-well-Platte in eine weiße 96-well Lumitrac-Platte überführt und die Lichtintensität am Spektrophotometer Infinite[®] M200 PR bestimmt. Nach Messung der *Firefly*-Aktivität

wurde durch Zugabe von 100 µl frisch angesetztem Dual-Glo[®] Stop&Glo[®] Reagenz die Lumineszenz der Firefly-Luziferase-Reaktion gequencht, sowie durch Anwesenheit des Substrates Coelenterazine die *Renilla*-Luziferase aktiviert. Die Platte wurde erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Lichtintensitäten am Spektrophotometer bei gleichen Einstellungen ausgelesen. Aus den beiden gemessenen Werten wurden dann die relativen Lichteinheiten (*Relative Light Units*, RLU) kalkuliert mit der Formel *Firefly*-Aktivität / *Renilla*-Aktivität *1000.

3.5.3.5 Isolation von Thrombozyten aus humanem Vollblut

Blutkonserven wurden vom Krankenhaus Frankfurt-Hoechst bezogen. Das Vollblut aus den Blutkonserven wurde mit PBS pH 7,4 verdünnt und die Erythrozyten durch Sedimentation mit 1% Dextran (w/v) für 30 min abgetrennt. Der Überstand wurde mit 20% LSM 1077 Lymphozyten Separations-Medium versetzt und für 10 min ohne automatische Bremsung bei 800 x g zentrifugiert. Thrombozyten wurden in der obersten Phase über dem Monozytenring erhalten und in jeweils 25 ml PBS pH 5,9 gemischt. Die Thrombozyten wurden für 15 min bei 2800 rpm bei Raumtemperatur sedimentiert. Die Zellpellets wurden mit 1 ml PBS pH 5,9 / 0,9% NaCl (1:1) vorsichtig resuspendiert und vereinigt. Anschließend wurden die Zellsuspension auf 50 ml mit PBS pH 5,9 / 0,9% NaCl (1:1) aufgefüllt und für 10 min bei 2800 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 1 ml PBS pH 5,9 resuspendiert und auf 6 ml mit PBS pH 5,9 aufgefüllt. Anschließend wurde die Thrombozytensuspension im Verhältnis 1:40 mit 0,2%iger Trypanblaulösung verdünnt und mit Hilfe der Neubauerzählkammer oder des TC 10 Zellzählers gezählt. In der Regel konnten 2,5 bis 5 x 10⁹ Zellen/ml gezählt werden.

3.5.4 Methoden mit DNA

3.5.4.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation aus *E. coli* erfolgte nach Herstellerangaben mittels QIAprep Spin Miniprep Kit aus einer 4 ml ÜNK. Die Präparation basierte auf alkalischer Lyse der Zellen mit anschließender Aufreinigung über eine Silica-Membran. Die Elution der DNA erfolgte mit 40 bis 50 µl MQ. Für größere Plasmidmengen wurde das QIAfilter Plasmid Maxi Kit bzw. Giga Kit verwendet. Hierfür wurden die Bakterien in 250 ml bzw. 1 l Schikanekolben mit je 100 ml bzw. 500 ml LB-Medium für 12 bis 16 h bei 37°C angezogen. Nach alkalischer Lyse wurde der Ansatz über eine Silica-Membran

aufgereinigt und das Eluat mittels Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde in 250 bis 500 μ l MQ resuspendiert.

3.5.4.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Desoxyribonukleinsäuren wurde durch Scientific Research and Development (SRD) GmbH (Bad Homburg) übernommen und basierte auf dem Kettenabbruch-Reaktionsverfahren nach Sanger. Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide als Terminatoren verwendet. Für die Sequenzierung wurde in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß mit flachem Deckel 150-300 ng Plasmid und 5 pmol Oligonukleotid zu 7 μ l MQ an SRD versandt.

3.5.4.3 Nachweis und Quantifizierung

Der Nachweis von Nukleinsäuren erfolgte über peqGold Universal Agarose-Gele. Abhängig von der Länge der nachzuweisenden DNA wurden verschiedenprozentige Gele eingesetzt. Für Fragmente unter 250 Basenpaaren wurden 3%ige, zwischen 250 und 1000 Basenpaaren 2%ige und für Nukleinsäuren über 1000 bp wurden 1%ige Agarose-Gele benutzt. Zur Kontrolle und Abschätzung der Größe der untersuchten DNA wurden die pegGold Ultra Low Range DNA-Leiter II (Fragmente zwischen 25 bp und 750 bp) und die peqGold 1kb DNA-Leiter (Fragmente zwischen 250 bp und 10000 bp) eingesetzt. Die Agarose-Gele wurden nach der Elektrophorese im Ethidiumbromid-Bad angefärbt und mit der Videodokumentationsanlage unter Bestrahlung durch UV-Licht fotografiert und ausgewertet. Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte über das Spektrometer Nanodrop 1000.

3.5.4.4 Restriktionseendonukleolytische Spaltung von DNA

Die Restriktionsspaltung mit Endonukleasen wurde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem zu den empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die verwendete Enzymmenge richtete sich nach der eingesetzten DNA-Menge, den vorhandenen Schnittstellen und dem Volumen des Gesamtansatzes. Dabei wurde eine Endkonzentration an Glycerin von 10% (v/v) nicht überschritten. Die Inkubationsdauer betrug 3 h bei 37°C. Die Aufreinigung der DNA erfolgte anschließend über Elution aus präparativen Agarosegelen oder mittels QIAgen PCR Purification Kit.

3.5.4.5 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die 5'-Phosphat-Gruppen von linearisierten Vektoren wurden mittels Shrimps alkalischer Phosphatase (SAP) oder *calf intestinal* Phosphatase (CIP) entfernt, um die Rückligation

kompatibler Enden zu vermeiden. Dazu wurden die Reaktionsansätze nach Angaben des Herstellers auf 1x SAP- bzw. CIP-Puffer eingestellt und mit 1 U Enzym versetzt. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend die DNA durch Behandlung mit Phenol-/Chloroform-/Isomylalkohol und Fällung mit Ethanol gereinigt.

3.5.4.6 Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die 5'-Enden hybridisierter Oligonukleotide wurden mittels Polynukleotidkinase phosphoryliert, um eine Ligation mit dephosphorylierten 5'-Enden linearisierter Vektoren zu ermöglichen. Dazu wurden die Reaktionsansätze nach Angaben des Herstellers auf 1x T4 DNA-Ligase-Puffer eingestellt, 2 µl ATP (10 mM) hinzugefügt und 10 U Enzym hinzugefügt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Ethanolfällung gereinigt.

3.5.4.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide mit komplementärer Sequenz wurden im molaren Verhältnis 1:1 gemischt (10 µl bei 100 pmol/µl) und im Thermomixer für 5 min bei 95°C denaturiert. Hybridisierung erfolgte durch langsames Abkühlen auf 4°C im Thermomixer bzw. Heizblock.

3.5.4.8 Ligation von DNA

Kompatible Enden von DNA-Fragmenten wurden durch Ligation mit der T4 DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers kovalent verknüpft. Abhängig von der Sequenzlänge von Vektor und Insert wurden jeweils 50 bis 100 ng Vektor-DNA mit einem fünffachen molaren Überschuss an Insert versetzt und 2-16 h bei 16°C inkubiert. Als Ligationsskontrollen dienten die gleichen Vektoransätze ohne Insert, jedoch mit und ohne Behandlung von T4 DNA-Ligase. Alle Ansätze wurden nach der Inkubation in *E. coli* DH5α transformiert.

3.5.4.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.5.4.9.1 Ethanolfällung

Zur Präzipitation von DNA aus Puffergemischen oder anderen wässrigen Lösungen wurde die Ethanolfällung benutzt. Der zu fällenden DNA wurde 1/10 Volumen 3M Na-Acetat pH 6,5 und 2 ½ Volumen Ethanol (100%) zugesetzt und für eine halbe Stunde bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für ½ h bei 4°C und 13300 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgezogen und das Pellet mit 70%igem

Ethanol gewaschen. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 10 min wurde der Überstand entfernt und das Pellet für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in einer geeigneten Menge MQ resuspendiert.

3.5.4.9.2 Gelaufreinigung

Verschieden große DNA-Moleküle wurden über die Gelaufreinigung erhalten. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und die entsprechende Bande unter Verwendung von UV-Licht ausgeschnitten. Das Gelstück wurde mittels QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um eine höhere Qualität der Nukleinsäure zu erhalten wurde die Silica-Membran 2 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen und mit 30 bis 40 µl MQ eluiert.

3.5.4.10 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und Zusatz freier Desoxynukleotide konnte ein doppelsträngiger Nukleinsäurebereich (Matrize) definierter Länge zwischen zwei an definierten Stellen in Strang und Gegenstrang hybridisierenden Oligonukleotiden selektiv und exponentiell vervielfältigt werden. Diese Reaktion erfolgte in Zyklen mit hitzeinduzierter Strangtrennung, Hybridisierung und anschließender Synthese. Die gezielte Konstruktion der verwendeten Oligonukleotide ermöglichte das Einführen von Mutationen und Restriktions-endonukleaseerkennungsstellen. Das Reaktionsgemisch enthielt die Matrize, die jeweiligen Oligonukleotide, Desoxynukleotide und die Polymerase im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach den verwendeten Oligonukleotiden, die Elongationsdauer nach der Länge des zu amplifizierenden Nukleinsäurebereichs. In Tabelle 3.17 ist ein Schema für eine Polymerase-Kettenreaktion mit der Phusion-Polymerase zu sehen.

Tab. 3.17 Ansatz einer Polymerase-Kettenreaktion

| Mastermix | | PCR-Programm | | | |
|---|--|---------------|------------|----------|--------|
| | x μl | Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklen |
| 50-100 ng DNA- Template | | | | | |
| 5x Phusion HF- Puffer | 10/20 μl | Denaturierung | 98°C | 30 sec | |
| dNTPs (je 10 mM) | 3 μl | Denaturierung | 98°C | 30 sec | 30 x |
| 10 pmol vorw. Oligonukleotid | 3 μl | Annealing | 45-65°C | 1 min | |
| 10 pmol rückw. Oligonukleotid | 3 μl | Elongation | 72°C | 30 sec | |
| Phusion-Polymerase (2 U/ μl) | 1 μl | Elongation | 72°C | 7 min | |
| MQ | ad 50/100 μl | Lagerung | 8°C | ∞ | |
| Summe | 50/100 μl | | | | |

3.5.5 Methoden mit RNA

3.5.5.1 Präzipitation und Aufreinigung von RNA

3.5.5.1.1 Ethanolfällung

Zur Fällung von RNA wurde gewöhnlich die Präzipitation mit Ethanol verwendet. Hierbei wurde die RNA mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 6,5 angesäuert und dann mit 5 Volumen 99,98% Ethanol bei -80°C für 30 min, bei -20°C für eine Stunde oder über Nacht gefällt. Danach wurde die RNA 30 min bei 8500 rpm abzentrifugiert und das Pellet 15 min mit einem Volumen 70% Ethanol bei 8500 rpm gewaschen und anschließend in MQ gelöst.

3.5.5.1.2 Isopropanolfällung

Hierbei wurde die Nukleinsäure mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 6,5 und einem Volumen Isopropanol (4°C) versetzt und mind. 30 min oder über Nacht bei -20°C gefällt. Danach wurde die Nukleinsäure 30 min - 1 h bei 8500 rpm und 4°C abzentrifugiert und

das Pellet 15 min mit 1 Volumen 70% Ethanol bei 8500 rpm gewaschen und anschließend in MQ gelöst.

3.5.5.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient zur Abtrennung von Proteinen von RNA oder DNA, da die Proteine im Phenol denaturieren und sich dann in der Interphase (zwischen der organischen und der wässrigen Phase) ansammeln, während die Nukleinsäuren sich in der wässrigen Phase lösen. Hierzu wurde die Nukleinsäure mit 1 Vol Phenol versetzt und in ein MaXtract-Gefäß überführt. Durch Zentrifugation nach Anleitung des Herstellers wurden die beiden Phasen getrennt und die obere wässrige Phase wurde mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und nochmals nach Anleitung des Herstellers zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase mit Isopropanol gefällt.

3.5.5.2 Extraktion von RNA aus humanen Zellen

Humane Zellen aus verschiedenen Zelllinien wurden in einer Zellzahl von 2×10^5 bis 5×10^6 Zellen für 5 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur geerntet und die Zellpellets in 400 μ l RNA-Extraktionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 20 μ l 20%ige SDS-Lösung, 400 μ l 6 M Guanidiniumthiocyanat und 400 μ l auf 65°C vorgewärmtes Phenol pH4-4,5 zugegeben. Die Ansätze wurden gevortext und für 5 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Die Ansätze wurden mit 400 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) gemischt und in QIAgen Maxtract-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 3 min bei 8500 rpm und 4°C wurde die wässrige Phase abgenommen und erneut mit 600 μ l 65°C warmen, sauren Phenol für 5 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 600 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) gemischt und die wässrige Phase in Maxtract-Röhrchen getrennt. Nach erneuter Zugabe von 600 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) und Zentrifugation wurde die wässrige Phase mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 5 Volumen 99,98% Ethanol gemischt und für 30 min bei -80°C gefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 30-60 min bei 8500 rpm und 4°C wurde das Pellet luftgetrocknet und in 40-80 μ l DEPC-H₂O gelöst. Die RNA wurde spektrometrisch am Nanodrop vermessen. Anschließend wurde 30-50 μ g RNA für 10 min bei Raumtemperatur mit 2U Turbo DNase von Ambion verdaut und erneut mit Ethanol gefällt. Die RNA wurde spektrometrisch am Nanodrop quantifiziert und über Agarosegele qualitativ überprüft.

3.5.5.3 *In vitro* Transkription

Die Matrizen für die *in vitro* Transkription wurde entweder mittels QIAfilter Plasmid Maxi Kit als Plasmid aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen EcoRI oder XbaI linearisiert oder über PCR mit spezifischen Primern, welche einen T7-Promotor einführen, erhalten. Vor der *in vitro* Transkription wurden die Matrizen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und in 40 µl DEPC-H₂O aufgenommen. In Tabelle 3.18 ist ein Ansatz für eine *in vitro* Transkription aufgelistet.

Tabelle 3.18 Ansatz einer *in vitro* Transkription

| <i>In vitro</i> Transkriptionsansatz | |
|---|----------------------------|
| DNA Matrize | 50 - 100 µg |
| MgAc ₂ | 25 mM |
| Tris-HCl pH 8,0 | 200 mM |
| DTT | 20 mM |
| Spermidin | 2 mM |
| NTPs | je 4 mM ATP, CTP, GTP, UTP |
| T7 Polymerase | 1-5 µl |
| MQ | Ad 500 µl – 1 ml |

Die Transkription erfolgte für mindestens 3 h oder über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die Ansätze mit Ethanol gefällt in 1 ml Ladepuffer aufgenommen und auf präparativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht (254 nm) konnten die Banden sichtbar gemacht, mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und über Nacht in 300 mM NaAc pH 6,5 bei 4°C aus dem Gel eluiert werden. Danach wurde die RNA nochmals mit Ethanol gefällt und in einem passenden Volumen DEPC-Wasser aufgenommen.

3.5.5.4 Denaturierende Gelelektrophorese

Die Größe und Konzentration von RNA-Fragmenten wurde durch analytische bzw. präparative Gelelektrophorese nachgewiesen und bestimmt. Dazu wurden in Abhängigkeit des gewählten Experiments 6%, 10%, oder 15% PAA-Gele verwendet. Damit bestehende Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst werden, wurde der Acrylamidlösung 7 M Urea zugesetzt. Die Auftrennung der mit RNA-Auftragepuffer versetzten Proben fand 30-60 min bei 100 V statt. Zur Detektion der RNA wurden die

Gele 5-10 min in einem Ethidiumbromidbad (5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht (254 nm) fotografiert.

3.5.5.4.1 UV-shadowing

RNA wurde präparativ aus einem PAA-Gel entfernt, indem Glasplatten, welche auf einer Seite reflektierend waren, so verwendet, dass die reflektierende Seite mit dem später polymerisierten Gel in Berührung kam. Nach der Elektrophorese wurde eine Glasplatte vorsichtig vom Gel abgehoben. Das auf der reflektierenden Seite der anderen Platte liegende Gel wurde mit Hilfe einer UV-Handlampe (254 nm) belichtet. Die RNA absorbierte das UV-Licht, hinterließ einen Absorptionsschatten und konnte mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten werden.

3.5.5.4.2 Elution der RNA

Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 350 µl 300 mM Na-Acetat pH 6,5 oder Crush-Soak-Puffer versetzt. Die Elution erfolgte über 4-16 h im Kühlschrank. Nach der Elution wurde der Ansatz für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand (ohne Gelreste) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 750 µl 99.9% EtOH (kalt) gegeben und die RNA für 3 min in flüssigem Stickstoff gefällt. Anschließend wurde für mindestens 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 150 µl 70% EtOH (kalt) gewaschen und nochmals zentrifugiert (15 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet (ca. 3 min), in 30 µl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

3.5.5.5 Markierung von RNA

3.5.5.5.1 Dephosphorylierung des 5'-Endes

Für die Markierung von RNA mit [γ -³²P]-ATP musste das Triphosphat am 5'-Ende der *in vitro* transkribierten RNA abgespalten werden. Hierzu wurde die alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm (CIP) verwendet.

Tab. 3.19 Ansatz zur Dephosphorylierung des 5'-Endes

| Dephosphorylierung | |
|------------------------------------|----------|
| <i>In vitro</i> transkribierte RNA | 50 pmol |
| 10 x Phosphatase-Puffer | 2 µl |
| CIP | 2µl |
| DEPC-H ₂ O | Ad 20 µl |

Die Reaktion wurde für 15 min bei 50°C durchgeführt und danach das Enzym für 3 min bei 95°C hitzeinaktiviert.

3.5.5.5.2 Radioaktive Markierung von RNA

Zur radioaktiven Markierung des 5'-Endes von dephosphorylierter RNA wurde ausschließlich $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ verwendet. Die Phosphorylierung mit $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ erfolgte durch die Polynukleotidkinase (PNK).

Tab. 3.20 Ansatz zur radioaktiven Markierung von RNA

| Radioaktive Endmarkierung | |
|--|----------|
| Dephosphorylierte RNA | 10 fmol |
| $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ | 4 µl |
| 1 x PNK-Puffer | 2 µl |
| PNK | 1µl |
| DEPC-H ₂ O | Ad 20 µl |

Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37°C durchgeführt und durch die Zugabe von 20 µl 2 x RNA Ladepuffer (Harnstoff) abgestoppt.

Das Aufreinigen der markierten RNA erfolgte über Gelelektrophorese. Zur Elution des radioaktiv markierten Fragments aus dem Gel wurde ein Röntgenfilm eine Minute auf das Gel aufgelegt, wobei die Position auf dem Gel durch Leuchtaufkleber markiert wurde. Der Film wurde entwickelt (Entwicklerbad/ Wasserbad/ Fixierbad/ Wasserbad/ Trocknen) und auf das Gel aufgelegt, wobei die Positionierung anhand der Leuchtaufkleber erfolgte. Das markierte Fragment wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Zur Gelelution wurde das Gelstück 2 x 30 min oder über Nacht auf Eis bzw. bei 4°C in 300 mM NaAc pH 6,5 inkubiert und mit Ethanol gefällt. Die Radioaktivität der markierten

RNA (cpm/ μ l) wurde mithilfe des Szintillationszählers bestimmt, wobei 1 μ l markierte RNA in 4 ml Szintillationsflüssigkeit vermessen wurde.

3.5.5.6 Gelverzögerungsexperimente (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*)

Für die Gelverzögerungsexperimente von verschiedenen TetR-Proteinen sowie CcpA mit Aptamer-RNA 12-1K Δ A bzw. *tetO*-Operator-DNA wurden die in Tabelle 3.20 beschriebenen Ansätze verwendet. Jeweils 10 fmol von Aptamer-RNA bzw. *tetO*-DNA wurden mit [γ -³²P]-ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert und mit Proteinkonzentrationen von 1 nM bis 500 nM für 30 min bei Raumtemperatur in 1 x Bandshift-Puffer inkubiert. Für Konkurrenzexperimente mittels EMSA wurde entweder Aptamer-RNA oder *tetO*-DNA radioaktiv markiert, mit unmarkierter *tetO*-DNA bzw. Aptamer-RNA und Proteinen gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Für Disruptionsstudien wurde zunächst markierte Aptamer-RNA oder *tetO*-DNA mit 100 nM Protein für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zu den Ansätzen steigende Konzentrationen unmarkierter *tetO*-DNA bzw. Aptamer-RNA zugegeben und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Tab. 3.21 Ansatz eines Gelverzögerungsexperiments

| Substanz | Menge |
|--|---|
| γ -[³² P]-ATP markierte Aptamer-RNA bzw. <i>tetO</i> -DNA | 10 – 20 fmol |
| (optional: unmarkierte <i>tetO</i> -DNA bzw. Aptamer-RNA) | 2 μ l in steigenden Konzentrationen |
| 10x Bandshift-Puffer | 2 μ l |
| TetR (B) | 2 μ l in steigenden Konzentrationen |
| DEPC-H ₂ O | Ad 20 μ l |

Vor dem Auftragen auf ein 10%iges natives Polyacrylamidgel wurde der Ansatz mit 20 μ l 10% Glycerin in 1 x TB versetzt, kurz gemischt und jeweils die Hälfte aufgetragen. An die Gele wurde eine Spannung von 70 V bei maximal 3 W für Polyacrylamidgele angelegt. Danach wurden die Gele bei 60°C für 10 – 40 min getrocknet und für 1 h bis über Nacht auf eine Phosphoimagerplatte aufgelegt. Die Phosphoimagerplatten wurden am Typhoonscanner mit ausgelesen.

3.5.5.7 Northern Blot

Eine Menge von 10–50 µg Komplet-RNA wurde pro Spur auf einem 20 x 20 cm 15%igen Polyacrylamid Gel bei 25 W aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA in einem Tankblotter mit 5 l vorgekühltem 1 x TBE bei 50 V und 3 A für eine Stunde auf eine Nylon Hybond N+-Membran transferiert. Die Membran wurde bei Raumtemperatur getrocknet und 4 min mit der RNA Seite nach unten auf dem UV-Schirm fixiert. Die Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und für eine Stunde mit 12 mL Rothi HybriQuick bei 42°C prähybridisiert (Schmelztemperatur der Sonde abzüglich 15°C). Dann wurden 30 µl eines spezifischen 5'-markierten DNA-Oligonukleotids zugegeben und abhängig von der erwarteten Stärke des Signals für weitere 1–12 h hybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde abgenommen und die Membran wurde bei 42°C für 20 min mit 5 x SSC, 0,1% SDS und jeweils 15 min mit 1 x SSC, 0,1% SDS und 0,5 x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Membran wurde luftgetrocknet und in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die Detektion erfolgte am Typhoon Phosphoimager.

3.5.5.8 LILBID (*laser induced liquid beam ionization/desorption*)

Bei LILBID handelt es sich um eine sanfte Massenspektrometriemethode, die es erlaubt nichtkovalente Komplexe zu untersuchen. Hierbei können Komplexgrößen, deren Stabilität sowie Bindungsstöchiometrien mithilfe unterschiedlicher Laserintensitäten bestimmt werden. Dazu wird ein Flüssigkeitsstrahl in ein Hochvakuum eingespritzt und mit einem Infrarotlaser bestrahlt. Hierdurch wird ein Teil des Lösungsmittels verdampft und die in der Analyseslösung vorliegenden Moleküle werden im Flugzeitmassenspektrometer auf ihr Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) untersucht. Die im Rahmen dieser Dissertation dargestellten LILBID-Messungen wurden von Jan Hoffmann aus der Arbeitsgruppe Brutschy durchgeführt.

3.5.5.9 Quantitative *Real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Quantitative RT-PCR Reaktionen wurden mit dem StepOnePlus *Real-time* System von Applied Biosystems durchgeführt. Bei der *Real-time* PCR wird die Vermehrung des PCR-Produktes durch Fluoreszenzmessung während der Amplifikationphase analysiert. Zur Detektion der PCR-Amplifikation wird eine Hydrolysierungssonde eingesetzt, die aus einem am 5'- und 3'-Ende fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid (TaqMan-Sonde) besteht. Die TaqMan-Sonde bindet sequenzspezifisch an das PCR-Produkt und wird in jedem Amplifikationszyklus durch die 5'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Die Fluoreszenz des Fluorophors am 5'-Ende der noch intakten

Reportersonde wird vom Fluorophor am 3'-Ende (*Quencher*) durch Energieübertragung (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) unterdrückt. Durch Hydrolyse wird die räumliche Nähe der beiden Fluorophore aufgehoben, wodurch die Fluoreszenz des Reporters schließlich proportional zur Menge des PCR-Produkts zunimmt. Der Anstieg der Fluoreszenz bei der PCR-Reaktion lässt auf die Ausgangsmenge der amplifizierten Sequenz schließen. Dazu wird die Anzahl der Temperaturzyklen (Ct-Wert) bestimmt, ab der die Fluoreszenz einen fixen Wert innerhalb der exponentiellen Phase der Reaktion erreicht (Gibson et al., 1996). Je höher der Ct-Wert ist, desto mehr Zyklen sind notwendig, um den einer bestimmten Produktmenge entsprechende Fluoreszenzwert zu erreichen und desto geringer war die Ausgangsmenge der amplifizierten DNA. Das Verhältnis zweier cDNA Mengen wurde berechnet über den exponentiellen Anstieg mittels der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Dabei gibt der ΔCt -Wert die Differenz des Ct-Wertes der Referenz cDNA und des Ct-Wertes der zu bestimmenden cDNA an. Die Reaktionen wurden in optischen 96-well Multititerplatten in einem Gesamtvolumen von 20 μ l durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der StepOnePlus Software und Microsoft Excel.

3.5.5.9.1 cDNA-Synthese für qRT-PCR

Zur cDNA-Synthese wurden 100 ng Komplet-RNA mit microRNA-spezifischen Oligonukleotiden, welche die Bindestelle für eine Hydrolyse-sonde tragen, mit der reversen Transkriptase Superscript II umgeschrieben. Die Reaktionsansätze wurden zunächst ohne RNA als Mastermix gemischt und jeweils 6 μ l in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurde die RNA zugegeben und die Ansätze kurz gemischt. Ein Reaktionsansatz ist in Tabelle 3.22 angegeben.

Tab. 3.22 Reverse Transkription von RNA

| Stemloop RT-PCR | | Programm | | |
|--|---------|----------|-------|------|
| 500 nM microRNA spezifisches Stemloop Oligonukleotid | 1 µl | 30 min | 16°C | |
| 500 nM snoRNA U48 spezifisches Stemloop Oligonukleotid | 1 µl | 30 sec | 30°C | 60 x |
| 10 mM dNTPS | 0,25 µl | 30 sec | 42°C | |
| 100 mM DTT | 1 µl | 1 min | 50°C | |
| 5 x First Strand-Puffer | 2 µl | 15 min | 70°C | |
| Reverse Transkriptase (SuperScript II) | 0,25 µl | ∞ | 4-8°C | |
| DEPC-H ₂ O | 0,5 µl | | | |
| 25 ng/µl Komplet-RNA | 4 µl | | | |

3.5.5.9.2 Quantitative PCR-Reaktion

Für die quantitative PCR wurde die oben beschriebene cDNA zunächst 1:5 mit DEPC-H₂O verdünnt und anschließend ein Mastermix mit jeweils spezifischen Oligonukleotiden für die microRNA bzw. für die U48 snoRNA, einem universellen reversen Oligonukleotid sowie der Taqman-Hydrolysisierungs-sonde pipettiert. Jeweils 15 µl des Mastermixes wurden in eine Vertiefung einer optischen 96-well-Platte mit einer sterilen Dispenserspitze gegeben und anschließend jeweils 5 µl der verdünnten cDNA-Ansätze an den Rand der Vertiefung. Dann wurden die Vertiefungen der 96-well mit einer luftundurchlässigen, optischen Schutzfolie verschlossen und die Platte für ein Minute bei 1500 rpm zentrifugiert. Ein Reaktionsansatz für die quantitative PCR-Reaktion ist in Tabelle 3.23 dargestellt.

Tab. 3.23 Reverse Transkription von RNA

| Quantitative PCR | | Programm | | |
|------------------------------------|-------|----------|-------|------|
| 10 µM Universal Primer | 1 µl | 2 min | 50°C | |
| 10 µM Forward Primer | 1 µl | 10 min | 95°C | |
| TaqMan Hydrolysierungssonde | 1 µl | 15 sec | 95°C | 60 x |
| Universal probe library #21 | | 1 min | 60°C | |
| 2 x Taqman Universal PCR Mastermix | 10 µl | ∞ | 4-8°C | |
| DEPC-H ₂ O | 2 µl | | | |
| cDNA (1:5 verdünnt) | 5 µl | | | |

3.5.6 Methoden mit Proteinen

3.5.6.1 Proteinmengenbestimmung

Für Proteinrohextrakte aus Zelllysaten wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford-Reaktion bestimmt anhand einer Eichgeraden mit BSA-Standard bestimmt.

Die Menge von TetR-Proteinen wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Wenn der Extinktionskoeffizient ϵ und die Schichtdicke d bekannt ist, lässt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus der Absorption die Konzentration c einer Proteinlösung bestimmen:

$$A = c \times \epsilon \times d$$

A ist hierbei die Absorption bei 280 nm und d die Schichtdicke (in der Regel $d = 1$ cm). Durch Umformung lässt sich die Konzentration bestimmen. Dabei gilt für ϵ folgende Summe:

$$\epsilon = 5700 \times (\text{Anzahl der Tryptophane}) + 1300 \times (\text{Anzahl der Tyrosine}) \quad [\epsilon] = \frac{1}{\text{mol} \times \text{cm}}$$

3.5.6.2 Dialyse von TetR-Proteinen

Für LILBID-Messungen wurde durch Dialyse das Glycerin aus der verwendeten Proteinlösung entfernt. Dafür wurde die gewünschte Menge Protein in eine Dialysekammer mit einer semipermeablen Membran gegeben und 3 x mindestens 8 h bei

4°C gegen 500 ml Bandshift-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) dialysiert. Die Proteinlösung wurde anschließend nach präziser Konzentrationsbestimmung in einem Reaktionsgefäß bei 4°C gelagert.

3.5.6.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Von kompletten Zelllysaten aus 2×10^5 HT-29 Zellen wurden 30-60 µg Proteinrohextrakt in 15-20 µl Volumen mit 3 µl Proteinauftragepuffer (Glycerin/0,1% Bromphenolblau 1:1 (v/v), 10% β-Mercaptoethanol) versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend über 10% SDS-Polyacrylamidgelelektrophoretisch mit Hilfe des Mini Protein Systems von Bio-Rad aufgetrennt. Das Proteingel wurde 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Die passend zugeschnittene Nitrozellulose-Membran wurde 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 100 V und 230 mA unter Kühlung für 80 bis 90 min. Die Membran wurde eine Stunde in Odyssey[®] Blocking Buffer bei Raumtemperatur blockiert. Zur Analyse der Proteinexpression von COX-2 bzw. β-Actin wurde die Membran 2 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C jeweils mit einem monoklonaler Antikörper (1:1000 verdünnt) aus Maus bzw. Ziege inkubiert. Anschließend wurde die Membran zunächst 2 x mit PBS pH 7,4 und 0,1% Tween 20 gewaschen, dann 1 x in PBS pH 7,4 und 45 min bei Raumtemperatur mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (IRDye[®], LI-COR[®] Biosciences) unter Lichtabschluss inkubiert. Die Membran wurde danach erneut 3 x mit PBS pH 7,4 und 0,1% Tween 20 gewaschen, dann 1 x in PBS pH 7,4 und anschließend am Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) analysiert. Die Intensitäten der untersuchten Proteinbanden wurden immer im Verhältnis zur Intensität der Kontrollbande von β-Actin quantifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen von TetR-Aptamer Interaktionen

4.1.1 Bindestudien von TetR und dem Aptamer 12-1KΔA durch Gelverzögerungsexperimente

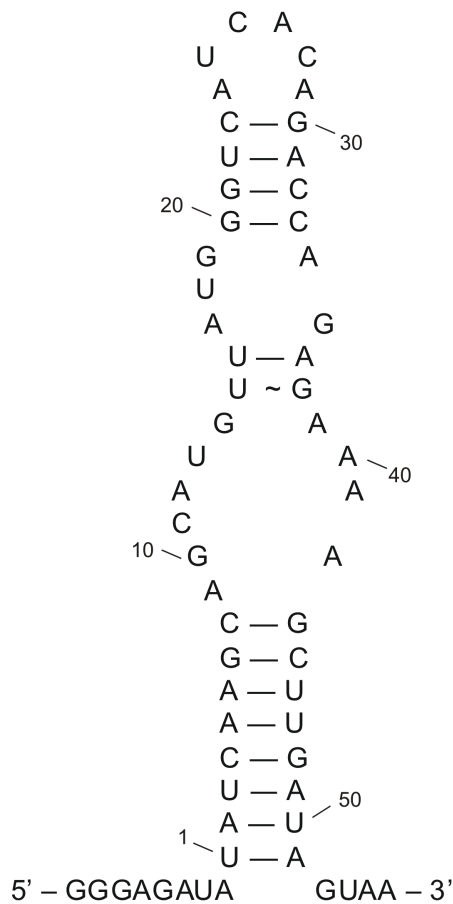


Abb. 4.1 Das TetR bindende Aptamer 12-1KΔA. Die Sekundärstruktur des Aptamers 12-1KΔA ist als eine Stammschleife mit asymmetrischer Ausbuchtung dargestellt. Die Vorhersage der Struktur erfolgte mit RNAfold und wurde über *inline probing* bestätigt.

Das TetR-bindende Aptamer 12-1 wurde über einen zweistufigen Prozess aus *in vitro* Selektion und *in vivo* Screening gefunden und durch *in vivo* Studien in Struktur und Funktion detailliert charakterisiert (Hunsicker et al., 2009). Durch

Gelverzögerungsexperimente sollte neben der Bindeaffinität auch der Bindebereich charakterisiert werden.

Für Bindestudien durch Gelverzögerungsexperimente (*electromobility shift assay*, EMSA) wurde das Aptamerkonstrukt 12-1K Δ A verwendet. Das Konstrukt besitzt mit einer Länge von 54 Basenpaaren und einem durch Deletion des ausgebuchteten Adenosins stabilisierten Stammbereich eine gute Aktivität *in vivo*. Das TetR bindende Aptamer 12-1K Δ A wurde entweder vom Plasmid pSP64_hh12-1K Δ A (Hunsicker et al., 2009) oder über ein PCR-Produkt mit der T7 Polymerase *in vitro* transkribiert und anschließend durch präparative Gelelektion aufgereinigt. Die Aptamer-RNA wurde auf eine Konzentration von 10 fmol/ μ l eingestellt. Das 5'-Ende der RNA wurde radioaktiv mit γ -³²P-ATP markiert und erneut über präparative Gelelektion aufgereinigt.

Zur Komplexbildung wurden die Wildtypproteine TetR(B) und TetR(BD) sowie verschiedene Mutanten im DNA-Bindekopf (Hunsicker et al., 2009) für Gelverzögerungsexperimente verwendet. In Abb. 4.2 ist das TetR-Dimer mit den untersuchten Aminosäuren dargestellt.

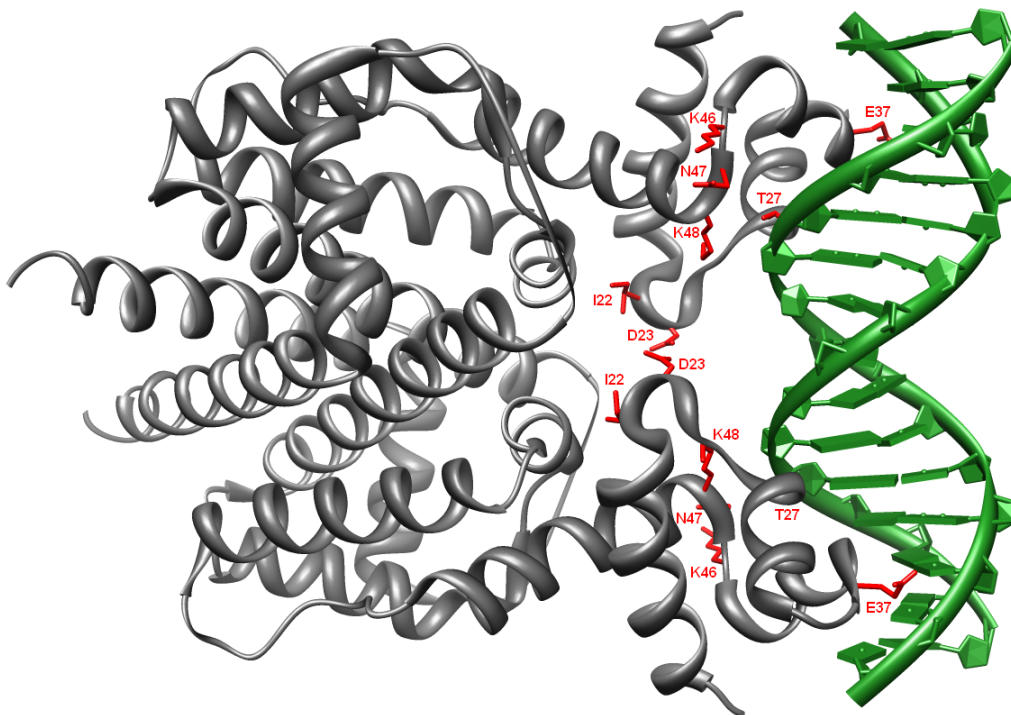


Abb. 4.2 Untersuchte Aminosäuren der TetR-Bindung. TetR ist als Dimer in grau dargestellt, die Operator-DNA *tetO* in grün. Die untersuchten Aminosäuren sind in rot hervorgehoben und numerisch markiert (Koordinaten in der *Protein Data Base* (PDB): 1QPI).

10 fmol Aptamer 12-1K Δ A wurden mit steigenden Konzentrationen an Protein wurden mit Raumtemperatur oder 37°C für 30 min in 1x Bandshift-Puffer inkubiert. Ebenso wurden 10 fmol *tetO*-Operator-DNA am 5'-Ende radioaktiv markiert und wie oben beschrieben mit steigenden Proteinkonzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze über native 10%-Polyacrylamidgele aufgetrennt, am Phosphoimager visualisiert und quantifiziert. In Abbildung 4.3 sind die Gelverzögerungsexperimente von Aptamer-RNA bzw. *tetO*-DNA mit den Wildtypproteinen sowie dem Kontrollprotein CcpA dargestellt.

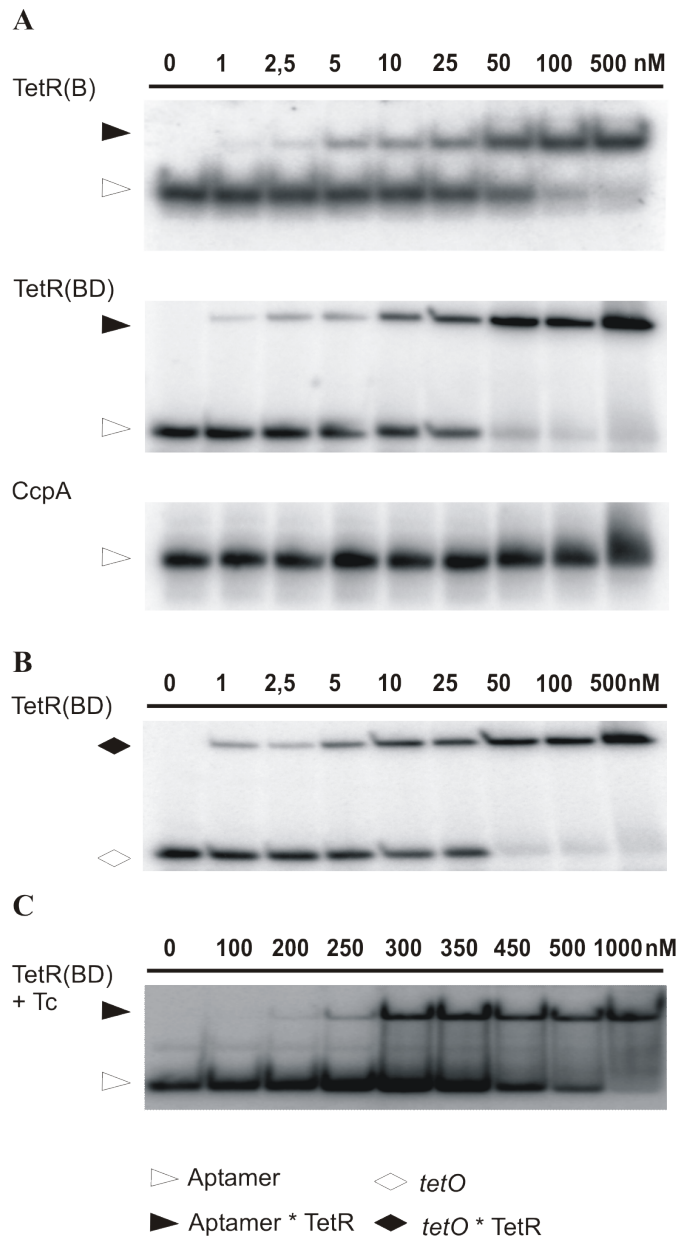


Abb. 4.3 Gelverzögerungsexperimente mit verschiedenen TetR Proteinen. **A** Radioaktiv markierte Aptamer-RNA 12-1KΔA wurde mit steigenden Konzentrationen TetR(B) bzw. TetR(BD) inkubiert und die Komplexbildung auf einem nativen 10%igen Polyacrylamid-Gel analysiert. Als Kontrolle wurde 12-1KΔA mit steigenden Konzentrationen CcpA inkubiert. **B** *tetO*-Operator-DNA wurde radioaktiv markiert und mit steigenden Konzentrationen TetR(BD) inkubiert. **C** Aptamer-RNA wurde mit steigenden Konzentrationen TetR(BD) und Tetracyclin im Verhältnis TetR:Tc 1:2 inkubiert.

In den Gelverzögerungsexperimenten konnte eine Komplexbildung aus Aptamer 12-1KΔA und Wildtyp TetR(B) bzw. TetR(BD) ab einer Proteinkonzentration von 2,5 nM beobachtet werden. Die Spezifität der Aptamer/Protein-Bindung wurde mit dem bakteriellen Regulatorprotein CcpA (catabolite control protein A) aus *Bacillus subtilis*

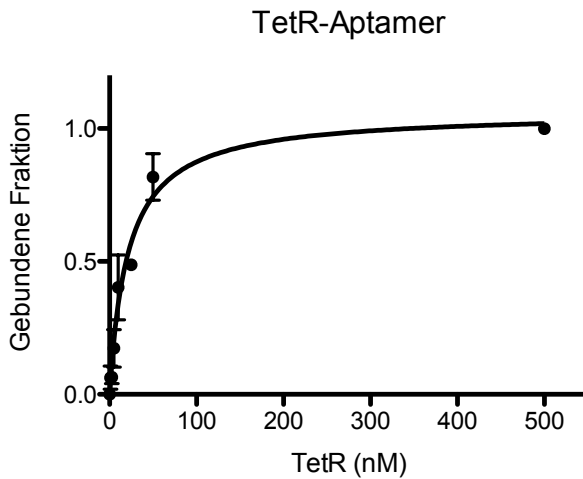
überprüft. Hier konnte keine Bindung festgestellt werden. Die Gelverzögerungsexperimente mit radioaktiv markierter *tetO*-DNA und TetR(BD) zeigten eine vergleichbare Komplexbildung ab 2,5 nM wie der Aptamer/TetR-Ansatz.

Die Komplexbildung bei Co-Inkubationen von Aptamer-RNA und TetR-Tc-Mischungen im molaren Verhältnis von 1:2 konnte dagegen erst bei höheren Proteinkonzentrationen ab 250 nM beobachtet werden.

4.1.2 Quantifizierung der Bindeaffinität und K_D -Berechnungen

Zur Quantifizierung der Bindungsstärke der Aptamer/TetR- bzw. *tetO*/TetR-Komplexe wurden die Intensitäten der Verzögerungsgelbanden mit Hilfe der ImageQuant Software des Typhoon Phosphoimagers analysiert. Die relativen Intensitäten der gebundenen Fraktionen an Protein wurden im Verhältnis zur Gesamtintensität geplottet. Die Intensitäten der Aptamer/TetR-Banden wurden aus jeweils drei unabhängigen Gelverzögerungsexperimenten analysiert. Die Analyse der *tetO*/TetR-Komplexes erfolgte in Duplikaten. In Abbildung 4.4 sind die Kurvenangleichungen der Aptamer/TetR- bzw. *tetO*/TetR-Komplexe aus einem Experiment dargestellt.

A



B

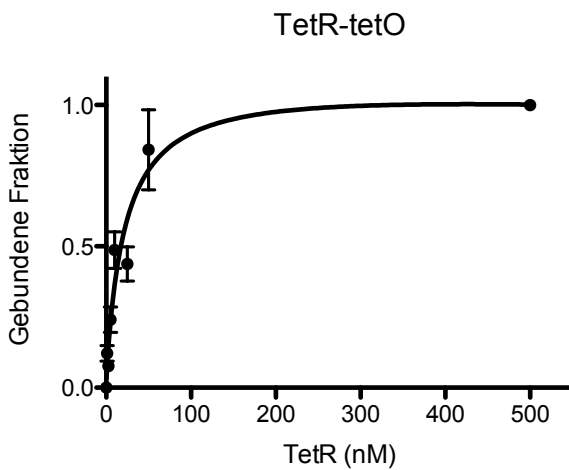


Abb. 4.4 Berechnung der Dissoziationskonstanten. Die Intensitäten der verzögerten Banden wurden an dem in der Sättigung liegenden 500 nM Wert normalisiert und gegen die TetR-Konzentration aufgetragen. Die Kurve wurde mittels SigmaPlot bzw. Graphpad Prism mit der Kurvengleichung $y = B_{\max} * x / (K_D + x)$ für eine spezifische Bindestelle angeglichen. **A** Kurvenangleichung der TetR-Aptamer-Bindung mit einem berechneten K_D von 21 nM (n=3). **B** Kurvenangleichung der TetR-*tetO* Bindung mit einem berechneten K_D von 22 nM (n=2).

Durch nichtlineare Kurvenangleichung für eine spezifische Bindestelle mit der Formel $y = B_{\max} * x / (K_D + x)$ konnte sowohl für die Aptamer-TetR-Bindung wie auch für die *tetO*-TetR-Bindung eine Bindekonstante (K_D) im Bereich von etwa 22 nM berechnet werden. Der Wert bei 100 nM wurde für eine optimale Kurvenangleichung nicht berücksichtigt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindeaffinität des

Aptamers zu TetR in Anwesenheit von Tetracyclin im Verhältnis von TetR zu Tc von 1:2 um das sechs- bis siebenfache auf 300 nM abnimmt (Amit Arora, persönlicher Kommentar).

4.1.3 Analyse der Bindungsspezifität mit unterschiedlichen TetR-Mutanten

Die Spezifität der Aptamer-Bindung an TetR konnte bereits durch Mutationsanalysen *in vivo* auf den DNA-Bindebereich des TetR-Dimers eingegrenzt werden. Die Mutanten im DNA-Bindekopf von TetR T27S, K35E, K35R, E37A, E37H, Q38S, P39S, T40S, L41I, Y42F, W43Y und H44W wurden auf eine Induktion durch das Aptamer 12-1 untersucht. Zudem wurden die TetR-Mutanten im Proteinkörper D53G, H64Y, N82A, F86A, H100Y, G102R, T103A, P105A, E147A und D178 ebenfalls auf Induktion analysiert (Dissertation Anke Hunsicker, 2009). Dabei konnte nur für die Positionen T27 und E37 eine Reduktion des Regulationsfaktors *in vivo* beobachtet werden. Alle anderen Mutanten konnten mit dem Aptamer induziert werden. Des Weiteren wurden die zu T27 und E37 benachbarten Aminosäureaustausche im DNA-Bindekopf D23A, G24A, L25A, T26A, R28A, A31G, Q32A, V36A, K46A, N47A und K48A auf Induktion untersucht. Die Position N47A konnte dabei als einzige Position nicht induziert werden (Dissertation Anke Hunsicker, 2009).

Für die biochemische Analyse im Rahmen dieser Arbeit wurden die *in vivo* regulatorisch interessanten TetR-Mutanten T27S, E37A und N47A verwendet, welche die DNA-Bindung von TetR vermitteln. Außerdem wurden die TetR-Mutanten I22C, D23C (Dissertation Beatrix Tiebel, 1998) sowie K46A und K48A betrachtet, welche von der Sequenzfolge benachbart sind und für die Positionierung der DNA-Bindeköpfe wichtig sind (schematische Darstellung der untersuchten Mutanten in Abbildung 4.2). In Abbildung 4.5 sind die Gelverzögerungsexperimente der untersuchten TetR-Mutanten dargestellt.

Ergebnisse

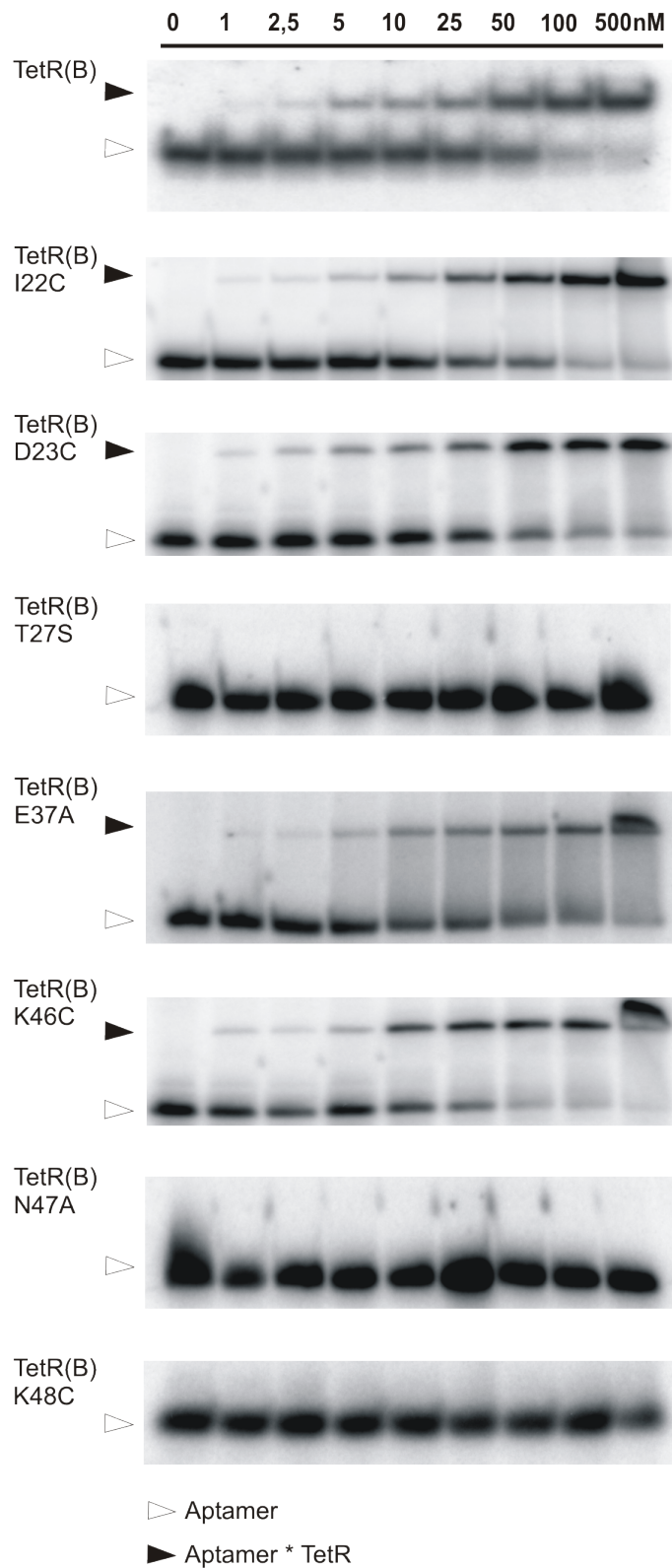


Abb. 4.5 Gelverzögerungsexperimente mit TetR-Mutanten. Die TetR-Mutanten T27S, N47A und K48A zeigen auch bei hohen Konzentrationen keine Bindung an die RNA. Die Mutanten I22C, D23C, E37A und K46C verhalten sich ähnlich wie das Wildtyp-Protein in der Gelverzögerung.

Die TetR-Mutanten T27S, N47A und K48C zeigten auch bei hohen Konzentrationen keine Bindung an die Aptamer-RNA. Die TetR(B) Mutanten im Proteinkörper I22C, D23C und K46C zeigten Gellaufverzögerungen ähnlich dem Wildtyp-Protein. Für die Mutante im DNA-Bindebereich E37A konnte ebenfalls ein ähnliches Gellaufverhalten wie für das Wildtyp-Protein beobachtet werden.

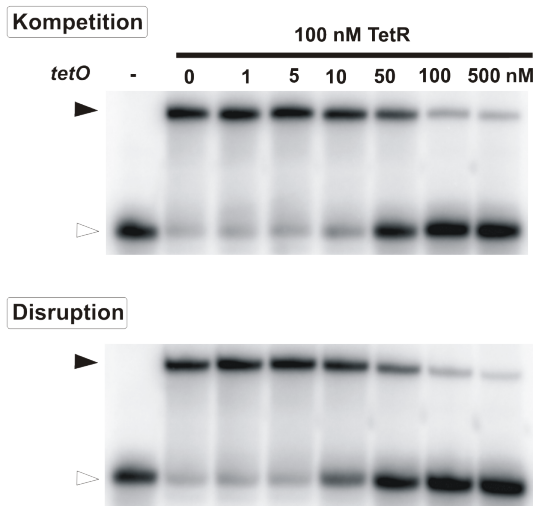
4.1.4 Kompetitions- und Disruptionsstudien zwischen Aptamer, *tetO*-DNA und TetR

Es konnte gezeigt werden, dass unter den beschriebenen Gelverzögerungsbedingungen sowohl das Aptamer 12-1KΔA wie auch *tetO*-Operator-DNA mit ähnlicher Affinität an TetR binden. Mit Kompetitions- und Disruptionsexperimenten sollte untersucht werden, ob der TetR/Aptamer-Komplex durch Zugabe von nicht markierter *tetO*-DNA verdrängt bzw. aufgehoben wird. Der gleiche Ansatz sollte für den TetR/*tetO*-Komplex durch Zugabe von unmarkierter Aptamer-RNA untersucht werden.

Für Konkurrenzexperimente wurden 10 fmol Aptamer-RNA oder *tetO*-DNA am dephosphorylierten 5'-Ende mit γ -³²P-ATP radioaktiv endmarkiert und mit 100 nM TetR sowie steigenden Konzentrationen an unmarkierter *tetO*-DNA bzw. Aptamer-RNA für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in einem nativen 10%-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Phosphorimaging analysiert.

Für Disruptionsexperimente wurden zunächst 10 fmol radioaktiv markierte Aptamer-RNA oder *tetO*-DNA mit 100 nM TetR für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden steigende Konzentrationen an unmarkierter *tetO*-DNA bzw. Aptamer-RNA zugegeben und die Ansätze erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf ein natives 10%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und durch Phosphorimaging analysiert. Die entsprechenden Gelverzögerungsexperimente sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

A



B

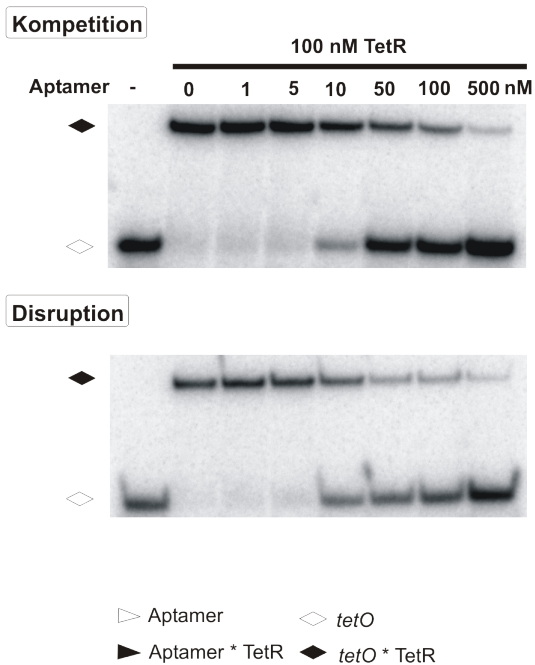


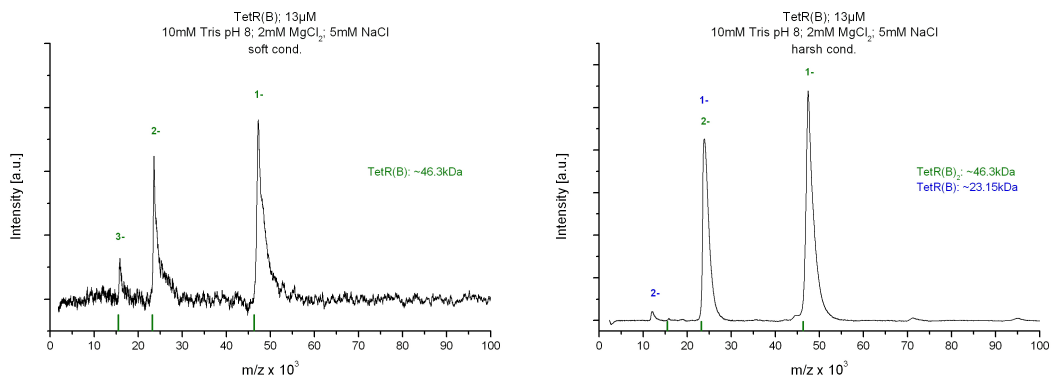
Abb. 4.6 Wettbewerbs- und Disruptionsexperimente. **A** Für Wettbewerbsexperimente wurde radioaktiv markierte Aptamer-RNA 12-1KΔA jeweils ohne bzw. mit 100 nM TetR sowie steigenden Konzentrationen unmarkierter *tetO*-DNA für 30 min inkubiert. Für Disruptionsexperimente wurde zunächst markierte Aptamer-RNA jeweils ohne bzw. mit 100 nM TetR inkubiert. Nach 20 min wurden steigende Konzentrationen an unmarkierter *tetO*-DNA zugegeben und erneut 20 min inkubiert. **B** Die gleichen Wettbewerbsexperimente wurden mit radioaktiv markierter *tetO*-DNA jeweils ohne bzw. mit 100 nM TetR durchgeführt sowie steigenden Konzentrationen unmarkierter Aptamer-RNA 12-1KΔA. Für Disruptionsexperimente wurde zunächst markierte *tetO*-DNA jeweils ohne bzw. mit 100 nM TetR inkubiert. Nach 20 min wurden steigende Konzentrationen an unmarkierter Aptamer-RNA zugegeben und erneut 20 min inkubiert.

Die Gellaufverzögerung des TetR-Aptamer-Komplexes konnte mit einem fünffachen Überschuss an *tetO*-DNA nahezu vollständig aufgehoben werden. Dabei konnte kein Unterschied festgestellt werden, ob die unmarkierte *tetO*-DNA gleichzeitig zugegeben wird (Kompetition) oder der Komplex durch spätere Zugabe aufgehoben wird (Disruption). Die kompetitive Bindung zwischen TetR, Aptamer und *tetO* konnte bestätigt werden, indem in einem gleichen Ansatz der TetR-*tetO*-Komplex durch Zugabe von Aptamer-RNA als Kompetitor aufgehoben wird. Hier konnte ebenso bei einer Konzentration von 500 nM Aptamer-RNA eine Auflösung des Komplexes beobachtet werden.

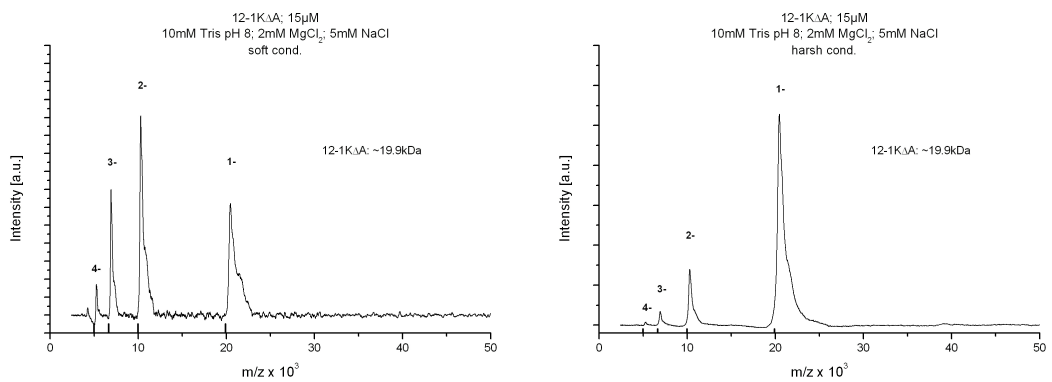
4.1.5 Bestimmung der Bindungsstöchiometrie durch LILBID

Zur Bestimmung der Stöchiometrie des Aptamer/TetR-Komplexes wurde das Aptamer und TetR jeweils alleine sowie eine Aptamer/TetR-Mischung massenspektrometrisch mittels LILBID-Technik untersucht. Für die LILBID-Messungen wurden die Aptamer-RNA und TetR in Messpuffer (10 mM Tris pH 8, 2 mM MgCl₂, 5 mM NaCl) auf eine äquimolare Konzentration verdünnt und analysiert. Die Messungen wurden von Jan Hoffmann im AK Brutschy durchgeführt. In Abbildung 4.7 sind die Massenspektrogramme von TetR, Aptamer-RNA 12-1KΔA und Aptamer/TetR-Komplex jeweils unter verschiedenen Analysebedingungen dargestellt.

A



B



C

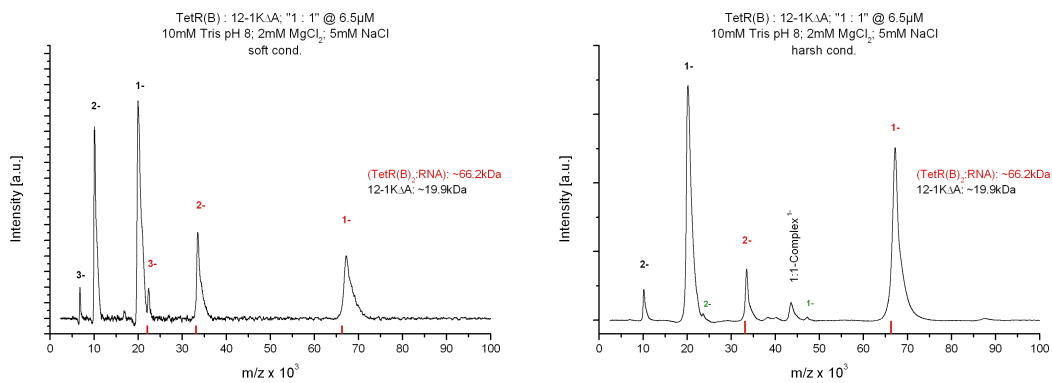


Abb. 4.7 Bestimmung der Bindungsstöchiometrie durch LILBID-Messungen. Für die Bestimmung der Stöchiometrie des Aptamer/TetR-Komplexes wurde jeweils die Masse von TetR und Aptamer 12-1KΔA alleine sowie die Masse des Komplexes massenspektrometrisch bei geringer (soft) und starker (harsh) Laserintensität (linkes gegen rechtes Spektrum) bestimmt. Die Auftragung erfolgte gemäß dem Verhältnis von Masse/Ladung [kDa/C] gegen die Intensität [a.u.]. **A** Ladungsverteilung von TetR (grün für das Dimer bzw. blau für das Monomer). **B** Ladungsverteilung der Aptamer-RNA 12-1KΔA (schwarz). **C** Ladungsverteilung der Aptamer-TetR-Mischung (rot für den TetR-Dimer/RNA-Komplex bzw. grün für den TetR-Monomer/RNA-Komplex).

TetR(B) konnte als Dimer mit einer erwarteten Größe von 46 kDa detektiert werden (Abb. 4.7-A links). Unter starker Laserleistung ist TetR auch als Monomer (23 kDa) nachweisbar (Abb. 4.7-A rechts). Die Aptamer-RNA mit einer Länge von 54 Basenpaaren zeigte unter milden und starken Laserintensitäten im Massenspektrogramm eine erwartete Größe von 19 kDa (Abb. 4.7-B). Durch den Überschuss an RNA sind ebenso unspezifische Produkte mit größerer Ladung detektierbar (Abb. 4.7-B rechts). In der Aptamer/TetR-Mischung konnte unter sanften Analysebedingungen ausschließlich der gesättigte Komplex aus TetR-Dimer und gebundener Aptamer-RNA mit einer Größe von etwa 66 kDa (Abb 4.7-C rechts) beobachtet werden. Zudem konnte der Überschuss an ungebundener Aptamer-RNA bei 19 kDa detektiert werden (Abb 4.7-C). Es konnte eine Stöchiometrie von einem TetR-Dimer gebunden an ein RNA-Molekül ermittelt werden.

4.2 Regulation von 5-LO und COX-2 durch miRNAs

4.2.1 Etablierung einer miRNA spezifischen Extraktionsmethode von RNA aus humanen Zellen

Für den Nachweis von miRNAs in humanen Zellen ist es notwendig, dass bei kompletten RNA-Extraktionen aus humanen Zellen eine möglichst hohe Anreicherung an kleinen RNAs (20-40 Nukleotide) erreicht wird. Hierzu wurden bestehende Protokolle der Hot Phenol RNA-Extraktion (Chomczynski and Sacchi, 1987; Kingston et al., 2001; Ribaudo et al., 2001) in einigen Schritten optimiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit RNA-Extraktionspuffer (siehe Kap. 3), gleichen Mengen an 6 M Guanidiniumthiocyanat und auf 65°C erhitzten Phenol sowie 0,1% SDS. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei 65°C inkubiert. Durch Zugabe von gleicher Menge an Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) wurde die wässrige Phase ausgeschüttelt und erneut mit einem Volumen 65°C heißen Phenols versetzt und 5 min bei 65°C inkubiert. Die wässrige Phase wurde zweimal mit gleichem Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) ausgeschüttelt und anschließend mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und fünf Volumen 99,98% Ethanol bei -80°C gefällt. Das Pellet wurde in 40-80 µl DEPC-H₂O aufgenommen und

spektrometrisch quantifiziert. Für die RNA-Extraktion wurden jeweils 3×10^6 Zellen der humanen Zelllinien HeLa, HFF, U937 und Mono-Mac-6 verwendet. Die etablierte Extraktionsmethode wurde mit der Extraktion mit dem miRNeasy-Kit von QIAGEN (Protokoll siehe Herstellerangaben) verglichen. In Tabelle 4.1 sind verschiedene Kriterien aufgeführt.

Tab. 4.1 Vergleich benutzter RNA-Extraktionsmethoden

| Vergleich | Hot Phenol | QIAGEN miRNeasy Kit |
|--------------------------------|--------------|---------------------|
| Zeitaufwand | 45 min - 1 h | 30 min |
| Kosten | 50-100 Euro | 200-300 Euro |
| RNA-Konzentration | 1,5 µg/µl | 0,7 µg/µl |
| Reinheit | hoch | hoch |
| Qualität | hoch | hoch |
| Anreicherung kleiner RNAs | hoch | hoch |
| Detektion durch Northern Blots | sehr gut | gut |

Die Anreicherung kleiner RNAs mit der Hot Phenol-Methode ist direkt vergleichbar mit dem kommerziell erhältlichen Kit. Die Ausbeute an Komplet-RNA ist zudem quantitativ noch effizienter. Außerdem können miRNAs in Northern Blots gleich gut detektiert werden. In Abbildung 4.8 ist die Detektion der miRNA miR-19b aus unterschiedlich extrahierter Komplet-RNA dargestellt.

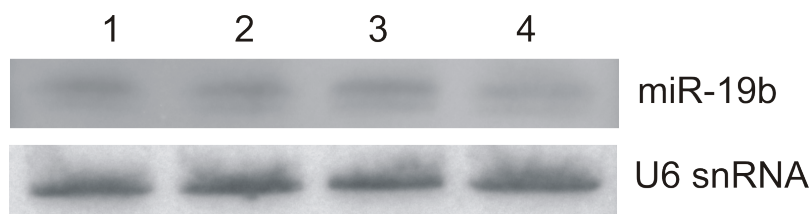


Abb. 4.8 Northern Blot-Analyse verschiedener RNA-Extraktionen. Die miRNA miR-19b wurde über Northern Blot detektiert. Die Extraktion der Komplet-RNA erfolgte über die Hot Phenol-Methode (Spur 1 und 3) und über das QIAGEN miRNeasy Extraktionskit (Spur 2 und 4). Die Qualität und Intensität der Banden ist bei beiden Extraktionsmethoden vergleichbar. Für die Beladungskontrolle wurde die U6 snRNA nachgewiesen.

Der höhere Kosten-Nutzen-Faktor liegt somit in Anbetracht des etwa gleichen Zeitaufwands, aber einer höheren Kostenersparnis auf der Seite der Hot Phenol RNA-Extraktionsmethode.

4.2.2 Identifizierung und Charakterisierung von 5-LO spezifischen miRNAs

4.2.2.1 Expressionsanalyse von miRNAs in verschiedenen Zelllinien durch Microarraytechnik

Verschiedene humane Zelllinien, welche unter verschiedenen Differenzierungsbedingungen ein unterschiedliches 5-LO Expressionsmuster aufweisen, wurden für eine miRNA-Expressionsanalyse mittels Microarraytechnik verwendet. Dazu wurde komplette RNA mit Hilfe der etablierten Hot Phenol-Methode extrahiert und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur einem DNase-Verdau unterzogen. Nach erneuter Fällung mit 5-fachem Volumen an 99,8% Ethanol wurde das Pellet in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen und sowohl quantitativ wie auch qualitativ über Absorptionsspektroskopie bzw. Agarosegelelektrophorese überprüft. Tabelle 4.2 zeigt schematisch die verwendeten Zelllinien.

Tab. 4.2 Untersuchte Zelllinien zur miRNA-Expressionsanalyse

| Zelllinie | 5-Lipoxygenaseaktivität |
|---|--|
| HeLa | negativ |
| U937 | negativ durch methylierten 5-LO Promotor |
| Mono-Mac-6 undifferenziert | Basalexpression der 5-LO |
| Mono-Mac-6 differenziert für 4 Tage mit TGFβ und Calcitriol | 64- bis 128-fach gesteigerte 5-LO Expression auf mRNA- bzw. Proteinebene |
| HFF | negativ |
| HFF infiziert mit CMV | bis zu 500-fach gesteigerte 5-LO Genexpression |

Jeweils 2 µg der extrahierten Komplett-RNA wurde an die Firma DNAVISION versendet und zur Expressionsanalyse aller bekannter humaner und viraler miRNAs mittels Agilent-Chiptechnologie gegeben. Die Qualität der abgegebenen RNA wurde durch DNAVISION überprüft und eine Anreicherung kleiner RNAs festgestellt. Abbildung 4.9 zeigt die Spektrogramme der präparierten RNA.

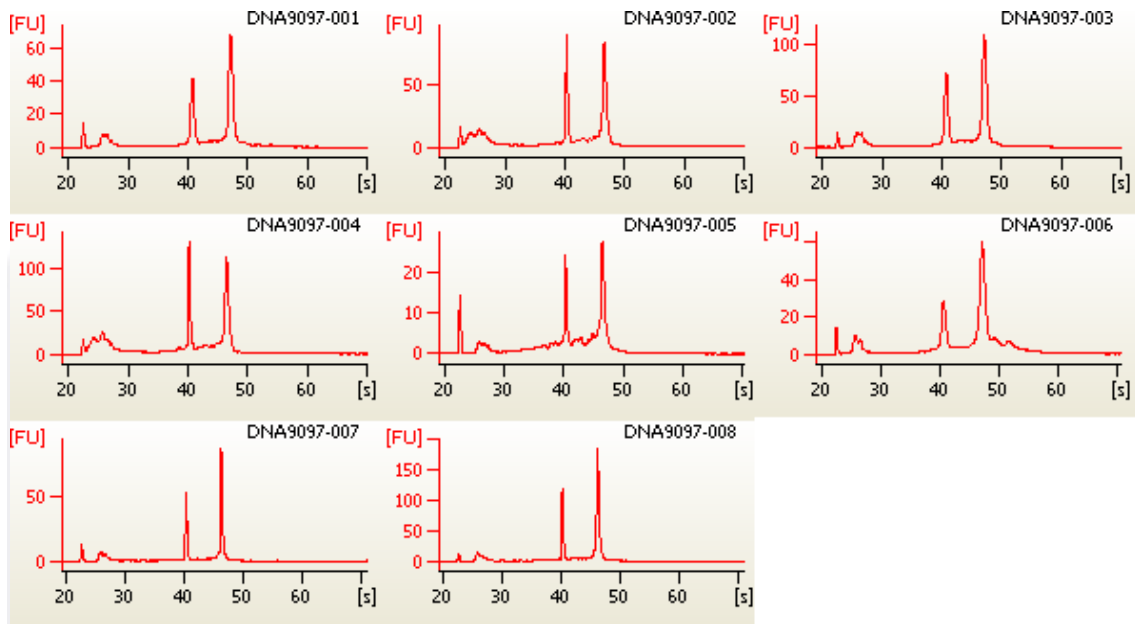
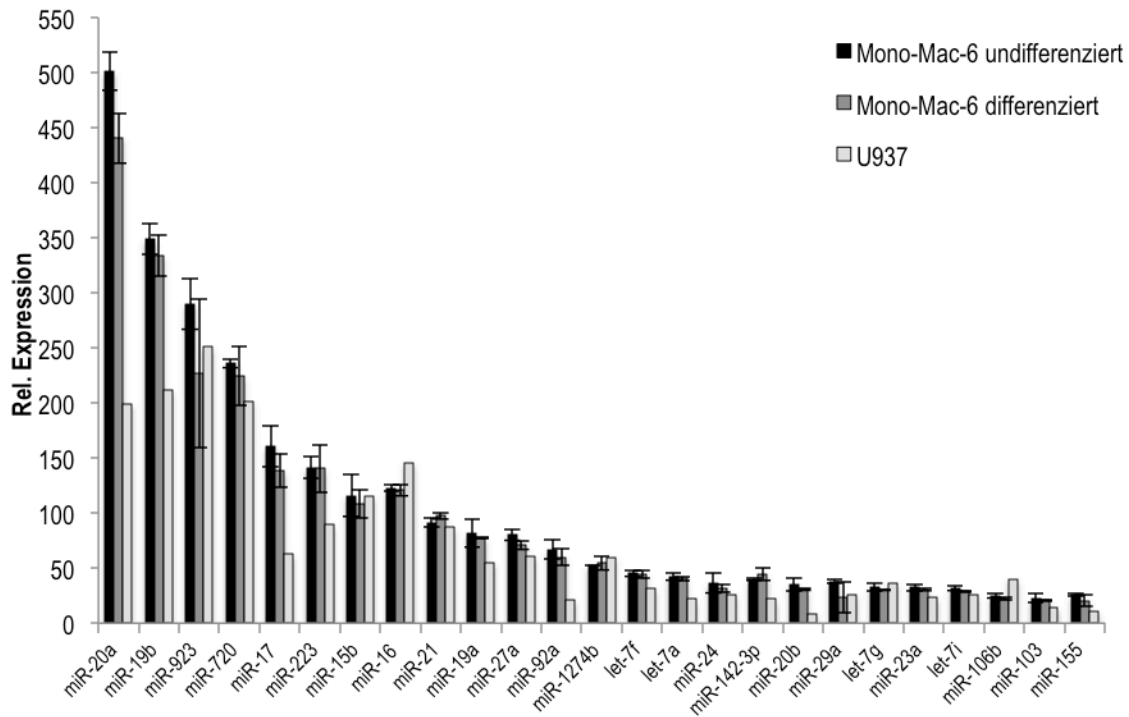


Abb. 4.9 Qualitätsanalyse der untersuchten RNA. Alle Präparationen zeigten bei 25 s einen Peak, der ein Zeichen für die Detektion kleiner RNAs ist. Die Probenbezeichnungen DNA-9097-001 bis DNA-9097-008 wurden von DNAVISION vergeben und repräsentieren die RNA-Extraktionen aus Mono-Mac-6-Zellen (001/002: undifferenziert; 003/004: differenziert), U937- (005), HeLa- (006) und HFF-Zellen (unbehandelt: 007; CMV infiziert: 008)

Die Analyse der Expressionsstärke erfolgte gegen interne positive und negative Kopplungskontrollen, deren Details von DNAVISION jedoch nicht zugänglich waren. Die Expressionsanalyse erfolgte in Duplikaten für undifferenzierte und differenzierte Mono-Mac-6-Zellen. Für die Analyse in U937-, HeLa- und HFF-Zellen wurden Einzelproben verwendet. In der verwendeten Microarraychip-Expressionsanalyse wurden 171 von 600 bekannten humanen miRNAs in den untersuchten Zelllinien identifiziert. Zudem wurden acht virale miRNAs mit erhöhter Expression gefunden. Aus den exprimierten miRNAs wurden solche ausgewählt, die eine gesteigerte Expression in unterschiedlichen Zelltypen aufweisen. Dabei wurde insbesondere auf miRNAs fokussiert, welche ein unterschiedliches Expressionsniveau in differenzierten

bzw. undifferenzierten Mono-Mac-6-Zellen sowie U937-Zellen aufweisen. Außerdem wurden miRNAs betrachtet, welche Expressionsunterschiede in unbehandelten bzw. mit CMV infizierten HFF-Zellen sowie HeLa-Zellen aufweisen. In Abbildung 4.10 sind humane miRNAs dargestellt, welche in der Microarray-Analyse in undifferenzierten und differenzierten Mono-Mac-6-Zellen bzw. in HFF-Zellen ein hohes Expressionsniveau aufweisen.

A



B

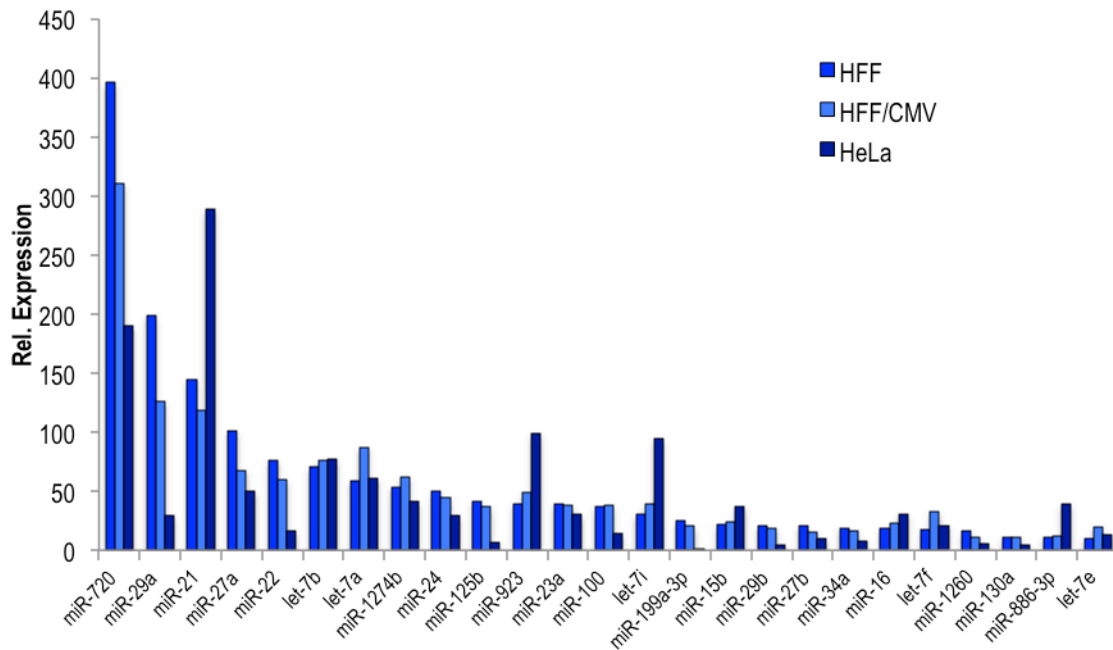


Abb. 4.10 Exprimierte miRNAs in Mono-Mac-6- und U937-Zellen. Von den 171 exprimierten miRNAs sind die 25 mit der höchsten relativen Expression in den untersuchten Zellen dargestellt. Die Expression in Mono-Mac-6-Zellen wurde in Duplikaten untersucht. Alle anderen Zellen wurden in Einzelwerten analysiert. **A** Expressionsanalyse in undifferenzierten (schwarz; mit SEM) und differenzierten (dunkelgrau; mit SEM) Mono-Mac-6-Zellen sowie U937-Zellen (hellgrau). **B** Expressionsanalyse in unbehandelten (mittelblau) und mit CMV infizierten (hellblau) HFF-Zellen sowie HeLa-Zellen (dunkelblau).

4.2.2.2 Bioinformatische Vorhersage von miRNAs im 3'-UTR von 5-LO

Im 3'-UTR der 5-LO wurde mit verschiedenen bioinformatischen Vorhersageprogramme nach möglichen Bindestellen bekannter miRNAs gesucht. Die Algorithmen miRanda, MicroCosm Targets, TargetScan, PicTar, DIANA microT und TarBase waren serverbasiert und konnten alle über das Internet verwendet werden. Eine Übersicht der verwendeten Vorhersageprogramme mit einer kurzen Beschreibung des Algorithmus ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tab. 4.3 Vorhersageprogramme für miRNA Bindestellen

| Name | Methode | Adresse | Referenz |
|----------------------|---|---|--|
| miRanda | Komplementarität ^{a)} | http://microrna.org | John et al., 2004 |
| Microcosm Targets | | http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/ | Enright et al., 2003 |
| TargetScan | Komplementarität ^{b)} der <i>seed</i> -Region | http://www.targetscan.org | Lewis et al., 2005 |
| PicTar | Thermodynamik ^{c)} | http://pictar.mdc-berlin.de | Krek et al., 2005 |
| DIANA microT | Thermodynamik ^{c)} | http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/ | Maragkakis et al., 2009 |
| TarBase | Experimentell validierte Zielgene ^{d)} | http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/ | Sethupathy et al., 2006 Papadopoulos et al., 2009 |

a) Der Algorithmus untersucht die Komplementarität der miRNA/mRNA-Bindung sowie die freie Energie des Duplex. Die Schwellenwerte für mögliche positive Kandidaten wurden auf $S > 90$ und $\Delta G < -17$ kcal/mol festgelegt, wobei S die Summe des Scores der einzelnen Basenpaaren über das gesamte Alignment darstellt und ΔG die freie Energie der Duplexbildung wiedergibt (Griffiths-Jones, 2010; John et al., 2004).

b) TargetScan untersucht genomweit UTR-Bereiche nach komplementären Sequenzen von 6-8 nt, welche im 5'-Bereich der miRNAs (*seed*) liegen. Andere Parameter bleiben dabei unberücksichtigt (Lewis et al., 2005; Lewis et al., 2003).

c) Die Algorithmen analysieren die freie Energie des miRNA/mRNA-Duplex, wobei die *seed*-Region $> 33\%$ der gesamten freien Energie des perfekt komplementären Duplex ausmachen muss. Dabei werden zudem die Kombinationen von Bindestellen sowie die Konservierung unter verschiedenen Spezies in einem Score berücksichtigt (Krek et al., 2005; Maragkakis et al., 2009).

d) TarBase beinhaltet alle veröffentlichten miRNAs, welche als regulatorisch aktiv beschrieben wurden. Dabei sind auch alle untersuchten Ziel-mRNAs aufgelistet, die entweder als positiv (induzierte Genrepression) oder negativ (kein Einfluss auf das Zielgen) getestet wurden (Sethupathy and Collins, 2008).

Die verwendeten Vorhersageprogramme untersuchen *in silico* einerseits die Komplementarität der miRNA/mRNA Bindestellen. Andererseits wird die Konservierung der Bindestellen zwischen verschiedenen Spezies von Vertebraten analysiert. Neben der

Suche nach Bindestellen auf mRNAs erlauben diese Programme auch die Identifikation von möglichen Zielgenen für bekannte miRNAs. Experimentell bereits validierte miRNAs wurden zusätzlich über TarBase bzw. PubMed gesucht.

Der 3'-UTR Bereich von 5-LO wurde mit allen aufgeführten Suchprogrammen nach Bindestellen für bekannte miRNAs untersucht. Zusätzlich wurden für die Auswertung alle miRNAs berücksichtigt, welche in Mono-Mac-6-Zellen ein hohes Expressionsniveau aufwiesen. Die Analyse ist schematisch in Abbildung 4.11 als Venn-Diagramm dargestellt.

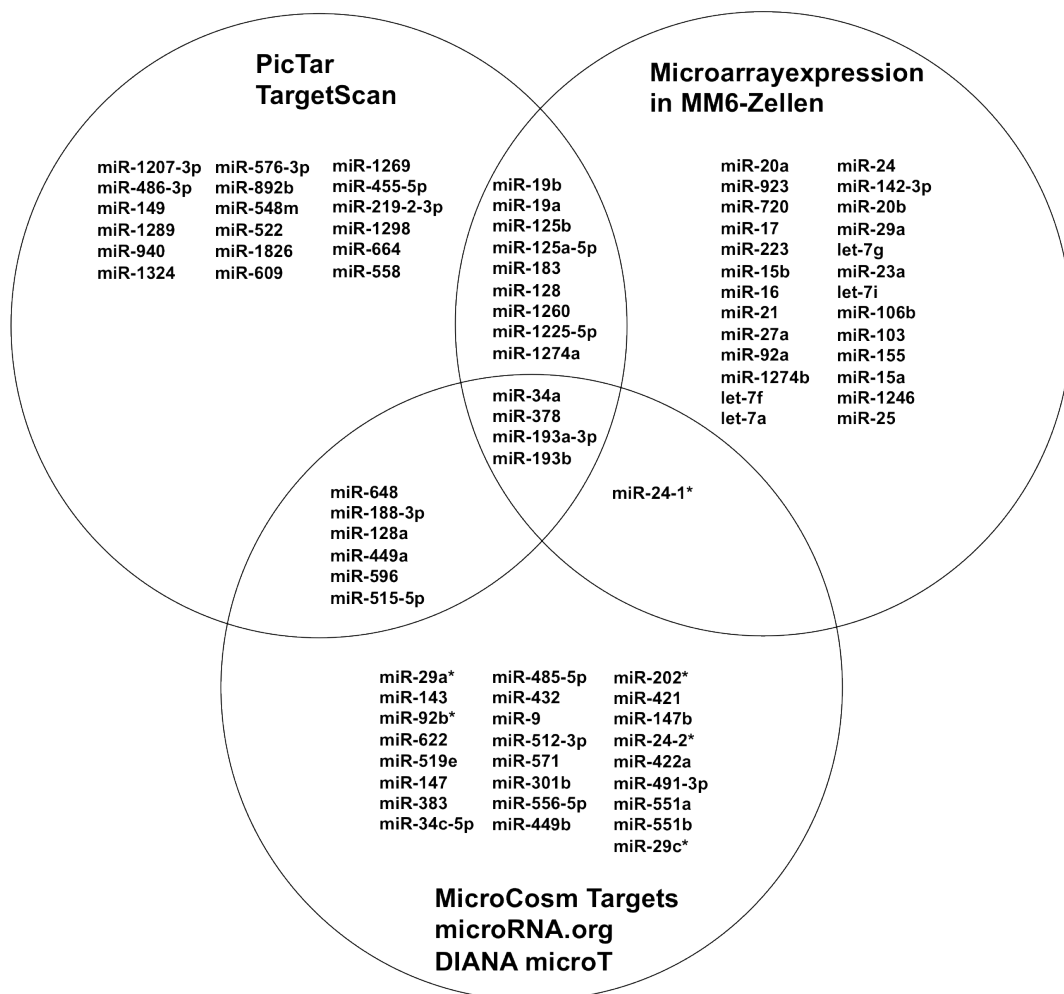


Abb. 4.11 Bioinformatische Vorhersage von miR-Bindestellen für 5-LO. Die Analyse erfolgte mit PicTar, TargetScan (Kreis oben links) sowie MicroCosms Targets, microRNA.org und DIANA microT (Kreis unten). Im Kreis oben rechts sind alle miRNAs aufgelistet, welche im Microarray eine relative Expression > 20 in Mono-Mac-6-Zellen aufweisen konnten. Es konnten keine bereits publizierten miRNAs für 5-LO gefunden werden.

Der 3'-UTR der 5-LO weist eine Länge von 426 Nukleotiden auf und trägt keine konservierte miRNA-Bindestellen in Säugern. Die Algorithmen liefern nur für das menschliche Genom vorhergesagte Bindestellen. Zudem ist bis zum jetzigen Zeitpunkt keine miRNA publiziert, welche direkt an der Regulation der 5-LO beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden für die Analyse miRNAs aus den Microarraydaten miteinbezogen, welche in Mono-Mac-6-Zellen hoch exprimiert sind. Die miR-19a, miR-19b, miR-125a-5p und miR-125b sind im Microarray detektierbar und weisen Bindestellen im 3'-UTR der 5-LO auf. MiR-125a-5p und miR-125b liegen allerdings mit einer relativen Expression von 1 bzw. 0,3 unter der durch Northern Blots validierten und festgelegten Ausschlussgrenze (> 25). In Abbildung 4.12 sind beispielhaft die Bindestellen für miR-19b und miR-125a-5p im 3'-UTR der 5-LO dargestellt.

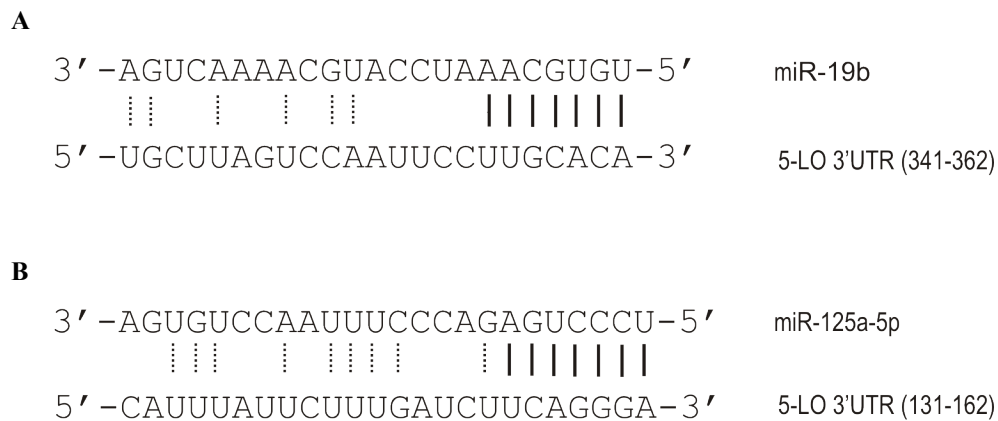


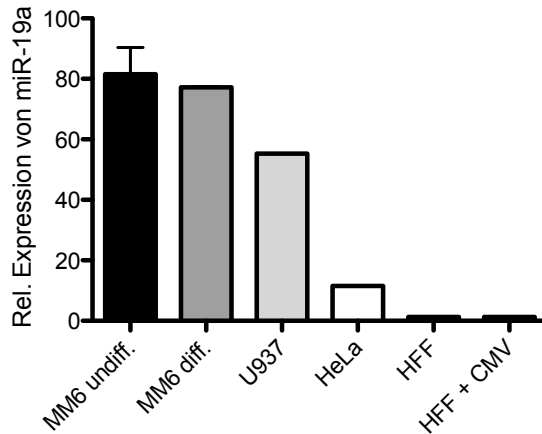
Abb. 4.12 Bindestellen von miR-19b und miR-125a-5p im 5-LO 3'UTR. Alle Watson-Crick-Basenpaarungen der seed-Region des miRNA/mRNA-Duplex sind als schwarze Linien dargestellt. Alle zusätzlichen Basenpaarungen sind als gestrichelte Linie dargestellt. **A** Bindung zwischen miR-19b und der 5-LO mRNA. **B** Bindung zwischen miR-125a-5p und der 5-LO mRNA.

4.2.2.3 Validierung und Expressionsanalyse von 5-LO spezifischen miRNAs

Ausgewählte miRNAs, welche im Microarray ein interessantes Expressionsmuster zeigten, wurden durch Northern Blot überprüft. Des Weiteren sollten miRNAs näher untersucht werden, die bioinformatisch vorhergesagte Bindestellen im 3'-UTR der 5-LO besitzen und ein hohes Expressionsniveau in der Microarrayanalyse aufweisen. Hierfür wurden als Mono-Mac-6 spezifische miRNAs miR-19a und miR-19b ausgewählt. Die

miRNAs unterscheiden sich dabei nur durch einen Nukleotidaustausch und tragen die gleiche Bindestelle im 3'-UTR der 5-LO. MiR-19b weist jedoch im Vergleich zu miR-19a eine etwa vierfach höhere Expression im Microarray auf. Aus diesem Grund wurde für eine weitere Analyse nur miR-19b herangezogen. In Abbildung 4.13 sind die relativen Expressionswerte von miR-19a und miR-19b im Microarray dargestellt.

A



B

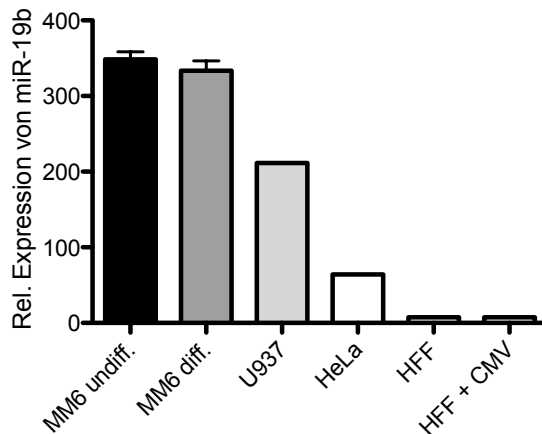


Abb. 4.13 Relative Expression von miR-19a und miR-19b. Angegeben sind die Expressionswerte in verschiedenen Zellen aus der Microarrayanalyse. Als schwarze bzw. dunkelgraue Balken ist die miRNA-Expression in undifferenzierten bzw. differenzierten Mono-Mac-6 Zellen als Duplikat mit Standardfehlerabweichung dargestellt. Als weiße Balken sind die Expressionswerte von HeLa-Zellen sowie von unstimulierten bzw. mit CMV stimulierten HFF-Zellen angegeben. **A** Relative Expressionswerte von miR-19a in der Microarrayanalyse. **B** Relative Expressionswerte von miR-19b in der Microarrayanalyse.

In Mono-Mac-6-Zellen konnte nur miR-19b durch Northern Blots detektiert werden. In Abbildung 4.14 ist die Expression von miR-19b jeweils in einer Zeitreihe von 12 Stunden bis vier Tage in undifferenzierten und mit TGF β und Calcitriol differenzierten Mono-Mac-6-Zellen dargestellt.

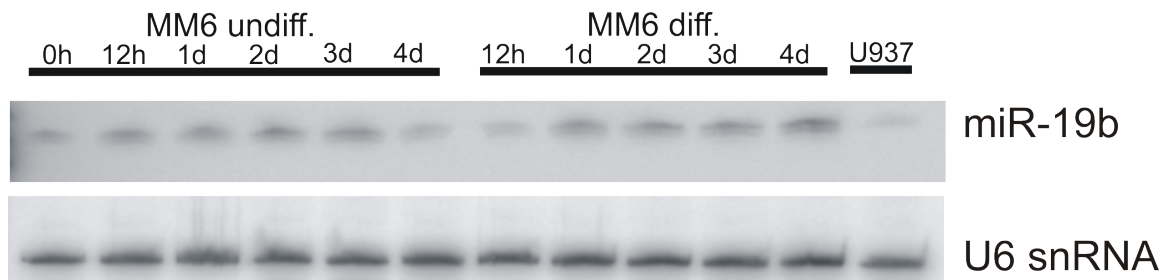


Abb. 4.14 Expressionsanalyse von miR-19b durch Northern Blots. Die Detektion von miR-19b erfolgte in undifferenzierten bzw. mit TGF β und Calcitriol differenzierten Mono-Mac-6-Zellen (MM6) sowie U937-Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d und 4 d. Als Kontrolle wurde die U6 snRNA detektiert.

Die Expression von miR-19b wurde in vier unabhängigen Northern Blots analysiert. Die Northern Blots waren jedoch nicht direkt vergleichbar und die Ergebnisse nur teilweise reproduzierbar. MiR-19b konnte im Northern Blot in allen untersuchten Proben detektiert werden. Die Expressionsstärke ist in undifferenzierten und differenzierten Mono-Mac-6-Zellen höher als in U937-Zellen. Diese Beobachtung korreliert tendenziell mit den Ergebnissen aus der Microarrayanalyse. Das Signal der miR-19b scheint nach 4 d in undifferenzierten Mono-Mac-6-Zellen abzunehmen. Außerdem kann ebenso nach 12 h Differenzierung ein schwächeres Signal vermutet werden. Die Expression zu den anderen betrachteten Zeitpunkten scheint auf etwa gleichem Niveau zu bleiben. Eine Quantifizierung der Expressionsunterschiede war aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit nicht möglich.

Neben miR-19b sollten weitere miRNAs, welche sowohl bioinformatisch vorhergesagte Bindestellen im 3'-UTR der 5-LO besitzen und im Microarray detektierbar waren (siehe Kap. 4.2.2.1), über Northern Blots nachgewiesen werden. Hierfür wurden miR-125a-5p, miR-125b, miR-128 und miR-34a ausgewählt. In Abbildung 4.15 sind die Expressionsunterschiede der ausgewählten miRNAs in der Microarrayanalyse dargestellt.

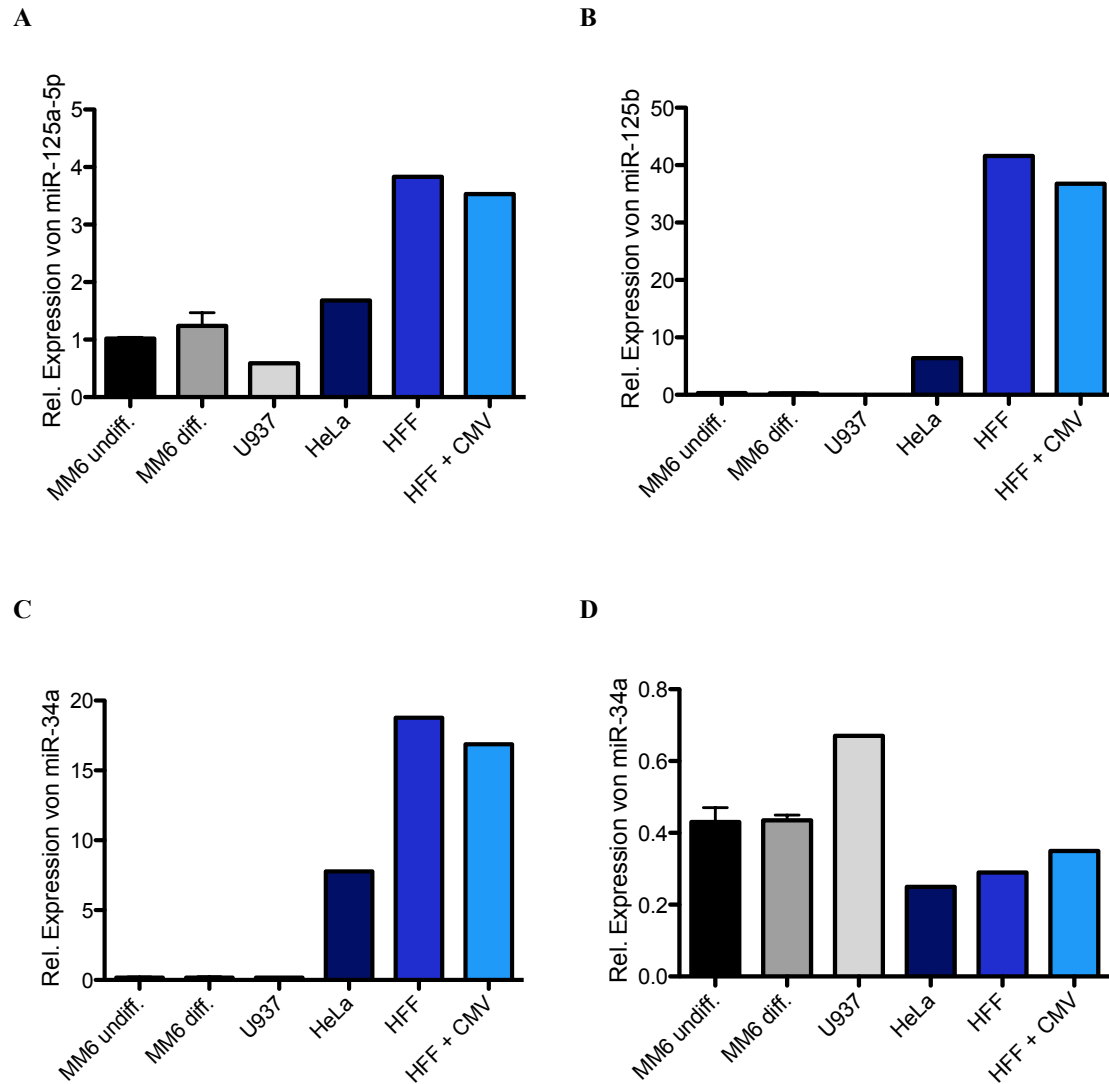


Abb. 4.15 Relative Expression von miR-125a-5p, miR-125b, miR-34a und miR-128 im Microarray. Als schwarze bzw. dunkelgraue Balken sind die miRNA-Expressionswerte in undifferenzierten bzw. differenzierten Mono-Mac-6 Zellen als Duplikat mit Standardfehlerabweichung dargestellt. Als dunkelblaue Balken sind die Expressionswerte von HeLa-Zellen dargestellt. Als hellblaue Balken sind die Expressionswerte in unstimulierten bzw. mit CMV stimulierten HFF-Zellen zu sehen. **A** Relative Expression von miR-125a-5p. **B** Relative Expression von miR-125b. **C** Relative Expression von miR-34a. **D** Relative Expression von miR-128.

Bei der Expressionsanalyse über Northern Blots konnte festgestellt werden, dass eine relative Expression von 25 in der Microarrayanalyse die Nachweisgrenze darstellt. Lediglich miR-125b konnte in HFF- und in HeLa-Zellen über Northern Blots detektiert werden. In Abbildung 4.16 ist miR-125b im Northern Blot zu sehen.

Ergebnisse

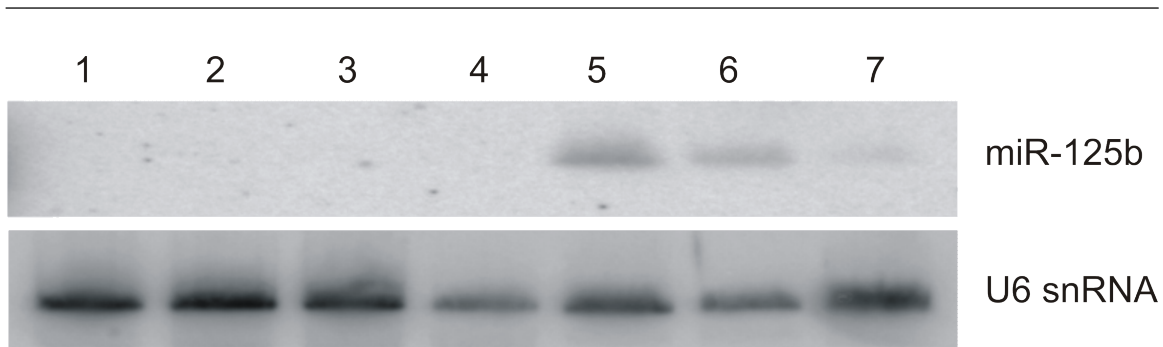


Abb. 4.16 Nachweis von miR-125b mit Northern Blots. Die miRNA miR-125b kann nur in reifen und CMV-infizierten HFF-Zellen sowie in HeLa-Zellen detektiert werden. **1** Mono-Mac-6-Zellen 1 d undifferenziert. **2** Mono-Mac-6-Zellen 3 d undifferenziert. **3** Mono-Mac-6-Zellen 1 d differenziert. **4** Mono-Mac-6-Zellen 3 d differenziert. **5** HFF-Zellen unbehandelt. **6** HFF-Zellen CMV-infiziert. **7** HeLa-Zellen.

4.2.2.4 Zeit- und differenzierungsabhängige Expression von miRNAs in Mono-Mac-6-Zellen

Zur Analyse möglicher Unterschiede im Expressionsniveau von miR-19b wurden quantitative RT-PCR Experimente durchgeführt. Hierfür wurden für die reverse Transkription spezifische Oligonukleotide verwendet, die sechs Basenpaare am 3'-Ende der miRNA binden und zudem in einer Stammschleife eine Bindestelle für ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid tragen. Für die quantitative PCR-Reaktion wurde neben einem universalen Oligonukleotid ein spezifisches Oligonukleotid verwendet, das vom 5'-Ende die miRNA-spezifische Sequenz amplifiziert. In den Microarrayanalysen ist die miRNA miR-19b, welche eine vorhergesagte Bindestelle im 3'-UTR der 5-LO besitzt, in Mono-Mac-6-Zellen hoch exprimiert. Die miRNA-19b zeigt ein unterschiedliches Expressionsniveau in undifferenzierten und differenzierten Zellen. Außerdem konnte die Expression von miR-19b durch Northern Blots (Kap. 4.2.1) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung nachgewiesen werden.

Zur Analyse einer möglichen zeitabhängigen Expression von miR-19b in undifferenzierten und mit TGF β und Calcitriol differenzierten Mono-Mac-6-Zellen wurde Komplet-RNA nach den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d und 4 d extrahiert und einem DNase-Verdau unterzogen. Zudem wurde Komplet-RNA von U937-Zellen extrahiert und ebenfalls mit DNase behandelt. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und für die quantitative PCR-Reaktion verwendet. Abbildung 4.17 zeigt die relative Expression von miR-19b in Mono-Mac-6-Zellen.

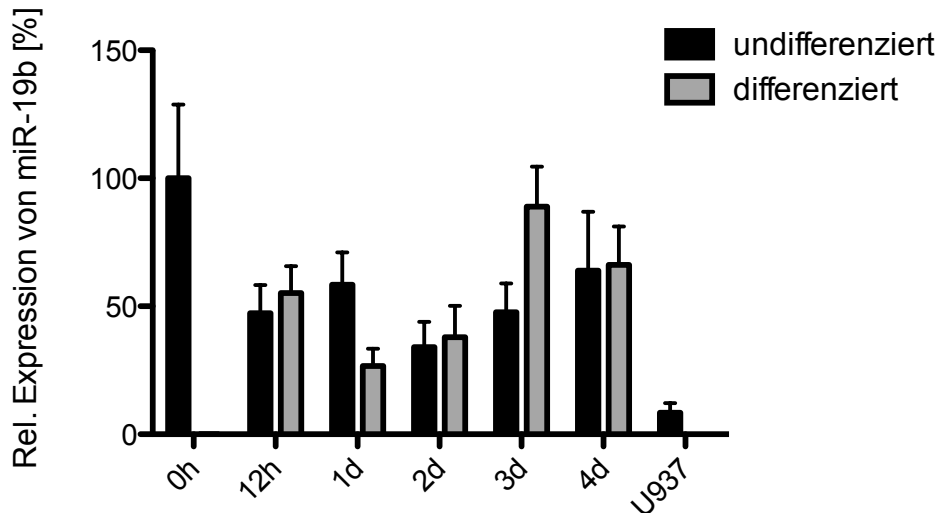


Abb. 4.17 Zeitabhängige Expression von miR-19b in Mono-Mac-6-Zellen. Die Expression von miR-19b wurde in undifferenzierten und differenzierten Mono-Mac-6-Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d und 4 d analysiert. Die relative Expression wurde gegen den Expressionswert zum Zeitpunkt 0h normalisiert. Die schwarzen Balken stellen die Expression von miR-19b in undifferenzierten Zellen dar. Die grauen Balken stellen die Expression von miR-19b nach Differenzierung mit TGF β und Calcitriol dar.

Die Expression von miR-19b zeigt unter den beobachteten Zeit- und Differenzierungsbedingungen keine Unterschiede. Sowohl in undifferenzierten Mono-Mac-6-Zellen wie auch nach Differenzierung mit TGF β und Calcitriol nimmt die Expression der miRNA nach Tag 1 ab und steigt bis zum Tag 4 wieder an. Lediglich nach drei Tagen kann ein leichter Anstieg der Expression von miR-19b in differenzierten Zellen beobachtet werden. Die als Kontrolle mitgeführten U937-Zellen zeigen eine basale Expression von miR-19b.

Die gewählten Zeitbedingungen wurden für weitere Expressionsanalysen von miR-19b so verändert, dass mögliche Änderungen vor und nach der Differenzierung beobachtet werden können. Dafür wurde zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h, 6 h, 12 h und 24 h von unbehandelten und mit TGF β und Calcitriol differenzierten Mono-Mac-6-Zellen Komplet-RNA isoliert und mit DNase behandelt. In Abbildung 4.18 ist die relative Expression von miR-19b durch qRT-PCR-Analysen dargestellt.

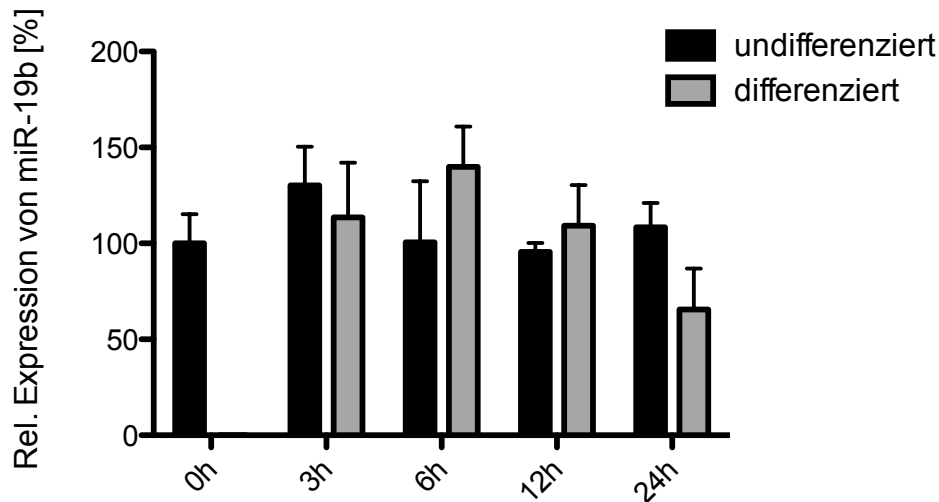


Abb. 4.18 Zeitabhängige Expression von miR-19b in Mono-Mac-6-Zellen. Die relative Expression von miR-19b wurde in undifferenzierten und differenzierten Mono-Mac-6-Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h, 6 h, 12 h und 24 h analysiert. Die relative Expression wurde gegen den Expressionswert zum Zeitpunkt 0 h normalisiert. Die schwarzen Balken stellen die Expression von miR-19b in undifferenzierten Zellen dar. Die grauen Balken stellen die Expression von miR-19b nach Differenzierung mit TGF β und Calcitriol dar. Die Quantifizierung erfolgte aus drei unabhängigen Messungen.

Die Expression von miR-19b im beobachteten Zeitfenster von 0 h bis 24 h unterscheidet sich nur geringfügig in undifferenzierten und differenzierten Mono-Mac-6-Zellen. Die Expression nimmt, wie bereits in der Zeitreihe von 0 h bis 4 d gezeigt werden konnte, innerhalb von 24 h ab. Nach 6 h kann ein leichter Anstieg von miR-19b in differenzierten Mono-Mac-6-Zellen beobachtet werden.

Aus den gezeigten Ergebnissen konnte keine miRNAs identifiziert werden, welche an der Regulation von 5-LO beteiligt sind. Die vorhandenen bioinformatischen Analysen und die Daten aus der Microarrayexpressionsanalyse kann als Grundlage für weitere Arbeiten benutzt werden.

4.2.3 Untersuchungen von COX-2 spezifischen miRNAs in HT-29-Zellen

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass COX-2 in Colonkarzinom spezifischen Zellen überexprimiert ist (Wu et al., 2010). Dixon und Mitarbeiter konnten zeigen, dass es unter inflammatorischen Bedingungen in Monozyten im direkten Zell-Zell-Kontakt mit aktivierten Thrombozyten zu einem raschen Expressionsanstieg von IL-1 β kommt. Unter diesen Bedingungen findet eine gesteigerte Expression verschiedener Wachstumsfaktoren

und Cytokine statt. Die mRNA von COX-2 wird dabei durch das RNA-bindende Protein HuR stabilisiert (Dixon et al., 2006).

Dieses System konnte von Melania Dovizio auf Colonkarzinom spezifische HT-29-Zellen übertragen werden. Werden HT-29-Zellen mit Thrombozyten co-kultiviert, kann ein signifikanter Anstieg der COX-2-Expression festgestellt werden. Das COX-2 Expressionsniveau steigt ebenso an, wenn HT-29-Zellen entweder mit löslichen Bestandteilen oder soliden Micropartikeln stimuliert werden. Werden HT-29-Zellen mit rekombinantem PDGF-BB stimuliert, so steigt das COX-2 Proteinlevel ebenfalls signifikant an (Melania Dovizio, persönlicher Kommentar).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang der Zell-Zell-Interaktion mit der Expression von COX-2 spezifischen miRNAs besteht. Dabei sollte der Einfluss der Thrombozyten spezifischen Micropartikel und PDGF auf die miRNA-Expression in HT-29-Zellen untersucht werden.

4.2.3.1 Bioinformatische Suche von miRNA-Bindestellen im COX-2 3'-UTR

Der 3'-UTR der COX-2 mRNA wurde mit den oben beschriebenen Algorithmen (siehe 4.2.2.2) nach putativen Bindestellen für bekannte miRNAs untersucht. Zusätzlich wurden bereits publizierte miRNAs mit in die Analyse einbezogen. Die miR-16 (Shanmugam et al., 2008; Shin et al., 2011), miR-101 (Hao et al., 2011; Strillacci et al., 2009), mir-199a* (Chakrabarty et al., 2007; Daikoku et al., 2008) und miR-26 (Ji et al., 2010) konnten bereits als regulatorische miRNAs im Kontext von COX-2 in verschiedenen Zellmodellen beschrieben werden. In Abbildung 4.19 ist die Analyse der miRNA-Bindestellen als Venn-Diagramm dargestellt.

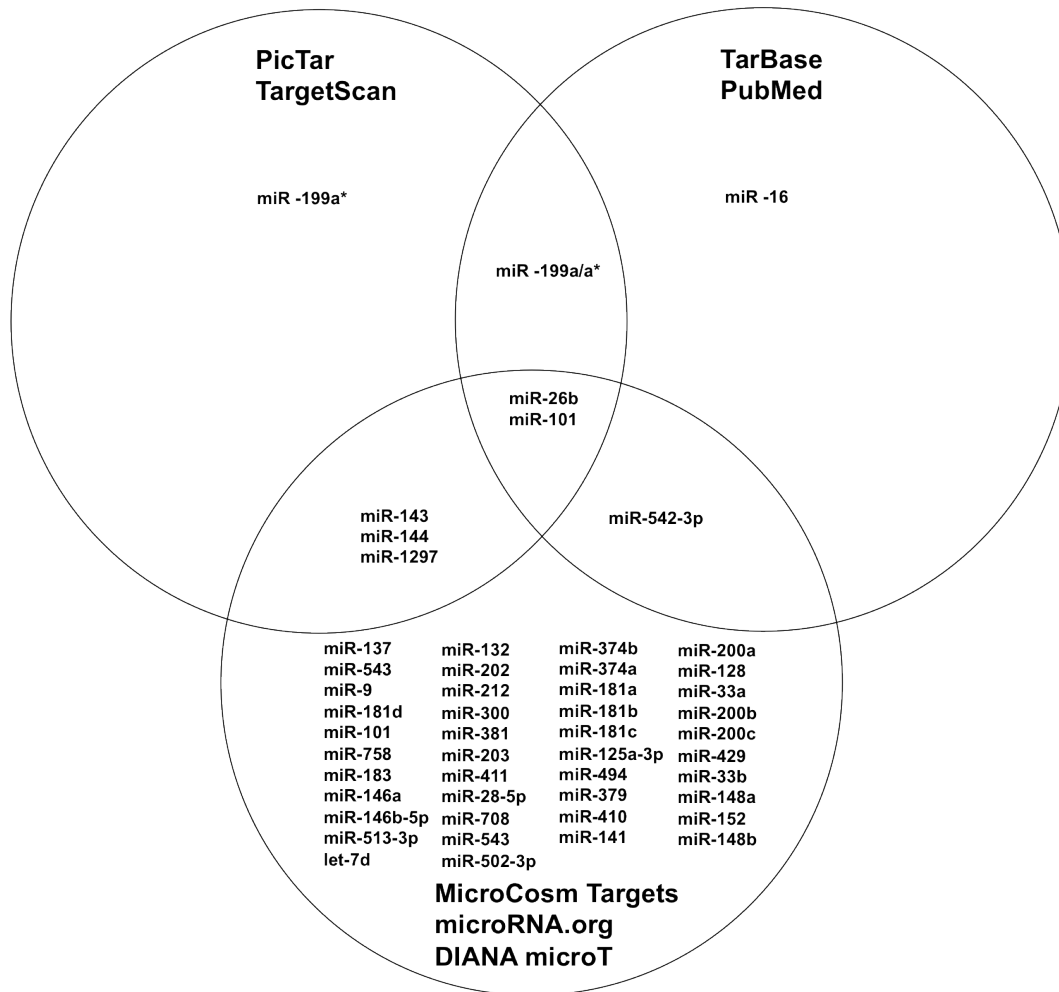


Abb. 4.19 Bioinformatische Vorhersage von miR-Bindestellen für COX-2. Die Analyse erfolgte mit PicTar, TargetScan (Kreis oben links) sowie Microcosms Targets, microRNA.org und DIANA microT (Kreis unten). Im Kreis oben rechts sind alle miRNAs aufgelistet, welche bereits experimentell validiert und publiziert wurden.

Mit den bioinformatischen Algorithmen konnten nur wenige überlappende miRNAs identifiziert werden. Für die weiteren Studien wurden die bereits publizierten miR-16, miR-101, miR-199a, miR-199a*, miR-26b (gleiche Bindestelle wie miR-1297) sowie miR-143 (gleiche Bindestelle wie miR-144) für die Expressionsanalyse in HT-29-Zellen ausgewählt.

4.2.3.2 Stabilitätsanalyse des 3'-UTR der COX-2 mRNA

Für die COX-2 mRNA wurde *in silico* die Stabilität des 3'-UTR-Bereichs mit einer Länge von 2513 Nukleotiden bioinformatisch untersucht. Dabei wurde das in Perl verfasste Programm SignificanceScoreAssignment (Florian Groher, Diplomarbeit 2011) verwendet. Das Programm basiert auf einer Publikation von Lee und Mitarbeitern (Lee et al., 2010). Dabei wurde untersucht, welche Sequenzen in 3'-untranslatierten Bereichen häufiger in stabilen und welche häufiger in instabilen mRNAs zu finden sind. Der 3'-UTR von COX-2 wurde in Hexamersequenzen zerlegt und anhand der Verteilungsmatrix ein Score zugewiesen. Eine schematische Stabilitätsverteilung im 3'-UTR der COX-2 ist in Abbildung 4.20 dargestellt.

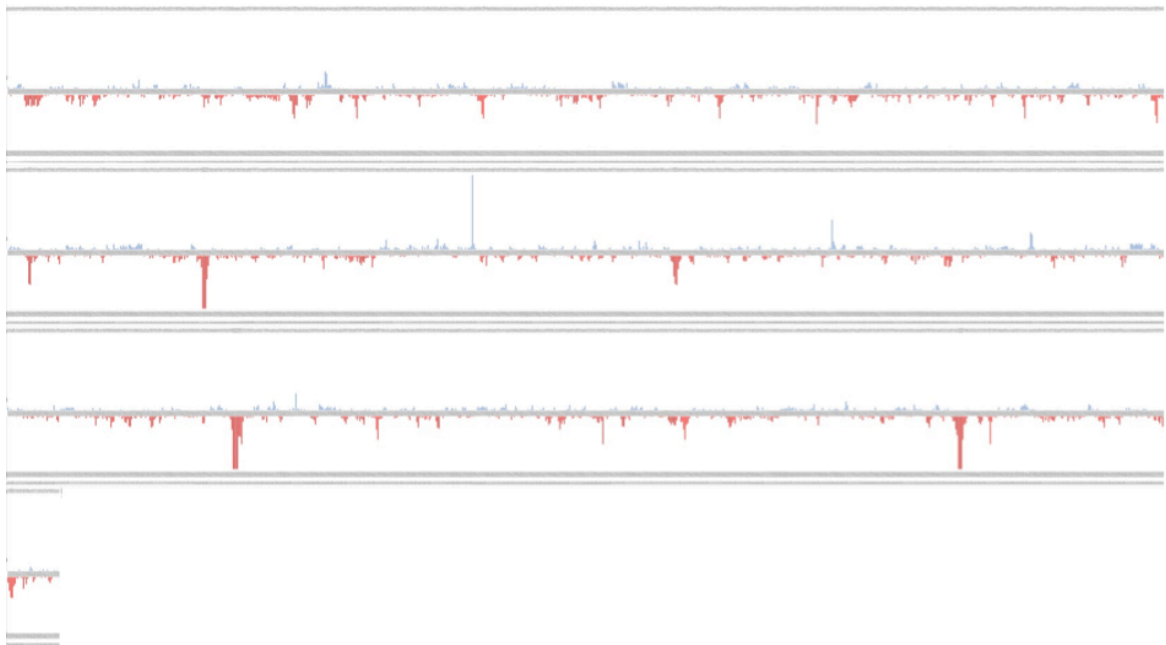


Abb. 4.20 Stabilitätsverteilung im 3'-UTR der COX-2 mRNA. Jedes Nukleotid wird durch einen Balken dargestellt. Die roten Balken stellen destabilisierende Bereiche dar. Stabilisierende Regionen sind als blaue Balken zu erkennen. Die Höhe der Balken repräsentiert dabei die Stärke des stabilisierenden bzw. destabilisierenden Effekts.

Die Auswertung des 3'-UTR Bereichs der COX-2 mit Hilfe des Programms SignificanceScoreAssignment ergab eine Anhäufung von destabilisierenden Elementen. Etwa 80% der untersuchten Hexamere des 3'-UTR Bereichs der COX-2 weisen einen negativen Score auf und wirken destabilisierend auf die COX-2 mRNA.

Nur wenige Hexamersequenzen konnten als stabilisierende Elemente ermittelt werden. Die Gesamtbetrachtung des 3'-UTR-Bereich der COX-2 ergab einen berechneten Score von -1430. Die vorhergesagte Bindestelle für miR-199a* liegt beispielsweise zwischen den Nukleotiden 1877 und 1899, welcher einen berechneten Score von +5,9 aufweist und demzufolge stabilisierend wirkt. Man kann daher eine Stabilitätskontrolle dieses Bereichs durch die miRNA vermuten. Alle anderen ausgewählten miRNAs, welche bioinformatisch vorhergesagten Bindestellen besitzen, liegen in Bereichen mit einem geringen negativen Score. Die Bindung der miRNAs in diesen Bereichen würde eine zusätzliche Destabilisierung des 3'-UTR-Bereichs bedeuten.

4.2.3.3 Expressionsanalyse von miRNAs in Thrombozyten co-kultivierten HT-29-Zellen

Die COX-2 spezifischen miRNAs, welche durch bioinformatische Vorhersage und Literatursuche ausgewählt wurden, sollten über Northern Blots nachgewiesen werden. Dafür wurde die Komplet-RNA von HT-29 Zellen extrahiert und analysiert, welche mit aktivierten Thrombozyten co-kultiviert wurden (Melania Dovizio, Universität Chieti). In Abbildung 4.21 sind alle über Northern Blots nachweisbaren miRNAs dargestellt. Als Kontrolle wurde entweder die U6 snRNA oder die ribosomale 5S rRNA verwendet.

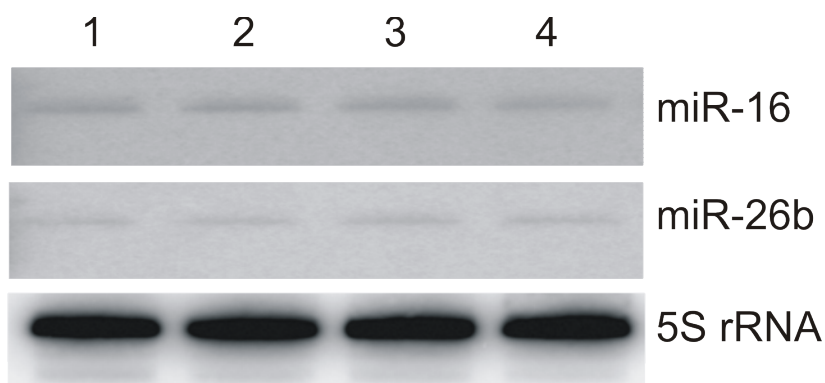


Abb. 4.21 Expressionsanalyse von miRNAs durch Northern Blot. Die reifen miRNAs miR-16 und miR-26b konnten mit radioaktiv markierten komplementären DNA-Oligonukleotiden in unbehandelten (Spur 1 und 3) und mit Thrombozyten co-kultivierten HT-29 Zellen (Spur 2 und 4) detektiert werden. Als Beladungskontrolle wurde ein Sequenzausschnitt der ribosomalen 5S rRNA durch eine markierte DNA-Sonde nachgewiesen.

Die Intensitäten der miRNA-spezifischen Banden sind in unbehandelten und co-kultivierten Zellen nahezu identisch. Expressionsunterschiede für miR-16 und miR-26b konnten mit Northern Blots nicht nachgewiesen werden. MiR-101, miR-199a*, miR-542-3p und miR-143 konnten nicht mit Northern Blots detektiert werden. Zudem wurde vermutet, dass durch die Co-Kultur mit Thrombozyten und die anschließende RNA-Extraktion gleichzeitig miRNAs nachgewiesen werden, welche ursprünglich von Thrombozyten exprimiert werden.

4.2.3.4 Nachweis von miRNAs aus Thrombozyten-Mikropartikeln

In Northern Blot-Experimenten konnte kein Unterschied in der miRNA-Expression zwischen unbehandelten und mit Thrombozyten co-kultivierten HT-29 Zellen festgestellt werden. Aus Publikationen ist bekannt, dass ein Expressionssignalweg für miRNAs in Thrombozyten vorhanden ist (Landry et al., 2009). Es sollte deshalb durch qRT-PCR-Experimente überprüft werden, ob verschiedene miRNAs in Mikropartikeln, welche als unlösliche Bestandteile in Thrombozyten mikroskopisch nachweisbar sind, detektiert werden können.

Dafür wurden Thrombozyten aus Vollblutkonserven (siehe Kap. 3) isoliert und in 10 ml McCoy's 5A Medium mit 0,5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin 5×10^8 Zellen/ml in Zellkulturschalen ausgesät und 20 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 5 mM CaCl₂ und 10 µM Ca²⁺-Ionophore stimuliert, um eine Thrombozytenaktivierung zu gewährleisten. Das Medium wurde abgenommen und bei 800 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, um den Überstand von den Zellen zu trennen. Der Überstand wurde anschließend bei 4°C für 90 min bei 150000 x g ultrazentrifugiert. Ein sichtbares Pellet wurde vom Überstand getrennt und einer RNA-Extraktion unterzogen. Die erhaltene RNA wurde quantifiziert und mit miRNA spezifischen Oligonukleotiden in cDNA revers transkribiert. Die cDNA wurde für quantitative PCR-Analysen verwendet. Abbildung 4.22 zeigt die Expression verschiedener miRNAs in Thrombozyten.

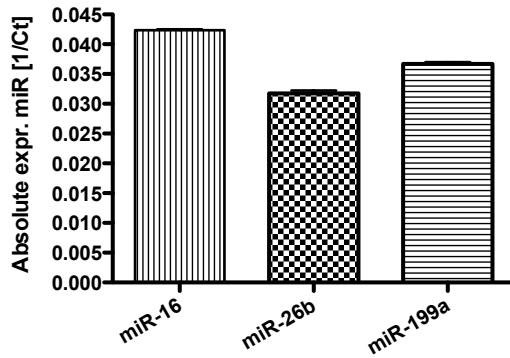


Abb. 4.22 miRNA-Expression in Thrombozyten-Mikropartikeln. Die Expressionsstärke der miRNAs miR-16, miR-26b und miR-199a ist als 1/Ct-Wert der quantitativen PCR-Reaktion angegeben.

Die untersuchten miRNAs miR-16, miR-26b und miR-199a konnten alle in der aus Mikropartikeln extrahierten RNA nachgewiesen werden. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Expressionskontrolle gefunden werden, da Thrombozyten durch das Fehlen eines Zellkerns weder kleine nukleoläre RNA (wie die U48 snRNA) noch RNA des Spleißapparates (wie die U6 snRNA) besitzen. Ebenso ist die in Northern Blot Experimenten verwendete ribosomale 5S RNA kaum nachweisbar und deswegen nicht geeignet. Deswegen ist hier die Expression der untersuchten miRNAs als reziproker Ct-Wert der quantitativen PCR-Reaktion angegeben, welcher die absolute Expression darstellt.

4.2.3.5 PDGF-BB stimulierte Expression von miRNAs in HT-29-Zellen

Aus Vorarbeiten von Melania Dovizio war bekannt, dass die Proteinexpression der COX-2 mit steigenden Konzentrationen an PDGF-BB signifikant ansteigt (Melania Dovizio, persönlicher Kommentar). Die Expression der COX-2 spezifischen miRNAs miR-16, miR-26b und miR-199a sowie miR-199a* wurde in Abhängigkeit einer Behandlung mit steigenden Mengen rekombinanten PDGF-BB untersucht.

Dafür wurden HT-29 Zellen in einer Zellzahl von 4×10^6 Zellen/ml in Zellkulturschalen ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und jeweils 10 ml McCoy's 5A mit 0,5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin mit 0, 1, 3 und 5 ng/ml PDGF-BB im Endvolumen auf die Zellen gegeben und für weitere 20 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde die Zellen geerntet und komplette RNA

extrahiert. Die RNA wurde mittels miRNA-spezifischer Oligonukleotide revers in cDNA transkribiert und anschließend für quantitative PCR-Experimente verwendet. In Abbildung 4.23 sind die relativen Expressionswerte der untersuchten miRNAs in unbehandelten und mit PDGF-stimulierten HT-29 dargestellt.

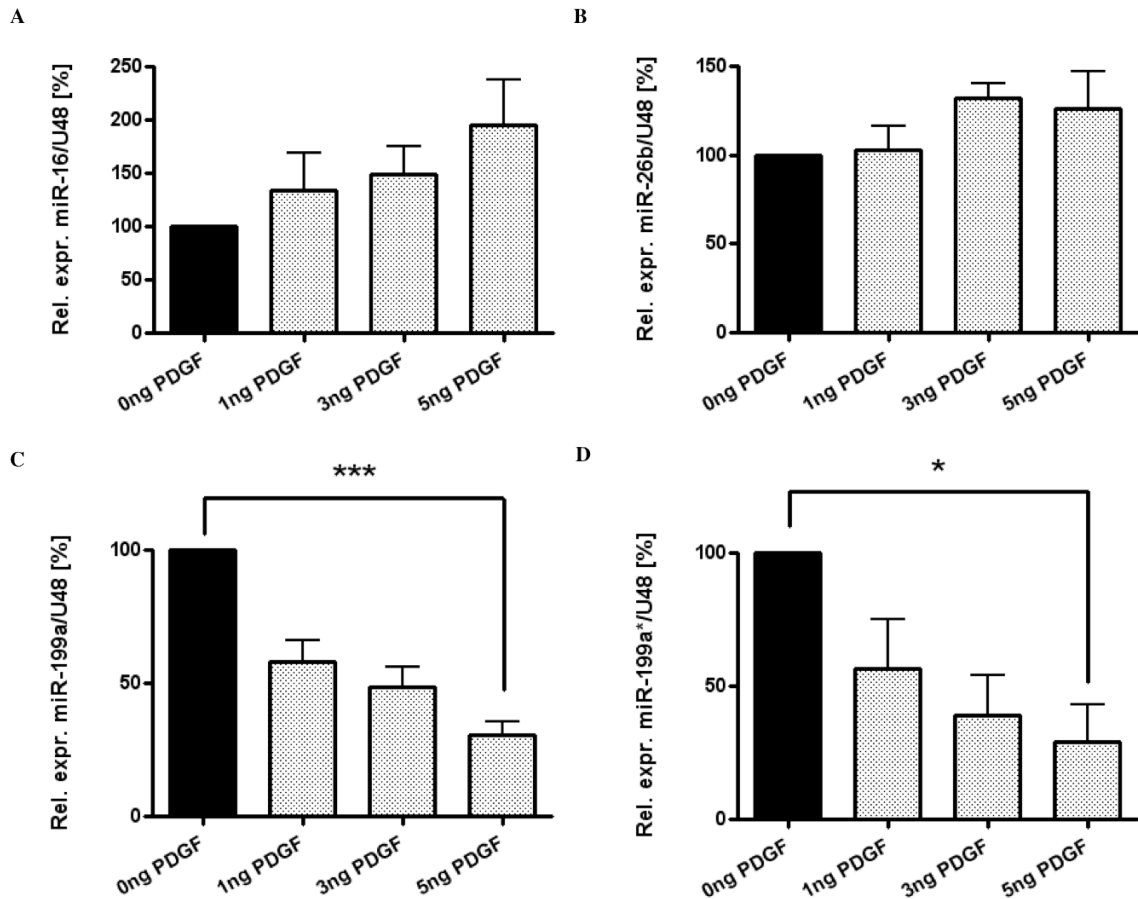


Abb. 4.23 Expressionsanalyse von miRNAs in HT-29-Zellen durch qRT-PCR. Die Expressionsstärke ist als relatives Verhältnis von miRNA zu U48 snRNA angegeben. Die Expressionsstärke der miRNAs in unbehandelten HT-29 Zellen sind als schwarze Balken dargestellt. Die Expression in PDGF-behandelten Zellen wurden normalisiert gegen unbehandelte Zellen und sind als hellgraue Balken dargestellt. **A** Relative Expressionsstärke von miR-16. **B** Relative Expressionsstärke von miR-26b. **C** Relative Expressionsstärke von miR-199a. **D** Relative Expressionsstärke von miR-199a*.

Die miR-16 und miR-26b zeigten bei steigenden Konzentrationen an PDGF-BB eine erhöhtes Expressionsniveau im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der Anstieg der Expression konnte mit Hilfe des t-Tests als nicht signifikant beurteilt werden. Bei miR-199a und miR-199a*, welche beide von der Vorläufer-miRNA pre-miR-199a abstammen, konnte bei steigenden Konzentrationen PDGF-BB ein signifikant abnehmendes

Expressionsniveau beobachtet werden. Die Signifikanz für miR-199a ($p < 0,001$) und miR-199a* ($p < 0,05$) wurde mit Hilfe von Graphpad Prism und dem t-Test ermittelt.

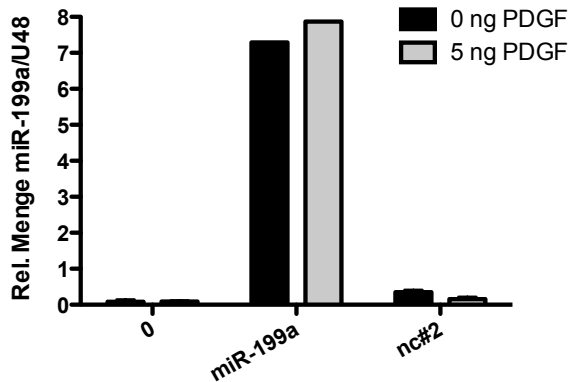
4.2.3.6 Expressionsanalyse von miR-199a und miR-199a* in HT-29-Zellen

Durch qRT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass die miRNAs miR-199a und miR-199a* in HT-29-Zellen nachweisbar sind. Die Expression beider miRNAs nimmt zudem bei Stimulation mit rekombinantem PDGF-BB signifikant ab. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass miR-199a bzw. miR-199a* direkt COX-2 regulieren können. PDGF induziert dabei den Expressionsanstieg von COX-2 durch die Repression der miRNAs. Es sollte durch eine transiente Überexpression der miRNAs überprüft werden, ob COX-2 dadurch reguliert wird. Zudem sollte in Reportergerneismessungen die Regulation der COX-2 Stabilität durch miR-199a* analysiert werden.

4.2.3.6.1 Transfektion von HT-29 Zellen

HT-29 Zellen wurden mit den synthetisch hergestellten reifen miRNAs miR-199a bzw. miR-199a* (miR-Mimics, Sigma-Aldrich) durch Lipofektion transfiziert, um eine endogene Überexpression von miR-199a und miR-199a* in HT-29-Zellen zu erreichen. Dafür wurden in 24-well-Platten jeweils 2×10^5 Zellen/ml pro Vertiefung ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und jeweils 25 µM miR-199a bzw. miR-199a* nach Transfektionsprotokoll mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert. Die Zellen wurden für weitere 20 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen durch Behandlung mit Trypsin-EDTA geerntet. Aus den Zellen wurde Komplett-RNA extrahiert und spektrometrisch quantifiziert. Die RNA wurde mit spezifischen Oligonukleotiden für miR-199a und miR-199a* revers transkribiert und die cDNA für quantitative PCR-Experimente verwendet. In Abbildung 4.24 ist eine quantitative PCR-Analyse von miR-199a* von untransfizierten und transfizierten HT-29-Zellen dargestellt.

A



B

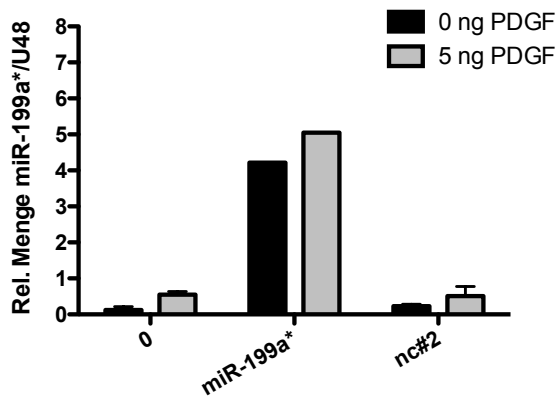


Abb. 4.24 Transfektion von HT-29-Zellen mit miR-199a und miR-199a*. HT-29-Zellen wurden mit reifen miRNA-Sequenzen für miR-199a und miR-199a* mittels Lipofektion transient transfiziert. Die Ansätze erfolgten in unbehandelten und in PDGF-stimulierten HT-29-Zellen. Die Transfektionseffizienz wurde über qRT-PCR Experimente nachgewiesen. **A** Die Menge an reifer miR-199a steigt nach der Transfektion auf das Achtfache im Vergleich zu nicht transfizierten bzw. mit einer unspezifischen Sequenz nc#2 transfizierten Zellen. **B** Die miRNA miR-199a* ist nach der Transfektion in fünffach höherer Konzentration im Vergleich zu den Kontrollansätzen detektierbar.

Die transiente Überexpression von miR-199a und miR-199a* in HT-29-Zellen mittels Lipofektion konnte erfolgreich durch qRT-PCR Experimente nachgewiesen werden. Im Vergleich zu nicht transfizierten HT-29 Zellen konnte die endogene Menge an miR-199a bzw. miR-199a* auf das 5- bzw. 8-fache erhöht werden. Die Transfektion von HT-29 Zellen mit der unspezifischer RNA-Sequenz nc#2 verursacht keinen Anstieg der untersuchten miRNAs. Bei miR-199a* ist eine höhere Expression in Anwesenheit von PDGF zu beobachten. Dieser Gegensatz ist vermutlich mit den durch die Transfektion veränderten zellulären Bedingungen sowie Messungenauigkeiten zu erklären.

4.2.3.6.2 Western Blot-Analyse der COX-2 in transfizierten HT-29 Zellen

Der Einfluss von miR-199a und miR-199a* auf die Expression von COX-2 sollte mit Hilfe von Western Blot-Analysen untersucht werden. HT-29- Zellen wurden wie bereits beschrieben mit den reifen miRNA miR-199a und miR-199a* transfiziert. Nach einer Inkubation von 20 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen geerntet und mit 50 µl Proteinlysepuffer lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordreaktion bestimmt. Die Inkubation mit einem COX-2 spezifischen Antikörper (aus Maus stammender monoklonaler Antikörper) erfolgte unter ständiger Drehung für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Als Kontrolle wurde β-Actin mit einem aus Ziege isolierten monoklonalen Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte über fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper (Emission bei 700 nm). Für COX-2 wurde die Membran mit einem Esel-gegen-Maus spezifischen Zweitantikörper (Emission bei 800 nm) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Detektion von β-Actin wurde ein Esel-gegen-Ziege spezifischer Antikörper verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der *Odyssey Imaging Software* im AK Steinhilber. In Abbildung 4.25 ist eine Western Blot-Analyse für COX-2 und β-Actin in HT-29-Zellen dargestellt.

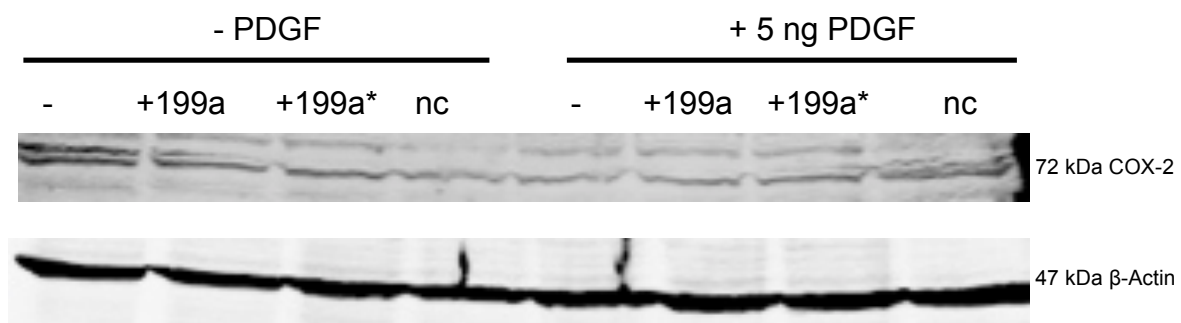


Abb. 4.25 Western Blot Analyse der COX-2 Proteinexpression. Die Expression von COX-2 wurde analysiert in transfizierten HT-29 Zellen. Für die Transfektion wurden neben der Nullkontrolle die reifen miRNAs miR-199a und miR-199a* sowie verschiedene Negativkontrollen verwendet. Es wurde die Änderung der Proteinexpression in unstimulierten bzw. mit 5 ng/ml PDGF stimulierten Zellen betrachtet.

Die Bande für COX-2 konnte im Proteingel bei 72 kDa als schwaches Signal mit vielen unspezifischen Nebenbanden detektiert werden. Das Signal für β-Actin war bei allen Proben gleich stark bei 42 kDa detektierbar. Es ist einer aus drei unabhängigen Western Blots dargestellt.

Die Qualität des COX-2 spezifischen Antikörpers ließ aufgrund der Menge an unspezifischen Nebenbanden keine Aussage über mögliche Unterschiede im Proteinexpressionsniveau zu. Die Quantifizierung der Proteinbanden im Verhältnis zur Expression von β -Actin war aufgrund dessen ebenso nicht möglich. Die Experimente müssten deswegen gegebenenfalls mit einem anderen Antikörper wiederholt werden.

Die Proteinexpression von COX-2 nimmt tendenziell nach der Transfektion mit miR-199a und miR-199a* in HT-29-Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen ab. Bei allen transfizierten Negativkontrollen konnte allerdings ebenfalls eine Reduktion der COX-2 Bande beobachtet werden. Man kann vermuten, dass die Blotreaktion nicht an allen Stellen gleich gut funktioniert hat. Aus diesem Grund war im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage möglich, ob eine direkte Regulation von COX-2 über miR-199a* stattfindet.

4.2.3.6.3 Luziferase-Reportergen-Messungen der miR-199a*-Bindestelle

Die im 3'-UTR-Bereich der COX-2 bioinformatisch vorhergesagte Bindestelle für miR-199a* wurde flankierend von jeweils 100 Basenpaaren stromauf- und stromabwärts mit den Restriktionsenzymen SpeI und HindIII in den pMIR-REPORT-Vektor kloniert, welcher unter der Kontrolle eines CMV-Promoters das Firefly-Luziferasegen aus *Photinus pyralis* konstitutiv exprimiert. Hinter dem Luziferasegen befindet sich eine Polylinkersequenz zur Insertion von miRNA-Bindestellen. In Abbildung 4.26 ist die Bindestelle für miR-199a* aus dem 3'-UTR Bereich von COX-2 mit der miR-199a* schematisch dargestellt.

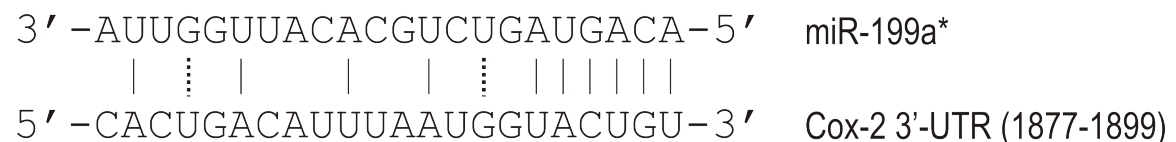


Abb. 4.26 Schematische Darstellung der Bindung von miR-199a* im 3'-UTR der COX-2 mRNA. Die Bindestelle aus dem 3'-UTR (Position 1877-1899) der COX-2 mRNA ist mit miR-199a* dargestellt. Als schwarze Linien sind alle Watson-Crick-Basenpaare eingezeichnet. Als gestrichelte Linien sind alle nichtkanonischen Bindungen dargestellt.

Als Negativkontrolle wurde eine mutierte miR-199a*-Bindestelle mit den Restriktionsenzymen SpeI und HindIII in pMIR-REPORT kloniert, welche keine Basenpaarung mit der reifen miR-199a* eingehen kann. Als Positivkontrolle wurde eine als *perfect match* bezeichnete Sequenz, welche komplementär zur der miRNA miR-199a* mit den Restriktionsenzymen SacI und HindIII in die Polylinkersequenz des pMIR-REPORT-Vektors kloniert. Für die Messungen in HT-29-Zellen wurde die miR-199a*-Bindestelle als Triplikativwiederholung mit den Restriktionsenzymen SacI und HindIII in pMIR-REPORT kloniert.

Für die Transfektion wurden 150 ng der erzeugten Konstrukte eingesetzt. Als Kontrolle wurden jeweils 20 ng des Plasmids pRenilla_SV40 verwendet, welches unter Kontrolle des SV40-Promoters konstitutiv das Luziferasegen aus *Renilla reniformis* exprimiert. Für Co-Transfektionen wurden zusätzlich zu den genannten Konstrukten die reifen miRNA-Sequenzen von miR-199a bzw. miR-199a* in einer Konzentration von 5 µM verwendet. Die Transfektionsansätze erfolgten in 24-well-Platten mit HT-29-, HeLa- und Cos-7-Zellen, um die Regulation unter verschiedenen zellulären Bedingungen beobachten zu können. In Abbildung 4.27 sind die Luziferase-Messungen der unterschiedlichen Konstrukte in verschiedenen Zelllinien als Duplikate dargestellt.

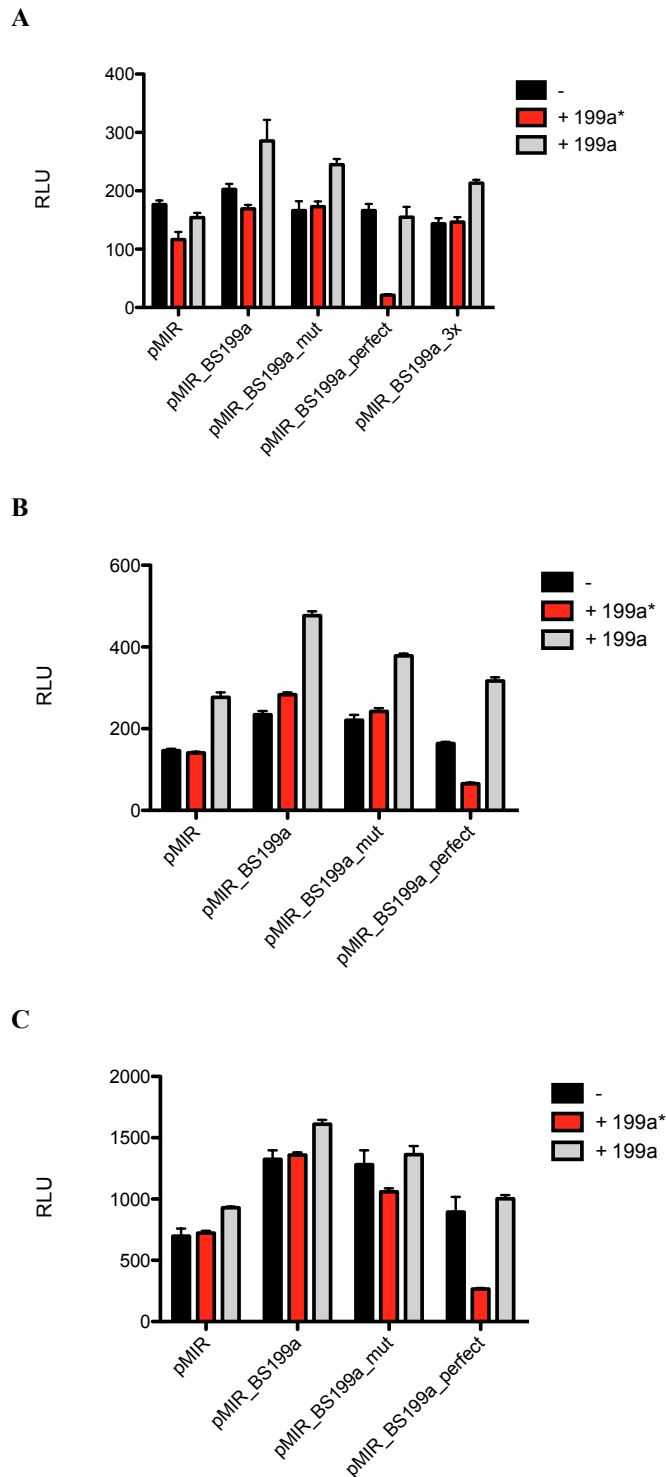


Abb. 4.27 Luziferase-Messungen der miR-199a* Bindestelle in verschiedenen Zelllinien. Die Bindestelle für miR-199a* im COX-2 3'-UTR wurde in den pMIR-REPORT-Vektor kloniert. Zudem wurde die Bindestelle mutiert, so dass keine Bindung mehr möglich ist. Als Kontrollen dienten der leere pMIR sowie eine als „perfect match“ bezeichnete Bindestelle, welche die komplementäre Sequenz zu miR-199a* darstellt. Die schwarzen Balken stellen die Messungen der transfizierten pMIR-Konstrukte dar. Die roten bzw. grauen Balken stellen Messungen der Co-Transfektionen mit miR-199a* bzw. miR-199a dar. **A** HT-29-Zellen. **B** HeLa-Zellen. **C** Cos-7-Zellen.

In den Reportergen-Messungen konnte keine Regulation der Luziferaseaktivität durch die miR-199a* beobachtet werden. Die verwendeten Zelllinien HT-29, HeLa und Cos-7 zeigten Schwankungen in der Luziferaseaktivität (RLU) durch unterschiedlich hohe Transfektionseffizienzen. Sowohl der natürliche Bindebereich aus dem 3'-UTR von COX-2, wie auch die mutierte Bindestelle verhalten sich wie der Leervektor pMIR. Lediglich das als Systemkontrolle verwendete *perfect match*-Konstrukt, welches die komplementäre Sequenz zu miR-199a* darstellt, bewirkt eine signifikante Reduktion der Luziferaseexpression.

5 Diskussion

5.1 Bindungsstudien der TetR-Aptamer-Bindung

5.1.1 TetR bindet mit hoher Affinität an das Aptamer

Die Bindekonstante des TetR/*tetO*-Komplex ist abhängig von der gewählten Ionenstärke. In Filterbindungsstudien mit Pufferbedingungen von 100 mM NaCl und EDTA zur Komplexierung von Mg²⁺-Ionen konnte eine Bindekonstante von 7×10^{-12} M ermittelt werden (Kleinschmidt et al., 1988; Lederer et al., 1996). Auch die Bindung von Tc an TetR ist abhängig von Mg²⁺-Ionen und den pH-Bedingungen (Palm et al., 2008).

Die Pufferbedingungen für die Gelverzögerungsexperimente zur Untersuchung der TetR-Aptamer-Interaktion wurden so gewählt, dass die Konzentrationen an mono- und bivalenten Ionen den physiologischen Bedingungen entsprechen. Dabei konnte erwartet werden, dass sich die Bindekonstante des TetR/*tetO*-Komplex verändert. Deshalb war es notwendig, dass die Bindung von TetR an *tetO* und an die Aptamer-RNA unter gleichen Bedingungen bestimmt wird. Die Bindeaffinität liegt unter den gewählten Bedingungen für beide Komplexe bei etwa 22 nM. Die Affinität von TetR an *tetO* nimmt dabei wie erwartet um eine Größenordnung vom pikomolaren in den nanomolaren Bereich ab.

Andere *in vitro* selektierte Aptamer gegen Nukleinsäuren-bindende Proteine weisen Bindekonstanten auf, die ebenso im niedrig nanomolaren Bereich liegen. Aptamere gegen den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIB aus *Saccharomyces cerevisiae* weisen K_D-Werte von ≤ 1 nM auf (Sevilimedu et al., 2008). Bei Aptameren gegen die *Xenopus* Zinkfingerproteine TFIIA und p43, welche Transkriptionsfaktoren der 5S DNA wie auch natürliche Liganden der ribosomalen 5S RNA sind, konnten K_D-Werte von 0,2 bis 1 nM bestimmt werden (Weiss et al., 2010).

Die Bindungsstärke der Aptamere gegen TBP konnte durch EMSA-Studien mit einem K_D von 3 bis 10 nM quantifiziert werden. Dabei ist die Bindeaffinität der Aptamere höher als die des natürlichen TATA*TBP-Komplexes (Fan et al., 2004; Shi et al., 2007). Die Affinität der selektierten Aptamere übersteigt dabei häufig die des natürlichen Liganden. Diese Tatsache kann mit den veränderten Bedingungen *in vitro* sowie stringenteren Selektionsbedingungen erklärt werden.

5.1.2 TetR weist überlappende Bereiche für die DNA- und RNA-Erkennung auf

Die TetR-Bindung an *tetO* wird durch ein *Helix-Turn-Helix*-Motiv vermittelt, welches wie zahlreiche DNA-Bindemotive vorwiegend neutral oder positiv geladene Aminosäuren aufweist (Brendel and Karlin, 1989). *In vitro* selektierte Aptamere gegen Nukleinsäuren-bindende Proteine kontaktieren häufig die Bindeepitope des natürlichen Liganden. Im Fall des hier untersuchten TetR-bindenden Aptamers konnte durch *in vivo*-Studien gezeigt werden, dass die Aptamerbindung auch im Bereich des *Helix-Turn-Helix*-Motivs von TetR positioniert ist. Verschiedene TetR-Mutanten im DNA-Bindekopf wie auch im Dimerisierungsbereich wurden auf Repressions- und Induktionsstärke durch das Aptamer in LacZ-Reportergenmessungen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Positionen T27S, E37A, N47A und K48A für die Regulation *in vivo* essentiell sind. Aminosäureaustausche im Proteinkörper beeinflussen die TetR-Bindung nicht (Dissertation Anke Hunsicker, 2009).

In den gezeigten Gelverzögerungsexperimenten konnten die Bindeepitope aus den *in vivo*-Analysen bestätigt werden. Die Mutanten T27S, N47A und K48C führen zu einem kompletten Verlust der Bindung des Aptamers. Die Mutanten I22C, D23C, E37A und K46C zeigen in den EMSA-Bindestudien gleiches Verhalten wie das Wildtypprotein. In Korrelation dazu konnten für die Mutanten I22C und D23C *in vivo* ähnliche Induktionsfaktoren wie für den Wildtyp bestimmt werden. Bei der Mutante E37A führt der Austausch der negativ geladenen Glutaminsäure (E) gegen ein Alanin (A) zu einer besseren Bindung an das Aptamer. Vermutlich verursacht eine Verringerung der negativen Ladung die unspezifische Bindung von TetR an das Aptamer unter den gewählten Gelverzögerungsbedingungen. Unter *in vivo* Bedingungen zeigt diese Mutante eine wesentlich schlechtere DNA-Bindung. Aus DNA-Bindestudien ist bekannt, dass die Aminosäuren T27 und E37 essentiell für die DNA-Bindung sind (Baumeister et al., 1992). Für die Aptamer-Bindung scheinen dagegen hauptsächlich die räumlich benachbarten Aminosäuren T27, N47 und K48 wichtig zu sein. In Anwesenheit von Tetracyclin konnte gezeigt werden, dass die Bindestärke um das 6-fache auf einen K_D von 300 nM ansteigt. Der berechnete Abstand der C_β -Atome der Aminosäuren T27, N47 und K48 nimmt im TetR*tc-Komplex zu. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass ebenso wie bei der DNA-Bindung die Konformationsänderung von TetR die Bindeeigenschaften des Aptamers beeinflusst.

5.1.3 Ein TetR-Dimer bindet ein Aptamermolekül

TetR liegt in der DNA-gebundenen Form als Dimer vor (Hillen and Schollmeier, 1983). Die Dimerisierung erfolgt dabei durch ein Vier-Helix-Bündel der Helices $\alpha 8$, $\alpha 8'$, $\alpha 10$ und $\alpha 10'$ (Schnappinger et al., 1998). Die Aptamer-Bindung an TetR kann im Gegensatz dazu auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die Möglichkeiten der Bindung wären a) ein Aptamer-Molekül bindet ein TetR-Monomer, b) ein Aptamer-Molekül bindet ein TetR-Dimer und c) zwei oder mehrere Aptamere binden ein TetR-Dimer. Die teilweise überlappenden Bindebereiche der DNA- bzw. RNA-Bindung aus den beschriebenen *in vivo*-Untersuchungen ließen die Vermutung zu, dass ein RNA-Molekül ein TetR-Dimer bindet.

Die Stöchiometrie der TetR-Aptamer-Bindung konnte durch LILBID-Messungen auf einen Komplex von 2:1 bestimmt werden. Dabei bindet ein RNA-Molekül ein TetR-Dimer. Diese Beobachtung korreliert mit anderen Aptamer-Protein-Komplexen. Das Thrombin-bindende Aptamer TBA bindet ebenfalls zwei Moleküle Thrombin. Dabei erkennt das Aptamer jedoch zwei unabhängige Bindestellen (Exosite 1 und 2) von Thrombin (Pagano et al., 2008).

Im Fall des NF- κ B-bindenden Aptamers α -p50 bindet ein RNA ein Homodimer NF- κ p50. Dabei wird der DNA-Duplex strukturell durch die RNA-Stammschleifenstruktur nachgeahmt und die DNA-Bindung inhibiert (Cassiday et al., 2002).

Die 3D-Struktur des TetR-bindenden Aptamer konnte bisher noch nicht durch Röntgenkristallstruktur- oder NMR-Analysen aufgelöst werden. Man kann vermuten, dass durch die überlappenden Bindebereiche der DNA- und RNA-Bindung die Struktur der großen DNA-Furche nachempfunden wird. Die TetR-Bindung erfolgt voraussichtlich asymmetrisch, da nicht alle essentiellen Aminosäurereste der DNA-Bindung durch das Aptamer beansprucht werden.

5.1.4 Das Aptamer kompetitiert mit *tetO* um die TetR-Bindung

Für die Induktion von TetR durch das Aptamer können unterschiedliche Möglichkeiten postuliert werden. Die Bindung des Aptamers kann ähnlich wie Tetracyclin eine Konformationsänderung von TetR bewirken. Die Bindung von Tetracyclin an TetR bewirkt eine allosterische Änderung des gesamten Proteins. Dadurch kommt es zu einer

Rotationsbewegung der DNA-Bindeköpfe und TetR diffundiert von der DNA ab (Tiebel et al., 1998; Tiebel et al., 2000). Für die untersuchte TetR-Aptamer-Bindung kann solch eine Konformationsänderung ausgeschlossen werden. Anhand von *in vivo*-Reportergeratemessungen konnte gezeigt werden, dass das Aptamer auch TetR-Mutanten im Induktorerkennungsbereich regulieren kann (Dissertation Anke Hunsicker, 2009).

Die Bindung des Aptamers könnte eine Dissoziation des TetR-Dimers in die jeweiligen Monomere bewirken. Diese Möglichkeit konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Das Aptamer bindet und induziert *in vivo* auch die *single chain*-Variante von TetR (scTetR). Die Monomere werden im scTetR durch einen Serin-Glycin-Linker verbunden und als stabil bleibendes Dimer exprimiert (Kamionka et al., 2006). Mit Reportergeratemessungen konnte *in vivo* für scTetR ein ähnliches Verhalten wie das Wildtyp-Protein beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die gezeigten Bindestudien zwischen TetR, der Operator-DNA *tetO* und dem TetR-bindenden Aptamer 12-1KΔA weisen ein bekanntes Prinzip der Konkurrenz zwischen der natürlichen DNA-Sequenz und des *in vitro* selektierten Aptamers auf. Verschiedene Aptamere gegen DNA-bindende Proteine konnten identifiziert werden, welche die Protein-DNA-Wechselwirkung gezielt aufheben. *In vitro* selektierte Aptamere gegen das TATA-bindende Protein (TBP) interagieren direkt mit der Bindung von TBP an die TATA-Sequenz. Dabei besetzen die Aptamere direkt den DNA-Bindebereich von TBP und können somit einen bestehenden TATA*TBP-Komplex destabilisieren. Wird das Helix-Turn-Helix-Motiv von TBP maskiert, konnten Aptamere selektiert werden, die andere Epitope des Proteins besetzen (Shi et al., 2007).

Aptamere gegen den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIB aus *Saccharomyces cerevisiae* konkurrieren mit der Bindung von TFIIB an TBP oder RNA Polymerase II. Dabei wird *in vitro* gezielt die Bildung des Präinitiationskomplexes gestört und somit die Transkriptionsinitiation inhibiert (Sevilimedu et al., 2008).

Die Bindeeigenschaften des TetR-bindenden Aptamers konnten durch biochemische Analysen tiefgehend charakterisiert werden. Die Anwendung als Expressionssonde für kleine, bakterielle RNAs konnte in Vorarbeiten bereits gezeigt werden. Ein mögliches Ziel könnte die konditionale Genkontrolle im eukaryotischen Kontext sein. Die Beziehung zwischen Struktur und Funktion könnte durch Röntgenstruktur- oder NMR-Analysen weiter charakterisiert und bestätigt werden.

5.2 Regulation von Entzündungsprozessen durch miRNAs

MiRNAs spielen bei der Regulation von Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle (Dai and Ahmed, 2011; Gomase and Parundekar, 2009). Die Immunantwort auf Infektionen bewirkt verschiedene, zelluläre Differenzierungsprozesse und wird stringent reguliert. In verschiedenen hämatopoetischen Zellen wie beispielsweise B-Zellen und T-Zellen konnten bereits mehrere regulatorische miRNAs beschrieben werden. MiR-181 konnte als wichtiger Schalter bei der B-Zell-Differenzierung in Mäusen beschrieben werden (Chen et al., 2004a)

Das angeborene Immunsystem beherbergt zahlreiche Gene, welche durch miRNAs kontrolliert werden. Für einige Cytokingene konnte bereits gezeigt werden, dass diese über ARE und miRNAs reguliert werden (Asirvatham et al., 2009). Bei verschiedenen inflammatorischen Prozessen konnte miR-155 beispielsweise als eine multifunktionale miRNA charakterisiert werden. Verschiedene Studien zeigen eine erhöhte Expression von miR-155 bei der Immunantwort, in Autoimmunerkrankungen und malignen Tumorerkrankungen (Faraoni et al., 2009; Jiang et al., 2010; Tili et al., 2011).

5-LO und COX-2 stellen vermittelnde Regulatorenzyme des angeborenen und adaptiven Immunsystems dar. Beide verwenden als gemeinsames Substrat Arachidonsäure, werden allerdings auf unterschiedliche Weise reguliert. Zudem ist die Regulation in beiden Signalwegen sehr komplex. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die posttranskriptionelle Regulation von 5-LO und COX-2 direkt über miRNAs moduliert wird.

5.2.1 Bioinformatische Vorhersage von miRNA-Bindestellen

Die Vorhersage von Bindestellen für miRNAs beruht in den zugänglichen Programmen auf einer statistischen Analyse der Sequenz des 3'-UTR einer mRNA. Die verwendeten Algorithmen unterscheiden sich dabei in Hinsicht auf die Vorhersage der Bindestelle. TargetScan und PicTar beziehen die Konservierung unter den Säugerspezies mit in die Vorhersageberechnung mit ein. Für die Analyse möglicher Bindestellen wird in erster Linie ein Sequenzabgleich der *seed*-Sequenz der miRNA mit der mRNA durchgeführt. Dabei müssen mindestens die ersten sieben Nukleotide komplementär zur mRNA sein. PicTar und miRanda berechnen die optimale freie Energie des miRNA/mRNA-Duplex

mit in die Bewertung der Bindestelle ein (Krek et al., 2005). Die Vorhersage von putativen Bindestellen durch Berechnung des kompletten miRNA/mRNA-Duplex stellt aufgrund der schwachen Komplementarität an sich allerdings kein optimales Mittel dar (Rajewsky, 2006). Die Kombination der verschiedenen Algorithmen soll die Wahrscheinlichkeit minimieren, dass falsch-positive Bindestellen untersucht werden, welche im zellulären Kontext keinen Einfluss auf die Genexpression haben. Mittlerweile sind neue Vorhersageprogramme zugänglich, welche gezielt auch die nicht regulierten Zielgene in die Datenbank aufnehmen und somit die Anzahl von falsch-positiven und falsch-negativen Kandidaten zu minimieren versuchen (Bandyopadhyay and Mitra, 2009).

Flankierende Sequenzbereiche der putativen Bindestellen werden in der Regel nicht in der statistischen Analyse berücksichtigt (Alexiou et al., 2009). Insbesondere AU-reiche Sequenzbereiche können einen allgemeinen, destabilisierenden Effekt auf die mRNA haben und die Regulation durch miRNAs überlagern. Hierfür könnte eine Stabilitätsanalyse der 3'-UTR-Bereiche wie im Fall der Analyse von COX-2 (SignificanceScoreAssignment) mit einbezogen werden. Die Stabilitätsverteilung kann einen möglichen Aufschluss über die Effizienz der Bindestellen im mRNA-Kontext geben.

Aus bioinformatischen Studien ist zudem bekannt, dass die Länge des 3'-UTR-Bereichs mit der Möglichkeit einer Regulation durch miRNAs direkt korreliert (Cheng et al., 2009). Haushaltsgene weisen in der Regel kürzere 3'-UTR-Bereiche auf und tragen demzufolge statistisch weniger regulatorische Bindestellen für miRNAs. 5-LO stellt kein klassisches Haushaltsgen dar, weist jedoch im Promoterbereich und durch den kurzen 3'-UTR typische Eigenschaften auf.

Die verwendeten Programme lieferten unterschiedliche Ergebnisse für Bindestellen von miRNAs. Aus den Ergebnissen wurden deshalb nur überlappende miRNAs für eine weitere Untersuchung ausgewählt. Für die Auswahl von 5-LO spezifischen miRNAs wurde deshalb zusätzlich ein Abgleich mit den Microarraydaten gemacht. Dabei wurde aufgrund der hohen Expression auf miR-19b fokussiert, für welche allerdings nur über TargetScan eine schwach konservierte Bindestelle gefunden werden konnte. Die anderen ausgewählten miRNAs konnten nicht durch experimentelle Methoden validiert werden. Interessanterweise werden zahlreiche miRNA-Bindestellen mit anderen Algorithmen gefunden. Vermutlich ist diese Tatsache mit einer unterschiedliche Bewertung durch variable Filterregeln der putativen Bindestellen zu erklären.

5.2.2 Vor- und Nachteile einer miRNA-Microarrayexpressionsanalyse

Expressionsanalysen im Hochdurchsatzverfahren stellen neben *in silico*-Analysen geeignete Mittel dar, um eine veränderte Genexpression bei unterschiedlichen Bedingungen erfassen zu können. Mit Hilfe von Microarrayanalysen können eine Vielzahl verschiedener Ansätze im Verhältnis zur geringen, einzusetzenden Probenmenge untersucht werden (Sealfon and Chu, 2011). In Hinsicht auf die Erforschung verschiedener Krebsarten können genomweite Unterschiede der Pathologie und Therapie analysiert werden (Guo, 2003).

Für miRNA-Expressionsanalysen mittels Microarraytechnik wird Komplet-RNA aus humanen Zellen extrahiert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wird mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und mit ebenfalls markierten, miRNA-spezifischen Expressionssonden hybridisiert. Somit können auf einem Chip mehrere hundert verschiedene miRNAs in verschiedenen Zellen bzw. unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden.

Bei der Extraktion der Komplet-RNA können durch die Präzipitation kleine RNAs verloren gehen. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, dass die Microarrayanalyse falsch-negative Ergebnisse liefert. Des Weiteren können Schwankungen während der Hybridisierung auftreten und die Ergebnisse nur Artefakte liefern. Die Ergebnisse aus Microarrayanalysen müssen deswegen durch experimentelle Methoden wie Northern Blots oder qRT-PCR validiert werden.

Eine mögliche Fehlerquelle der Expressionsanalyse besteht in der Anzahl der untersuchten Proben. Die untersuchten Mono-Mac-6-Zellen wurden im undifferenzierten und differenzierten Zustand als Duplikate betrachtet, während die anderen als Einzelproben analysiert wurden. Auf Triplikate musste aus Kostengründen verzichtet werden. Deshalb konnten mögliche auftretende Schwankungen im Expressionsniveau nicht berücksichtigt werden. Möglicherweise werden dadurch auch miRNAs außer Acht gelassen, die ein zu geringes Expressionsniveau aufweisen.

5.2.3 Über den Einfluss von miRNAs auf 5-LO

Die 5-LO mRNA ist unter undifferenzierten Bedingungen sehr instabil und wird rasch degradiert. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Stabilität der 5-LO mRNA durch

miRNAs moduliert wird. Hier sollten Expressionsunterschiede von miRNAs im differenzierten und undifferenzierten Zustand beobachtbar sein.

In den untersuchten Zellen konnten keine miRNAs identifiziert werden, die regulatorisch aktiv sind. Die Expressionsanalyse durch Microarraytechnik liefert eine gesamtheitliche Darstellung vorhandener miRNAs. Dabei kann jedoch keine Aussage gemacht werden, ob bzw. welche Gene reguliert werden. In den untersuchten Mono-Mac-6-Zellen wurde der undifferenzierte sowie der differenzierte Zustand nach vier Tagen betrachtet. Die Unterschiede der betrachteten miRNAs sind dabei sehr gering. Möglicherweise ist dabei der untersuchte Differenzierungszustand zu spät gewählt und eine Regulation durch miRNA außerhalb des gewählten Zeitfensters.

Aus den Studien konnte keine regulatorisch aktiven miRNAs identifiziert werden. Mir-19b wurde aufgrund der hohen Expressionswerte in der Microarrayanalyse ausgewählt, verändert aber in der untersuchten Zeitreihe nicht das Expressionsniveau. Die Bindestelle für miR-19b konnte nur im humanen 5-LO 3'UTR gefunden werden und ist nicht unter anderen Säugerspezies konserviert. Die Analyse der Bindestelle zeigt auch, dass der mRNA/miRNA-Komplex sehr instabil ist. Die *seed*-Sequenz besteht nicht aus einem sogenannten 8mer, sondern nur aus einem sogenannten 7mer-1A. Dabei sind nur die Nukleotide 2-7 komplementär zur mRNA und tragen an Position 8 ein Adenosin. Diese 7mer-*seeds* können zwar regulatorisch aktiv sein, sind aber deutlich weniger effektiv als 8mer-*seeds* (Brennecke et al., 2005). Der 3'-Bereich der miRNA weist nur vier zusätzliche Watson-Crick-Basenpaare auf und bewirkt somit keinen kompensatorischen Bindungseffekt.

Im Rahmen dieser Arbeit waren zeitlich keine Reportergergemessungen mehr möglich, um einen regulatorischen Effekt der vorhergesagten Bindestelle für miR-19b überprüfen zu können. Aus Reportergergemessungen mit miR-19a, welche die gleiche Bindestelle im 3'-UTR der 5-LO besitzt und im Microarray mit einer 10-fach geringeren Expression detektiert werden konnte, wurde in der Zwischenzeit ein regulatorischer Effekt auf 5-LO beobachtet (Saskia Busch, persönlicher Kommentar). Möglicherweise bewirkt der Basenaustausch von U zu C im Vergleich zwischen miR-19a und miR-19b eine höhere Spezifität des miRNA/mRNA-Duplex.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation von 5-LO über miRNAs besteht darin, beteiligte Proteine im 5-LO Signalweg mit in die Betrachtung einzubeziehen. Aus Studien ist bekannt, dass unter Hypoxie die Expression von FLAP (5-LO assoziiertes Protein) eine Aktivierung von HIF-1 und NF- κ B bewirkt. Dabei wird die Expression von miR-

135-a und 199a-5p unter gleichen Bedingungen inhibiert (Gonsalves and Kalra, 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass 5-LO mit dem C-terminalen Bereich der miRNA-spezifischen Endoribonuklease Dicer interagieren kann (Dincbas-Renqvist et al., 2009). Der C-Terminus von Dicer zeichnet sich durch eine RNase III-Domäne sowie eine doppelsträngige RNA-Bindedomäne (dsRBD) aus, welche für die Prozessierung von pre-miRNAs zuständig ist (MacRae et al., 2007). Man kann deshalb vermuten, dass die mögliche Interaktion von 5-LO und Dicer zu einer alternativen Prozessierung der pre-miRNAs führt und somit die Regulation durch miRNAs über 5-LO moduliert wird.

5.2.4 COX-2 wird durch miRNAs reguliert

In der Literatur sind miRNAs beschrieben, die an der Regulation von COX-2 beteiligt sind. Insbesondere miR-101 und miR-199a* konnten sowohl bioinformatisch wie auch experimentell nachgewiesen werden. MiR-101 wird in COX-2 überexprimierten Zellen reprimiert (Strillacci et al., 2009). In dieser Arbeit konnte die Expression von miR-101 in HT-29-Zellen ebenfalls nur auf basalem Niveau detektiert werden.

Die in dieser Studie untersuchte miR-199a* wurde als regulatorisch aktiv in der Embryonalentwicklung von Mäusen beschrieben (Chakrabarty et al., 2007). Eine weitere Publikation beschreibt eine reziproke Expression von miR-199a* und COX-2 in Maus-spezifischen Krebszellen der Gebärmutter Schleimhaut (Daikoku et al., 2008). In humanen Zellen konnte bisher noch keine direkte Regulation von COX-2 durch miR-199a* nachgewiesen werden. Die Bindestelle im COX-2 3'-UTR der Maus spezifischen miR-199a* wird bioinformatisch nur über PicTar gefunden. Des Weiteren bestehen deutliche Unterschiede der vorhergesagten Bindestelle für Mensch und Maus. Die *seed*-Region ist konserviert unter anderen Säugerspezies. Allerdings weicht die Sequenz im distalen Bereich im 3'-UTR um acht Nukleotide zwischen Mensch und Maus ab.

In dieser Arbeit wurde die Expression von miRNA-199a* in Colonkarzinom-spezifischen HT-29-Zellen untersucht. Die in der Literatur beschriebene Expressionskontrolle von COX-2 durch miR-199a* findet wahrscheinlich wie für viele miRNAs beschrieben nur gewebespezifisch statt. Interessanterweise ist dabei nur die miR-199a* aktiv, während die komplementäre Sequenz miR-199a keine Bindestelle im COX-2 3'-UTR trägt. Neueste Studien belegen, dass der sogenannte *passenger*-Strang ebenso in vielen Geweben

regulatorisch aktiv ist (Yang et al., 2011b). Obwohl beide die komplementäre Sequenz darstellen, sind miR-199a und miR-199a* auf gleichem Niveau nachweisbar.

Die miRNAs miR-16 und miR-26b konnten ebenfalls in HT-29-Zellen detektiert werden. Beide miRNAs sind bereits in der Literatur beschrieben. Für miR-16 konnte gezeigt werden, dass eine kompetitive Interaktion mit dem RNA-bindenden Protein hnRNP K an AU-reichen Bereichen von COX-2 besteht (Shanmugam et al., 2008). MiR-26b reguliert in Desferrioxamin behandelten Zellen eines Nasopharyngalkarzinoms die Expression von COX-2. Die Überexpression von miR-26b führt zu einer Inhibition der Zellproliferation (Ji et al., 2010).

5.2.5 PDGF beeinflusst die Expression verschiedener miRNAs

Aus Studien von Melania Dovizio war bekannt, dass die Stimulation von HT-29-Zellen mit PDGF-BB die mRNA stabilisiert und die Proteinexpression signifikant ansteigen lässt (Melania Dovizio, persönlicher Kommentar). Interessanterweise werden miR-16 und miR-26b unter den gleichen Bedingungen induziert, während miR-199a und miR-199a* dagegen eine signifikante Reduktion der Expression zeigen.

Es gibt verschiedene Hinweise, dass ein Zusammenhang zwischen der Regulation von PDGF und miRNAs besteht. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass PDGF das Expressionsniveau verschiedener miRNAs in Glioblastom- und Eierstockkrebszellen verändert. Dabei wird spezifisch zwischen verschiedenen PDGF-Homodimeren unterschieden. Let-7d wird durch das Homodimer PDGF-AA reguliert, PDGF-BB kontrolliert die Expression von miR-146b (Shao et al., 2011). In einem Zebrafischmodell wird der PDGF-Rezeptor alpha (PDGF-R α) negativ durch Mirn-140 reguliert. Eine Überexpression der miRNA führt zu einer fehlerhaften Regulation der embryonalen Gaumenentwicklung (Eberhart et al., 2008).

Eine weitere Hypothese besteht darin, dass miRNAs über Microvesikel übertragen werden (Zomer et al., 2010). In Thrombozyten konnten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene miRNAs nachgewiesen werden, die einen möglichen Einfluss in der Darmkrebsentstehung haben. In verschiedenen Publikationen wurde bereits gezeigt, dass die Transkription von miRNAs in Thrombozyten stattfindet (Landry et al., 2009; Nagalla et al., 2011; Osman and Falker, 2011). Vieles deutet daraufhin, dass diese miRNAs im

direkten Zell-Zell-Kontakt übertragen werden und so die Genexpression modulieren können.

Es konnte allerdings in den gezeigten Experimenten kein direkter Zusammenhang zwischen der miRNA-Expression und der COX-2-Regulation beobachtet werden. Möglicherweise werden durch die analysierten miRNAs andere Gene reguliert, welche regulatorisch auf die COX-2-Expression wirken können. IKK β wird beispielsweise in Ovarialkarzinomzellen durch miR-199a reguliert und beeinflusst so die Aktivität von NF- κ B (Chen et al., 2008). Möglicherweise kann dieses Modell auf Colonkarzinomzellen übertragen werden.

In Leberzellkarzinomen wird miR-199a* als Tumorsuppressor beschrieben. Die Proliferation von CD44-positiven Zellen wird durch eine Überexpression von miR-199a* inhibiert (Henry et al., 2010). MiR-199a* reguliert in diesem Signalweg ebenso auch das Proto-Onkogen MET und die Kinase ERK2 (Kim et al., 2008).

Ein weiteres Zielgen könnte CUGBP2 sein, welches in colorektalen Adenomen und Adenokarzinomen ARE-reiche Gene zu kontrollieren scheint (Kanies et al., 2008). Der 3'-UTR der CUGBP2 mRNA weist bioinformatisch vorhergesagte Bindestellen für miR-26b und miR-199a auf. Es könnte daher ein Regulationsmechanismus postuliert werden, der ein Zusammenspiel aus RNA-bindenden Proteinen und miRNAs im COX-2-Signalweg darstellt.

5.3 Fazit und Ausblick

In dieser vorliegenden Arbeit wurden RNA-Liganden-Interaktionen in zwei der drei Domänen des Lebens betrachtet und untersucht. Es konnten zwei große, unabhängige Blöcke der RNA-Forschung bearbeitet werden. Neben der intensiven biochemischen Bindungsanalyse eines RNA-Aptamers gegen den bakteriellen Tetrazyklinrepressor wurden viele Methoden zur Identifikation und dem Nachweis von miRNAs in verschiedenen humanen Zellen des 5-LO- und COX-2-Stoffwechsels etabliert. Die Daten der Microarrayanalyse für 5-LO exprimierende Zellen sowie die bioinformatische Auswertung des 3'-UTRs können als Vorarbeiten dienen und nun verwendet werden, um regulatorische miRNAs im 5-LO-Signalweg zu identifizieren. Die Interaktion zwischen 5-LO und Dicer sollte dabei mit in das experimentelle Vorgehen einbezogen werden. Die

Reduktion der Expression von miR-199a und miR-199a* in Abhängigkeit von PDGF kann im COX-2 spezifischen Kontext ein Hinweis auf eine mögliche Regulation anderer beteiligter Gene sein. Zudem sollte bei der Identifikation möglicher Zielgene die Interaktion von HT-29-Zellen und Thrombozyten berücksichtigt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Alexiou, P., M. Maragkakis, G.L. Papadopoulos, M. Reczko, and A.G. Hatzigeorgiou. 2009. Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics*. 25:3049-3055.
- Apte, R.S. 2008. Pegaptanib sodium for the treatment of age-related macular degeneration. *Expert Opin Pharmacother*. 9:499-508.
- Aramaki, H., N. Yagi, and M. Suzuki. 1995. Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng*. 8:1259-1266.
- Asirvatham, A.J., W.J. Magner, and T.B. Tomasi. 2009. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine*. 45:58-69.
- Bala, J., A. Bhaskar, A. Varshney, A.K. Singh, S. Dey, and P. Yadava. 2011. In vitro selected RNA aptamer recognizing glutathione induces ROS mediated apoptosis in the human breast cancer cell line MCF 7. *RNA Biol*. 8.
- Bandyopadhyay, S., and R. Mitra. 2009. TargetMiner: microRNA target prediction with systematic identification of tissue-specific negative examples. *Bioinformatics*. 25:2625-2631.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281-297.
- Basyuk, E., F. Suavet, A. Doglio, R. Bordonne, and E. Bertrand. 2003. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*. 31:6593-6597.
- Baumeister, R., V. Helbl, and W. Hillen. 1992. Contacts between Tet repressor and tet operator revealed by new recognition specificities of single amino acid replacement mutants. *J Mol Biol*. 226:1257-1270.
- Berens, C., A. Thain, and R. Schroeder. 2001. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem*. 9:2549-2556.
- Bigby, T.D., and M.J. Holtzman. 1987. Enhanced 5-lipoxygenase activity in lung macrophages compared to monocytes from normal subjects. *J Immunol*. 138:1546-1550.
- Borgeat, P., M. Hamberg, and B. Samuelsson. 1976. Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *J Biol Chem*. 251:7816-7820.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem*. Bd. 72, S. 248-254
- Breaker, R.R. 2010. Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Brendel, V., and S. Karlin. 1989. Association of charge clusters with functional domains of cellular transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:5698-5702.
- Brennecke, J., A. Stark, R.B. Russell, and S.M. Cohen. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 3:e85.
- Brown, C.J., A. Ballabio, J.L. Rupert, R.G. Lafreniere, M. Grompe, R. Tonlorenzi, and H.F. Willard. 1991. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*. 349:38-44.
- Brungs, M., O. Radmark, B. Samuelsson, and D. Steinhilber. 1995. Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:107-111.

- Bunka, D.H., O. Platonova, and P.G. Stockley. 2010. Development of aptamer therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 10:557-562.
- Carothers, J.M., J.H. Davis, J.J. Chou, and J.W. Szostak. 2006. Solution structure of an informationally complex high-affinity RNA aptamer to GTP. *RNA.* 12:567-579.
- Cassiday, L.A., L.L. Lebruska, L.M. Benson, S. Naylor, W.G. Owen, and L.J. Maher, 3rd. 2002. Binding stoichiometry of an RNA aptamer and its transcription factor target. *Anal Biochem.* 306:290-297.
- Chakrabarty, A., S. Tranguch, T. Daikoku, K. Jensen, H. Furneaux, and S.K. Dey. 2007. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:15144-15149.
- Cheah, M.T., A. Wachter, N. Sudarsan, and R.R. Breaker. 2007. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature.* 447:497-500.
- Chen, C.Y., and A.B. Shyu. 1994. Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol Cell Biol.* 14:8471-8482.
- Chen, C.Y., and A.B. Shyu. 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 20:465-470.
- Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish, and D.P. Bartel. 2004a. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 303:83-86.
- Chen, R., A.B. Alvero, D.A. Silasi, M.G. Kelly, S. Fest, I. Visintin, A. Leiser, P.E. Schwartz, T. Rutherford, and G. Mor. 2008. Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene.* 27:4712-4723.
- Chen, S., A. Zhang, L.B. Blyn, and G. Storz. 2004b. MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 186:6689-6697.
- Cheng, C., N. Bhardwaj, and M. Gerstein. 2009. The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs. *BMC Genomics.* 10:431.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
- Chopra, I., and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:232-260 ; second page, table of contents.
- Cowan, J.A., T. Ohshima, D. Wang, and K. Natarajan. 2000. Recognition of a cognate RNA aptamer by neomycin B: quantitative evaluation of hydrogen bonding and electrostatic interactions. *Nucleic Acids Res.* 28:2935-2942.
- Cox, J.C., and A.D. Ellington. 2001. Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorg Med Chem.* 9:2525-2531.
- Cox, J.C., A. Hayhurst, J. Hesselberth, T.S. Bayer, G. Georgiou, and A.D. Ellington. 2002. Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. *Nucleic Acids Res.* 30:e108.
- Dahlen, S.E. 2006. Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy? *Eur J Pharmacol.* 533:40-56.
- Dai, R., and S.A. Ahmed. 2011. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res.* 157:163-179.
- Daikoku, T., Y. Hirota, S. Tranguch, A.R. Joshi, F.J. DeMayo, J.P. Lydon, L.H. Ellenson, and S.K. Dey. 2008. Conditional loss of uterine Pten unfailingly and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res.* 68:5619-5627.

- de Ruijter, A.J., A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp, and A.B. van Kuilenburg. 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 370:737-749.
- Delilhas, N., and S. Forst. 2001. MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J Mol Biol.* 313:1-12.
- Dieckmann, T., E. Suzuki, G.K. Nakamura, and J. Feigon. 1996. Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold. *RNA.* 2:628-640.
- Dincbas-Renqvist, V., G. Pepin, M. Rakonjac, I. Plante, D.L. Ouellet, A. Hermansson, I. Goulet, J. Doucet, B. Samuelsson, O. Radmark, and P. Provost. 2009. Human Dicer C-terminus functions as a 5-lipoxygenase binding domain. *Biochim Biophys Acta.* 1789:99-108.
- Dingermann, T., U. Frank-Stoll, H. Werner, A. Wissmann, W. Hillen, M. Jacquet, and R. Marschalek. 1992. RNA polymerase III catalysed transcription can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by the bacterial tetracycline repressor-operator system. *EMBO J.* 11:1487-1492.
- Dixon, D.A., N.D. Tolley, K. Bemis-Standoli, M.L. Martinez, A.S. Weyrich, J.D. Morrow, S.M. Prescott, and G.A. Zimmerman. 2006. Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *J Clin Invest.* 116:2727-2738.
- Domingo, E., and J.J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol.* 51:151-178.
- Du, T., and P.D. Zamore. 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development.* 132:4645-4652.
- Eberhart, J.K., X. He, M.E. Swartz, Y.L. Yan, H. Song, T.C. Boling, A.K. Kunerth, M.B. Walker, C.B. Kimmel, and J.H. Postlethwait. 2008. MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis. *Nat Genet.* 40:290-298.
- Eckert, B., and C.F. Beck. 1989. Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J Bacteriol.* 171:3557-3559.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411:494-498.
- Ellington, A.D., and J.W. Szostak. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 346:818-822.
- Fan, X., H. Shi, K. Adelman, and J.T. Lis. 2004. Probing TBP interactions in transcription initiation and reinitiation with RNA aptamers that act in distinct modes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:6934-6939.
- Faraoni, I., F.R. Antonetti, J. Cardone, and E. Bonmassar. 2009. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta.* 1792:497-505.
- Fauzi, H., A. Agyeman, and J.V. Hines. 2009. T box transcription antitermination riboswitch: influence of nucleotide sequence and orientation on tRNA binding by the antiterminator element. *Biochim Biophys Acta.* 1789:185-191.
- Feigon, J., T. Dieckmann, and F.W. Smith. 1996. Aptamer structures from A to zeta. *Chem Biol.* 3:611-617.
- Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:7413-7417.
- Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9:102-114.

- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-811.
- Friedman, A.M., T.O. Fischmann, and T.A. Steitz. 1995. Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science*. 268:1721-1727.
- Funk, C.D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 294:1871-1875.
- Furstenberger, G., P. Krieg, K. Muller-Decker, and A.J. Habenicht. 2006. What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *Int J Cancer*. 119:2247-2254.
- Ghosh, J., and C.E. Myers. 1997. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 235:418-423.
- Gilbert, W., and B. Muller-Hill. 1966. Isolation of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 56:1891-1898.
- Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 25:6680-6684.
- Gomase, V.S., and A.N. Parundekar. 2009. microRNA: human disease and development. *Int J Bioinform Res Appl*. 5:479-500.
- Gonsalves, C.S., and V.K. Kalra. 2010. Hypoxia-mediated expression of 5-lipoxygenase-activating protein involves HIF-1alpha and NF-kappaB and microRNAs 135a and 199a-5p. *J Immunol*. 184:3878-3888.
- Goringer, H.U., M. Homann, and M. Lorger. 2003. In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules. *Int J Parasitol*. 33:1309-1317.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen, and H. Bujard. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. 268:1766-1769.
- Graham, F.L., and A.J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52 (2): 456-67.
- Grainger, D.J. 2004. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24:399-404.
- Gregory, R.I., T.P. Chendrimada, N. Cooch, and R. Shiekhattar. 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 123:631-640.
- Gregory, R.I., K.P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, and R. Shiekhattar. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 432:235-240.
- Griffiths-Jones, S. 2010. miRBase: microRNA sequences and annotation. *Curr Protoc Bioinformatics*. Chapter 12:Unit 12 19 11-10.
- Grishok, A., A.E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D.L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun, and C.C. Mello. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 106:23-34.
- Groher, F. 2011. Regulation der Genexpression der 5-Lipoxygenase. *Diplomarbeit Universität Frankfurt*.
- Grundy, F.J., and T.M. Henkin. 2003. The T box and S box transcription termination control systems. *Front Biosci*. 8:d20-31.
- Guo, H., N.T. Ingolia, J.S. Weissman, and D.P. Bartel. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 466:835-840.

- Guo, L., and Z. Lu. 2010. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS One*. 5:e11387.
- Guo, Q.M. 2003. DNA microarray and cancer. *Curr Opin Oncol*. 15:36-43.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, D.M. *DNA cloning: A practical approach*. IRL Press, Oxford, Vol. 1, pp. 109-135.
- Hao, Y., X. Gu, Y. Zhao, S. Greene, W. Sha, D. Smoot, J.A. Califano, T.C. Wu, and X. Pang. 2011. Enforced Expression of miR-101 inhibits prostate cancer cell growth by modulating cyclooxygenase-2 pathway in vivo. *Cancer Prev Res (Phila)*.
- Henry, J.C., J.K. Park, J. Jiang, J.H. Kim, D.M. NAGOrney, L.R. Roberts, S. Banerjee, and T.D. Schmittgen. 2010. miR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 403:120-125.
- Henssler, E.M., O. Scholz, S. Lochner, P. Gmeiner, and W. Hillen. 2004. Structure-based design of Tet repressor to optimize a new inducer specificity. *Biochemistry*. 43:9512-9518.
- Hermann, T., and D.J. Patel. 2000. RNA bulges as architectural and recognition motifs. *Structure*. 8:R47-54.
- Hillen, W., and C. Berens. 1994. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*. 48:345-369.
- Hillen, W., C. Gatz, L. Altschmied, K. Schollmeier, and I. Meier. 1983. Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes. Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. *J Mol Biol*. 169:707-721.
- Hillen, W., and K. Schollmeier. 1983. Nucleotide sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene. *Nucleic Acids Res*. 11:525-539.
- Hillen, W., K. Schollmeier, and C. Gatz. 1984. Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance operon. II. Interaction of RNA polymerase and TET repressor with the tet operon regulatory region. *J Mol Biol*. 172:185-201.
- Hollams, E.M., K.M. Giles, A.M. Thomson, and P.J. Leedman. 2002. mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease. *Neurochem Res*. 27:957-980.
- Hopcroft, N.H., A. Manfredo, A.L. Wendt, A.M. Brzozowski, P. Gollnick, and A.A. Antson. 2004. The interaction of RNA with TRAP: the role of triplet repeats and separating spacer nucleotides. *J Mol Biol*. 338:43-53.
- Hoshiko, S., O. Radmark, and B. Samuelsson. 1990. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:9073-9077.
- Huizenga, D.E., and J.W. Szostak. 1995. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*. 34:656-665.
- Hull, M.A., O.O. Faluyi, C.W. Ko, S. Holwell, D.J. Scott, R.J. Cuthbert, R. Poulson, R. Goodlad, C. Bonifer, A.F. Markham, and P.L. Coletta. 2006. Regulation of stromal cell cyclooxygenase-2 in the ApcMin/+ mouse model of intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 27:382-391.
- Hung, T., and H.Y. Chang. 2010. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. *RNA Biol*. 7:582-585.
- Hunsicker, A., M. Steber, G. Mayer, J. Meitert, M. Klotzsche, M. Blind, W. Hillen, C. Berens, and B. Suess. 2009. An RNA aptamer that induces transcription. *Chem Biol*. 16:173-180.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A.E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, and P.D. Zamore. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 293:834-838.

- Jarema, M.A., P. Lu, and J.H. Miller. 1980. Lac repressor: a genetic and nuclear magnetic resonance study of structure and function. *Biophys J.* 32:450-452.
- Jellinek, D., C.K. Lynott, D.B. Rifkin, and N. Janjic. 1993. High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:11227-11231.
- Ji, Y., Y. He, L. Liu, and X. Zhong. 2010. MiRNA-26b regulates the expression of cyclooxygenase-2 in desferrioxamine-treated CNE cells. *FEBS Lett.* 584:961-967.
- Jiang, S., H.W. Zhang, M.H. Lu, X.H. He, Y. Li, H. Gu, M.F. Liu, and E.D. Wang. 2010. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.* 70:3119-3127.
- John, B., A.J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander, and D.S. Marks. 2004. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2:e363.
- Kamionka, A., M. Majewski, K. Roth, R. Bertram, C. Kraft, and W. Hillen. 2006. Induction of single chain tetracycline repressor requires the binding of two inducers. *Nucleic Acids Res.* 34:3834-3841.
- Kang, Y.J., U.R. Mbonye, C.J. DeLong, M. Wada, and W.L. Smith. 2007. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog Lipid Res.* 46:108-125.
- Kanies, C.L., J.J. Smith, C. Kis, C. Schmidt, S. Levy, K.S. Khabar, J. Morrow, N. Deane, D.A. Dixon, and R.D. Beauchamp. 2008. Oncogenic Ras and transforming growth factor-beta synergistically regulate AU-rich element-containing mRNAs during epithelial to mesenchymal transition. *Mol Cancer Res.* 6:1124-1136.
- Katryniok, C., N. Schnur, A. Gillis, A. von Knethen, B.L. Sorg, L. Looijenga, O. Radmark, and D. Steinhilber. 2010. Role of DNA methylation and methyl-DNA binding proteins in the repression of 5-lipoxygenase promoter activity. *Biochim Biophys Acta.* 1801:49-57.
- Keefe, A.D., S. Pai, and A. Ellington. 2010. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 9:537-550.
- Khanapure, S.P., D.S. Garvey, D.R. Janero, and L.G. Letts. 2007. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr Top Med Chem.* 7:311-340.
- Kim, S., U.J. Lee, M.N. Kim, E.J. Lee, J.Y. Kim, M.Y. Lee, S. Choung, Y.J. Kim, and Y.C. Choi. 2008. MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem.* 283:18158-18166.
- Kingston, R.E., P. Chomczynski, and N. Sacchi. 2001. Guanidine methods for total RNA preparation. *Curr Protoc Mol Biol.* Chapter 4:Unit4 2.
- Kleinschmidt, C., K. Tovar, W. Hillen, and D. Porschke. 1988. Dynamics of repressor-operator recognition: the Tn10-encoded tetracycline resistance control. *Biochemistry.* 27:1094-1104.
- Klotzsche, M., C. Berens, and W. Hillen. 2005. A peptide triggers allostery in tet repressor by binding to a unique site. *J Biol Chem.* 280:24591-24599.
- Klug, S.J., A. Huttenhofer, and M. Famulok. 1999. In vitro selection of RNA aptamers that bind special elongation factor SelB, a protein with multiple RNA-binding sites, reveals one major interaction domain at the carboxyl terminus. *RNA.* 5:1180-1190.
- Klug, S.J., A. Huttenhofer, M. Kromayer, and M. Famulok. 1997. In vitro and in vivo characterization of novel mRNA motifs that bind special elongation factor SelB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:6676-6681.

- Kortmann, J., S. Sczodrok, J. Rinnenthal, H. Schwalbe, and F. Narberhaus. 2010. Translation on demand by a simple RNA-based thermosensor. *Nucleic Acids Res.*
- Koshino, T., S. Takano, T. Houjo, Y. Sano, K. Kudo, H. Kihara, S. Kitani, T. Takaishi, K. Hirai, K. Ito, and Y. Morita. 1998. Expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein mRNAs in the peripheral blood leukocytes of asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun.* 247:510-513.
- Krek, A., D. Grun, M.N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E.J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K.C. Gunsalus, M. Stoffel, and N. Rajewsky. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 37:495-500.
- Kubodera, T., M. Watanabe, K. Yoshiuchi, N. Yamashita, A. Nishimura, S. Nakai, K. Gomi, and H. Hanamoto. 2003. Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett.* 555:516-520.
- Kulbachinskiy, A., A. Feklistov, I. Krasheninnikov, A. Goldfarb, and V. Nikiforov. 2004. Aptamers to *Escherichia coli* core RNA polymerase that sense its interaction with rifampicin, sigma-subunit and GreB. *Eur J Biochem.* 271:4921-4931.
- Kundu, J.K., and Y.J. Surh. 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res.* 659:15-30.
- Kwon, Y., and B.A. Magnuson. 2007. Effect of azoxymethane and curcumin on transcriptional levels of cyclooxygenase-1 and -2 during initiation of colon carcinogenesis. *Scand J Gastroenterol.* 42:72-80.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- Landry, P., I. Plante, D.L. Ouellet, M.P. Perron, G. Rousseau, and P. Provost. 2009. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol.* 16:961-966.
- Lau, N.C., L.P. Lim, E.G. Weinstein, and D.P. Bartel. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 294:858-862.
- Lederer, T., M. Kintrop, M. Takahashi, P.E. Sum, G.A. Ellestad, and W. Hillen. 1996. Tetracycline analogs affecting binding to Tn10-Encoded Tet repressor trigger the same mechanism of induction. *Biochemistry.* 35:7439-7446.
- Lee, J.E., J.Y. Lee, J. Wilusz, B. Tian, and C.J. Wilusz. 2010. Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells. *PLoS One.* 5:e11201.
- Lee, J.H., M.D. Canny, A. De Erkenez, D. Krilleke, Y.S. Ng, D.T. Shima, A. Pardi, and F. Jucker. 2005. A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18902-18907.
- Lee, J.T., L.S. Davidow, and D. Warshawsky. 1999. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet.* 21:400-404.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75:843-854.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.H. Yeom, S. Lee, S.H. Baek, and V.N. Kim. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23:4051-4060.
- Leipuviene, R., and E.C. Theil. 2007. The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen. *Cell Mol Life Sci.* 64:2945-2955.

- Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120:15-20.
- Lewis, B.P., I.H. Shih, M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel, and C.B. Burge. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 115:787-798.
- Liu, X., K. Fortin, and Z. Mourelatos. 2008. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol.* 18:113-121.
- Long, S.B., M.B. Long, R.R. White, and B.A. Sullenger. 2008. Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. *RNA*. 14:2504-2512.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg, and U. Kutay. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 303:95-98.
- Lunde, B.M., C. Moore, and G. Varani. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:479-490.
- MacRae, I.J., K. Zhou, and J.A. Doudna. 2007. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 14:934-940.
- Majerfeld, I., J. Chocholousova, V. Malaiya, J. Widmann, D. McDonald, J. Reeder, M. Iyer, M. Illangasekare, M. Yarus, and R. Knight. 2010. Nucleotides that are essential but not conserved; a sufficient L-tryptophan site in RNA. *RNA*. 16:1915-1924.
- Maniatis T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Maragkakis, M., M. Reczko, V.A. Simossis, P. Alexiou, G.L. Papadopoulos, T. Dalamagas, G. Giannopoulos, G. Goumas, E. Koukis, K. Kourtis, T. Vergoulis, N. Koziris, T. Sellis, P. Tsanakas, and A.G. Hatzigeorgiou. 2009. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res*. 37:W273-276.
- Mashima, T., A. Matsugami, F. Nishikawa, S. Nishikawa, and M. Katahira. 2009. Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein. *Nucleic Acids Res*. 37:6249-6258.
- Mayer, G. 2009. The chemical biology of aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl*. 48:2672-2689.
- McMurry, L., R.E. Petrucci, Jr., and S.B. Levy. 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:3974-3977.
- McMurry, L.M., D.A. Aronson, and S.B. Levy. 1983. Susceptible *Escherichia coli* cells can actively excrete tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother*. 24:544-551.
- Mehrabian, M., H. Allayee, J. Wong, W. Shi, X.P. Wang, Z. Shaposhnik, C.D. Funk, and A.J. Lusis. 2002. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res*. 91:120-126.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 15:185-197.
- Meitert, J. 2007. RNA Expressionsanalysen über ein TetR-bindendes Aptamer. *Diplomarbeit* Universität Erlangen-Nürnberg.
- Morozova, N., J. Allers, J. Myers, and Y. Shamoo. 2006. Protein-RNA interactions: exploring binding patterns with a three-dimensional superposition analysis of high resolution structures. *Bioinformatics*. 22:2746-2752.
- Mullis, K.B., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich. 1986. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt 1:263-73.

- Murmu, N., J. Jung, D. Mukhopadhyay, C.W. Houchen, T.E. Riehl, W.F. Stenson, A.R. Morrison, T. Arumugam, B.K. Dieckgraefe, and S. Anant. 2004. Dynamic antagonism between RNA-binding protein CUGBP2 and cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 in radiation damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:13873-13878.
- Nagalla, S., C. Shaw, X. Kong, A.A. Kondkar, L.C. Edelstein, L. Ma, J. Chen, G.S. McKnight, J.A. Lopez, L. Yang, Y. Jin, M.S. Bray, S.M. Leal, J.F. Dong, and P.F. Bray. 2011. Platelet microRNA-mRNA co-expression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood*.
- Nitsche, A., A. Kurth, A. Dunkhorst, O. Panke, H. Sielaff, W. Junge, D. Muth, F. Scheller, W. Stocklein, C. Dahmen, G. Pauli, and A. Kage. 2007. One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. *BMC Biotechnol.* 7:48.
- O'Toole, A.S., S. Miller, N. Haines, M.C. Zink, and M.J. Serra. 2006. Comprehensive thermodynamic analysis of 3' double-nucleotide overhangs neighboring Watson-Crick terminal base pairs. *Nucleic Acids Res.* 34:3338-3344.
- Orth, P., F. Cordes, D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, and W. Hinrichs. 1998. Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping. *J Mol Biol.* 279:439-447.
- Osman, A., and K. Falker. 2011. Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes. *Platelets*.
- Pagano, B., L. Martino, A. Randazzo, and C. Giancola. 2008. Stability and binding properties of a modified thrombin binding aptamer. *Biophys J.* 94:562-569.
- Palm, G.J., T. Lederer, P. Orth, W. Saenger, M. Takahashi, W. Hillen, and W. Hinrichs. 2008. Specific binding of divalent metal ions to tetracycline and to the Tet repressor/tetracycline complex. *J Biol Inorg Chem.* 13:1097-1110.
- Pang, K.C., M.C. Frith, and J.S. Mattick. 2006. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet.* 22:1-5.
- Payer, B., and J.T. Lee. 2008. X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annu Rev Genet.* 42:733-772.
- Piccirillo, C., R. Khanna, and M. Kiledjian. 2003. Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2. *RNA.* 9:1138-1147.
- Pickart, C.M., and M.J. Eddins. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1695:55-72.
- Plasterk, R.H. 2002. RNA silencing: the genome's immune system. *Science.* 296:1263-1265.
- Polo, S., S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M.R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli, and P.P. Di Fiore. 2002. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature.* 416:451-455.
- Ptashne, M., and A. Gann. 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature.* 386:569-577.
- Pueringer, R.J., C.C. Bahns, and G.W. Hunninghake. 1992. Alveolar macrophages have greater amounts of the enzyme 5-lipoxygenase than do monocytes. *J Appl Physiol.* 73:781-786.
- Radmark, O., O. Werz, D. Steinhilber, and B. Samuelsson. 2007. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci.* 32:332-341.
- Rajewsky, N. 2006. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet.* 38 Suppl:S8-13.

- Ramos, E., M. Moreno, M.E. Martin, M. Soto, and V.M. Gonzalez. 2010. In vitro selection of *Leishmania infantum* H3-binding ssDNA aptamers. *Oligonucleotides*. 20:207-213.
- Reinhart, B.J., F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz, and G. Ruvkun. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403:901-906.
- Ribardo, R., M. Gilman, R.E. Kingston, P. Choczynski, and N. Sacchi. 2001. Preparation of RNA from tissues and cells. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 10:Unit 10 11.
- Romano, M., and J. Claria. 2003. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J*. 17:1986-1995.
- Rose, J.K., L. Buonocore, and M.A. Whitt. 1991. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques*. 10:520-525.
- Rouzer, C.A., and L.J. Marnett. 2009. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res*. 50 Suppl:S29-34.
- Rowe, A.A., E.A. Miller, and K.W. Plaxco. 2010. Reagentless measurement of aminoglycoside antibiotics in blood serum via an electrochemical, ribonucleic acid aptamer-based biosensor. *Anal Chem*. 82:7090-7095.
- Sanger F, S. Nicklen, A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12): 5463-7.
- Saenger, W., P. Orth, C. Kisker, W. Hillen, and W. Hinrichs. 2000. The Tetracycline Repressor-A Paradigm for a Biological Switch. *Angew Chem Int Ed Engl*. 39:2042-2052.
- Samuelsson, B., S. Hoshiko, and O. Radmark. 1991. Characterization of the promoter of the human 5-lipoxygenase gene. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 21A:1-8.
- Sashital, D.G., and S.E. Butcher. 2006. Flipping off the riboswitch: RNA structures that control gene expression. *ACS Chem Biol*. 1:341-345.
- Schnappinger, D., P. Schubert, C. Berens, K. Pfeleiderer, and W. Hillen. 1999. Solvent-exposed residues in the Tet repressor (TetR) four-helix bundle contribute to subunit recognition and dimer stability. *J Biol Chem*. 274:6405-6410.
- Schnappinger, D., P. Schubert, K. Pfeleiderer, and W. Hillen. 1998. Determinants of protein-protein recognition by four helix bundles: changing the dimerization specificity of Tet repressor. *EMBO J*. 17:535-543.
- Scholz, O., M. Kostner, M. Reich, S. Gastiger, and W. Hillen. 2003. Teaching TetR to recognize a new inducer. *J Mol Biol*. 329:217-227.
- Scholz, O., P. Schubert, M. Kintrup, and W. Hillen. 2000. Tet repressor induction without Mg²⁺. *Biochemistry*. 39:10914-10920.
- Schwarz, D.S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P.D. Zamore. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 115:199-208.
- Sealfon, S.C., and T.T. Chu. 2011. RNA and DNA microarrays. *Methods Mol Biol*. 671:3-34.
- Seet, B.T., I. Dikic, M.M. Zhou, and T. Pawson. 2006. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:473-483.
- Sethupathy, P., and F.S. Collins. 2008. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet*. 24:489-497.
- Seuter, S., B.L. Sorg, and D. Steinhilber. 2006. The coding sequence mediates induction of 5-lipoxygenase expression by Smads3/4. *Biochem Biophys Res Commun*. 348:1403-1410.

- Sevilimedu, A., H. Shi, and J.T. Lis. 2008. TFIIB aptamers inhibit transcription by perturbing PIC formation at distinct stages. *Nucleic Acids Res.* 36:3118-3127.
- Shanmugam, N., M.A. Reddy, and R. Natarajan. 2008. Distinct roles of heterogeneous nuclear ribonuclear protein K and microRNA-16 in cyclooxygenase-2 RNA stability induced by S100b, a ligand of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 283:36221-36233.
- Shao, M., S. Rossi, B. Chelladurai, M. Shimizu, O. Ntukogu, M. Ivan, G.A. Calin, and D. Matei. 2011. PDGF induced microRNA alterations in cancer cells. *Nucleic Acids Res.*
- Shi, H., X. Fan, A. Sevilimedu, and J.T. Lis. 2007. RNA aptamers directed to discrete functional sites on a single protein structural domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3742-3746.
- Shilatifard, A. 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem.* 75:243-269.
- Shiman, R., and D.E. Draper. 2000. Stabilization of RNA tertiary structure by monovalent cations. *J Mol Biol.* 302:79-91.
- Shin, V.Y., H. Jin, E.K. Ng, A.S. Cheng, W.W. Chong, C.Y. Wong, W.K. Leung, J.J. Sung, and K.M. Chu. 2011. NF-kappaB targets miR-16 and miR-21 in gastric cancer: involvement of prostaglandin E receptors. *Carcinogenesis.* 32:240-245.
- Sigler, A., P. Schubert, W. Hillen, and M. Niederweis. 2000. Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and Escherichia coli. *Eur J Biochem.* 267:527-534.
- Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 69:145-182.
- Soutourina, J., S. Wydau, Y. Ambroise, C. Boschiero, and M. Werner. 2011. Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription in vivo. *Science.* 331:1451-1454.
- Spanbroek, R., R. Grabner, K. Lotzer, M. Hildner, A. Urbach, K. Ruhling, M.P. Moos, B. Kaiser, T.U. Cohnert, T. Wahlers, A. Zieske, G. Plenz, H. Robenek, P. Salbach, H. Kuhn, O. Radmark, B. Samuelsson, and A.J. Habenicht. 2003. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:1238-1243.
- Steber, M. 2006. Regulation genetischer Aktivität durch RNA-Moleküle: Das TetR bindende Aptamer. *Diplomarbeit* Universität Erlangen-Nürnberg.
- Steinhilber, D. 1994. 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm Acta Helv.* 69:3-14.
- Sterner, D.E., and S.L. Berger. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:435-459.
- Stoffers, K.L., B.L. Sorg, S. Seuter, O. Rau, O. Radmark, and D. Steinhilber. 2010. Calcitriol upregulates open chromatin and elongation markers at functional vitamin D response elements in the distal part of the 5-lipoxygenase gene. *J Mol Biol.* 395:884-896.
- Strillacci, A., C. Griffoni, P. Sansone, P. Paterini, G. Piazzini, G. Lazzarini, E. Spisni, M.A. Pantaleo, G. Biasco, and V. Tomasi. 2009. MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Exp Cell Res.* 315:1439-1447.
- Stulke, J., I. Martin-Verstraete, M. ZAGOrec, M. Rose, A. Klier, and G. Rapoport. 1997. Induction of the Bacillus subtilis ptsGHI operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol Microbiol.* 25:65-78.

- Sureban, S.M., N. Murmu, P. Rodriguez, R. May, R. Maheshwari, B.K. Dieckgraefe, C.W. Houchen, and S. Anant. 2007. Functional antagonism between RNA binding proteins HuR and CUGBP2 determines the fate of COX-2 mRNA translation. *Gastroenterology*. 132:1055-1065.
- Takahashi, M., L. Altschmied, and W. Hillen. 1986. Kinetic and equilibrium characterization of the Tet repressor-tetracycline complex by fluorescence measurements. Evidence for divalent metal ion requirement and energy transfer. *J Mol Biol*. 187:341-348.
- Takahashi, T., K. Tada, and H. Mihara. 2009. RNA aptamers selected against amyloid beta-peptide (Abeta) inhibit the aggregation of Abeta. *Mol Biosyst*. 5:986-991.
- Tanabe, T., and N. Tohnai. 2002. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 68-69:95-114.
- Thomas, M., S. Chedin, C. Carles, M. Riva, M. Famulok, and A. Sentenac. 1997. Selective targeting and inhibition of yeast RNA polymerase II by RNA aptamers. *J Biol Chem*. 272:27980-27986.
- Thore, S., C. Frick, and N. Ban. 2008. Structural basis of thiamine pyrophosphate analogues binding to the eukaryotic riboswitch. *J Am Chem Soc*. 130:8116-8117.
- Thore, S., M. Leibundgut, and N. Ban. 2006. Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science*. 312:1208-1211.
- Tiebel, B., L.M. Aung-Hilbrich, D. Schnappinger, and W. Hillen. 1998. Conformational changes necessary for gene regulation by Tet repressor assayed by reversible disulfide bond formation. *EMBO J*. 17:5112-5119.
- Tiebel, B., K. Garke, and W. Hillen. 2000. Observing conformational and activity changes of tet repressor in vivo. *Nat Struct Biol*. 7:479-481.
- Tiebel, B. 1998. Analyse struktureller Änderungen am Tetracyclin Repressor. *Dissertation* Universität Erlangen-Nürnberg.
- Tili, E., J.J. Michaille, D. Wernicke, H. Alder, S. Costinean, S. Volinia, and C.M. Croce. 2011. Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:4908-4913.
- Tinoco, I., Jr., and C. Bustamante. 1999. How RNA folds. *J Mol Biol*. 293:271-281.
- Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini. 2007. Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomol Eng*. 24:191-200.
- Tuerk, C., P. Gauss, C. Thermes, D.R. Groebe, M. Gayle, N. Guild, G. Stormo, Y. d'Aubenton-Carafa, O.C. Uhlenbeck, I. Tinoco, Jr., and et al. 1988. CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:1364-1368.
- Tuerk, C., and L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 249:505-510.
- Tuschl, T. 2001. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem*. 2:239-245.
- Uhl, J., N. Klan, M. Rose, K.D. Entian, O. Werz, and D. Steinhilber. 2002. The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. *J Biol Chem*. 277:4374-4379.
- Uhl, J., N. Klan, M. Rose, K.D. Entian, O. Werz, and D. Steinhilber. 2003. DNA methylation regulates 5-lipoxygenase promoter activity. *Adv Exp Med Biol*. 525:169-172.
- Valencia-Sanchez, M.A., J. Liu, G.J. Hannon, and R. Parker. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*. 20:515-524.
- van Kuppeveld, F.J., K.E. Johansson, J.M. Galama, J. Kissing, G. Bolske, J.T. van der Logt, and W.J. Melchers. 1994. Detection of mycoplasma contamination in cell

- cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Appl Environ Microbiol.* 60:149-152.
- Vater, A., F. Jarosch, K. Buchner, and S. Klussmann. 2003. Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res.* 31:e130.
- Vater, A., and S. Klussmann. 2003. Toward third-generation aptamers: Spiegelmers and their therapeutic prospects. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 6:253-261.
- Viegas, S.C., and C.M. Arraiano. 2008. Regulating the regulators: How ribonucleases dictate the rules in the control of small non-coding RNAs. *RNA Biol.* 5:230-243.
- Vogel, J., and E.G. Wagner. 2007. Target identification of small noncoding RNAs in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 10:262-270.
- von Hippel, P.H., W.A. Rees, and K.S. Wilson. 1995. RNA interactions in the regulation of transcription. *Nucleic Acids Symp Ser:*1-4.
- Wachter, A. 2010. Riboswitch-mediated control of gene expression in eukaryotes. *RNA Biol.* 7:67-76.
- Waldminghaus, T., N. Heidrich, S. Brantl, and F. Narberhaus. 2007. FourU: a novel type of RNA thermometer in Salmonella. *Mol Microbiol.* 65:413-424.
- Wang, D., and R.N. Dubois. 2010. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 10:181-193.
- Wang, L.H., A. Hajibeigi, X.M. Xu, D. Loose-Mitchell, and K.K. Wu. 1993. Characterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 190:406-411.
- Weigand, J.E., and B. Suess. 2009. Aptamers and riboswitches: perspectives in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85:229-236.
- Weiss, T.C., G.G. Zhai, and P.J. Romaniuk. 2010. An RNA aptamer with high affinity and high specificity for the 5S RNA binding zinc finger proteins TFIIIA and p43. *Biochemistry.* 49:1755-1765.
- Williams, C.S., M. Mann, and R.N. DuBois. 1999. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene.* 18:7908-7916.
- Wu, W.K., J.J. Sung, C.W. Lee, J. Yu, and C.H. Cho. 2010. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. *Cancer Lett.* 295:7-16.
- Xu, X.M., J.L. Tang, X. Chen, L.H. Wang, and K.K. Wu. 1997. Involvement of two Sp1 elements in basal endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J Biol Chem.* 272:6943-6950.
- Yang, C., Y. Wang, J.L. Marty, and X. Yang. 2011a. Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator. *Biosens Bioelectron.* 26:2724-2727.
- Yang, J.S., M.D. Phillips, D. Betel, P. Mu, A. Ventura, A.C. Siepel, K.C. Chen, and E.C. Lai. 2011b. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA.* 17:312-326.
- Yang, X., T. Bing, H. Mei, C. Fang, Z. Cao, and D. Shangguan. 2011c. Characterization and application of a DNA aptamer binding to L-tryptophan. *Analyst.* 136:577-585.
- Yang, X., N. Li, and D.G. Gorenstein. 2011d. Strategies for the discovery of therapeutic Aptamers. *Expert Opin Drug Discov.* 6:75-87.
- Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara, and B.R. Cullen. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17:3011-3016.
- Young, L.E., and D.A. Dixon. 2010. Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase 2 Expression in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 6:60-67.

- Yuan, C., C.J. Rieke, G. Rimon, B.A. Wingerd, and W.L. Smith. 2006. Partnering between monomers of cyclooxygenase-2 homodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:6142-6147.
- Zomer, A., T. Vendrig, E.S. Hopmans, M. van Eijndhoven, J.M. Middeldorp, and D.M. Pegtel. 2010. Exosomes: Fit to deliver small RNA. *Commun Integr Biol.* 3:447-450.

7 Anhang

7.1 Rohdaten der miRNA-Microarrayexpressionsanalyse

Tab. 7.1 Expression humaner miRNAs in unterschiedlichen Zellen

| miRNA | MM6 undiff. | MM6 undiff. | MM6 diff. | MM6 diff. | U937 | HeLa | HFF | HFF + CMV |
|----------------|-------------|-------------|-----------|-----------|--------|--------|--------|-----------|
| hsa-miR-20a | 513,19 | 489,07 | 456,63 | 424,46 | 199,18 | 48,33 | 4,25 | 4,16 |
| hsa-miR-19b | 358,37 | 338,82 | 346,58 | 320,39 | 211,38 | 64,16 | 7,02 | 7,30 |
| hsa-miR-923 | 273,63 | 305,97 | 179,05 | 274,63 | 250,78 | 98,93 | 39,61 | 49,09 |
| hsa-miR-720 | 238,55 | 233,18 | 242,99 | 205,26 | 201,68 | 189,77 | 395,93 | 310,09 |
| hsa-miR-17 | 173,63 | 147,21 | 149,45 | 127,58 | 62,72 | 19,42 | 1,87 | 1,86 |
| hsa-miR-223 | 148,01 | 134,00 | 155,82 | 124,91 | 90,20 | 0,02 | 0,03 | 0,02 |
| hsa-miR-15b | 129,31 | 102,52 | 117,66 | 99,00 | 115,17 | 37,23 | 21,61 | 23,64 |
| hsa-miR-16 | 120,43 | 124,75 | 124,24 | 117,16 | 146,13 | 30,83 | 18,57 | 22,48 |
| hsa-miR-21 | 94,75 | 88,24 | 99,61 | 95,45 | 86,90 | 288,80 | 145,02 | 118,48 |
| hsa-miR-19a | 90,37 | 72,75 | 76,94 | 77,48 | 55,25 | 11,50 | 1,32 | 1,31 |
| hsa-miR-27a | 83,81 | 76,70 | 68,17 | 73,78 | 60,41 | 49,89 | 100,85 | 67,79 |
| hsa-miR-92a | 72,84 | 60,53 | 65,61 | 54,38 | 21,14 | 9,91 | 1,21 | 1,30 |
| hsa-miR-1274b | 52,99 | 52,57 | 58,65 | 50,13 | 60,12 | 41,64 | 53,71 | 61,82 |
| hsa-let-7f | 47,11 | 43,31 | 41,58 | 46,83 | 32,15 | 20,78 | 18,05 | 32,87 |
| hsa-let-7a | 45,10 | 40,08 | 42,01 | 38,77 | 21,84 | 61,16 | 59,19 | 87,42 |
| hsa-miR-24 | 42,49 | 30,07 | 33,66 | 29,13 | 26,42 | 30,01 | 49,67 | 44,90 |
| hsa-miR-142-3p | 40,28 | 39,14 | 40,48 | 48,33 | 22,26 | 0,01 | 0,02 | 0,01 |
| hsa-miR-20b | 39,52 | 31,02 | 30,09 | 31,27 | 8,95 | 2,40 | 0,20 | 0,26 |
| hsa-miR-29a | 39,32 | 36,46 | 13,72 | 33,76 | 25,68 | 29,91 | 198,52 | 125,72 |
| hsa-let-7g | 35,37 | 29,98 | 30,80 | 29,97 | 36,62 | 15,86 | 9,20 | 13,87 |
| hsa-miR-23a | 34,56 | 30,27 | 31,46 | 29,85 | 23,30 | 30,69 | 39,30 | 37,78 |
| hsa-let-7i | 32,90 | 30,18 | 29,38 | 28,21 | 25,39 | 94,27 | 30,62 | 39,23 |
| hsa-miR-106b | 26,00 | 23,44 | 23,25 | 21,37 | 40,25 | 17,07 | 4,38 | 3,76 |
| hsa-miR-103 | 25,67 | 19,66 | 21,38 | 20,18 | 14,52 | 3,68 | 5,33 | 7,00 |
| hsa-miR-155 | 24,56 | 26,38 | 16,45 | 23,83 | 11,13 | 0,56 | 0,67 | 1,29 |
| hsa-miR-124 | 20,63 | 13,58 | 9,68 | 13,28 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 |
| hsa-let-7d | 20,57 | 14,69 | 15,82 | 14,14 | 13,73 | 6,82 | 5,02 | 9,25 |
| hsa-miR-210 | 19,74 | 15,86 | 12,99 | 14,25 | 10,20 | 1,71 | 4,35 | 4,32 |
| hsa-miR-15a | 19,00 | 19,79 | 21,74 | 20,65 | 45,83 | 7,07 | 6,97 | 6,44 |
| hsa-miR-107 | 17,69 | 13,50 | 15,79 | 14,35 | 9,34 | 3,34 | 3,61 | 4,32 |
| hsa-miR-1246 | 17,25 | 24,13 | 15,44 | 22,45 | 1,82 | 2,24 | 0,12 | 0,18 |
| hsa-miR-18a | 14,16 | 9,23 | 9,96 | 9,15 | 10,51 | 1,59 | 0,24 | 0,26 |
| hsa-miR-17* | 13,31 | 9,03 | 10,05 | 9,22 | 3,20 | 1,20 | 0,13 | 0,13 |
| hsa-miR-425 | 11,13 | 10,00 | 11,39 | 9,75 | 5,66 | 1,27 | 0,36 | 0,45 |
| hsa-miR-1274a | 8,53 | 7,36 | 6,22 | 7,61 | 6,01 | 5,34 | 6,37 | 9,11 |
| hsa-miR-320d | 8,19 | 5,94 | 6,33 | 5,34 | 9,19 | 12,12 | 4,19 | 4,65 |
| hsa-miR-25 | 8,12 | 6,42 | 7,25 | 6,56 | 20,92 | 6,98 | 2,36 | 3,88 |
| hsa-miR-93 | 7,96 | 5,38 | 6,85 | 4,96 | 10,23 | 4,89 | 1,84 | 2,40 |
| hsa-miR-142-5p | 6,63 | 6,57 | 6,27 | 6,78 | 3,88 | -0,02 | -0,01 | -0,01 |

Anhang

| | | | | | | | | |
|-----------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| hsa-miR-494 | 6,62 | 12,42 | 2,09 | 10,99 | 5,03 | 2,99 | 1,10 | 1,05 |
| hsa-miR-301a | 6,03 | 5,79 | 6,01 | 6,84 | 0,96 | 1,47 | 0,38 | 0,43 |
| hsa-let-7e | 6,00 | 5,40 | 10,09 | 5,10 | 2,58 | 12,69 | 10,15 | 19,89 |
| hsa-miR-29c | 5,93 | 4,23 | 5,39 | 4,26 | 13,04 | 1,77 | 6,93 | 5,02 |
| hsa-miR-342-3p | 5,82 | 4,23 | 5,53 | 4,30 | 4,56 | 0,98 | 0,58 | 0,87 |
| hsa-miR-320c | 5,76 | 4,71 | 4,69 | 4,02 | 5,27 | 7,18 | 2,43 | 2,42 |
| hsa-miR-1260 | 5,40 | 4,82 | 5,71 | 4,41 | 5,66 | 5,73 | 16,16 | 10,90 |
| hsa-miR-29b | 5,38 | 5,16 | 1,54 | 6,48 | 3,12 | 4,57 | 20,47 | 18,46 |
| hsa-miR-196b | 5,17 | 3,90 | 6,91 | 3,61 | 6,66 | 0,58 | 2,63 | 2,60 |
| hsa-miR-27b | 4,89 | 4,09 | 3,97 | 4,17 | 5,31 | 9,83 | 20,42 | 15,43 |
| hsa-miR-320b | 4,87 | 3,45 | 3,73 | 3,10 | 5,73 | 8,41 | 3,33 | 3,78 |
| hsa-miR-886-3p | 4,79 | 5,20 | 1,68 | 5,19 | 0,01 | 39,19 | 11,10 | 12,02 |
| hsa-miR-130b | 4,71 | 3,32 | 2,81 | 3,11 | 7,89 | 2,29 | 1,92 | 2,12 |
| hsa-miR-361-5p | 4,70 | 3,90 | 4,07 | 3,83 | 3,47 | 1,66 | 1,07 | 1,13 |
| hsa-miR-26b | 4,30 | 4,24 | 5,12 | 4,40 | 1,69 | 1,09 | 0,92 | 1,16 |
| hsa-miR-30b | 4,29 | 3,07 | 3,94 | 3,63 | 2,66 | 1,98 | 1,00 | 1,07 |
| hsa-miR-18b | 3,80 | 2,56 | 2,86 | 2,68 | 2,80 | 0,45 | 0,07 | 0,07 |
| hsa-miR-30d | 3,35 | 3,14 | 3,27 | 3,22 | 1,95 | 1,85 | 0,75 | 0,63 |
| hsa-miR-181a | 3,34 | 3,68 | 5,37 | 3,45 | 0,89 | 2,32 | 0,35 | 0,38 |
| hsa-miR-1225-5p | 3,00 | 3,71 | 2,25 | 3,47 | 1,43 | 1,00 | 1,48 | 0,48 |
| hsa-miR-188-5p | 2,86 | 2,64 | 2,06 | 2,25 | 0,23 | 0,46 | 0,31 | 0,17 |
| hsa-miR-324-5p | 2,76 | 2,06 | 2,29 | 1,94 | 1,77 | 1,56 | 1,20 | 1,29 |
| hsa-miR-1207-5p | 2,58 | 3,05 | 2,29 | 2,72 | 2,19 | 1,35 | 1,97 | 0,46 |
| hsa-miR-23b | 2,28 | 2,05 | 2,16 | 1,93 | 1,72 | 5,26 | 7,93 | 8,06 |
| hsa-miR-148a | 2,22 | 1,44 | 2,03 | 1,50 | 5,74 | 0,08 | 0,09 | 0,15 |
| hsa-miR-19b-1* | 2,10 | 1,47 | 2,14 | 1,52 | 0,68 | 0,30 | 0,03 | 0,02 |
| hsa-miR-199b-5p | 2,10 | 1,45 | 1,96 | 1,57 | 2,49 | 0,01 | 1,69 | 1,22 |
| hsa-miR-590-5p | 2,09 | 1,82 | 1,75 | 1,94 | 3,23 | 1,34 | 0,71 | 0,66 |
| hsa-miR-1308 | 1,98 | 1,76 | 1,26 | 1,32 | 0,51 | 1,50 | 3,47 | 2,51 |
| hsa-miR-30e | 1,97 | 2,20 | 2,21 | 2,26 | 2,75 | 1,21 | 0,48 | 0,38 |
| hsa-miR-1202 | 1,88 | 2,31 | 1,54 | 2,24 | 1,39 | 1,28 | 1,00 | 0,60 |
| hsa-miR-221 | 1,86 | 1,36 | 1,10 | 1,69 | 0,82 | 0,20 | 4,65 | 3,83 |
| hsa-let-7b | 1,73 | 1,66 | 1,94 | 1,50 | 0,18 | 77,33 | 70,25 | 76,32 |
| hsa-miR-1275 | 1,71 | 1,79 | 0,81 | 1,53 | 0,87 | 0,66 | 0,56 | 0,79 |
| hsa-miR-193a-3p | 1,69 | 1,27 | 0,94 | 0,98 | 1,00 | 1,32 | 7,45 | 5,59 |
| hsa-miR-199a-3p | 1,69 | 1,12 | 1,62 | 1,16 | 2,03 | 0,00 | 24,76 | 20,32 |
| hsa-miR-324-3p | 1,69 | 1,23 | 1,66 | 1,13 | 1,68 | 1,61 | 1,55 | 1,30 |
| hsa-miR-630 | 1,67 | 1,81 | 1,78 | 1,62 | 0,27 | 0,67 | 0,11 | 0,09 |
| hsa-miR-98 | 1,44 | 1,18 | 1,11 | 1,41 | 1,20 | 0,46 | 0,37 | 0,69 |
| hsa-miR-331-3p | 1,23 | 1,04 | 1,37 | 1,04 | 2,66 | 1,26 | 3,09 | 3,04 |
| hsa-miR-22 | 1,20 | 1,50 | 5,10 | 1,52 | 1,73 | 16,64 | 76,14 | 59,80 |
| hsa-miR-638 | 1,20 | 1,81 | 0,92 | 1,62 | 1,27 | 0,64 | 0,46 | 0,19 |
| hsa-miR-660 | 1,16 | 0,97 | 1,00 | 1,03 | 1,88 | 0,17 | 0,15 | 0,36 |
| hsa-miR-140-5p | 1,10 | 1,20 | 1,51 | 1,33 | 1,99 | 0,63 | 0,92 | 1,07 |
| hsa-miR-101 | 1,08 | 0,96 | 1,21 | 1,10 | 1,29 | 0,74 | 0,23 | 0,24 |
| hsa-miR-320a | 1,06 | 0,82 | 0,81 | 0,75 | 1,26 | 2,05 | 0,88 | 1,03 |
| hsa-miR-125a-5p | 1,00 | 1,04 | 1,47 | 1,01 | 0,59 | 1,68 | 3,83 | 3,53 |
| hsa-miR-362-5p | 0,91 | 0,76 | 0,68 | 0,72 | 2,08 | 0,23 | 0,11 | 0,23 |

Anhang

| | | | | | | | | |
|-----------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| hsa-miR-20a* | 0,87 | 1,00 | 1,06 | 1,29 | 0,23 | 0,10 | 0,01 | 0,00 |
| hsa-miR-26a | 0,86 | 0,97 | 1,42 | 0,97 | 1,66 | 1,61 | 2,00 | 1,91 |
| hsa-miR-1915 | 0,86 | 1,12 | 0,72 | 1,00 | 0,88 | 0,42 | 6,18 | 1,00 |
| hsa-let-7c | 0,80 | 0,75 | 0,66 | 0,74 | 0,07 | 10,39 | 4,55 | 5,06 |
| hsa-miR-28-5p | 0,80 | 0,86 | 1,04 | 0,88 | 0,90 | 0,73 | 0,75 | 0,85 |
| hsa-miR-532-5p | 0,78 | 0,64 | 0,65 | 0,61 | 1,72 | 0,28 | 0,14 | 0,39 |
| hsa-miR-181b | 0,73 | 0,75 | 0,87 | 0,67 | 0,36 | 1,12 | 0,14 | 0,16 |
| hsa-miR-1268 | 0,72 | 1,03 | 0,50 | 0,89 | 2,14 | 0,54 | 0,29 | 0,13 |
| hsa-miR-99a | 0,71 | 0,72 | 0,43 | 0,61 | -0,01 | 6,26 | 0,71 | 0,70 |
| hsa-miR-374a | 0,68 | 0,56 | 0,63 | 0,59 | 1,55 | 0,61 | 0,55 | 0,55 |
| hsa-miR-140-3p | 0,67 | 0,67 | 0,74 | 0,62 | 1,04 | 0,38 | 0,37 | 0,39 |
| hsa-miR-338-3p | 0,67 | 0,64 | 1,17 | 0,75 | 0,11 | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| hsa-miR-1280 | 0,65 | 0,59 | 0,57 | 0,60 | 0,78 | 0,48 | 1,10 | 0,78 |
| hsa-miR-574-3p | 0,63 | 0,34 | 0,51 | 0,31 | 0,27 | 0,21 | 0,60 | 0,37 |
| hsa-miR-181c | 0,63 | 0,55 | 0,88 | 0,53 | 0,02 | 0,07 | 0,08 | 0,08 |
| hsa-miR-575 | 0,63 | 0,70 | 0,39 | 0,67 | 0,35 | 0,54 | 0,24 | 0,22 |
| hsa-miR-181c* | 0,61 | 0,43 | 0,75 | 0,44 | 0,02 | 0,06 | 0,09 | 0,11 |
| hsa-miR-185 | 0,60 | 0,50 | 0,63 | 0,45 | 1,64 | 0,46 | 0,64 | 0,81 |
| hsa-miR-92a-1* | 0,60 | 0,46 | 0,73 | 0,41 | 0,17 | 0,09 | 0,00 | 0,01 |
| hsa-miR-148b | 0,58 | 0,47 | 0,51 | 0,52 | 0,25 | 0,44 | 0,30 | 0,31 |
| hsa-miR-195 | 0,56 | 0,60 | 0,63 | 0,62 | 0,04 | 0,30 | 0,16 | 0,18 |
| hsa-miR-221* | 0,51 | 0,45 | 0,35 | 0,51 | 0,38 | 0,06 | 0,95 | 0,99 |
| hsa-miR-374b | 0,50 | 0,34 | 0,31 | 0,29 | 1,16 | 0,39 | 0,37 | 0,42 |
| hsa-miR-30c | 0,49 | 0,60 | 0,62 | 0,69 | 0,76 | 0,77 | 0,39 | 0,35 |
| hsa-miR-663 | 0,48 | 0,81 | 0,24 | 0,75 | 0,16 | 0,13 | 0,11 | 0,03 |
| hsa-miR-128 | 0,47 | 0,39 | 0,45 | 0,42 | 0,67 | 0,25 | 0,29 | 0,35 |
| hsa-miR-574-5p | 0,45 | 0,31 | 0,42 | 0,27 | 0,32 | 0,60 | 0,89 | 0,71 |
| hsa-miR-146b-5p | 0,45 | 0,47 | 0,42 | 0,49 | 0,04 | 0,00 | 0,02 | 0,03 |
| hsa-miR-378 | 0,44 | 0,42 | 0,79 | 0,45 | 0,56 | 0,20 | -0,01 | 0,00 |
| hsa-miR-378* | 0,39 | 0,35 | 0,67 | 0,33 | 0,42 | 0,13 | -0,01 | 0,00 |
| hsa-miR-424 | 0,39 | 0,43 | 0,23 | 0,46 | 3,19 | 0,83 | 2,97 | 2,57 |
| hsa-miR-365 | 0,37 | 0,31 | 0,24 | 0,34 | 0,22 | 1,26 | 2,10 | 1,95 |
| hsa-miR-1181 | 0,37 | 0,35 | 0,21 | 0,32 | 0,03 | 0,09 | 0,80 | 0,17 |
| hsa-miR-769-5p | 0,37 | 0,28 | 0,42 | 0,28 | 1,10 | 0,18 | 0,28 | 0,23 |
| hsa-miR-222 | 0,34 | 0,28 | 0,20 | 0,27 | 0,26 | 0,10 | 0,53 | 0,63 |
| hsa-miR-99b | 0,32 | 0,29 | 0,63 | 0,26 | 0,16 | 1,35 | 0,92 | 1,28 |
| hsa-miR-193a-5p | 0,27 | 0,20 | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,20 | 1,66 | 1,05 |
| hsa-miR-125b | 0,26 | 0,33 | 0,25 | 0,30 | 0,00 | 6,38 | 41,59 | 36,79 |
| hsa-miR-21* | 0,24 | 0,13 | 0,36 | 0,13 | 0,26 | 2,40 | 1,01 | 0,34 |
| hsa-miR-34a | 0,22 | 0,12 | 0,24 | 0,12 | 0,17 | 7,77 | 18,77 | 16,88 |
| hsa-miR-152 | 0,21 | 0,24 | 0,20 | 0,23 | 0,00 | 0,13 | 0,54 | 0,62 |
| hsa-miR-29b-1* | 0,14 | 0,12 | 0,07 | 0,13 | 0,10 | 0,30 | 1,14 | 0,68 |
| hsa-miR-9* | 0,14 | 0,06 | 0,23 | 0,07 | 1,57 | 0,00 | -0,02 | 0,00 |
| hsa-miR-24-1* | 0,08 | 0,06 | 0,08 | 0,07 | 0,11 | 0,23 | 0,69 | 0,52 |
| hsa-miR-30a | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,04 | 7,79 | 2,51 | 1,99 |
| hsa-miR-96 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,07 | 0,89 | 1,22 | 0,01 | 0,15 |
| hsa-miR-582-5p | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,07 | 0,60 | 1,87 | 0,01 | 0,00 |
| hsa-miR-132 | 0,05 | 0,04 | 0,05 | 0,04 | 0,08 | 0,31 | 0,32 | 0,83 |

Anhang

| | | | | | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| hsa-miR-183 | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,55 | 0,67 | 0,00 | 0,06 |
| hsa-miR-455-3p | 0,03 | 0,01 | 0,04 | 0,01 | 0,62 | 0,44 | 2,19 | 1,62 |
| hsa-miR-130a | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | -0,01 | 4,53 | 11,25 | 10,81 |
| hsa-miR-409-3p | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,04 | 1,22 | 1,63 |
| hsa-miR-100 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,02 | 0,03 | 14,81 | 36,73 | 37,63 |
| hsa-miR-145 | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 1,32 | 0,90 |
| hsa-miR-299-5p | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,85 | 1,21 |
| hsa-miR-654-3p | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,94 | 0,84 |
| hsa-miR-151-5p | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 4,48 | 3,20 | 3,51 |
| hsa-miR-487b | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,04 | 1,04 | 1,16 |
| hsa-miR-193b | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,14 | 6,25 | 4,06 | 3,39 |
| hsa-miR-758 | 0,00 | 0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,58 | 0,57 |
| hsa-miR-136 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,99 | 0,84 |
| hsa-miR-127-3p | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,04 | 2,00 | 2,02 |
| hsa-miR-431 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,59 | 0,75 |
| hsa-miR-196a | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,54 | 2,90 | 0,99 | 1,79 |
| hsa-miR-10a | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,02 | 0,72 | 0,16 | 0,16 |
| hsa-miR-337-5p | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,86 | 0,76 |
| hsa-miR-199a-5p | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 6,24 | 3,66 |
| hsa-miR-493* | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,52 | 0,66 |
| hsa-miR-34b* | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,07 | 0,99 | 0,85 |
| hsa-miR-224 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,46 | 0,41 | 0,59 |
| hsa-miR-218 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,02 | 0,71 | 0,83 |
| hsa-miR-214 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 4,28 | 3,70 |
| hsa-miR-151-3p | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,89 | 0,72 | 0,86 |
| hsa-miR-31* | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 6,21 | 5,27 | 4,42 |
| hsa-miR-381 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,05 | 1,17 | 1,01 |
| hsa-miR-410 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,05 | 0,98 | 0,94 |
| hsa-miR-377 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 1,70 | 1,56 |
| hsa-miR-299-3p | -0,01 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,02 | 0,52 | 0,69 |
| hsa-miR-376a | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,04 | 1,56 | 1,92 |
| hsa-miR-432 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,40 | 0,65 |
| hsa-miR-379 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | 0,03 | 0,62 | 0,85 |
| hsa-miR-30a* | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,02 | 1,01 | 0,61 | 0,50 |
| hsa-miR-376c | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,11 | 3,22 | 3,43 |
| hsa-miR-31 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,01 | 5,33 | 3,69 | 4,08 |

7.2 SignificanceScoreAssignment des 3'-UTR der COX-2 mRNA

Tab. 7.2 SignificanceScore-Berechnung des COX-2 3'-UTR.

| Nr. | Hexamer | Score | Nr. | Hexamer | Score |
|-----|---------|--------|------|---------|---------|
| 1 | AGUCUA | 0,769 | 1269 | UUUUGC | -1,155 |
| 2 | GUCUAA | 0,000 | 1270 | UUUGCU | -1,124 |
| 3 | UCUAAU | -0,611 | 1271 | UUGCUA | 0,075 |
| 4 | CUAAUG | -0,020 | 1272 | UGC UAA | -0,095 |
| 5 | UAAUGA | 0,436 | 1273 | GCUAAG | 0,021 |
| 6 | AAUGAU | 0,364 | 1274 | CUAAGA | 0,099 |
| 7 | AUGAUC | 0,616 | 1275 | UAAGAG | -0,018 |
| 8 | UGAUCA | 1,768 | 1276 | AAGAGA | 1,675 |
| 9 | GAUCAU | 2,148 | 1277 | AGAGAC | 0,527 |
| 10 | AUCAUA | 2,290 | 1278 | GAGACA | 0,194 |
| 11 | UCAUAU | 0,100 | 1279 | AGACAC | 0,128 |
| 12 | CAUAUU | 0,697 | 1280 | GACACA | 1,376 |
| 13 | AUAUUU | -2,909 | 1281 | ACACAG | 1,515 |
| 14 | UAUUUA | -5,869 | 1282 | CACAGU | -1,505 |
| 15 | AUUUAU | -5,242 | 1283 | ACAGUC | 0,124 |
| 16 | UUUAUU | -5,422 | 1284 | CAGUCU | 0,047 |
| 17 | UUAUUU | -2,159 | 1285 | AGUCUU | -0,360 |
| 18 | UAUUUA | -5,869 | 1286 | GUCUUC | -0,083 |
| 19 | AUUUAU | -5,242 | 1287 | UCUUCU | 4,446 |
| 20 | UUUAUU | -5,422 | 1288 | CUUCUC | 0,739 |
| 21 | UUAUUU | -2,159 | 1289 | UUCUCA | 0,000 |
| 22 | UAUUUA | -5,869 | 1290 | UCUCAU | 1,498 |
| 23 | AUUUAU | -5,242 | 1291 | CUCAUC | -0,177 |
| 24 | UUUAUA | -3,054 | 1292 | UCAUCA | 3,674 |
| 25 | UUAUAU | -1,740 | 1293 | CAUCAC | 1,116 |
| 26 | UAUAUG | -0,962 | 1294 | AUCACU | 0,000 |
| 27 | AUAUGA | 0,000 | 1295 | UCACUU | -0,717 |
| 28 | UAUGAA | -0,642 | 1296 | CACUUC | 0,817 |
| 29 | AUGAAC | -0,037 | 1297 | ACUUCG | -0,095 |
| 30 | UGAACC | -0,298 | 1298 | CUUCGU | -0,348 |
| 31 | GAACCA | 0,832 | 1299 | UUCGUU | -0,431 |
| 32 | AACCAU | 0,857 | 1300 | UCGUUU | -0,883 |
| 33 | ACCAUG | 0,154 | 1301 | CGUUUC | -0,031 |
| 34 | CCAUGU | 0,333 | 1302 | GUUUCU | -1,103 |
| 35 | CAUGUC | 0,573 | 1303 | UUUCUC | -0,098 |
| 36 | AUGUCU | -0,183 | 1304 | UUCUCC | -0,028 |
| 37 | UGUCUA | 0,870 | 1305 | UCUCCU | 1,374 |
| 38 | GUCUAU | 0,709 | 1306 | CUCCUA | 0,811 |
| 39 | UCUAUU | 0,000 | 1307 | UCCUAU | 0,341 |
| 40 | CUAUUA | 1,411 | 1308 | CCUAUU | 1,137 |
| 41 | UAUUAA | -0,124 | 1309 | CUAUUU | -0,537 |
| 42 | AUUAAU | -0,246 | 1310 | UAUUUU | -2,715 |
| 43 | UUAAUU | -2,928 | 1311 | AUUUUG | -3,239 |
| 44 | UAAUUU | -3,495 | 1312 | UUUUGU | -10,505 |
| 45 | AAUUUA | -1,375 | 1313 | UUUGUU | -14,295 |
| 46 | AUUUAA | -0,615 | 1314 | UUGUUU | -14,795 |
| 47 | UUUAAU | -4,746 | 1315 | UGUUUU | -6,801 |
| 48 | UUAAUU | -2,928 | 1316 | GUUUUA | -3,012 |
| 49 | UAAUUA | 0,580 | 1317 | UUUUAC | -1,935 |
| 50 | AAUUAU | 0,331 | 1318 | UUUACU | -0,044 |
| 51 | AUUUAU | 0,410 | 1319 | UUACUA | -0,215 |
| 52 | UUUUUU | -2,159 | 1320 | UACUAG | 0,026 |
| 53 | UAUUUA | -5,869 | 1321 | ACUAGU | 0,049 |
| 54 | AUUUAA | -0,615 | 1322 | CUAGUU | -0,194 |
| 55 | UUUAAU | -4,746 | 1323 | UAGUUU | -1,329 |
| 56 | UUAAUA | -2,157 | 1324 | AGUUUU | -3,232 |
| 57 | UAAUAA | -0,354 | 1325 | GUUUUA | -3,012 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|--------|--------|------|--------|--------|
| 58 | AAUAAU | -1,026 | 1326 | UUUUA | -4,434 |
| 59 | AUAAUA | 0,158 | 1327 | UUUAAG | -0,188 |
| 60 | UAAUAU | -0,226 | 1328 | UUAAGA | 0,240 |
| 61 | AAUAUU | 0,241 | 1329 | UAAGAU | 0,000 |
| 62 | AUAUUU | -2,909 | 1330 | AAGAUC | 0,116 |
| 63 | UAUUUA | -5,869 | 1331 | AGAUCA | 1,532 |
| 64 | AUUUAU | -5,242 | 1332 | GAUCAG | 1,300 |
| 65 | UUUAUA | -3,054 | 1333 | AUCAGA | 0,494 |
| 66 | UUAUAU | -1,740 | 1334 | UCAGAG | 0,302 |
| 67 | UAUAUU | -2,536 | 1335 | CAGAGU | 0,511 |
| 68 | AUAUUA | 0,068 | 1336 | AGAGUU | -0,622 |
| 69 | UAUUA | -0,124 | 1337 | GAGUUC | -0,185 |
| 70 | AUUA | -1,157 | 1338 | AGUUCA | -0,847 |
| 71 | UUAAAC | -0,819 | 1339 | GUUCAC | 0,784 |
| 72 | UAAACU | -0,550 | 1340 | UUCACU | 0,163 |
| 73 | AAACUC | 1,255 | 1341 | UCACUU | -0,717 |
| 74 | AACUCC | 0,107 | 1342 | CACUUU | -0,105 |
| 75 | ACUCCU | -0,223 | 1343 | ACUUUC | -0,790 |
| 76 | CUCCUU | 0,478 | 1344 | CUUUCU | 0,428 |
| 77 | UCCUUA | 1,486 | 1345 | UUUCUU | -0,563 |
| 78 | CCUUAU | 0,197 | 1346 | UUCUUU | 0,191 |
| 79 | CUUAUG | 0,225 | 1347 | UCUUUG | 0,747 |
| 80 | UUAUGU | -0,915 | 1348 | CUUUGG | -0,733 |
| 81 | UAUGUU | -0,095 | 1349 | UUUGGA | -0,489 |
| 82 | AUGUUA | 0,685 | 1350 | UUGGAC | -1,557 |
| 83 | UGUUA | -0,139 | 1351 | UGGACU | -3,660 |
| 84 | GUUA | -0,082 | 1352 | GGACUC | -0,929 |
| 85 | UUACUU | -0,283 | 1353 | GACUCU | 0,826 |
| 86 | UACUUA | 0,462 | 1354 | ACUCUG | 0,429 |
| 87 | ACUUA | -1,330 | 1355 | CUCUGC | 0,271 |
| 88 | CUUAAC | -0,963 | 1356 | UCUGCC | 0,572 |
| 89 | UUAACA | 0,000 | 1357 | CUGCCU | 0,117 |
| 90 | UAACAU | 0,000 | 1358 | UGCCUA | 0,791 |
| 91 | AACAUC | 2,431 | 1359 | GCCUAU | 1,672 |
| 92 | ACAUCU | 1,095 | 1360 | CCUAU | 0,824 |
| 93 | CAUCUU | 0,187 | 1361 | CUUAU | 0,704 |
| 94 | AUCUUC | 0,895 | 1362 | UAUAUU | -2,536 |
| 95 | UCUUCU | 4,446 | 1363 | AUAUUU | -2,909 |
| 96 | CUUCUG | 0,192 | 1364 | UAUUUU | -2,715 |
| 97 | UUCUGU | -0,837 | 1365 | AUUUUC | 1,497 |
| 98 | UCUGUA | -0,286 | 1366 | UUUUCU | -0,997 |
| 99 | CUGUAA | -1,315 | 1367 | UUUCUU | -0,563 |
| 100 | UGUAAC | 0,092 | 1368 | UUCUUA | 0,270 |
| 101 | GUAACA | 0,398 | 1369 | UCUUA | 0,000 |
| 102 | UAACAG | 0,038 | 1370 | CUUACC | 0,373 |
| 103 | AACAGA | 0,178 | 1371 | UUACCU | 0,332 |
| 104 | ACAGAA | 0,197 | 1372 | UACCUG | 0,069 |
| 105 | CAGAAG | -0,053 | 1373 | ACCGA | 1,280 |
| 106 | AGAAGU | 1,808 | 1374 | CCUGAA | 1,988 |
| 107 | GAAGUC | 1,681 | 1375 | CUGAAC | 0,161 |
| 108 | AAGUCA | 1,925 | 1376 | UGAACU | -1,187 |
| 109 | AGUCAG | 0,016 | 1377 | GAACUU | -2,112 |
| 110 | GUCAGU | -2,368 | 1378 | AACUUU | -1,970 |
| 111 | UCAGUA | -1,773 | 1379 | ACUUUU | -1,621 |
| 112 | CAGUAC | -0,321 | 1380 | CUUUUG | -0,124 |
| 113 | AGUACU | -1,705 | 1381 | UUUUGC | -1,155 |
| 114 | GUACUC | -0,207 | 1382 | UUUGCA | -0,431 |
| 115 | UACUCC | 0,234 | 1383 | UUGCAA | 0,773 |
| 116 | ACUCCU | -0,223 | 1384 | UGCAAG | 0,317 |
| 117 | CUCCUG | -0,872 | 1385 | GCAAGU | 0,269 |
| 118 | UCCUGU | -0,196 | 1386 | CAAGUU | 0,427 |
| 119 | CCUGUU | -0,141 | 1387 | AAGUUU | -2,887 |
| 120 | CUGUUG | -2,193 | 1388 | AGUUUU | -3,232 |
| 121 | UGUUGC | -1,221 | 1389 | GUUUUC | -0,747 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|---------|--------|------|--------|--------|
| 122 | GUUGCG | -0,626 | 1390 | UUUUCA | -1,005 |
| 123 | UUGCGG | -0,356 | 1391 | UUUCAG | -0,906 |
| 124 | UGCGGA | -0,759 | 1392 | UUCAGG | 0,294 |
| 125 | GCGGAG | -0,464 | 1393 | UCAGGU | 0,054 |
| 126 | CGGAGA | 0,245 | 1394 | CAGGUA | -0,651 |
| 127 | GGAGAA | 0,566 | 1395 | AGGUAA | -0,144 |
| 128 | GAGAAA | 1,943 | 1396 | GGUAAA | -0,625 |
| 129 | AGAAAAG | 1,718 | 1397 | GUAAAC | -0,476 |
| 130 | GAAAGG | -0,410 | 1398 | UAAACC | 0,304 |
| 131 | AAAGGA | -0,636 | 1399 | AAACCU | 1,257 |
| 132 | AAGGAG | 2,289 | 1400 | AACCUC | 0,378 |
| 133 | AGGAGU | -0,290 | 1401 | ACCUCA | -0,483 |
| 134 | GGAGUC | 0,854 | 1402 | CCUCAG | -0,441 |
| 135 | GAGUCA | 0,493 | 1403 | CUCAGC | 0,177 |
| 136 | AGUCAU | 0,164 | 1404 | UCAGCU | -0,207 |
| 137 | GUCAUA | 0,876 | 1405 | CAGCUC | -0,143 |
| 138 | UCAUAC | 0,929 | 1406 | AGCUCA | -0,594 |
| 139 | CAUACU | 0,222 | 1407 | GCUCAG | 0,107 |
| 140 | AUACUU | -0,544 | 1408 | CUCAGG | 0,154 |
| 141 | UACUUG | -1,046 | 1409 | UCAGGA | 0,249 |
| 142 | ACUUGU | -6,305 | 1410 | CAGGAC | 1,334 |
| 143 | CUUGUG | -1,979 | 1411 | AGGACU | 0,050 |
| 144 | UUGUGA | -1,701 | 1412 | GGACUG | -0,088 |
| 145 | UGUGAA | -4,348 | 1413 | GACUGC | 0,018 |
| 146 | GUGAAG | -1,351 | 1414 | ACUGCU | 0,595 |
| 147 | UGAAGA | -0,081 | 1415 | CUGCUA | 0,035 |
| 148 | GAAGAC | 0,106 | 1416 | UGCUAU | 1,132 |
| 149 | AAGACU | 0,000 | 1417 | GCUAUU | 0,718 |
| 150 | AGACUU | -1,603 | 1418 | CUAUUU | -0,537 |
| 151 | GACUUU | -2,121 | 1419 | UAUUUA | -5,869 |
| 152 | ACUUUU | -1,621 | 1420 | AUUUAG | -1,019 |
| 153 | CUUUUA | -1,068 | 1421 | UUUAGC | -0,924 |
| 154 | UUUUAU | -5,188 | 1422 | UUAGCU | 0,000 |
| 155 | UUUAUG | -1,748 | 1423 | UAGCUC | -0,520 |
| 156 | UUAUGU | -0,915 | 1424 | AGCUCC | 0,886 |
| 157 | UAUGUC | -0,242 | 1425 | GCUCU | 0,476 |
| 158 | AUGUCA | -0,670 | 1426 | CUCCUC | 15,066 |
| 159 | UGUCAC | -0,106 | 1427 | UCCUCU | 4,011 |
| 160 | GUCACU | -0,055 | 1428 | CCUCUU | 2,174 |
| 161 | UCACUA | -0,068 | 1429 | CUCUUA | 0,408 |
| 162 | CACUAC | -0,659 | 1430 | UCUUAA | -1,752 |
| 163 | ACUACU | -0,391 | 1431 | CUUAAG | -2,172 |
| 164 | CUACUC | 0,542 | 1432 | UUAAGA | 0,240 |
| 165 | UACUCU | 0,000 | 1433 | UAAGAA | 0,899 |
| 166 | ACUCUA | 0,665 | 1434 | AAGAAG | 2,391 |
| 167 | CUCUAA | 0,750 | 1435 | AGAAGA | 2,114 |
| 168 | UCUAAA | 0,779 | 1436 | GAAGAU | -0,051 |
| 169 | CUAAAG | 0,536 | 1437 | AAGAUU | -0,516 |
| 170 | UAAAGA | -0,398 | 1438 | AGAUUA | -0,672 |
| 171 | AAAGAU | 0,042 | 1439 | GAUUAA | -0,362 |
| 172 | AAGAUU | -0,516 | 1440 | AUUAAA | -1,157 |
| 173 | AGAUUU | -1,726 | 1441 | UUAAAA | -0,808 |
| 174 | GAUUUU | -1,508 | 1442 | UAAAAG | -0,579 |
| 175 | AUUUUG | -3,239 | 1443 | AAAAGA | 0,011 |
| 176 | UUUUGC | -1,155 | 1444 | AAAGAG | 1,561 |
| 177 | UUUGCU | -1,124 | 1445 | AAGAGA | 1,675 |
| 178 | UUGCUG | -0,655 | 1446 | AGAGAA | 1,355 |
| 179 | UGCUGU | -1,080 | 1447 | GAGAAA | 1,943 |
| 180 | GCUGUU | -1,581 | 1448 | AGAAAA | 0,814 |
| 181 | CUGUUG | -2,193 | 1449 | GAAAAA | -0,876 |
| 182 | UGUUGC | -1,221 | 1450 | AAAAAA | -0,019 |
| 183 | GUUGCU | -1,532 | 1451 | AAAAAA | -0,019 |
| 184 | UUGCUG | -0,655 | 1452 | AAAAAA | -0,019 |
| 185 | UGCUGU | -1,080 | 1453 | AAAAAA | -0,019 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|--------|---------|------|--------|--------|
| 186 | GCUGUU | -1,581 | 1454 | AAAAAG | -1,348 |
| 187 | CUGUUA | -0,329 | 1455 | AAAAGG | -0,495 |
| 188 | UGUAAA | -1,551 | 1456 | AAAGGC | 0,911 |
| 189 | GUUAAG | -1,290 | 1457 | AAGGCC | 0,986 |
| 190 | UUAAGU | -2,250 | 1458 | AGGCCC | 0,337 |
| 191 | UAAGUU | -0,922 | 1459 | GGCCCU | 0,359 |
| 192 | AAGUUU | -2,887 | 1460 | GCCCUU | -0,528 |
| 193 | AGUUUG | -2,193 | 1461 | CCCUUU | 0,108 |
| 194 | GUUUGG | -3,228 | 1462 | CCUUUU | -2,405 |
| 195 | UUUGGA | -0,489 | 1463 | CUUUUA | -1,068 |
| 196 | UUGGAA | -3,090 | 1464 | UUUUAU | -4,434 |
| 197 | UGGAAA | 0,025 | 1465 | UUUAAA | -3,605 |
| 198 | GGAAAA | -0,316 | 1466 | UUAAAA | -0,808 |
| 199 | GAAAAC | 1,331 | 1467 | UAAAAA | 0,307 |
| 200 | AAAACA | 2,756 | 1468 | AAAAAU | 2,032 |
| 201 | AAACAG | 0,180 | 1469 | AAAAUA | 2,185 |
| 202 | AACAGU | 0,348 | 1470 | AAAUAG | -0,348 |
| 203 | ACAGUU | -0,758 | 1471 | AAUAGU | 0,573 |
| 204 | CAGUUU | -2,929 | 1472 | AUAGUA | 0,621 |
| 205 | AGUUUU | -3,232 | 1473 | UAGUAU | -0,384 |
| 206 | GUUUUU | -9,715 | 1474 | AGUAUA | -0,156 |
| 207 | UUUUUA | -11,956 | 1475 | GUAUAC | 0,000 |
| 208 | UUUUAU | -5,188 | 1476 | UAUACA | 0,571 |
| 209 | UUUAUU | -5,422 | 1477 | AUACAC | 0,132 |
| 210 | UUAUUC | 0,800 | 1478 | UACACU | 0,081 |
| 211 | UAUUCU | 1,570 | 1479 | ACACUU | 0,582 |
| 212 | AUUCUG | 0,073 | 1480 | CACUUA | -0,464 |
| 213 | UUCUGU | -0,837 | 1481 | ACUUAU | 0,000 |
| 214 | UCUGUU | -0,196 | 1482 | CUUAUU | 0,284 |
| 215 | CUGUUU | -2,443 | 1483 | UUUUUU | -2,159 |
| 216 | UGUUUU | -6,801 | 1484 | UAUUUU | -2,715 |
| 217 | GUUUUA | -3,012 | 1485 | AUUUUA | -0,259 |
| 218 | UUUUAU | -5,188 | 1486 | UUUUAU | -4,434 |
| 219 | UUUAUA | -3,054 | 1487 | UUUAAG | -0,188 |
| 220 | UUAUAA | -0,417 | 1488 | UUAAGU | -2,250 |
| 221 | UAUAAA | -0,559 | 1489 | UAAGUG | -1,264 |
| 222 | AUAAAC | -0,084 | 1490 | AAGUGA | 0,097 |
| 223 | UAAACC | 0,304 | 1491 | AGUGAA | -0,101 |
| 224 | AAACCA | 3,155 | 1492 | GUGAAA | -1,980 |
| 225 | AACCAG | 0,652 | 1493 | UGAAAA | 0,085 |
| 226 | ACCAGA | 0,780 | 1494 | GAAAAG | -0,398 |
| 227 | CCAGAG | 2,082 | 1495 | AAAAGC | -0,703 |
| 228 | CAGAGA | 0,906 | 1496 | AAAGCA | 0,253 |
| 229 | AGAGAG | 8,577 | 1497 | AAGCAG | -0,259 |
| 230 | GAGAGA | 7,498 | 1498 | AGCAGA | -0,059 |
| 231 | AGAGAA | 1,355 | 1499 | GCAGAG | -0,210 |
| 232 | GAGAAA | 1,943 | 1500 | CAGAGA | 0,906 |
| 233 | AGAAAU | 1,570 | 1501 | AGAGAA | 1,355 |
| 234 | GAAAUG | 0,295 | 1502 | GAGAAU | 0,174 |
| 235 | AAAUGA | 0,137 | 1503 | AGAAUU | 0,203 |
| 236 | AAUGAG | 0,367 | 1504 | GAAUUU | -0,308 |
| 237 | AUGAGU | 0,000 | 1505 | AAUUUU | -0,965 |
| 238 | UGAGUU | 0,113 | 1506 | AUUUUA | -0,259 |
| 239 | GAGUUU | 0,324 | 1507 | UUUUAU | -5,188 |
| 240 | AGUUUU | -3,232 | 1508 | UUUAUU | -5,422 |
| 241 | GUUUUG | -3,847 | 1509 | UUUUUU | -2,159 |
| 242 | UUUUGA | -1,888 | 1510 | UAUUUA | -5,869 |
| 243 | UUUGAC | -0,090 | 1511 | AUUUUA | -5,242 |
| 244 | UUGACG | 0,059 | 1512 | UUUAUA | -3,054 |
| 245 | UGACGU | -0,040 | 1513 | UUUAUG | 0,791 |
| 246 | GACGUC | -0,560 | 1514 | UAUAGC | 0,128 |
| 247 | ACGUCU | -1,127 | 1515 | AUAGCU | 0,000 |
| 248 | CGUCUU | -0,265 | 1516 | UAGCUA | -0,239 |
| 249 | GUCUUU | -1,933 | 1517 | AGCUAA | 0,261 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|---------|---------|------|--------|--------|
| 250 | UCUUUU | -1,793 | 1518 | GCUAAU | 0,095 |
| 251 | CUUUUU | -5,968 | 1519 | CUAAUU | -0,119 |
| 252 | UUUUUA | -11,956 | 1520 | UAAUUU | -3,495 |
| 253 | UUUUAC | -1,935 | 1521 | AAUUUU | -0,965 |
| 254 | UUUACU | -0,044 | 1522 | AUUUUA | -0,259 |
| 255 | UUACUU | -0,283 | 1523 | UUUUAG | -1,428 |
| 256 | UACUUG | -1,046 | 1524 | UUUAGC | -0,924 |
| 257 | ACUUGA | -2,357 | 1525 | UUAGCU | 0,000 |
| 258 | CUUGAA | -3,365 | 1526 | UAGCUA | -0,239 |
| 259 | UUGAAU | -0,718 | 1527 | AGCUAU | 0,248 |
| 260 | UGAAUU | -0,156 | 1528 | GCUAUC | -0,084 |
| 261 | GAAUUU | -0,308 | 1529 | CUAUCU | 1,357 |
| 262 | AAUUUC | -0,110 | 1530 | UAUCUG | 0,420 |
| 263 | AUUUCA | -0,211 | 1531 | AUCUGU | 0,669 |
| 264 | UUUCAA | -0,233 | 1532 | UCUGUA | -0,286 |
| 265 | UUCAAC | 0,068 | 1533 | CUGUAA | -1,315 |
| 266 | UCAACU | 1,013 | 1534 | UGUAAC | 0,092 |
| 267 | CAACUU | 0,678 | 1535 | GUAACC | 0,166 |
| 268 | AACUUA | -0,018 | 1536 | UAACCA | -0,488 |
| 269 | ACUUAU | 0,000 | 1537 | AACCAA | 2,214 |
| 270 | CUUAUA | 1,329 | 1538 | ACCAAG | 0,948 |
| 271 | UUAUAU | -1,740 | 1539 | CCAAGA | 0,130 |
| 272 | UAUAUU | -2,536 | 1540 | CAAGAU | 1,787 |
| 273 | AUAUUA | 0,068 | 1541 | AAGAUG | 0,508 |
| 274 | UAUUAU | 0,113 | 1542 | AGAUGG | 0,750 |
| 275 | AUUUAU | 0,016 | 1543 | GAUGGA | 0,000 |
| 276 | UUAUAA | -0,417 | 1544 | AUGGAU | 0,000 |
| 277 | UAUAAG | -0,022 | 1545 | UGGAUG | 0,484 |
| 278 | AUAAGA | 2,469 | 1546 | GGAUGC | 0,834 |
| 279 | UAAGAA | 0,899 | 1547 | GAUGCA | -0,103 |
| 280 | AAGAAC | -0,419 | 1548 | AUGCAA | 1,188 |
| 281 | AGAACG | -0,075 | 1549 | UGCAAA | 1,049 |
| 282 | GAACGA | -0,404 | 1550 | GCAAAG | 1,545 |
| 283 | AACGAA | -0,827 | 1551 | CAAAGA | 1,621 |
| 284 | ACGAAA | -0,692 | 1552 | AAAGAG | 1,561 |
| 285 | CGAAAG | -0,133 | 1553 | AAGAGG | 0,441 |
| 286 | GAAAGU | -0,390 | 1554 | AGAGGC | 0,119 |
| 287 | AAAGUA | -0,252 | 1555 | GAGGCU | 0,482 |
| 288 | AAGUAA | -0,884 | 1556 | AGGCUA | 0,616 |
| 289 | AGUAAA | -0,832 | 1557 | GGCUAG | 0,447 |
| 290 | GUA AAG | -1,525 | 1558 | GCUAGU | -0,504 |
| 291 | UAAAGA | -0,398 | 1559 | CUAGUG | -0,216 |
| 292 | AAAGAU | 0,042 | 1560 | UAGUGC | 0,024 |
| 293 | AAGAUG | 0,508 | 1561 | AGUGCC | -0,141 |
| 294 | AGAUGU | -0,245 | 1562 | GUGCCU | -1,506 |
| 295 | GAUGUU | -0,313 | 1563 | UGCCUC | -0,724 |
| 296 | AUGUUU | -2,513 | 1564 | GCCUCA | -0,191 |
| 297 | UGUUUG | -5,925 | 1565 | CCUCAG | -0,441 |
| 298 | GUUUGA | -1,171 | 1566 | CUCAGA | -0,180 |
| 299 | UUUGAA | -0,372 | 1567 | UCAGAG | 0,302 |
| 300 | UUGAAU | -0,718 | 1568 | CAGAGA | 0,906 |
| 301 | UGAAUA | 0,016 | 1569 | AGAGAG | 8,577 |
| 302 | GAAUAC | -0,666 | 1570 | GAGAGA | 7,498 |
| 303 | AAUACU | -0,458 | 1571 | AGAGAA | 1,355 |
| 304 | AUACUU | -0,544 | 1572 | GAGAAC | 0,347 |
| 305 | UACUUA | 0,462 | 1573 | AGAACU | -0,669 |
| 306 | ACUUAU | -1,330 | 1574 | GAACUG | -0,817 |
| 307 | CUUAAA | -0,644 | 1575 | AACUGU | 0,000 |
| 308 | UUA AAC | -0,819 | 1576 | ACUGUA | -0,468 |
| 309 | UAAACA | -0,374 | 1577 | CUGUAC | 0,244 |
| 310 | AAACAC | 2,423 | 1578 | UGUACG | 0,000 |
| 311 | AACACU | 0,893 | 1579 | GUACGG | 0,371 |
| 312 | ACACUG | -0,460 | 1580 | UACGGG | -0,946 |
| 313 | CACUGU | -0,474 | 1581 | ACGGGG | 0,000 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|---------|---------|------|--------|--------|
| 314 | ACUGUC | 0,618 | 1582 | CGGGGU | -0,180 |
| 315 | CUGUCA | -0,200 | 1583 | GGGGUU | 0,018 |
| 316 | UGUCAC | -0,106 | 1584 | GGGUUU | -3,145 |
| 317 | GUCACA | -0,514 | 1585 | GGUUUG | -2,582 |
| 318 | UCACAA | 1,781 | 1586 | GUUUGU | -6,334 |
| 319 | CACAAG | 2,432 | 1587 | UUUGUG | -1,093 |
| 320 | ACAAGA | 1,275 | 1588 | UUGUGA | -1,701 |
| 321 | CAAGAU | 1,787 | 1589 | UGUGAC | 0,189 |
| 322 | AAGAUG | 0,508 | 1590 | GUGACU | 0,571 |
| 323 | AGAUGG | 0,750 | 1591 | UGACUG | -1,062 |
| 324 | GAUGGC | -0,018 | 1592 | GACUGG | -0,112 |
| 325 | AUGGCA | 1,259 | 1593 | ACUGGA | -2,104 |
| 326 | UGGCAA | -0,303 | 1594 | CUGGAA | -0,095 |
| 327 | GGCAAA | 0,608 | 1595 | UGGAAA | 0,025 |
| 328 | GCAAAA | 0,548 | 1596 | GGAAAA | -0,316 |
| 329 | CAAAAU | 3,013 | 1597 | GAAAAA | -0,876 |
| 330 | AAAAUG | 1,477 | 1598 | AAAAAG | -1,348 |
| 331 | AAAUGC | 0,917 | 1599 | AAAAGU | -0,622 |
| 332 | AAUGCU | 0,212 | 1600 | AAAGUU | -3,065 |
| 333 | AUGCUG | 0,015 | 1601 | AAGUUA | 0,599 |
| 334 | UGCUGA | -0,391 | 1602 | AGUUAC | -0,020 |
| 335 | GCUGAA | -0,357 | 1603 | GUUACG | -0,250 |
| 336 | CUGAAA | 0,429 | 1604 | UUACGU | -0,327 |
| 337 | UGAAAAG | -0,626 | 1605 | UACGUU | -0,081 |
| 338 | GAAAGU | -0,390 | 1606 | ACGUUC | -0,437 |
| 339 | AAAGUU | -3,065 | 1607 | CGUUCC | -1,146 |
| 340 | AAGUUU | -2,887 | 1608 | GUUCCC | 0,555 |
| 341 | AGUUUU | -3,232 | 1609 | UUCCCA | 2,181 |
| 342 | GUUUUU | -9,715 | 1610 | UCCCAU | 0,189 |
| 343 | UUUUUA | -11,956 | 1611 | CCCAUU | 0,073 |
| 344 | UUUUAC | -1,935 | 1612 | CCAUUC | 0,522 |
| 345 | UUUACA | -1,294 | 1613 | CAUUCU | 0,738 |
| 346 | UUACAC | -0,604 | 1614 | AUUCUA | 0,425 |
| 347 | UACACU | 0,081 | 1615 | UUCUAA | 0,221 |
| 348 | ACACUG | -0,460 | 1616 | UCUAAU | -0,611 |
| 349 | CACUGU | -0,474 | 1617 | CUAAUU | -0,119 |
| 350 | ACUGUC | 0,618 | 1618 | UAAUUA | 0,580 |
| 351 | CUGUCG | -0,994 | 1619 | AAUUAA | 0,060 |
| 352 | UGUCGA | 0,000 | 1620 | AUUAAU | -0,246 |
| 353 | GUCGAU | 0,176 | 1621 | UUAAUG | -0,909 |
| 354 | UCGAUG | 0,346 | 1622 | UAAUGC | 0,045 |
| 355 | CGAUGU | 0,551 | 1623 | AAUGCC | 2,050 |
| 356 | GAUGUU | -0,313 | 1624 | AUGCCC | -0,020 |
| 357 | AUGUUU | -2,513 | 1625 | UGCCCU | -0,028 |
| 358 | UGUUUC | -0,581 | 1626 | GCCCUU | -0,528 |
| 359 | GUUUCC | 0,015 | 1627 | CCCUUU | 0,108 |
| 360 | UUUCCA | 0,653 | 1628 | CCUUUC | 1,451 |
| 361 | UUCCAA | 0,235 | 1629 | CUUUCU | 0,428 |
| 362 | UCCAAU | 0,500 | 1630 | UUUCUU | -0,563 |
| 363 | CCAAUG | 2,444 | 1631 | UUCUUA | 0,270 |
| 364 | CAAUGC | 0,912 | 1632 | UCUUAU | 1,373 |
| 365 | AAUGCA | 0,406 | 1633 | CUUAUU | 0,284 |
| 366 | AUGCAU | 0,894 | 1634 | UUAUUU | -2,159 |
| 367 | UGCAUC | 0,620 | 1635 | UAUUUA | -5,869 |
| 368 | GCAUCU | 1,034 | 1636 | AUUUAA | -0,615 |
| 369 | CAUCUU | 0,187 | 1637 | UUUAAA | -3,605 |
| 370 | AUCUUC | 0,895 | 1638 | UUAAAA | -0,808 |
| 371 | UCUUCC | 2,655 | 1639 | UAAAAA | 0,307 |
| 372 | CUUCCA | 0,662 | 1640 | AAAAAC | 0,013 |
| 373 | UUCCAU | 0,497 | 1641 | AAAACA | 2,756 |
| 374 | UCCAUG | 1,090 | 1642 | AAACAA | 2,976 |
| 375 | CCAUGA | -0,192 | 1643 | AACAAA | 2,135 |
| 376 | CAUGAU | 0,020 | 1644 | ACAAAA | 2,180 |
| 377 | AUGAUG | -0,511 | 1645 | CAAAAC | 3,060 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|---------|--------|------|---------|--------|
| 378 | UGAUGC | 0,491 | 1646 | AAAACC | 2,173 |
| 379 | GAUGCA | -0,103 | 1647 | AAACCA | 3,155 |
| 380 | AUGCAU | 0,894 | 1648 | AACCAA | 2,214 |
| 381 | UGCAUU | -0,418 | 1649 | ACCAAA | 2,729 |
| 382 | GCAUUA | -0,118 | 1650 | CCAAAU | 0,070 |
| 383 | CAUUAG | 0,203 | 1651 | CAA AUG | 0,571 |
| 384 | AUUAGA | 0,365 | 1652 | AAAUGA | 0,137 |
| 385 | UUAGAA | -0,879 | 1653 | AAUGAU | 0,364 |
| 386 | UAGAAG | 0,842 | 1654 | AUGAUA | 0,358 |
| 387 | AGAAGU | 1,808 | 1655 | UGAUUA | 0,569 |
| 388 | GAAGUA | -0,206 | 1656 | GAUAUC | 2,983 |
| 389 | AAGUAA | -0,884 | 1657 | AUAUCU | 1,891 |
| 390 | AGUAAC | 0,566 | 1658 | UAUCUA | 2,184 |
| 391 | GUAACU | -0,342 | 1659 | AUCUAA | -0,136 |
| 392 | UAACUA | 0,000 | 1660 | UCUAAG | 0,850 |
| 393 | AACUAA | 0,000 | 1661 | CUAAGU | 0,472 |
| 394 | ACUAAU | 0,577 | 1662 | UAAGUA | -1,492 |
| 395 | CUAAUG | -0,020 | 1663 | AAGUAG | -0,249 |
| 396 | UAAUGU | -3,120 | 1664 | AGUAGU | -0,700 |
| 397 | AAUGUU | -0,097 | 1665 | GUAGUU | 0,000 |
| 398 | AUGUUU | -2,513 | 1666 | UAGUUC | 1,317 |
| 399 | UGUUUG | -5,925 | 1667 | AGUUCU | -0,109 |
| 400 | GUUUGA | -1,171 | 1668 | GUUCUC | 0,637 |
| 401 | UUUGAA | -0,372 | 1669 | UUCUCA | 0,000 |
| 402 | UUGAAA | -1,707 | 1670 | UCUCAG | -0,069 |
| 403 | UGAAAU | -0,608 | 1671 | CUCAGC | 0,177 |
| 404 | GAAAUU | -1,993 | 1672 | UCAGCA | -0,178 |
| 405 | AAAUUU | -0,446 | 1673 | CAGCAA | 1,042 |
| 406 | AAUUUU | -0,965 | 1674 | AGCAAU | 0,501 |
| 407 | AUUUUA | -0,259 | 1675 | GCAAUA | 0,355 |
| 408 | UUUUAU | -4,434 | 1676 | CAAUAA | 0,572 |
| 409 | UUUAAA | -3,605 | 1677 | AAUAAU | -1,026 |
| 410 | UUAAAAG | -4,726 | 1678 | AUAUAU | 0,158 |
| 411 | UAAAGU | -3,258 | 1679 | UAAUAA | -0,354 |
| 412 | AAAGUA | -0,252 | 1680 | AAUAAU | -1,026 |
| 413 | AAGUAC | -0,072 | 1681 | AUAUAU | 0,158 |
| 414 | AGUACU | -1,705 | 1682 | UAAUAA | -0,354 |
| 415 | GUACUU | -0,970 | 1683 | AAUAAU | -1,026 |
| 416 | UACUUU | -1,234 | 1684 | AUAAUG | -1,042 |
| 417 | ACUUUU | -1,621 | 1685 | UAAUGA | 0,436 |
| 418 | CUUUUG | -0,124 | 1686 | AAUGAC | -0,078 |
| 419 | UUUUGG | -2,142 | 1687 | AUGACG | -0,314 |
| 420 | UUUGGU | -3,149 | 1688 | UGACGA | -0,383 |
| 421 | UUGGUU | -3,623 | 1689 | GACGAU | 0,199 |
| 422 | UGGUUA | -0,308 | 1690 | ACGAUA | 0,130 |
| 423 | GGUUAU | 0,073 | 1691 | CGAUAA | -0,599 |
| 424 | GUUAUU | -0,268 | 1692 | GAUAAU | -0,044 |
| 425 | UUUUUU | -2,159 | 1693 | AUAUAU | 0,158 |
| 426 | UAUUUU | -2,715 | 1694 | UAAUAC | -2,244 |
| 427 | AUUUUU | -6,868 | 1695 | AAUACU | -0,458 |
| 428 | UUUUUC | -1,632 | 1696 | AUACUU | -0,544 |
| 429 | UUUUCU | -0,997 | 1697 | UACUUC | -0,493 |
| 430 | UUUCUG | -0,090 | 1698 | ACUUCU | -0,523 |
| 431 | UUCUGU | -0,837 | 1699 | CUUCUU | 2,524 |
| 432 | UCUGUC | 0,132 | 1700 | UCUUUU | 0,191 |
| 433 | CUGUCA | -0,200 | 1701 | UCUUUU | -1,793 |
| 434 | UGUCAU | -0,047 | 1702 | CUUUUC | -2,859 |
| 435 | GUCAUC | 0,089 | 1703 | UUUCC | -0,175 |
| 436 | UCAUCA | 3,674 | 1704 | UUUCCA | 0,653 |
| 437 | CAUCAA | 2,028 | 1705 | UUCCAC | 0,429 |
| 438 | AUCAAA | 1,181 | 1706 | UCCACA | 0,923 |
| 439 | UCAAAC | -0,212 | 1707 | CCACAU | 0,562 |
| 440 | CAAACA | 2,962 | 1708 | CACAUC | 1,434 |
| 441 | AAACAA | 2,976 | 1709 | ACAUCU | 1,095 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|--------|--------|------|---------|--------|
| 442 | AACAAA | 2,135 | 1710 | CAUCUC | 1,254 |
| 443 | ACAAAA | 2,180 | 1711 | AUCUCA | 0,881 |
| 444 | CAAAAA | 1,319 | 1712 | UCUCAU | 1,498 |
| 445 | AAAAAC | 0,013 | 1713 | CUCAUU | 1,143 |
| 446 | AAAACA | 2,756 | 1714 | UCAUUG | -0,339 |
| 447 | AAACAG | 0,180 | 1715 | CAUUGU | -0,881 |
| 448 | AACAGG | 0,017 | 1716 | AUUGUC | -0,199 |
| 449 | ACAGGU | -0,395 | 1717 | UUGUCA | -0,599 |
| 450 | CAGGUA | -0,651 | 1718 | UGUCAC | -0,106 |
| 451 | AGGUAU | -0,473 | 1719 | GUCACU | -0,055 |
| 452 | GGUAUC | 0,697 | 1720 | UCACUG | -0,059 |
| 453 | GUAUCA | 0,553 | 1721 | CACUGA | 0,236 |
| 454 | UAUCAG | -0,461 | 1722 | ACUGAC | -0,941 |
| 455 | AUCAGU | 0,187 | 1723 | CUGACA | -0,127 |
| 456 | UCAGUG | -0,183 | 1724 | UGACAU | 0,048 |
| 457 | CAGUGC | -0,478 | 1725 | GACAUU | -0,449 |
| 458 | AGUGCA | 0,158 | 1726 | ACAUUU | -0,383 |
| 459 | GUGCAU | -0,188 | 1727 | CAUUUA | 1,120 |
| 460 | UGCAUU | -0,418 | 1728 | AUUUAA | -0,615 |
| 461 | GCAUUA | -0,118 | 1729 | UUUAAU | -4,746 |
| 462 | CAUUAU | 0,317 | 1730 | UUA AUG | -0,909 |
| 463 | AUUAAU | 0,410 | 1731 | UAAUGG | -0,751 |
| 464 | UUAUUA | -0,678 | 1732 | AAUGGU | 1,016 |
| 465 | UAUUAA | -0,124 | 1733 | AUGGUA | 0,192 |
| 466 | AUUAAA | -1,157 | 1734 | UGGUAC | -1,102 |
| 467 | UUAAAU | -1,107 | 1735 | GGUACU | 0,000 |
| 468 | UAAAUG | -0,865 | 1736 | GUACUG | -0,740 |
| 469 | AAAUGA | 0,137 | 1737 | UACUGU | -1,986 |
| 470 | AAUGAA | 1,044 | 1738 | ACUGUA | -0,468 |
| 471 | AUGAAU | 0,172 | 1739 | CUGUAU | -0,634 |
| 472 | UGAAUA | 0,016 | 1740 | UGUAUA | -5,849 |
| 473 | GAAUUA | 0,439 | 1741 | GUAUAU | -3,002 |
| 474 | AAUAUU | 0,241 | 1742 | UAUAUU | -2,536 |
| 475 | AUAUUU | -2,909 | 1743 | AUAUUA | 0,068 |
| 476 | UAUUUA | -5,869 | 1744 | UAUUAC | 0,000 |
| 477 | AUUUAA | -0,615 | 1745 | AUUACU | -0,039 |
| 478 | UUUAAA | -3,605 | 1746 | UUACUU | -0,283 |
| 479 | UUAAAU | -1,107 | 1747 | UACUUA | 0,462 |
| 480 | UAAAUU | -0,598 | 1748 | ACUAAA | -1,330 |
| 481 | AAAUUA | -0,026 | 1749 | CUUAAU | -0,562 |
| 482 | AAUUAG | 0,478 | 1750 | UUAAUU | -2,928 |
| 483 | AUUAGA | 0,365 | 1751 | UAAUUU | -3,495 |
| 484 | UUAGAC | -0,045 | 1752 | AAUUUA | -1,375 |
| 485 | UAGACA | -0,219 | 1753 | AUUUAU | -5,242 |
| 486 | AGACAU | 0,278 | 1754 | UUUAUU | -5,422 |
| 487 | GACAUU | -0,449 | 1755 | UUAUUG | -1,323 |
| 488 | ACAUUA | -0,055 | 1756 | UAUUGA | 0,193 |
| 489 | CAUUAC | 0,724 | 1757 | AUUGAA | -0,820 |
| 490 | AUUACC | 0,750 | 1758 | UUGAAG | -0,898 |
| 491 | UUACCA | 0,652 | 1759 | UGAAGA | -0,081 |
| 492 | UACCAG | 0,478 | 1760 | GAAGAU | -0,051 |
| 493 | ACCAGU | -1,132 | 1761 | AAGAUU | -0,516 |
| 494 | CCAGUA | -0,301 | 1762 | AGAUAU | -0,672 |
| 495 | CAGUAA | -1,455 | 1763 | GAUUUA | 0,143 |
| 496 | AGUAAU | 0,000 | 1764 | AUUUAU | 0,410 |
| 497 | GUAUUU | -0,120 | 1765 | UUUUUA | -0,678 |
| 498 | UAUUUU | -3,495 | 1766 | UAUUUA | 0,113 |
| 499 | AAUUUC | -0,110 | 1767 | AUUUUU | 0,410 |
| 500 | AUUUCA | -0,211 | 1768 | UUUUUU | -2,159 |
| 501 | UUUCAU | -0,025 | 1769 | UAUUUA | -5,869 |
| 502 | UUCAUG | 0,348 | 1770 | AUUUAU | -5,242 |
| 503 | UCAUGU | 0,854 | 1771 | UUUAUG | -1,748 |
| 504 | CAUGUC | 0,573 | 1772 | UUAUGU | -0,915 |
| 505 | AUGUCU | -0,183 | 1773 | UAUGUC | -0,242 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|--------|---------|------|--------|---------|
| 506 | UGUCUA | 0,870 | 1774 | AUGUCU | -0,183 |
| 507 | GUCUAC | 0,291 | 1775 | UGUCUU | -3,606 |
| 508 | UCUACU | 0,100 | 1776 | GUCUUA | -1,667 |
| 509 | CUACUU | -0,287 | 1777 | UCUUAA | 1,373 |
| 510 | UACUUU | -1,234 | 1778 | CUUAUU | 0,284 |
| 511 | ACUUUU | -1,621 | 1779 | UUAUUA | -0,678 |
| 512 | CUUUUU | -5,968 | 1780 | UAUUAG | -0,090 |
| 513 | UUUUUA | -11,956 | 1781 | AUUAGG | -0,165 |
| 514 | UUUUAA | -4,434 | 1782 | UUAGGA | 0,000 |
| 515 | UUUAAA | -3,605 | 1783 | UAGGAC | 0,000 |
| 516 | UUAAAA | -0,808 | 1784 | AGGACA | 1,529 |
| 517 | UAAAAU | -0,222 | 1785 | GGACAC | 0,515 |
| 518 | AAAAUC | -0,193 | 1786 | GACACU | -1,241 |
| 519 | AAAUCA | 0,262 | 1787 | ACACUA | 0,487 |
| 520 | AAUCAG | 0,098 | 1788 | CACUAU | 0,377 |
| 521 | AUCAGC | 0,784 | 1789 | ACUAUG | 0,465 |
| 522 | UCAGCA | -0,178 | 1790 | CUAUGG | 0,230 |
| 523 | CAGCAA | 1,042 | 1791 | UAUGGU | -0,021 |
| 524 | AGCAAU | 0,501 | 1792 | AUGGUU | -0,074 |
| 525 | GCAAUG | 2,340 | 1793 | UGGUUA | -0,308 |
| 526 | CAAUGA | 1,884 | 1794 | GGUUAU | 0,073 |
| 527 | AAUGAA | 1,044 | 1795 | GUUUAU | -0,289 |
| 528 | AUGAAA | -0,013 | 1796 | UUAUAA | -0,417 |
| 529 | UGAAAC | -1,554 | 1797 | UAUAAA | -0,559 |
| 530 | GAAACA | 0,551 | 1798 | AUAAAC | -0,084 |
| 531 | AAACAA | 2,976 | 1799 | UAAACU | -0,550 |
| 532 | AACAAU | 2,108 | 1800 | AAACUG | -0,261 |
| 533 | ACAAUA | 1,425 | 1801 | AACUGU | 0,000 |
| 534 | CAAUAA | 0,572 | 1802 | ACUGUG | -0,364 |
| 535 | AAUAAU | -1,026 | 1803 | CUGUGU | -0,021 |
| 536 | AUAAUU | -1,391 | 1804 | UGUGUU | 0,021 |
| 537 | UAAUUU | -3,495 | 1805 | GUGUUU | -0,112 |
| 538 | AAUUUG | -0,847 | 1806 | UGUUUA | -3,768 |
| 539 | AUUUGA | -0,076 | 1807 | GUUUAU | -3,657 |
| 540 | UUUGAA | -0,372 | 1808 | UUUAAG | -0,188 |
| 541 | UUGAAA | -1,707 | 1809 | UUAAGC | 0,042 |
| 542 | UGAAAU | -0,608 | 1810 | UAAGCC | -0,022 |
| 543 | GAAAUU | -1,993 | 1811 | AAGCCU | 0,236 |
| 544 | AAAUUU | -0,446 | 1812 | AGCCUA | 1,908 |
| 545 | AAUUUC | -0,110 | 1813 | GCCUAC | 0,838 |
| 546 | AUUUCU | -0,049 | 1814 | CCUACA | 0,850 |
| 547 | UUUCUA | -0,558 | 1815 | CUACAA | 0,000 |
| 548 | UUCUAA | 0,221 | 1816 | UACAAU | 0,236 |
| 549 | UCUAAA | 0,779 | 1817 | ACAAUC | 1,655 |
| 550 | CUAAAA | 0,537 | 1818 | CAAUCA | 2,538 |
| 551 | UAAAUU | -0,598 | 1819 | AAUCAU | 1,228 |
| 552 | AAAUUC | 1,369 | 1820 | AUCAUU | 0,979 |
| 553 | AAUUCA | 0,102 | 1821 | UCAUUG | -0,339 |
| 554 | AUUCAU | 1,115 | 1822 | CAUUGA | -0,299 |
| 555 | UUCAUA | -0,606 | 1823 | AUUGAU | 0,534 |
| 556 | UCAUAG | -0,953 | 1824 | UUGAUU | -0,063 |
| 557 | CAUAGG | -0,216 | 1825 | UGAUUU | -0,273 |
| 558 | AUAGGG | 0,145 | 1826 | GAUUUU | -1,508 |
| 559 | UAGGGU | -0,046 | 1827 | AUUUUU | -6,868 |
| 560 | AGGGUA | 0,489 | 1828 | UUUUUU | -26,930 |
| 561 | GGGUAG | -0,374 | 1829 | UUUUUU | -26,930 |
| 562 | GGUAGA | -0,044 | 1830 | UUUUUU | -26,930 |
| 563 | GUAGAA | 0,487 | 1831 | UUUUUU | -26,930 |
| 564 | UAGAAU | 1,380 | 1832 | UUUUUG | -10,285 |
| 565 | AGAAUC | 0,077 | 1833 | UUUUGU | -10,505 |
| 566 | GAAUCA | 1,135 | 1834 | UUUGUU | -14,295 |
| 567 | AAUCAC | 1,213 | 1835 | UUGUUA | -2,721 |
| 568 | AUCACC | 0,024 | 1836 | UGUUAU | -0,188 |
| 569 | UCACCU | 0,681 | 1837 | GUUAUG | -0,131 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|---------|---------|------|--------|--------|
| 570 | CACCUG | 0,318 | 1838 | UUAUGU | -0,915 |
| 571 | ACCUGU | -2,600 | 1839 | UAUGUC | -0,242 |
| 572 | CCUGUA | -0,128 | 1840 | AUGUCA | -0,670 |
| 573 | CUGUAA | -1,315 | 1841 | UGUCAC | -0,106 |
| 574 | UGUAAA | -4,303 | 1842 | GUCACA | -0,514 |
| 575 | GUAAAA | -0,298 | 1843 | UCACAA | 1,781 |
| 576 | UAAAAAG | -0,579 | 1844 | CACAAU | 0,351 |
| 577 | AAAAGC | -0,703 | 1845 | ACAAUC | 1,655 |
| 578 | AAAGCU | -0,698 | 1846 | CAAUCA | 2,538 |
| 579 | AAGCUU | 0,121 | 1847 | AAUCAG | 0,098 |
| 580 | AGCUUG | -1,833 | 1848 | AUCAGU | 0,187 |
| 581 | GCUUGU | -0,051 | 1849 | UCAGUA | -1,773 |
| 582 | CUUGUU | -0,413 | 1850 | CAGUAU | -1,461 |
| 583 | UUGUUU | -14,795 | 1851 | AGUAUA | -0,156 |
| 584 | UGUUUG | -5,925 | 1852 | GUAUAU | -3,002 |
| 585 | GUUUGA | -1,171 | 1853 | UAUAUC | 1,209 |
| 586 | UUUGAU | -1,091 | 1854 | AUAUCU | 1,891 |
| 587 | UUGAUU | -0,063 | 1855 | UAUCUU | 0,411 |
| 588 | UGAUUU | -0,273 | 1856 | AUCUUC | 0,895 |
| 589 | GAUUUC | 0,132 | 1857 | UCUUCU | 4,446 |
| 590 | AUUUCU | -0,049 | 1858 | CUUCUU | 2,524 |
| 591 | UUUCUU | -0,563 | 1859 | UUCUUU | 0,191 |
| 592 | UUCUUA | 0,270 | 1860 | UCUUUG | 0,747 |
| 593 | UCUUAU | -1,752 | 1861 | CUUUGG | -0,733 |
| 594 | CUUAAA | -0,644 | 1862 | UUUGGG | -2,861 |
| 595 | UUAAAG | -4,726 | 1863 | UUGGGG | -1,613 |
| 596 | UAAAGU | -3,258 | 1864 | UGGGGU | 0,095 |
| 597 | AAAGUU | -3,065 | 1865 | GGGGUU | 0,018 |
| 598 | AAGUUA | 0,599 | 1866 | GGGUUA | 0,024 |
| 599 | AGUUAU | -0,515 | 1867 | GGUUAU | -0,091 |
| 600 | GUUAUU | -0,268 | 1868 | GUUACC | 0,316 |
| 601 | UUAUUA | -0,678 | 1869 | UUACCU | 0,332 |
| 602 | UAUUAA | -0,124 | 1870 | UACCUC | -0,145 |
| 603 | AUUAAA | -1,157 | 1871 | ACCUCU | 1,186 |
| 604 | UUAAAC | -0,819 | 1872 | CCUCUC | 0,428 |
| 605 | UAAACU | -0,550 | 1873 | CUCUCU | 8,503 |
| 606 | AAACUU | -3,195 | 1874 | UCUCUG | 0,577 |
| 607 | AACUUG | -4,231 | 1875 | CUCUGA | 0,870 |
| 608 | ACUUGU | -6,305 | 1876 | UCUGAA | 0,070 |
| 609 | CUUGUA | -3,125 | 1877 | CUGAAU | 0,655 |
| 610 | UUGUAC | -3,433 | 1878 | UGAAUA | 0,016 |
| 611 | UGUACA | -3,076 | 1879 | GAAUAU | 0,439 |
| 612 | GUACAU | -1,812 | 1880 | AAUAUU | 0,241 |
| 613 | UACAUU | -0,790 | 1881 | AUAUUA | 0,068 |
| 614 | ACAUUU | 0,450 | 1882 | UAUUUU | 0,113 |
| 615 | CAUUAU | 0,167 | 1883 | AUUAUG | -0,278 |
| 616 | AUAUAC | 0,152 | 1884 | UUAUGU | -0,915 |
| 617 | UAUACC | 0,484 | 1885 | UAUGUA | -0,951 |
| 618 | AUACCA | 1,337 | 1886 | AUGUAA | -1,949 |
| 619 | UACCAA | 1,400 | 1887 | UGUAAA | -4,303 |
| 620 | ACCAAA | 2,729 | 1888 | GUAAAC | -0,476 |
| 621 | CCAAAA | 3,038 | 1889 | UAAACA | -0,374 |
| 622 | CAAAAA | 1,319 | 1890 | AAACAA | 2,976 |
| 623 | AAAAAG | -1,348 | 1891 | AACAAU | 2,108 |
| 624 | AAAAGA | 0,011 | 1892 | ACAAUC | 1,655 |
| 625 | AAAGAA | 0,265 | 1893 | CAAUCC | 0,566 |
| 626 | AAGAAG | 2,391 | 1894 | AAUCCA | 0,634 |
| 627 | AGAAGC | -0,733 | 1895 | AUCCAA | 1,115 |
| 628 | GAAGCU | -0,359 | 1896 | UCCAAA | 1,854 |
| 629 | AAGCUG | -0,818 | 1897 | CCAAAG | 0,877 |
| 630 | AGCUGU | -0,280 | 1898 | CAAAGA | 1,621 |
| 631 | GUCGUC | -1,468 | 1899 | AAAGAA | 0,265 |
| 632 | CUGUCU | -0,248 | 1900 | AAGAAA | 1,006 |
| 633 | UGUCUU | -3,606 | 1901 | AGAAAU | 1,570 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|---------|--------|------|--------|---------|
| 634 | GUCUUG | -0,970 | 1902 | GAAAUG | 0,295 |
| 635 | UCUUGG | -0,429 | 1903 | AAAUGA | 0,137 |
| 636 | CUUGGA | -0,413 | 1904 | AAUGAU | 0,364 |
| 637 | UUGGAU | -0,621 | 1905 | AUGAAU | 0,634 |
| 638 | UGGAUU | -1,714 | 1906 | UGAUUG | -0,877 |
| 639 | GGAUUU | -0,500 | 1907 | GAUUGU | -0,969 |
| 640 | GAUUUA | -0,486 | 1908 | AUUGUA | -2,416 |
| 641 | AUUUAA | -0,615 | 1909 | UUGUAU | -3,849 |
| 642 | UUUAAA | -3,605 | 1910 | UGUAUU | -1,372 |
| 643 | UUAAAU | -1,107 | 1911 | GUUUUA | -0,254 |
| 644 | UAAAUC | -0,209 | 1912 | UAUUAA | -0,124 |
| 645 | AAAUCU | -0,078 | 1913 | AUUAAG | 0,768 |
| 646 | AAUCUG | 0,151 | 1914 | UUAAGA | 0,240 |
| 647 | AUCUGU | 0,669 | 1915 | UAAGAU | 0,000 |
| 648 | UCUGUA | -0,286 | 1916 | AAGAAU | -0,516 |
| 649 | CUGUAA | -1,315 | 1917 | AGAAUU | -1,726 |
| 650 | UGUAAA | -4,303 | 1918 | GAUUUG | -0,374 |
| 651 | GUAAAA | -0,298 | 1919 | AUUUGU | -2,386 |
| 652 | UAAAAU | -0,222 | 1920 | UUUGUG | -1,093 |
| 653 | AAAAUC | -0,193 | 1921 | UUGUGA | -1,701 |
| 654 | AAAUCA | 0,262 | 1922 | UGUGAA | -4,348 |
| 655 | AAUCAG | 0,098 | 1923 | GUGAAU | 0,610 |
| 656 | AUCAGU | 0,187 | 1924 | UGAAUA | 0,016 |
| 657 | UCAGUA | -1,773 | 1925 | GAAUAA | -0,391 |
| 658 | CAGUAG | -1,088 | 1926 | AAUAAA | 0,493 |
| 659 | AGUAGA | 0,099 | 1927 | AUAAAU | -0,329 |
| 660 | GUAGAA | 0,487 | 1928 | UAAAUU | -0,598 |
| 661 | UAGAAA | 0,862 | 1929 | AAAUUU | -0,446 |
| 662 | AGAAAU | 1,570 | 1930 | AAUUUU | -0,965 |
| 663 | GAAAUU | -1,993 | 1931 | AUUUUU | -6,868 |
| 664 | AAAUUU | -0,446 | 1932 | UUUUUA | -11,956 |
| 665 | AAUUUU | -0,965 | 1933 | UUUUAG | -1,428 |
| 666 | AUUUUA | -0,259 | 1934 | UUUAGA | -1,153 |
| 667 | UUUUAC | -1,935 | 1935 | UUAGAA | -0,879 |
| 668 | UUUACU | -0,044 | 1936 | UAGAAA | 0,862 |
| 669 | UUACUA | -0,215 | 1937 | AGAAAU | 1,570 |
| 670 | UACUAC | -0,425 | 1938 | GAAAUC | 0,791 |
| 671 | ACUACA | -0,253 | 1939 | AAAUCU | -0,078 |
| 672 | CUACAA | 0,000 | 1940 | AAUCUG | 0,151 |
| 673 | UACAAU | 0,236 | 1941 | AUCUGA | 0,072 |
| 674 | ACAAUU | 0,312 | 1942 | UCUGAU | 0,129 |
| 675 | CAAUUG | 0,574 | 1943 | CUGAAU | 0,016 |
| 676 | AAUUGC | -0,870 | 1944 | UGAUUG | -0,877 |
| 677 | AUUGCU | -0,338 | 1945 | GAUUGG | -0,670 |
| 678 | UUGCUU | -3,020 | 1946 | AUUGGC | -0,538 |
| 679 | UGC UUG | -0,164 | 1947 | UUGGCA | 0,089 |
| 680 | GCUUGU | -0,051 | 1948 | UGGCAU | 0,291 |
| 681 | CUUGUU | -0,413 | 1949 | GGCAUA | 0,718 |
| 682 | UUGUUA | -2,721 | 1950 | GCAUAU | 0,088 |
| 683 | UGUUAA | -1,551 | 1951 | CAUAUU | 0,697 |
| 684 | GUUAAA | -0,679 | 1952 | AUAUUG | 0,994 |
| 685 | UUAAAA | -0,808 | 1953 | UAUUGA | 0,193 |
| 686 | UAAAAU | -0,222 | 1954 | AUUGAG | -0,573 |
| 687 | AAAAUA | 2,185 | 1955 | UUGAGA | -1,872 |
| 688 | AAAUUA | 0,445 | 1956 | UGAGAU | 0,000 |
| 689 | AAUAUU | 0,241 | 1957 | GAGAUU | 0,606 |
| 690 | AUAUUU | -2,909 | 1958 | AGAUUU | 1,672 |
| 691 | UAUUUU | -2,715 | 1959 | GAUUUU | 0,102 |
| 692 | AUUUUA | -0,259 | 1960 | AUAUUU | -2,909 |
| 693 | UUUUUA | -5,188 | 1961 | UAUUUA | -5,869 |
| 694 | UUUAUA | -3,054 | 1962 | AUUUAA | -0,615 |
| 695 | UUUAUA | -0,417 | 1963 | UUUAAG | -0,188 |
| 696 | UAUAAG | -0,022 | 1964 | UUAAGG | -0,737 |
| 697 | AUAAGU | -0,273 | 1965 | UAAGGU | -0,339 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|--------|---------|------|---------|--------|
| 698 | UAAGUG | -1,264 | 1966 | AAGGUU | -1,678 |
| 699 | AAGUGA | 0,097 | 1967 | AGGUUG | -1,125 |
| 700 | AGUGAU | 0,184 | 1968 | GGUUGA | -0,046 |
| 701 | GUGAUG | 0,437 | 1969 | GUUGAA | -1,876 |
| 702 | UGAUGU | -0,553 | 1970 | UUGAAU | -0,718 |
| 703 | GAUGUU | -0,313 | 1971 | UGAAUG | 0,109 |
| 704 | AUGUUC | 0,636 | 1972 | GAAUGU | -0,062 |
| 705 | UGUUC | 1,773 | 1973 | AAUGUU | -0,097 |
| 706 | GUUCCU | -0,015 | 1974 | AUGUUU | -2,513 |
| 707 | UUCUUU | 0,369 | 1975 | UGUUUG | -5,925 |
| 708 | UCCUUU | -0,594 | 1976 | GUUUGU | -6,334 |
| 709 | CCUUUU | -2,405 | 1977 | UUUGUC | -0,060 |
| 710 | CUUUUU | -5,968 | 1978 | UUGUCC | 0,172 |
| 711 | UUUUUC | -1,632 | 1979 | UGUCCU | -0,822 |
| 712 | UUUUCA | -1,005 | 1980 | GUCCUU | 0,266 |
| 713 | UUUCAC | 0,876 | 1981 | UCCUUA | 1,486 |
| 714 | UUCACC | 0,802 | 1982 | CCUUAG | 1,343 |
| 715 | UCACCA | 0,251 | 1983 | CUUAGG | 0,019 |
| 716 | CACCAA | 2,909 | 1984 | UUAGGA | 0,000 |
| 717 | ACCAAG | 0,948 | 1985 | UAGGAU | 0,942 |
| 718 | CCAAGA | 0,130 | 1986 | AGGAUA | 0,879 |
| 719 | CAAGAG | 0,623 | 1987 | GGAUAG | 0,000 |
| 720 | AAGAGU | 0,183 | 1988 | GAUAGG | 0,866 |
| 721 | AGAGUA | -0,318 | 1989 | AUAGGC | 0,000 |
| 722 | GAGUAU | -0,699 | 1990 | UAGGCC | -0,553 |
| 723 | AGUAUA | -0,156 | 1991 | AGGCCU | -0,728 |
| 724 | GUAUAA | -1,570 | 1992 | GGCCUA | -0,279 |
| 725 | UAUAAA | -0,559 | 1993 | GCCUAU | 1,672 |
| 726 | AUAAAC | -0,084 | 1994 | CCUAUG | 0,812 |
| 727 | UAAACC | 0,304 | 1995 | CUAUGU | 1,515 |
| 728 | AAACCU | 1,257 | 1996 | UAUGUG | -0,599 |
| 729 | AACCUU | 0,575 | 1997 | AUGUGC | -0,674 |
| 730 | ACCUUU | 0,044 | 1998 | UGUGCU | -0,496 |
| 731 | CCUUUU | -2,405 | 1999 | GUGCUA | -0,181 |
| 732 | CUUUUU | -5,968 | 2000 | UGCUG | -0,251 |
| 733 | UUUUUA | -11,956 | 2001 | GCUAGC | 0,075 |
| 734 | UUUUAG | -1,428 | 2002 | CUAGCC | -0,115 |
| 735 | UUUAGU | -0,579 | 2003 | UAGCCC | 0,201 |
| 736 | UUAGUG | -0,265 | 2004 | AGCCCA | 1,651 |
| 737 | UAGUGU | -0,968 | 2005 | GCCCAC | 0,825 |
| 738 | AGUGUG | -1,529 | 2006 | CCCACA | 1,325 |
| 739 | GUGUGA | -1,083 | 2007 | CCACAA | 1,645 |
| 740 | UGUGAC | 0,189 | 2008 | CACAAA | 1,848 |
| 741 | GUGACU | 0,571 | 2009 | ACAAAAG | 0,984 |
| 742 | UGACUG | -1,062 | 2010 | CAAAGA | 1,621 |
| 743 | GACUGU | -0,084 | 2011 | AAAGAA | 0,265 |
| 744 | ACUGUU | -2,478 | 2012 | AAGAAU | -0,326 |
| 745 | CUGUUA | -0,329 | 2013 | AGAAUA | 0,230 |
| 746 | UGUUA | -1,551 | 2014 | GAAUAU | 0,439 |
| 747 | GUUAAA | -0,679 | 2015 | AAUAU | 0,241 |
| 748 | UUAAAA | -0,808 | 2016 | AUAUUG | 0,994 |
| 749 | UAAAAC | -0,106 | 2017 | UAUUGU | -0,345 |
| 750 | AAAACU | -0,776 | 2018 | AUUGUC | -0,199 |
| 751 | AAACUU | -3,195 | 2019 | UUGUCU | -1,194 |
| 752 | AACUUC | -0,018 | 2020 | UGUCUC | 0,524 |
| 753 | ACUUC | 0,907 | 2021 | GUCUCA | 1,327 |
| 754 | CUUCU | 1,311 | 2022 | UCUCAU | 1,498 |
| 755 | UUCUU | 0,369 | 2023 | CUCAUU | 1,143 |
| 756 | UCCUU | -0,594 | 2024 | UCAUUA | 2,969 |
| 757 | CCUUUU | -2,405 | 2025 | CAUUAG | 0,203 |
| 758 | CUUUUA | -1,068 | 2026 | AUUAGC | 0,235 |
| 759 | UUUUAA | -4,434 | 2027 | UUAGCC | -0,022 |
| 760 | UUUAAA | -3,605 | 2028 | UAGCCU | -1,681 |
| 761 | UUAAAA | -1,107 | 2029 | AGCCUG | 0,000 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|--------|--------|------|--------|--------|
| 762 | UAAUUC | -0,209 | 2030 | GCCUGA | -0,456 |
| 763 | AAAUCA | 0,262 | 2031 | CCUGAA | 1,988 |
| 764 | AAUCA | 0,852 | 2032 | CUGAAU | 0,655 |
| 765 | AUCAA | 1,181 | 2033 | UGAAUG | 0,109 |
| 766 | UCAAAA | 1,961 | 2034 | GAAUGU | -0,062 |
| 767 | CAAAAU | 3,013 | 2035 | AAUGUG | -0,525 |
| 768 | AAAAUG | 1,477 | 2036 | AUGUGC | -0,674 |
| 769 | AAAUGC | 0,917 | 2037 | UGUGCC | -0,095 |
| 770 | AAUGCC | 2,050 | 2038 | GUGCCA | -0,135 |
| 771 | AUGCCA | 2,733 | 2039 | UGCCAU | 0,000 |
| 772 | UGCCAA | 0,531 | 2040 | GCCAU | 0,464 |
| 773 | GCCAAA | -0,035 | 2041 | CCAUAA | -0,092 |
| 774 | CCAAAU | 0,070 | 2042 | CAUAAG | 0,413 |
| 775 | CAAAUU | -0,398 | 2043 | AUAAGA | 2,469 |
| 776 | AAUUU | -0,446 | 2044 | UAAGAC | 0,276 |
| 777 | AAUUUA | -1,375 | 2045 | AAGACU | 0,000 |
| 778 | AUUUAU | -5,242 | 2046 | AGACUG | -0,264 |
| 779 | UUUAUU | -5,422 | 2047 | GACUGA | -0,983 |
| 780 | UUAUUA | -0,678 | 2048 | ACUGAC | -0,941 |
| 781 | UAUUAA | -0,124 | 2049 | CUGACC | 0,312 |
| 782 | AUUAAG | 0,768 | 2050 | UGACCU | 0,359 |
| 783 | UUAAGG | -0,737 | 2051 | GACCUU | 1,411 |
| 784 | UAAGGU | -0,339 | 2052 | ACUUUU | 0,044 |
| 785 | AAGGUG | -0,016 | 2053 | CCUUUU | -2,405 |
| 786 | AGGUGG | 0,452 | 2054 | CUUUUA | -1,068 |
| 787 | GGUGGU | -0,320 | 2055 | UUUUA | -4,434 |
| 788 | GUGGUG | -2,224 | 2056 | UUUAAA | -3,605 |
| 789 | UGGUGG | 0,014 | 2057 | UUAAAA | -0,808 |
| 790 | GGUGGA | 0,060 | 2058 | UAAAAU | -0,222 |
| 791 | GUGGAG | -0,210 | 2059 | AAAAUG | 1,477 |
| 792 | UGGAGC | -0,163 | 2060 | AAAUGU | -0,210 |
| 793 | GGAGCC | -1,006 | 2061 | AAUGUU | -0,097 |
| 794 | GAGCCA | -0,250 | 2062 | AUGUUU | -2,513 |
| 795 | AGCCAC | 0,264 | 2063 | UGUUUU | -6,801 |
| 796 | GCCACU | 0,294 | 2064 | GUUUUG | -3,847 |
| 797 | CCACUG | -0,276 | 2065 | UUUUGA | -1,888 |
| 798 | CACUGC | -1,391 | 2066 | UUUGAG | -4,074 |
| 799 | ACUGCA | -1,460 | 2067 | UUGAGG | -1,280 |
| 800 | CUGCAG | 0,025 | 2068 | UGAGGG | 0,302 |
| 801 | UGCAGU | -1,981 | 2069 | GAGGGA | 0,534 |
| 802 | GCAGUG | -0,997 | 2070 | AGGGAU | 2,689 |
| 803 | CAGUGU | -1,151 | 2071 | GGGAUC | 0,000 |
| 804 | AGUGUU | 0,188 | 2072 | GGAUCU | -1,033 |
| 805 | GUGUUA | -0,131 | 2073 | GAUCUG | -0,737 |
| 806 | UGUUAU | -0,188 | 2074 | AUCUGU | 0,669 |
| 807 | GUUAUC | -0,241 | 2075 | UCUGUG | -0,056 |
| 808 | UUAUCU | 0,401 | 2076 | CUGUGG | -0,230 |
| 809 | UAUCUU | 0,411 | 2077 | UGUGGA | -0,707 |
| 810 | AUCUUA | 0,078 | 2078 | GUGGAU | -0,834 |
| 811 | UCUUA | -1,752 | 2079 | UGGAUG | 0,484 |
| 812 | CUUAAA | -0,644 | 2080 | GGAUGC | 0,834 |
| 813 | UUAAAA | -0,808 | 2081 | GAUGCU | 2,028 |
| 814 | UAAAAU | -0,222 | 2082 | AUGCUU | -0,033 |
| 815 | AAAAUA | 2,185 | 2083 | UGCUUC | -0,122 |
| 816 | AAAUAA | 0,494 | 2084 | GCUUCG | -0,124 |
| 817 | AAUAAG | 0,395 | 2085 | CUUCGU | -0,348 |
| 818 | AUAAGA | 2,469 | 2086 | UUCGUU | -0,431 |
| 819 | UAAGAA | 0,899 | 2087 | UCGUUA | -1,299 |
| 820 | AAGAAU | -0,326 | 2088 | CGUUA | -0,775 |
| 821 | AGAAUA | 0,230 | 2089 | GUAAAU | -0,911 |
| 822 | GAAUAU | 0,439 | 2090 | UUAAUU | -2,928 |
| 823 | AAUAUU | 0,241 | 2091 | UAAUUU | -3,495 |
| 824 | AUAUUU | -2,909 | 2092 | AAUUUG | -0,847 |
| 825 | UAUUUU | -2,715 | 2093 | AUUUGU | -2,386 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|---------|---------|------|---------|---------|
| 826 | AUUUUG | -3,239 | 2094 | UUUGUU | -14,295 |
| 827 | UUUUGU | -10,505 | 2095 | UUGUUC | 0,061 |
| 828 | UUUGUU | -14,295 | 2096 | UGUUCA | -0,178 |
| 829 | UUGUUG | -1,198 | 2097 | GUUCAG | -1,283 |
| 830 | UGUUGA | -1,687 | 2098 | UUCAGC | -0,152 |
| 831 | GUUGAG | -0,644 | 2099 | UCAGCC | 0,529 |
| 832 | UUGAGA | -1,872 | 2100 | CAGCCA | 0,633 |
| 833 | UGAGAU | 0,000 | 2101 | AGCCAC | 0,264 |
| 834 | GAGAU A | 0,606 | 2102 | GCCACA | 0,444 |
| 835 | AGAU AU | 1,672 | 2103 | CCACAA | 1,645 |
| 836 | GAU AUU | 0,102 | 2104 | CACAAU | 0,351 |
| 837 | AU AUUC | 1,249 | 2105 | ACAAUU | 0,312 |
| 838 | UAU UCC | 0,746 | 2106 | CAAUUU | 0,075 |
| 839 | AU UCCA | 0,347 | 2107 | AAUUUA | -1,375 |
| 840 | U UCCAG | 1,141 | 2108 | AUUUAU | -5,242 |
| 841 | UCCAGA | 0,597 | 2109 | UUUAUU | -5,422 |
| 842 | CCAGAA | 0,355 | 2110 | UUAUUG | -1,323 |
| 843 | CAGAAU | 0,080 | 2111 | UAUUGA | 0,193 |
| 844 | AGAAUU | 0,203 | 2112 | AUUGAG | -0,573 |
| 845 | GAAUUU | -0,308 | 2113 | UUGAGA | -1,872 |
| 846 | AAUUUG | -0,847 | 2114 | UGAGAA | 0,742 |
| 847 | AUUUGU | -2,386 | 2115 | GAGAAA | 1,943 |
| 848 | UUUGUU | -14,295 | 2116 | AGAAAA | 0,814 |
| 849 | UUGUUU | -14,795 | 2117 | GAAAAU | 1,023 |
| 850 | UGUUUA | -3,768 | 2118 | AAAAUA | 2,185 |
| 851 | GUUU AU | -0,705 | 2119 | AAUAU A | 0,445 |
| 852 | UUUAUA | -3,054 | 2120 | AAUAUU | 0,241 |
| 853 | UUAUAU | -1,740 | 2121 | AUAUUC | 1,249 |
| 854 | UAUAUG | -0,962 | 2122 | UAUUCU | 1,570 |
| 855 | AUAUGG | 0,289 | 2123 | AUUCUG | 0,073 |
| 856 | UAUGGC | 0,646 | 2124 | UUCUGU | -0,837 |
| 857 | AUGGCU | 0,226 | 2125 | UCUGUG | -0,056 |
| 858 | UGGCUG | -0,314 | 2126 | CUGUGU | -0,021 |
| 859 | GGCUGG | 0,026 | 2127 | UGUGUC | -0,086 |
| 860 | GCUGGU | -0,720 | 2128 | GUGUCA | 0,174 |
| 861 | CUGGUA | -0,335 | 2129 | UGUCA A | -0,231 |
| 862 | UGGUAA | -3,182 | 2130 | GUCAAG | -0,064 |
| 863 | GGUAAC | -0,740 | 2131 | UCAAGC | 0,515 |
| 864 | GUAACA | 0,398 | 2132 | CAAGCA | 1,507 |
| 865 | UAACAU | 0,000 | 2133 | AAGCAC | 0,710 |
| 866 | AACAUG | -0,478 | 2134 | AGCACU | -0,292 |
| 867 | ACAUGU | 0,513 | 2135 | GCACUG | -0,510 |
| 868 | CAUGUA | 0,165 | 2136 | CACUGU | -0,474 |
| 869 | AUGUAA | -1,949 | 2137 | ACUGUG | -0,364 |
| 870 | UGUAAA | -4,303 | 2138 | CUGUGG | -0,230 |
| 871 | GUAAAA | -0,298 | 2139 | UGUGGG | -0,056 |
| 872 | UAAAAU | -0,222 | 2140 | GUGGGU | 0,033 |
| 873 | AAAAUC | -0,193 | 2141 | UGGGUU | -1,937 |
| 874 | AAAUCU | -0,078 | 2142 | GGGUUU | -3,145 |
| 875 | AAUCUA | 2,039 | 2143 | GGUUUU | -4,397 |
| 876 | AUCUAU | 1,891 | 2144 | GUUUUA | -3,012 |
| 877 | UCUAUA | 0,955 | 2145 | UUUUA A | -4,434 |
| 878 | CUAU AU | 0,704 | 2146 | UUUA AU | -4,746 |
| 879 | UAUAUC | 1,209 | 2147 | UUAUA A | -2,157 |
| 880 | AUAUCA | 0,613 | 2148 | UAAUAU | -0,226 |
| 881 | UAUCAG | -0,461 | 2149 | AAUAUU | 0,241 |
| 882 | AUCAGC | 0,784 | 2150 | AUAUUU | -2,909 |
| 883 | UCAGCA | -0,178 | 2151 | UAUUUU | -2,715 |
| 884 | CAGCAA | 1,042 | 2152 | AUUUUU | -6,868 |
| 885 | AGCAAA | 1,810 | 2153 | UUUUUA | -11,956 |
| 886 | GCAAAA | 0,548 | 2154 | UUUUAA | -4,434 |
| 887 | CAAAA G | 0,595 | 2155 | UUUAAA | -3,605 |
| 888 | AAAAGG | -0,495 | 2156 | UUAAA U | -1,107 |
| 889 | AAAGGG | -0,067 | 2157 | UAAAUC | -0,209 |

Anhang

| | | | | | |
|-----|---------|--------|------|--------|--------|
| 890 | AAGGGU | -0,228 | 2158 | AAUCA | 0,262 |
| 891 | AGGGUC | 0,040 | 2159 | AAUCA | 0,852 |
| 892 | GGGUCU | -1,293 | 2160 | AUCAA | 1,181 |
| 893 | GGUCUA | 0,339 | 2161 | UCAAA | -0,212 |
| 894 | GUCUAC | 0,291 | 2162 | CAAACG | -0,608 |
| 895 | UCUACC | 1,043 | 2163 | AAACGC | 0,501 |
| 896 | CUACCU | 0,213 | 2164 | AACGCU | 0,000 |
| 897 | UACCUU | 0,096 | 2165 | ACGCUG | 0,032 |
| 898 | ACCUUU | 0,044 | 2166 | CGCUGA | 0,762 |
| 899 | CCUUUA | -0,138 | 2167 | GCUGAU | 0,402 |
| 900 | CUUUAA | -1,014 | 2168 | CUGAUU | 0,016 |
| 901 | UUUAAA | -3,605 | 2169 | UGAUUA | 0,105 |
| 902 | UUAAAA | -0,808 | 2170 | GAUUAC | 0,089 |
| 903 | UAAAAU | -0,222 | 2171 | AUUACA | 0,507 |
| 904 | AAAAUA | 2,185 | 2172 | UUACAG | -1,366 |
| 905 | AAUAAA | 0,494 | 2173 | UACAGA | -0,571 |
| 906 | AAUAAG | 0,395 | 2174 | ACAGAU | -0,349 |
| 907 | AUAAGC | -0,303 | 2175 | CAGAU | 0,455 |
| 908 | UAAGCA | 0,139 | 2176 | AGAUAA | 0,140 |
| 909 | AAGCAA | 2,609 | 2177 | GAUAAU | -0,044 |
| 910 | AGCAAU | 0,501 | 2178 | AUAAUA | 0,158 |
| 911 | GCAAUA | 0,355 | 2179 | UAUAG | -0,719 |
| 912 | CAUAAA | 0,572 | 2180 | AAUAGU | 0,573 |
| 913 | AAUAAC | 0,123 | 2181 | AUAGUA | 0,621 |
| 914 | AUAACA | 1,835 | 2182 | UAGUUA | -0,384 |
| 915 | UAACAA | 0,929 | 2183 | AGUAUU | -1,078 |
| 916 | AACAAA | 2,135 | 2184 | GUAUUU | -3,151 |
| 917 | ACAAAG | 0,984 | 2185 | UAUUUA | -5,869 |
| 918 | CAAAGA | 1,621 | 2186 | AUUUAU | -5,242 |
| 919 | AAAGAA | 0,265 | 2187 | UUUAUA | -3,054 |
| 920 | AAGAAG | 2,391 | 2188 | UUUAU | -1,740 |
| 921 | AGAAGA | 2,114 | 2189 | UAUUA | -3,910 |
| 922 | GAAGAA | 0,996 | 2190 | AUAUAA | -0,015 |
| 923 | AAGAAA | 1,006 | 2191 | UAUAAA | -0,559 |
| 924 | AGAAAA | 0,814 | 2192 | AUAAAA | -0,329 |
| 925 | GAAAAC | 1,331 | 2193 | UAAAA | -2,234 |
| 926 | AAAACC | 2,173 | 2194 | AAAAUA | 0,494 |
| 927 | AAACCA | 3,155 | 2195 | AAUAAU | -1,026 |
| 928 | AACCAA | 2,214 | 2196 | AUAAUU | -1,391 |
| 929 | ACCAA | 2,729 | 2197 | UAUUUG | -1,535 |
| 930 | CCAAAU | 0,070 | 2198 | AAUUGA | -1,117 |
| 931 | CAAAUU | -0,398 | 2199 | AUUGAA | -0,820 |
| 932 | AAUUUA | -0,026 | 2200 | UUGAAA | -1,707 |
| 933 | AAUUUAU | 0,331 | 2201 | UGAAAA | 0,085 |
| 934 | AUUUAU | 0,410 | 2202 | GAAAA | -0,876 |
| 935 | UUUUUG | -1,323 | 2203 | AAAAAA | -0,019 |
| 936 | UAUUUGU | -0,345 | 2204 | AAAAAA | -0,019 |
| 937 | AUUUGU | -1,264 | 2205 | AAAAAU | 2,032 |
| 938 | UUGUUC | 0,061 | 2206 | AAAAUU | 1,055 |
| 939 | UGUUCA | -0,178 | 2207 | AAUUUU | -0,446 |
| 940 | GUUCA | 0,079 | 2208 | AAUUUU | -0,965 |
| 941 | UUCAAA | 0,423 | 2209 | AUUUUC | 1,497 |
| 942 | UCAAAU | -0,510 | 2210 | UUUUCU | -0,997 |
| 943 | CAAAUU | -0,398 | 2211 | UUUCUU | -0,563 |
| 944 | AAUUUU | -0,446 | 2212 | UUCUUU | 0,191 |
| 945 | AAUUUA | -1,375 | 2213 | UCUUUU | -1,793 |
| 946 | AUUUAG | -1,019 | 2214 | CUUUUG | -0,124 |
| 947 | UUUAGG | -0,316 | 2215 | UUUUGG | -2,142 |
| 948 | UUAGGU | -0,398 | 2216 | UUUGGG | -2,861 |
| 949 | UAGGUU | -0,429 | 2217 | UUGGGA | -0,482 |
| 950 | AGGUUU | -0,350 | 2218 | UGGGAA | -0,659 |
| 951 | GGUUUA | 0,105 | 2219 | GGGAAG | -0,615 |
| 952 | GUUUAA | -3,657 | 2220 | GGAAGA | -0,993 |
| 953 | UUUAAA | -3,605 | 2221 | GAAGAG | -0,170 |

Anhang

| | | | | | |
|------|--------|---------|------|--------|--------|
| 954 | UUAAC | -0,819 | 2222 | AAGAGG | 0,441 |
| 955 | UAAACU | -0,550 | 2223 | AGAGGG | 0,705 |
| 956 | AAACUU | -3,195 | 2224 | GAGGGA | 0,534 |
| 957 | AACUUU | -1,970 | 2225 | AGGGAG | 0,740 |
| 958 | ACUUUU | -1,621 | 2226 | GGGAGA | 1,091 |
| 959 | CUUUUG | -0,124 | 2227 | GGAGAA | 0,566 |
| 960 | UUUUGA | -1,888 | 2228 | GAGAAA | 1,943 |
| 961 | UUUGAA | -0,372 | 2229 | AGAAAA | 0,814 |
| 962 | UUGAAG | -0,898 | 2230 | GAAAAU | 1,023 |
| 963 | UGAAGC | -0,167 | 2231 | AAAAUG | 1,477 |
| 964 | GAAGCA | 0,123 | 2232 | AAAUGA | 0,137 |
| 965 | AAGCAA | 2,609 | 2233 | AAUGAA | 1,044 |
| 966 | AGCAAA | 1,810 | 2234 | AUGAAA | -0,013 |
| 967 | GCAAAC | 1,190 | 2235 | UGAAAU | -0,608 |
| 968 | CAAACU | 0,348 | 2236 | GAAUAU | 0,679 |
| 969 | AAACUU | -3,195 | 2237 | AAUAAA | 0,494 |
| 970 | AACUUU | -1,970 | 2238 | AAUAAA | 0,493 |
| 971 | ACUUUU | -1,621 | 2239 | AUAAAU | -0,329 |
| 972 | CUUUUU | -5,968 | 2240 | UAAAUA | -2,234 |
| 973 | UUUUUU | -26,930 | 2241 | AAUAUU | 0,445 |
| 974 | UUUUUU | -26,930 | 2242 | AAUAUC | -0,020 |
| 975 | UUUUUU | -26,930 | 2243 | AUAUCA | 0,613 |
| 976 | UUUUUA | -11,956 | 2244 | UAUCAU | 0,734 |
| 977 | UUUUAU | -5,188 | 2245 | AUCAUU | 0,979 |
| 978 | UUUAUC | -0,475 | 2246 | UCAUUU | 2,969 |
| 979 | UUAUCC | 0,000 | 2247 | CAUAAA | 0,070 |
| 980 | UAUCCU | 0,748 | 2248 | AUUAAA | -1,157 |
| 981 | AUCCUU | 0,216 | 2249 | UUAAAG | -4,726 |
| 982 | UCCUUG | 0,382 | 2250 | UAAAGA | -0,398 |
| 983 | CCUUGU | -0,921 | 2251 | AAAGAU | 0,042 |
| 984 | CUUGUG | -1,979 | 2252 | AAGUAU | 1,215 |
| 985 | UUGUGC | -0,016 | 2253 | AGAUAA | 0,140 |
| 986 | UGUGCA | -0,962 | 2254 | GAUAAC | -0,180 |
| 987 | GUGCAC | 0,331 | 2255 | AUAACU | -0,198 |
| 988 | UGCACU | -1,076 | 2256 | UAACUC | -0,220 |
| 989 | GCACUG | -0,510 | 2257 | AACUCA | 0,713 |
| 990 | CACUGC | -1,391 | 2258 | ACUCAG | 0,096 |
| 991 | ACUGCA | -1,460 | 2259 | CUCAGG | 0,154 |
| 992 | CUGCAG | 0,025 | 2260 | UCAGGA | 0,249 |
| 993 | UGCAGG | -0,399 | 2261 | CAGGAG | 0,589 |
| 994 | GCAGGC | -0,871 | 2262 | AGGAGA | 0,724 |
| 995 | CAGGCC | 0,000 | 2263 | GGAGAA | 0,566 |
| 996 | AGGCCU | -0,728 | 2264 | GAGAAU | 0,174 |
| 997 | GGCCUG | -2,547 | 2265 | AGAAUC | 0,077 |
| 998 | GCCUGG | -0,066 | 2266 | GAAUCU | 0,124 |
| 999 | CCUGGU | -0,701 | 2267 | AAUCUU | -0,235 |
| 1000 | CUGGUA | -0,335 | 2268 | AUCUUC | 0,895 |
| 1001 | UGGUAC | -1,102 | 2269 | UCUUCU | 4,446 |
| 1002 | GGUACU | 0,000 | 2270 | CUUCUU | 2,524 |
| 1003 | GUACUC | -0,207 | 2271 | UUCUUU | 0,191 |
| 1004 | UACUCA | 0,372 | 2272 | UCUUUA | -0,206 |
| 1005 | ACUCAG | 0,096 | 2273 | CUUACU | -0,220 |
| 1006 | CUCAGA | -0,180 | 2274 | UUUACA | -1,294 |
| 1007 | UCAGAU | 0,000 | 2275 | UUACAA | 1,294 |
| 1008 | CAGAUU | -1,138 | 2276 | UACAAU | 0,236 |
| 1009 | AGAUUU | -1,726 | 2277 | ACAAUU | 0,312 |
| 1010 | GAUUUU | -1,508 | 2278 | CAUUUU | 0,075 |
| 1011 | AUUUUG | -3,239 | 2279 | AAUUUU | -0,965 |
| 1012 | UUUUGC | -1,155 | 2280 | AUUUUA | -0,259 |
| 1013 | UUUGCU | -1,124 | 2281 | UUUUAC | -1,935 |
| 1014 | UUGCUA | 0,075 | 2282 | UUUACG | 0,000 |
| 1015 | UGCUAU | 1,132 | 2283 | UUACGU | -0,327 |
| 1016 | GCUAUG | 0,087 | 2284 | UACGUU | -0,081 |
| 1017 | CUAUGA | 0,467 | 2285 | ACGUUU | -0,561 |

Anhang

| | | | | | |
|------|---------|--------|------|---------|--------|
| 1018 | UAUGAG | 0,043 | 2286 | CGUUUA | -0,464 |
| 1019 | AUGAGG | -0,357 | 2287 | GUUUAG | -0,329 |
| 1020 | UGAGGU | -0,893 | 2288 | UUUAGA | -1,153 |
| 1021 | GAGGUU | -1,109 | 2289 | UUAGAA | -0,879 |
| 1022 | AGGUUA | -0,542 | 2290 | UAGAAU | 1,380 |
| 1023 | GGUUA | -1,709 | 2291 | AGAAUG | 0,130 |
| 1024 | GUUAAU | -0,911 | 2292 | GAAUGU | -0,062 |
| 1025 | UUA AUG | -0,909 | 2293 | AAUGUU | -0,097 |
| 1026 | UAAUGA | 0,436 | 2294 | AUGUUU | -2,513 |
| 1027 | AAUGAA | 1,044 | 2295 | UGUUUA | -3,768 |
| 1028 | AUGAAG | 0,307 | 2296 | GUUUAA | -3,657 |
| 1029 | UGAAGU | -0,593 | 2297 | UUUAAG | -0,188 |
| 1030 | GAAGUA | -0,206 | 2298 | UUAAGG | -0,737 |
| 1031 | AAGUAC | -0,072 | 2299 | UAAGGU | -0,339 |
| 1032 | AGUACC | 0,300 | 2300 | AAGGUU | -1,678 |
| 1033 | GUACCA | 0,022 | 2301 | AGGUUA | -0,542 |
| 1034 | UACCAA | 1,400 | 2302 | GGUUA | -1,709 |
| 1035 | ACCAAG | 0,948 | 2303 | GUUAAG | -1,290 |
| 1036 | CCAAGC | 1,714 | 2304 | UUAAGA | 0,240 |
| 1037 | CAAGCU | 2,093 | 2305 | UAAGAA | 0,899 |
| 1038 | AAGCUG | -0,818 | 2306 | AAGAAA | 1,006 |
| 1039 | AGCUGU | -0,280 | 2307 | AGAAAG | 1,718 |
| 1040 | GCUGUG | -0,136 | 2308 | GAAAGA | 0,735 |
| 1041 | CUGUGC | -1,351 | 2309 | AAAGAA | 0,265 |
| 1042 | UGUGCU | -0,496 | 2310 | AAGAAA | 1,006 |
| 1043 | GUGCUU | -0,061 | 2311 | AGAAAU | 1,570 |
| 1044 | UGC UUG | -0,164 | 2312 | GAAUA | 0,679 |
| 1045 | GCUUGA | -0,198 | 2313 | AAAUAG | -0,348 |
| 1046 | CUUGAA | -3,365 | 2314 | AAUAGU | 0,573 |
| 1047 | UUGAAU | -0,718 | 2315 | AUAGUC | -0,205 |
| 1048 | UGAAUA | 0,016 | 2316 | UAGUCA | -0,346 |
| 1049 | GAAUAA | -0,391 | 2317 | AGUCA | 0,239 |
| 1050 | AAUAAU | -1,026 | 2318 | GUCAAU | 2,782 |
| 1051 | AUAAUG | -1,042 | 2319 | UCAUA | 0,756 |
| 1052 | UAAUGA | 0,436 | 2320 | CAAUAU | 0,338 |
| 1053 | AAUGAU | 0,364 | 2321 | AAUAUG | 0,368 |
| 1054 | AUGAUA | 0,358 | 2322 | AUAUGC | 0,455 |
| 1055 | UGAUAU | 0,569 | 2323 | UAUGCU | 0,594 |
| 1056 | GAUAUG | 0,612 | 2324 | AUGCUU | -0,033 |
| 1057 | AUAUGU | -0,467 | 2325 | UGC UUG | -0,164 |
| 1058 | UAUGUU | -0,095 | 2326 | GCUUGU | -0,051 |
| 1059 | AUGUUU | -2,513 | 2327 | CUUGUA | -3,125 |
| 1060 | UGUUUU | -6,801 | 2328 | UUGUAU | -3,849 |
| 1061 | GUUUUC | -0,747 | 2329 | UGUAUA | -5,849 |
| 1062 | UUUUCU | -0,997 | 2330 | GUUUA | -1,570 |
| 1063 | UUUCUC | -0,098 | 2331 | UAUAAA | -0,559 |
| 1064 | UUCUCA | 0,000 | 2332 | AUAAAA | 0,940 |
| 1065 | UCUCAG | -0,069 | 2333 | UAAAAC | -0,106 |
| 1066 | CUCAGA | -0,180 | 2334 | AAAACA | 2,756 |
| 1067 | UCAGAU | 0,000 | 2335 | AAACAC | 2,423 |
| 1068 | CAGAUU | -1,138 | 2336 | AACACU | 0,893 |
| 1069 | AGAUUU | -1,726 | 2337 | ACACUG | -0,460 |
| 1070 | GAUUUU | -1,508 | 2338 | CACUGU | -0,474 |
| 1071 | AUUUUC | 1,497 | 2339 | ACUGUU | -2,478 |
| 1072 | UUUUCU | -0,997 | 2340 | CUGUUC | 0,445 |
| 1073 | UUUCUG | -0,090 | 2341 | UGUCA | -0,178 |
| 1074 | UUCUGU | -0,837 | 2342 | GUUCAC | 0,784 |
| 1075 | UCUGUU | -0,196 | 2343 | UUCACU | 0,163 |
| 1076 | CUGUUG | -2,193 | 2344 | UCACUG | -0,059 |
| 1077 | UGUUGU | -0,460 | 2345 | CACUGU | -0,474 |
| 1078 | GUUGUA | -1,375 | 2346 | ACUGUU | -2,478 |
| 1079 | UUGUAC | -3,433 | 2347 | CUGUUU | -2,443 |
| 1080 | UGUACA | -3,076 | 2348 | UGUUUU | -6,801 |
| 1081 | GUACAG | -2,558 | 2349 | GUUUUU | -9,715 |

Anhang

| | | | | | |
|------|---------|--------|------|--------|---------|
| 1082 | UACAGU | -0,615 | 2350 | UUUUUU | -26,930 |
| 1083 | ACAGUU | -0,758 | 2351 | UUUUUU | -26,930 |
| 1084 | CAGUUU | -2,929 | 2352 | UUUUUU | -26,930 |
| 1085 | AGUUUA | -0,822 | 2353 | UUUUUA | -11,956 |
| 1086 | GUUUAA | -3,657 | 2354 | UUUUAA | -4,434 |
| 1087 | UUUAAU | -4,746 | 2355 | UUUAAA | -3,605 |
| 1088 | UUAAUU | -2,928 | 2356 | UUAAAA | -0,808 |
| 1089 | UAAUUU | -3,495 | 2357 | UAAAAA | 0,307 |
| 1090 | AAUUUA | -1,375 | 2358 | AAAAAA | -0,019 |
| 1091 | AUUUAG | -1,019 | 2359 | AAAAAA | -0,019 |
| 1092 | UUUAGC | -0,924 | 2360 | AAAAAA | -0,019 |
| 1093 | UUAGCA | 0,270 | 2361 | AAAAAA | -0,019 |
| 1094 | UAGCAG | -0,605 | 2362 | AAAAAA | -0,019 |
| 1095 | AGCAGU | -5,947 | 2363 | AAAAAC | 0,013 |
| 1096 | GCAGUC | -1,720 | 2364 | AAAACU | -0,776 |
| 1097 | CAGUCC | -1,076 | 2365 | AAACUU | -3,195 |
| 1098 | AGUCCA | 0,082 | 2366 | AACUUG | -4,231 |
| 1099 | GUCCAU | 0,000 | 2367 | ACUUGA | -2,357 |
| 1100 | UCCAUA | 0,104 | 2368 | CUUGAU | -0,196 |
| 1101 | CCAUAU | 1,127 | 2369 | UUGAUU | -0,063 |
| 1102 | CAUAUC | 0,712 | 2370 | UGAUUU | -0,273 |
| 1103 | AUAUCA | 0,613 | 2371 | GAUUUG | -0,374 |
| 1104 | UAUCAC | 1,393 | 2372 | AUUUGU | -2,386 |
| 1105 | AUCACA | 4,856 | 2373 | UUUGUU | -14,295 |
| 1106 | UCACAU | 0,526 | 2374 | UUGUUA | -2,721 |
| 1107 | CACAUU | 0,777 | 2375 | UGUUAU | -0,188 |
| 1108 | ACAUUG | -0,509 | 2376 | GUUAUU | -0,268 |
| 1109 | CAUUGC | -0,062 | 2377 | UUAUUA | -0,678 |
| 1110 | AUUGCA | -0,295 | 2378 | UAUUAA | -0,124 |
| 1111 | UUGCAA | 0,773 | 2379 | AUUAAC | 1,488 |
| 1112 | UGCAAA | 1,049 | 2380 | UUAACA | 0,000 |
| 1113 | GCAAAA | 0,548 | 2381 | UAACAU | 0,000 |
| 1114 | CAAAAAG | 0,595 | 2382 | AACAUU | 0,201 |
| 1115 | AAAAGU | -0,622 | 2383 | ACAUUG | -0,509 |
| 1116 | AAAGUA | -0,252 | 2384 | CAUUGA | -0,299 |
| 1117 | AAGUAG | -0,249 | 2385 | AUUGAU | 0,534 |
| 1118 | AGUAGC | -0,564 | 2386 | UUGAUC | 1,467 |
| 1119 | GUAGCA | -0,322 | 2387 | UGAUCU | 0,167 |
| 1120 | UAGCAA | 0,737 | 2388 | GAUCUG | -0,737 |
| 1121 | AGCAAU | 0,501 | 2389 | AUCUGC | 0,903 |
| 1122 | GCAAUG | 2,340 | 2390 | UCUGCU | 0,854 |
| 1123 | CAAUGA | 1,884 | 2391 | CUGCUG | -0,602 |
| 1124 | AAUGAC | -0,078 | 2392 | UGCUGA | -0,391 |
| 1125 | AUGACC | 1,246 | 2393 | GCUGAC | -0,104 |
| 1126 | UGACCU | 0,359 | 2394 | CUGACA | -0,127 |
| 1127 | GACCUC | 0,470 | 2395 | UGACAA | 1,452 |
| 1128 | ACCUCA | -0,483 | 2396 | GACAAA | 2,272 |
| 1129 | CCUCAU | 0,072 | 2397 | ACAAAA | 2,180 |
| 1130 | CUCAUA | -0,068 | 2398 | CAAAAC | 3,060 |
| 1131 | UCAUAA | 1,527 | 2399 | AAAACC | 2,173 |
| 1132 | CAUAAA | 0,068 | 2400 | AAACCU | 1,257 |
| 1133 | AUAAAA | 0,940 | 2401 | AACCUG | 0,130 |
| 1134 | UAAAAU | -0,222 | 2402 | ACCUGG | 0,381 |
| 1135 | AAAAUA | 2,185 | 2403 | CCUGGG | 0,390 |
| 1136 | AAAUAC | 0,060 | 2404 | CUGGGA | 0,574 |
| 1137 | AAUACC | 0,272 | 2405 | UGGGAA | -0,659 |
| 1138 | AUACCU | 0,155 | 2406 | GGGAAU | 0,225 |
| 1139 | UACCUA | -0,145 | 2407 | GGAAUU | -0,402 |
| 1140 | ACCUCU | 1,186 | 2408 | GAAUUU | -0,308 |
| 1141 | CCUCUU | 2,174 | 2409 | AAUUUG | -0,847 |
| 1142 | CUCUUC | 5,383 | 2410 | AUUUGG | -1,022 |
| 1143 | UCUUCA | -0,057 | 2411 | UUUGGG | -2,861 |
| 1144 | CUUCAA | 1,612 | 2412 | UUGGGU | -0,084 |
| 1145 | UUCAAA | 0,423 | 2413 | UGGGUU | -1,937 |

Anhang

| | | | | | |
|------|--------|--------|------|--------|--------|
| 1146 | UCAAAA | 1,961 | 2414 | GGGUUG | -0,101 |
| 1147 | CAAAAU | 3,013 | 2415 | GGUUGU | -2,913 |
| 1148 | AAAAUG | 1,477 | 2416 | GUUGUG | -0,816 |
| 1149 | AAAUGC | 0,917 | 2417 | UUGUGU | -1,759 |
| 1150 | AAUGCU | 0,212 | 2418 | UGUGUA | -2,153 |
| 1151 | AUGCUU | -0,033 | 2419 | GUGUAU | -2,461 |
| 1152 | UGCUUA | -0,018 | 2420 | UGUAUG | -0,569 |
| 1153 | GCUUAA | -0,800 | 2421 | GUAUGC | 0,303 |
| 1154 | CUUAAA | -0,644 | 2422 | UAUGCG | 0,057 |
| 1155 | UUAAAU | -1,107 | 2423 | AUGCGA | 0,000 |
| 1156 | UAAAUU | -0,598 | 2424 | UGCGAA | -0,709 |
| 1157 | AAAUUC | 1,369 | 2425 | GCGAAU | -1,023 |
| 1158 | AAUUCA | 0,102 | 2426 | CGAAUG | -0,178 |
| 1159 | AUUCAU | 1,115 | 2427 | GAAUGU | -0,062 |
| 1160 | UUCAUU | 0,125 | 2428 | AAUGUU | -0,097 |
| 1161 | UCAUUU | -0,076 | 2429 | AUGUUU | -2,513 |
| 1162 | CAUUUC | 0,868 | 2430 | UGUUUC | -0,581 |
| 1163 | AUUUCA | -0,211 | 2431 | GUUUCA | 0,067 |
| 1164 | UUUCAC | 0,876 | 2432 | UUUCAG | -0,906 |
| 1165 | UUCACA | 0,498 | 2433 | UUCAGU | -2,344 |
| 1166 | UCACAC | 1,511 | 2434 | UCAGUG | -0,183 |
| 1167 | CACACA | 37,749 | 2435 | CAGUGC | -0,478 |
| 1168 | ACACAU | 2,797 | 2436 | AGUGCC | -0,141 |
| 1169 | CACAUU | 0,777 | 2437 | GUGCCU | -1,506 |
| 1170 | ACAUUA | -0,055 | 2438 | UGCCUC | -0,724 |
| 1171 | CAUUAU | 0,070 | 2439 | GCCUCA | -0,191 |
| 1172 | AUUAUU | -0,246 | 2440 | CCUCAG | -0,441 |
| 1173 | UUAUUU | -2,928 | 2441 | CUCAGA | -0,180 |
| 1174 | UAAUUU | -3,495 | 2442 | UCAGAC | 0,018 |
| 1175 | AAUUUU | -0,965 | 2443 | CAGACA | 0,577 |
| 1176 | AUUUUA | -0,259 | 2444 | AGACAA | 2,957 |
| 1177 | UUUUUA | -5,188 | 2445 | GACAAA | 2,272 |
| 1178 | UUUAUC | -0,475 | 2446 | ACAAAU | 0,199 |
| 1179 | UUAUCU | 0,401 | 2447 | CAAAUG | 0,571 |
| 1180 | UAUCUC | 1,558 | 2448 | AAAUGU | -0,210 |
| 1181 | AUCUCA | 0,881 | 2449 | AAUGUG | -0,525 |
| 1182 | UCUCAG | -0,069 | 2450 | AUGUGU | 0,735 |
| 1183 | CUCAGU | -0,525 | 2451 | UGUGUA | -2,153 |
| 1184 | UCAGUC | -1,032 | 2452 | GUGUAU | -2,461 |
| 1185 | CAGUCU | 0,047 | 2453 | UGUAUU | -1,372 |
| 1186 | AGUCUU | -0,360 | 2454 | GUUUUU | -3,151 |
| 1187 | GUCUUG | -0,970 | 2455 | UAUUUA | -5,869 |
| 1188 | UCUUGA | -2,312 | 2456 | AUUUAA | -0,615 |
| 1189 | CUUGAA | -3,365 | 2457 | UUUAAC | -1,156 |
| 1190 | UUGAAG | -0,898 | 2458 | UUAAAU | -0,398 |
| 1191 | UGAAGC | -0,167 | 2459 | UAACUU | -1,086 |
| 1192 | GAAGCC | -0,340 | 2460 | AACUUA | -0,018 |
| 1193 | AAGCCA | -0,234 | 2461 | ACUUAU | 0,000 |
| 1194 | AGCCAA | 1,546 | 2462 | CUUAUG | 0,225 |
| 1195 | GCCAAU | 0,744 | 2463 | UUUAUG | -0,915 |
| 1196 | CCAAUU | 0,415 | 2464 | UAUGUA | -0,951 |
| 1197 | CAAUUC | 0,286 | 2465 | AUGUAA | -1,949 |
| 1198 | AAUUCA | 0,102 | 2466 | UGUAAA | -4,303 |
| 1199 | AUUCAG | 0,104 | 2467 | GUAAAA | -0,298 |
| 1200 | UUCAGU | -2,344 | 2468 | UAAAAG | -0,579 |
| 1201 | UCAGUA | -1,773 | 2469 | AAAAGA | 0,011 |
| 1202 | CAGUAG | -1,088 | 2470 | AAAGAU | 0,042 |
| 1203 | AGUAGG | -0,377 | 2471 | AAGAUU | 1,215 |
| 1204 | GUAGGU | 0,478 | 2472 | AGAUAA | 0,140 |
| 1205 | UAGGUG | 0,117 | 2473 | GAUAAG | 1,243 |
| 1206 | AGGUGC | 0,000 | 2474 | AUAAGU | -0,273 |
| 1207 | GGUGCA | -0,022 | 2475 | UAAGUC | 0,236 |
| 1208 | GUGCAU | -0,188 | 2476 | AAGUCU | 0,299 |
| 1209 | UGCAUU | -0,418 | 2477 | AGUCUG | 0,282 |

Anhang

| | | | | | |
|------|--------|--------|------|--------|-----------|
| 1210 | GCAUUG | -1,510 | 2478 | GUCUGG | -0,667 |
| 1211 | CAUUGG | -0,450 | 2479 | UCUGGA | 0,459 |
| 1212 | AUUGGA | -1,376 | 2480 | CUGGAA | -0,095 |
| 1213 | UUGGAA | -3,090 | 2481 | UGGAAA | 0,025 |
| 1214 | UGGAAU | -0,420 | 2482 | GGAAAU | -0,244 |
| 1215 | GGAAUC | 2,250 | 2483 | GAAUAU | 0,679 |
| 1216 | GAAUCA | 1,135 | 2484 | AAAUAU | 0,494 |
| 1217 | AAUCAA | 0,852 | 2485 | AAUAAA | 0,493 |
| 1218 | AUCAAG | 1,765 | 2486 | AUAAAU | -0,329 |
| 1219 | UCAAGC | 0,515 | 2487 | UAAAUG | -0,865 |
| 1220 | CAAGCC | 0,834 | 2488 | AAAUGU | -0,210 |
| 1221 | AAGCCU | 0,236 | 2489 | AAUGUC | 0,016 |
| 1222 | AGCCUG | 0,000 | 2490 | AUGUCU | -0,183 |
| 1223 | GCCUGG | -0,066 | 2491 | UGUCUG | -1,951 |
| 1224 | CCUGGC | 0,457 | 2492 | GUCUGU | -2,069 |
| 1225 | CUGGCU | 0,382 | 2493 | UCUGUU | -0,196 |
| 1226 | UGGCUA | -0,502 | 2494 | CUGUUU | -2,443 |
| 1227 | GGCUAC | 0,530 | 2495 | UGUUUA | -3,768 |
| 1228 | GCUACC | 0,137 | 2496 | GUUUUA | -0,705 |
| 1229 | CUACCU | 0,213 | 2497 | UUUAUU | -5,422 |
| 1230 | UACCUG | 0,069 | 2498 | UUUUUU | -2,159 |
| 1231 | ACCUGC | 0,515 | 2499 | UAUUUU | -2,715 |
| 1232 | CCUGCA | 1,557 | 2500 | AUUUUU | -6,868 |
| 1233 | CUGCAU | -0,161 | 2501 | UUUUUG | -10,285 |
| 1234 | UGCAUG | 0,000 | 2502 | UUUUGU | -10,505 |
| 1235 | GCAUGC | 0,040 | 2503 | UUUGUA | -4,619 |
| 1236 | CAUGCU | -0,457 | 2504 | UUGUAC | -3,433 |
| 1237 | AUGCUG | 0,015 | 2505 | UGUACU | -0,443 |
| 1238 | UGCUGU | -1,080 | 2506 | GUACUA | -0,618 |
| 1239 | GCUGUU | -1,581 | 2507 | UACUAU | 0,660 |
| 1240 | CUGUUC | 0,445 | 2508 | ACUAUU | -0,168 |
| 1241 | UGUUCC | 1,773 | 2509 | CUAUUU | -0,537 |
| 1242 | GUUCCU | -0,015 | 2510 | UAUUUA | -5,869 |
| 1243 | UUCCUU | 0,369 | 2511 | AUUUUA | -0,615 |
| 1244 | UCCUUU | -0,594 | 2512 | UUUAAA | -3,605 |
| 1245 | CCUUUU | -2,405 | 2513 | UUAAAA | -0,808 |
| 1246 | CUUUUC | -2,859 | 2514 | UAAAAA | 0,307 |
| 1247 | UUUUUC | -0,997 | 2515 | AAAAAU | 2,032 |
| 1248 | UUUCUU | -0,563 | 2516 | AAAAUU | 1,055 |
| 1249 | UUCUUU | 0,191 | 2517 | AAAUUG | -2,493 |
| 1250 | UCUUUU | -1,793 | 2518 | AAUUGA | -1,117 |
| 1251 | CUUUUC | -2,859 | 2519 | AUUGAC | -0,125 |
| 1252 | UUUUUC | -0,997 | 2520 | UUGACA | 0,114 |
| 1253 | UUUCUU | -0,563 | 2521 | UGACAG | -0,030 |
| 1254 | UUCUUC | 1,781 | 2522 | GACAGA | 0,254 |
| 1255 | UCUUCU | 4,446 | 2523 | ACAGAU | -0,349 |
| 1256 | CUUCUU | 2,524 | 2524 | CAGAUC | 0,826 |
| 1257 | UUCUUU | 0,191 | 2525 | AGAUCU | -0,143 |
| 1258 | UCUUUU | -1,793 | 2526 | GAUCUU | -0,235 |
| 1259 | CUUUUA | -1,068 | 2527 | AUCUUU | 0,592 |
| 1260 | UUUUAG | -1,428 | 2528 | UCUUUU | -1,793 |
| 1261 | UUUAGC | -0,924 | 2529 | CUUUUC | -2,859 |
| 1262 | UUAGCC | -0,022 | 2530 | UUUUCU | -0,997 |
| 1263 | UAGCCA | -0,037 | 2531 | UUUCUG | -0,090 |
| 1264 | AGCCAU | 0,079 | 2532 | UUCUGA | 0,318 |
| 1265 | GCCAAU | 0,180 | 2533 | UCUGAA | 0,070 |
| 1266 | CCAUUU | 1,001 | 2534 | CUGAAG | 0,232 |
| 1267 | CAUUUU | -0,582 | 2535 | UGAAGA | -0,081 |
| 1268 | AUUUUG | -3,239 | | | |
| | | | | | -1456,783 |

7.3 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| Amp | Ampicillin |
| Amp ^R | Ampicillinresistenz |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| DNA | Deoxyribonukleinsäure |
| dNTP | deoxyNukleotidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> (lat.: „und andere“) |
| EtOH | Ethanol |
| fwd. | <i>forward</i> |
| GFP | <i>green fluorescence protein</i> |
| griech. | griechisch |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid |
| Kap. | Kapitel |
| LB | Luria-Broth |
| lat. | lateinisch |
| Lsg. | Lösung |
| mRNA | <i>messengerRNA</i> |
| miR | microRNA |
| NaAc | Natriumacetat |
| NTP | Nukleotidtriphosphat |
| oD _x | optische Dichte bei x nm |
| ONPG | ortho-Nitrophenyl- β -galaktopyranosid |
| ORF | <i>open reading frame</i> |
| PAA | Polyacrylamid |

| | |
|-------|---------------------------------------|
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| qRT | quantitative reverse Transkription |
| rev | <i>reverse</i> |
| RLU | <i>Relative Light Units</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| s. | siehe |
| SD | Shine-Dalgarno-Sequenz |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Tab. | Tabelle |
| Tc | Tetrazyklin |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetraethylenmethyldiamin |
| TetR | Tetrazyklinrepressor |
| Tris | Trishydroxymethylaminoethan |
| tRNA | <i>transfer</i> RNA |
| üN | über Nacht |
| ÜNK | Übernachtkultur |
| ÜTK | Übertagkultur |
| UTR | <i>untranslated region</i> |
| UV | Ultraviolett |
| 3' | 3'-OH-Ende |
| 5' | 5'-Phosphat-Ende |

Einheiten

| | |
|-----|---|
| Å | Angström (100 pm) |
| bp | Basenpaar |
| bar | Druckeinheit |
| °C | Grad Celsius |
| g | Fallbeschleunigung (9,80665 m s ⁻²) |
| h | Stunde |
| l | Liter |
| m | Meter |
| M | molar (mol/l) |

Anhang

| | |
|-----|--|
| min | Minute |
| mol | Stoffmenge ($6,022 \times 10^{23}$ Teilchen) |
| MU | <i>Miller Units</i> |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| sec | Sekunde |
| U | Unit |
| V | Volt |
| v/v | Volumenprozent |
| W | Watt |
| w/v | <i>weight per volume</i> ; Masse pro Volumen (g/100ml) |

Nukleotide

Vorsätze

| | | | | |
|---|---------------|-------|-------|------------|
| A | Adenosin | k | kilo | 10 |
| C | Cytosin | m | milli | 10^{-3} |
| G | Guanosin | μ | mikro | 10^{-6} |
| T | Thymidin | n | nano | 10^{-9} |
| U | Uridin | p | piko | 10^{-12} |
| N | A, C, G, T, U | f | femto | 10^{-15} |

Aminosäuren nach IUPAC

| | | | | | |
|---|-----|----------------|---|-----|------------|
| A | Ala | Alanin | M | Met | Methionin |
| C | Cys | Cystein | N | Asn | Asparagin |
| D | Asp | Asparaginsäure | P | Pro | Prolin |
| E | Glu | Glutaminsäure | Q | Gln | Glutamin |
| F | Phe | Phenylalanin | R | Arg | Arginin |
| G | Gly | Glycin | S | Ser | Serin |
| H | His | Histidin | T | Thr | Threonin |
| I | Ile | Isoleucin | V | Val | Valin |
| K | Lys | Lysin | W | Trp | Tryptophan |
| L | Leu | Leucin | Y | Tyr | Tyrosin |

Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Hunsicker A., Steber M., Mayer G., Klotzsche M., Blind M., Hillen W., Berens C. and Suess B. (2009). An RNA aptamer that induces transcription. *Chemistry and Biology*. 27;16(2):173-80.

Steber M., Arora A., Hoffmann J., Brutschy B. and Suess B. (2011). Mechanistic basis for aptamer-based induction of TetR. (in Vorbereitung)

Präsentationen

GMB-Tagung, Hamburg 2007 (Poster)

Identification and characterization of a TetR binding aptamer

EMBO-RNA-Workshop, Wien 2009 (Poster)

Identification and characterization of a TetR binding aptamer

FIRST/GK1172-Winter/SummerSchool 2009 (Vortrag)

Identification and characterization of miRNAs regulating 5-LO

FIRST/GK1172-Winter/SummerSchool 2010 (Vortrag)

Identification of miRNAs regulating COX-2 expression in colon cancer cells interacting with platelets

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name, Vorname: Steber, Markus
Geburtsdatum/-ort: 16.08.1979 in Augsburg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulausbildung

09/1986 – 07/1990 Grundschule St. Ägidius Neusäß
09/1990 - 07/1999 Justus-von-Liebig-Gymnasium Neusäß

Zivildienst

09/1999 - 07/2000 Annakolleg der Barbara-von-Stetten-Stiftung Augsburg

Hochschulausbildung

09/2000 - 03/2001 Wartesemester auf einen Studienplatz in Zahnmedizin
04/2001 - 09/2001 Studium der Zahnmedizin, Universität Würzburg
10/2001 - 02/2007 Studium der Biologie, Universität Erlangen-Nürnberg
Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Hillen und Dr. B. Süß mit dem Thema „Regulation genetischer Aktivität durch RNA-Moleküle“ am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Erlangen-Nürnberg
seit 03/2007 Doktorarbeit bei Prof. Dr. B. Süß am Institut für Mikrobiologie, Genetik und Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg, seit 09/2007 am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Universität Frankfurt/Main

Förderung

01/2009 - 12/2010 Promotionsstipendium des DFG-Graduiertenkollegs
FIRST/GK1172 *Biologicals*

Frankfurt, den 14.06.2011