



# **Molekulare Netzwerke: microRNAs in der neuronalen Differenzierung unrestringierter somatischer Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC)**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Katharina Maria Iwaniuk**  
aus Myslowitz (Polen)

Düsseldorf, Oktober 2011

angefertigt am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hans Werner Müller

Korreferent: Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2011

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat.“*

Johann Wolfgang von Goethe, (1749-1832)

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Summary .....</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>11</b>
4.1	Ebenen der Genregulation .....	11
4.2	MicroRNAs: Struktur, Biogenese und Wirkung .....	12
4.2.1	Biogenese .....	13
4.2.2	Translationsinhibierung durch microRNAs .....	15
4.2.3	Bioinformatische microRNA-Zielgen-Vorhersagen .....	16
4.2.4	MicroRNAs in der Neurogenese .....	17
4.3	Stammzellen .....	19
4.3.1	Embryonale Stammzellen .....	19
4.3.2	Induzierte pluripotente Stammzellen .....	23
4.3.3	Unrestringierte somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut .....	24
4.4	Neuronale Differenzierung der USSC .....	26
4.5	Ziel der Arbeit .....	27
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
5.1	Material .....	29
5.1.1	Plastikgefäße, Einwegartikel und Filmmaterial .....	29
5.1.2	Chemikalien .....	29
5.1.3	Geräte .....	29
5.1.4	Vektor .....	30
5.1.5	Antikörper .....	31
5.1.6	DNA-Größen-Standards .....	32
5.1.7	Oligonukleotide .....	32
5.1.7.1	Primer und weitere DNA-Oligonukleotide .....	32
5.1.7.2	LNA-Oligonukleotide .....	34
5.1.7.3	MicroRNA-Mimics .....	34
5.1.8	Enzyme .....	35
5.1.9	Kommerzielle Kits .....	36
5.1.10	Bakterienstamm .....	36
5.1.11	Humane Zelllinien .....	37
5.1.12	Verwendete Antibiotika .....	37
5.1.13	Datenbanken und Software .....	37
5.2	Methoden .....	38

5.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	38
5.2.1.1	RNA-Isolierung mittels mirVana Kit.....	38
5.2.1.2	Total-RNA-Isolierung mittels Qiagen RNeasy-Mini Kit.....	39
5.2.1.3	Aufreinigung von DNA mittels Phenolextraktion und Ethanol-Fällung .....	39
5.2.1.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	39
5.2.1.5	Größenauftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	40
5.2.1.6	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
5.2.1.7	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	41
5.2.1.8	Silberfärbung von RNA im Polyacrylamid-Gel .....	41
5.2.1.9	EDC/LNA-Northernblot.....	42
5.2.1.10	PCR - Polymerase-Kettenreaktion .....	44
5.2.1.11	Restriktion der PCR-Produkte und Kontroll-Ligation .....	46
5.2.1.12	Kolonie-PCR .....	46
5.2.1.13	Hybridisierung der miR-137match-Oligonukleotide.....	47
5.2.1.14	cDNA-Synthese für Klonierung .....	47
5.2.1.15	Vektor-Präparation für Klonierung.....	48
5.2.1.16	Vektor-Insert-Ligation.....	49
5.2.1.17	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> SURE .....	49
5.2.1.18	Elektroporation von <i>E. coli</i> SURE .....	50
5.2.1.19	Plasmidextraktion mittels QIAprep Spin Miniprep Kit.....	50
5.2.1.20	DNA-Sequenzierung .....	50
5.2.1.21	Maxi-Präparation von pmirGLO und pmirGLO/3'UTR-Konstrukten .....	51
5.2.2	In silico Methoden .....	51
5.2.3	Zellbasierte Methoden.....	52
5.2.3.1	Kultivierung der Zelllinie HEK293T .....	52
5.2.3.2	Bestimmung der Lebend-Zellzahl .....	52
5.2.3.3	Lagerung von HEK293T.....	53
5.2.3.4	Experimentelle Zielgenvalidierungen in HEK293T-Zellen.....	53
5.2.3.5	Kultivierung von USSC-Linien.....	54
5.2.3.6	Neuronale Differenzierung von USSC-Linien.....	55
5.2.3.7	Immunzytochemische Färbung von USSC .....	55
5.2.3.8	microRNA-Quantifizierung mittels TaqMan Megaplex Array.....	56
5.2.3.9	MicroRNA-vermittelte Translationsrepression im zeitlichen Verlauf.....	59
5.2.3.10	Neurogenesis and Neural Stem Cell Array .....	60
<b>6</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>63</b>
6.1	Vergleichende microRNA-Profil-Analytik.....	63
6.1.1	XXL-Differenzierung von USSC-Linien .....	63

6.1.2	Vergleichende microRNA-Expressionsanalysen.....	65
6.2	Zielgenvorhersagen für die 18 herunterregulierten microRNAs.....	70
6.3	Experimentelle Zielgenvalidierungen .....	76
6.3.1	Prinzip des Luciferase-Assays .....	76
6.3.2	Ausgewählte Proteine und microRNAs .....	78
6.3.3	Klonierung zu testender 3'UTR-Fragmente .....	79
6.3.4	Zielgenvalidierungen .....	81
6.4	Zeitlicher Verlauf microRNA-vermittelter Translationsrepression.....	89
6.5	Globale Genexpressionsanalyse .....	91
6.6	Funktionale Analyse von 10 ausgewählten microRNAs.....	93
6.6.1	Genexpression im Zuge der neuronalen Differenzierung.....	93
6.6.2	Einfluss von microRNA-Mimics auf die XXL-Differenzierung von USSC .....	95
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>100</b>
7.1	MicroRNA-Expression der USSC und vergleichende Analyse.....	100
7.1.1	MicroRNA-Expressionsprofile nativer USSC.....	101
7.1.2	Differentielle microRNA-Expression in XXL-USSC .....	101
7.2	Bioinformatische Zielgenvorhersagen.....	104
7.3	Experimentelle Zielgenvalidierungen .....	107
7.4	Kinetik microRNA-vermittelter Translationsrepression.....	112
7.5	Globale Genexpressionsanalysen .....	113
7.6	Funktionale microRNA-Analysen .....	115
7.7	Ausblick.....	116
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>118</b>
8.1	MicroRNA-Expressionsprofile .....	118
8.2	Potentieller regulatorischer Einfluss von microRNAs auf verschiedene KEGG-Pathways .....	128
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>146</b>
<b>11</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>148</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A.dest.	destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
ci	Curie
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPM	Counts per Minute
Ct	cycle threshold
dCt	delta Ct-Wert
ddCt	delta delta Ct-Wert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
E.coli	Escherichia coli
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Natriumsalz
ESC	„embryonic stem cell“, embryonale Stammzelle
et al.	et alii
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
fwd	forward (vorwärts)
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung, 9,80665 m/s <sup>2</sup>
gDNA	genomische DNA
GO	gene ontology
GTP	Guaninriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
hsa	homo sapiens
HSC	„hematopoietic stem cell“, hämatopoietische Stammzelle
hUCB	human umbilical cord blood
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kBq	Kilobecquerel

---

L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LNA	locked nucleic acid
μ	mikro
m	milli
M	Mol (mol/l)
mA	Milliampere
MBq	Megabecquerel
MCS	Multiple cloning site
mESC	murine embryonale Stammzellen
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
MHC	major histocompatibility complex
μl	Mikroliter
miRISC	microRNA-assoziiertes RISC
miRNA/miR-	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	molar
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymal stem cell (mesenchymale Stammzelle)
msec	Millisekunde
n	nano
NB	Northern Blot
nm	Nanometer
NSC	„neural stem cell“, neurale Stammzelle
nt	Nukleotid(e)
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x nm Wellenlänge
Ω	Ohm
Opti-Mem	Serum-freies Zellkulturmedium (Invitrogen)
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p	piko
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Puffer)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
pmol	pikomolar
qPCR	quantitative Real-time-PCR
RA	retinoic acid, Retinsäure
rev	reverse (rückwärts)
RISC	RNA-induced silencing complex
RLC	RISC loading complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
ss	single strand
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA (Puffer)
TE	Tris-EDTA (Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
T <sub>hyb</sub>	Hybridisierungstemperatur
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
u	units
USSC	unrestringierte somatische Stammzelle aus Nabelschnurblut
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumen pro Volumen
vs.	versus
W	Watt
(w/v)	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentralnervensystem

## 2 Zusammenfassung

Im Verlaufe der vorliegenden Promotionsarbeit wurde der Einfluss von microRNAs auf die neuronale Differenzierung unrestringierter somatischer Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut (USSC) untersucht.

Die neuronale Differenzierung von USSC, mittels einer auf  $\alpha$ -Retinsäure und weiteren Faktoren basierenden Induktion, wurde im Vorfeld beschrieben [1,2] und diente als Basis für die vorliegende Arbeit. Es wurden von drei USSC-Linien und neuronal andifferenzierten Derivaten (XXL-USSC) umfassende microRNA-Expressionsprofile erstellt und analysiert. Dabei zeigte sich, dass im Zuge der 14-tägigen neuronalen Andifferenzierung von USSC eine Gruppe von 18 microRNAs gemeinsam herunterreguliert wurde. Diese microRNAs entstammen vorwiegend der miR-17-92-Familie, darüber hinaus wurden aber auch weitere microRNAs wie miR-137 und miR-138 herunterreguliert vorgefunden. Um die biologische Funktion dieser microRNAs im gegebenen zellulären System zu erfassen, wurden umfangreiche bioinformatische Zielgenvorhersagen durchgeführt und diese vorhergesagten Zielgene durch Analyse der „Gene-Ontology-Terms“ und Integrationen in „KEGG-Pathways“ neuronal relevanten biologischen Funktionen zugeordnet. Dabei zeigte sich, dass die Gruppe der zuvor genannten 18 microRNAs einen massiven potentiellen Einfluss auf eine Vielzahl von Komponenten relevanter Pathways wie „Axon Guidance“, „TGF-beta-“, „WNT“- sowie „MAPK-Signaling“ und „Longterm Potentiation“ ausübt. So werden zum Beispiel mehr als 57% der Proteine des „Axon Guidance-Pathways“ von diesen microRNAs erfasst.

Diese Beobachtungen implizieren, dass die genannten 18 microRNAs eine netzwerkartige Funktion im Rahmen der Neurodifferenzierung von USSC ausüben, wobei ihre Herunterregulation im Zuge der Differenzierung die Expression ganzer Gruppen neuronal relevanter Proteine „freigeben“ würde. Um die kreuzweise Vernetzung von microRNAs und potentiellen Zielgenen experimentell zu untermauern, wurde ein Assay etabliert, der auf der Klonierung der 3'UTR eines potentiellen Zielgens an das 3'-Ende des Luciferase-ORF basiert. Von den 71 untersuchten individuellen vorhergesagten microRNA-Zielgeninteraktionen konnten 23 experimentell bestätigt werden. Dabei wurden für 9 von 10 microRNAs bis dato nicht bekannte Zielgene identifiziert. Unter Verwendung obiger Reporterkonstrukte konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation endogener microRNAs im Zuge der neuronalen Andifferenzierung von USSC zu einer verminderten Translationshemmung der mRNAs zuvor validierter Zielproteine führte.

In Zusammenarbeit mit Sandra Weinhold (ITZ Uniklinikum Düsseldorf) und James Adjaye (MPI Berlin) erstellte Transkriptomanalysen mittels Illumina-Plattform von nativen und

neuronal andifferenzierten USSC zeigten eine signifikante Anreicherung vorhergesagter Zielgene in der Gruppe von in XXL-USSC hochregulierten Proteinen.

Der funktionale Einfluss der genannten microRNA-Gruppe auf die neuronale Differenzierung von USSC wurde durch simultane Überexpression von microRNA-Subgruppen während der XXL-Induktion untersucht. Es konnte ein deutlicher Einfluss auf die Morphologie sowie die Zellzahl festgestellt werden, eine quantitative real-time PCR-Analyse von 84 neuronal relevanten Genen (Neurogenesis and Neural Stem Cell Array) konnte diesen Einfluss auf mRNA-Ebene zum untersuchten Zeitpunkt jedoch nicht bestätigen.

### 3 Summary

The major goal of this study was to analyze the impact of microRNAs on neuronal lineage differentiation of unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood (USSC). This XXL-medium mediated differentiation method was published earlier [1,2]. Differentiated cells (XXL-USSC) demonstrate a neuronal morphology, expression of neuronal markers and release of dopamine but no fast-activating and fast inactivating sodium currents could be detected.

Three distinct USSC lines were differentiated into neuronal lineage for 14 days (XXL-USSC) and microRNA expression profiles were obtained using a qRT-PCR-based TaqMan assay. A set of 18 microRNAs was found consistently downregulated in all XXL-USSC lines and bioinformatical target gene predictions for this microRNA group revealed a large amount of putative target genes with functions in the context of neuronal differentiation, development and function. Strikingly, microRNAs and predicted target proteins were interwoven in a network-like manner, with many microRNAs sharing their target genes and vice versa. In addition, a large amount of predicted target proteins were identified as members of biochemical pathways important of neuronal differentiation and function („Axon Guidance“, „TGF-beta-“, „WNT“-, „MAPK-Signaling“ and „Longterm Potentiation“). In example, more than 57% of axon guidance members were predicted to be targets of the 18 downregulated microRNAs. This observation implies a concerted regulatory network during USSC differentiation, but remained to be validated experimentally. Thus a luciferase reporter gene assay was established based on cloning of 3'UTRs from proteins of interest at the 3'-end of the firefly luciferase ORF. The cross-wise interaction between 10 selected microRNAs and 11 selected proteins could be demonstrated by positive experimental validation of 23 out of 71 individual microRNA/3'UTR-interactions tested. Furthermore, using these constructs, transfection experiments in USSC demonstrated that the translational repression of validated target proteins mediated by endogenous USSC microRNAs diminished in course of neuronal differentiation. Illumina transcriptome analyses (in cooperation with Sandra Weinhold, ITZ, University Clinic Düsseldorf and James Adjaye, MPI Berlin) revealed a statistically enriched amount of upregulated genes in XXL-USSC within the group of putative target genes for the 18 downregulated microRNAs.

Using batches of microRNA mimics in transfections of USSC followed by induction of neuronal differentiation, overexpression of these microRNAs demonstrated an influence on neuronal differentiation at a morphological level and on the number of cells remaining after XXL-induction. Although genes important for neuronal differentiation and development (Neurogenesis and Neural Stem Cell Array) were found upregulated in day 5-7 XXL-USSC,

overexpression of microRNAs using different microRNA mimic batches did not affect their expression pattern. These findings imply that despite the observed changes in morphology microRNAs do not (indirectly) affect transcription at this early time point in differentiation and these observed morphological effects are likely due to posttranslational regulatory effects.

## 4 Einleitung

### 4.1 Ebenen der Genregulation

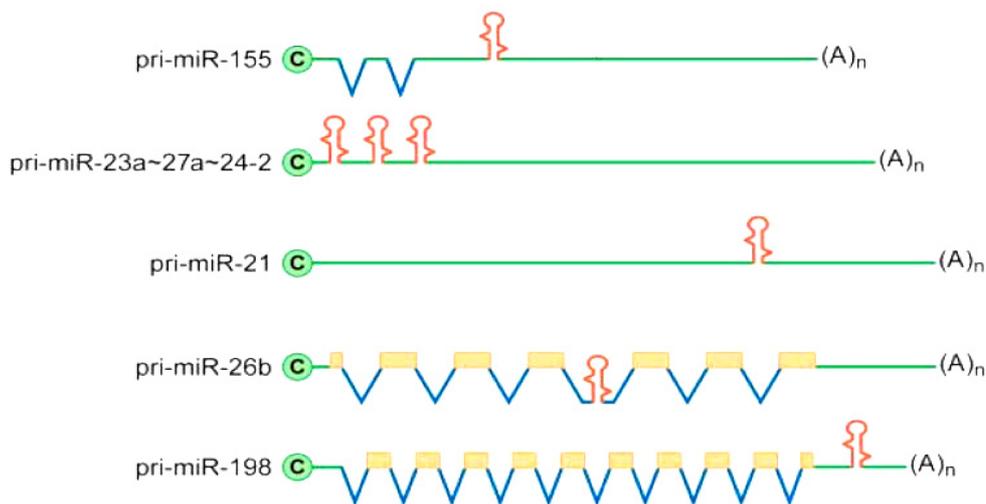
Genregulation bezeichnet die Gesamtheit aller molekularen und biochemischen Prozesse einer Zelle, welche die Endmenge eines Genproduktes beeinflussen können. Diese Genprodukte können Proteine und Peptide, aber auch verschiedene RNA-Varianten wie rRNA, tRNA, sowie verschiedene kleine RNAs sein. Dabei gibt es unterschiedliche Ebenen auf denen Genregulation stattfindet und somit die Genexpression beeinflusst, wobei häufig eine parallele Regulation auf verschiedenen Ebenen stattfindet. Auf DNA-Ebene besteht die Möglichkeit über Promotoren und Enhancer- bzw. Silencer-Elemente die Transkriptionsinitiation und -effizienz zu beeinflussen (Beispiel Hormon-induzierte Transkription). Vermittelt wird die Wirkung dieser Genbereiche meistens durch Anwesenheit oder Fehlen spezifischer Transkriptionsfaktoren, die häufig selbst einer Regulation über posttranslationale Modifikationen unterliegen (z.B. Phosphorylierung, Dephosphorylierung). Desweiteren haben epigenetische Einflüsse wie CpG-Methylierung bestimmter Genabschnitte und/oder deren Assoziation an modifizierte Histone teilweise erhebliche Auswirkung auf deren Expression (Rett-, ICF- und Fragile-X-Syndrom). Auf Ebene der mRNA beeinflusst vor allem die Prozessierung (Capping, Splicing, Polyadenylierung, Editing, Transport) und Halbwertszeit bzw. Stabilität den Grad der Genexpression. Weitere Regulationspunkte auf dem Weg zum funktionalen Protein bieten die Translationsinitiation und -effizienz, korrekte Faltung und Halbwertszeit der Proteine, sowie die bereits erwähnten posttranslationalen Modifikationen (Phosphorylierung, Glycosylierung, Acetylierung, Abspaltung von Signalsequenzen, Komplexierung mit Ionen etc.).

Eine weitere, verhältnismäßig neuentdeckte Form der Genregulation bildet die RNA-Interferenz (RNAi). Dabei hemmen kurze, endogene microRNAs oder siRNAs mRNAs effizient und sequenzspezifisch auf translationaler Ebene die Proteinexpression. Während siRNAs vollständig komplementär zu ihrer Ziel-mRNA sind und meist in deren ORF binden, wirken microRNAs dagegen auf die 3'UTR ihrer Ziel-mRNA und besitzen häufig nur eine unvollständige Komplementarität zu ihren Bindestellen. Je nach Komplementaritätsgrad zur Ziel-3'UTR unterdrücken sie nur die Translation oder beeinflussen die mRNA-Stabilität. SiRNA-Interaktionen führen dagegen immer zum Abbau der Ziel-mRNA. Die microRNAs wurden erstmals im Jahre 1993 während der Larvalentwicklung von *C. elegans* beschrieben [3]. Erst 2001 wurden weitere microRNAs entdeckt und beschrieben [4,5,6]. Inzwischen finden sich 16772 Einträge in der microRNA-Datenbank „miRBase“ (Version 17, April 2011, <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>) [7,8,9,10,11], davon allein 1424 humane microRNAs ([http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summary.pl?org=hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa)).

## 4.2 MicroRNAs: Struktur, Biogenese und Wirkung

Was genau sind also microRNAs? Im reifen Zustand handelt es sich um 19-22 Nukleotide lange, nicht-codierende, einzelsträngige RNA-Moleküle, die aus Haarnadelschleifenförmigen Transkripten generiert werden [12,13,14]. MicroRNAs finden sich in allen bisher untersuchten Eukaryoten wie z.B. einzelligen Algen [15], Schleimpilzen [16], höheren Pflanzen [17,18,19,20], Fruchtfliegen [21], Wirbeltieren (Maus, Ratte, Mensch: [22]), sowie in einigen Viren [23], nicht jedoch in prokaryotischen Zellen.

Mit über 200 verschiedenen microRNAs pro höherer eukaryotischer Spezies bilden sie eine der umfangreichsten Genfamilien, die ca. 1% des Genoms ausmacht [13]. Ihre Biogenese ist evolutionär konserviert und gliedert sich in mehrere aufeinander folgende Reifungsschritte. Es gibt eine Vielzahl von möglichen Genorten für microRNAs: die meisten sind in intergenischen Sequenzen lokalisiert [6], einige besitzen eigene Promotoren [24,25], zum Teil liegen sie einzeln vor, zum Teil bilden sie polyzistronische Transkriptionseinheiten [6,26,27,28]. Vereinzelt findet man microRNA-Gene aber auch in Introns [29] und in seltenen Fällen auch in 3'UTRs [29] bekannter, proteincodierender Gene aber auch in Introns und Exons nicht-codierender RNAs (ncRNA) [29]. Abbildung 4.1 gibt einen Überblick über die pri-miRNA-Strukturen ausgewählter microRNAs.



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung verschiedener humaner pri-microRNA-Strukturen.** MicroRNA-Stem-loops sind mit orange gekennzeichnet, nicht-codierende Sequenzen in grün, Introns in blau und Exons in gelb. Die 5'-Cap-Struktur ist mit einem „C“ symbolisiert. Modifiziert nach Cullen 2004 [14].

### 4.2.1 Biogenese

Zunächst werden die langen primären Transkripte (pri-microRNA), ähnlich proteincodierenden Genen, von der RNA-Polymerase II transkribiert [24]. Sie können mehrere Kilobasen lang sein und bilden dabei typische Haarnadelschleifen-Strukturen aus, „Stem-loops“ genannt. Wie es für RNA-Polymerase-II-transkribierte Gene üblich ist, besitzen pri-microRNAs sowohl eine Cap-Struktur, als auch einen Poly-A-Schwanz [25]. Noch im Zellkern wird die pri-microRNA weiter prozessiert. Ein zentrales Molekül in dem so genannten „Mikroprozessor-Komplex“ stellt die Typ-III-RNase Drosha dar (vergleiche Abbildung 4.2). Im humanen System assoziiert Drosha mit ihrem Ko-Faktor DGCR8 („DiGeorge syndrome critical region gene 8“, in *D.melanogaster* und *C.elegans* auch „Pasha“ genannt) und spaltet aus der pri-microRNA die ca. 60-100 Nukleotide lange precursor-microRNA (pre-microRNA) eine helikale Windung (~11 nt) von der ssRNA/dsRNA-Gabelung entfernt ab, dabei entsteht ein charakteristischer 3'-Überhang von 2 Nukleotiden Länge [30,31,32,33,34]. Nun wird die pre-microRNA über einen Exportin-5/Ran-GTP-vermittelten Transport über Kernporen ins Zytoplasma verbracht, wo sie durch Dicer, ebenfalls eine Typ-III-RNase, zu ca. 22 Nukleotiden langen microRNA/microRNA\*-Duplexen weiter prozessiert wird [35,36,37,38,39,40] (Abbildung 4.2). Dicer ist ein hochkonserviertes Protein, welches den Kern des „RNA induced silencing complex(RISC) loading complex“ (RLC) darstellt und sich in nahezu allen eukaryotischen Organismen wie Hefen, Pflanzen und Metazoen findet. Manche Organismen besitzen sogar multiple Dicer-Homologe mit verschiedenen Funktionen: in *D. melanogaster* prozessiert beispielsweise Dicer-1 microRNAs und Dicer-2 siRNAs [41].

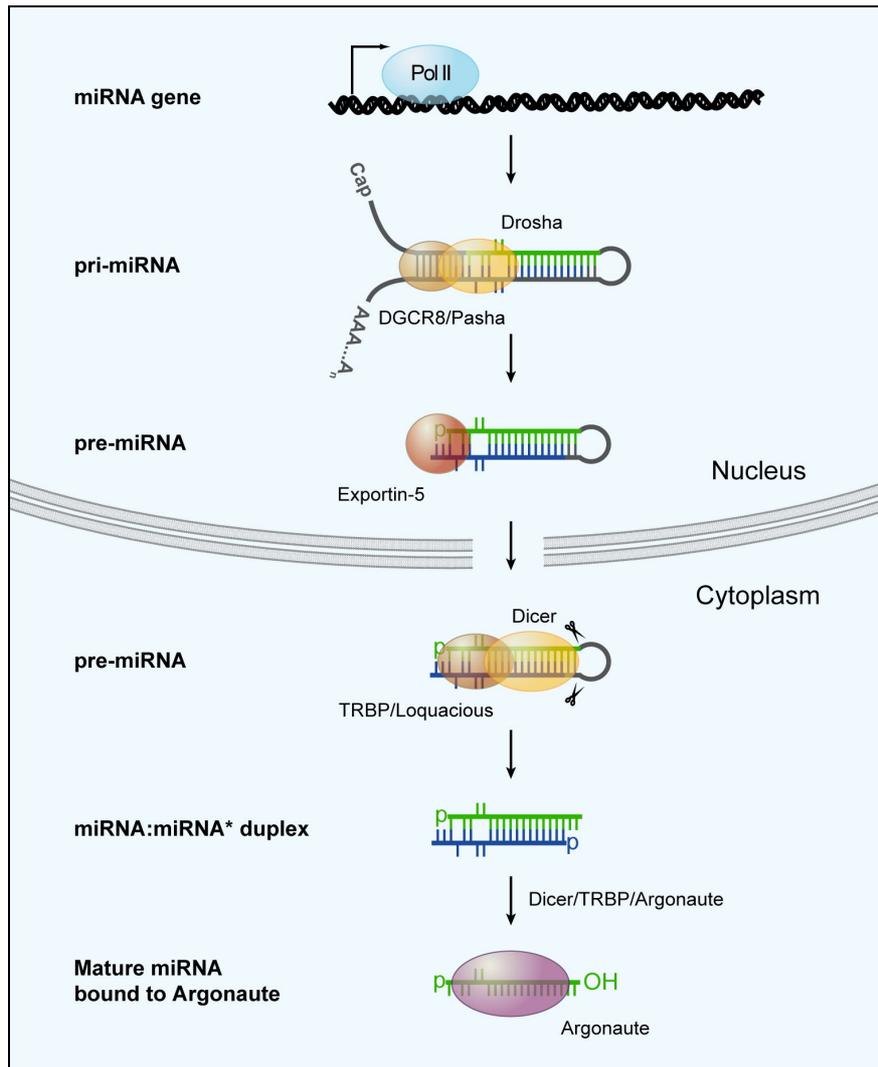
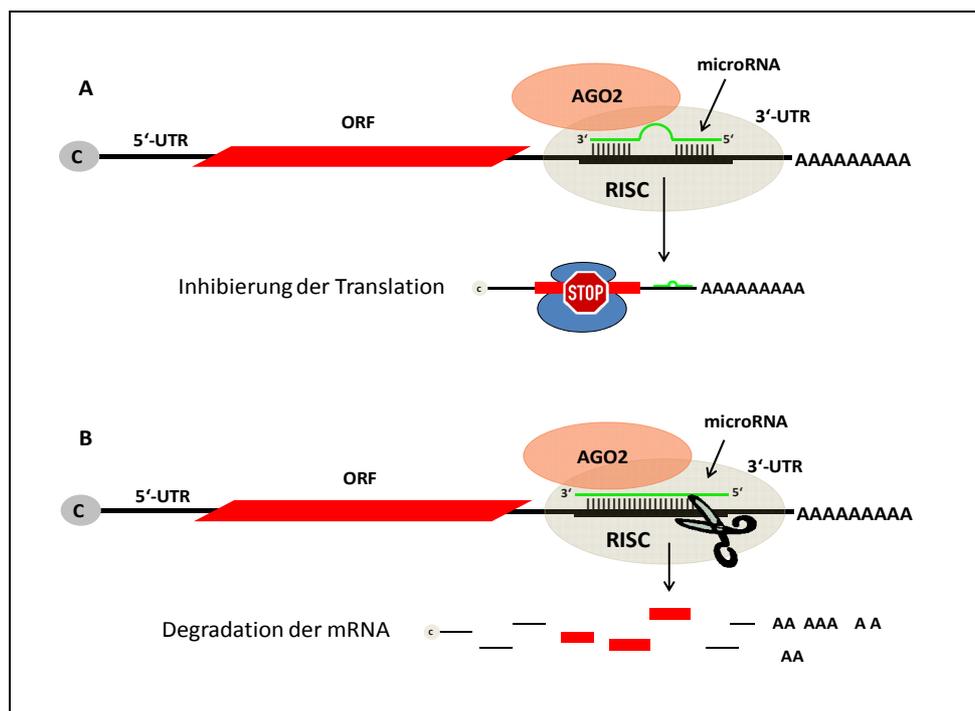


Abbildung 4.2 : Schematischer Überblick über die microRNA-Biosynthese. Für detaillierte Informationen siehe Text. Abbildung aus Bushati and Cohen 2007 [42].

Ähnlich wie Drosha im Mikroprozessor-Komplex, assoziiert Dicer im RISC an weitere Proteine wie die RNA-bindenden „TAR RNA-binding protein“ (TRBP, Loquacios in *Drosophila*) und „protein kinase R-activating protein“ (PACT). Ein weiteres zentrales Protein des microRNA-assoziierten RISC (miRISC) bildet Argonaute-2 (AGO2) [43,44,45]. MicroRNA-Duplexe, die durch den RLC prozessiert und anschließend in den miRISC inkorporiert wurden, werden nun in Einzelstränge aufgetrennt. Der zum Zielgen komplementäre, funktionale microRNA-Strang („guide strand“) wird einbehalten, während der andere Strang („passenger strand“, auch miR\* tituliert) entlassen und degradiert wird [46,47]. Die durch AGO2 vermittelte Auswahl des funktionalen Stranges ist von der thermodynamischen Stabilität der Basenpaare am 5'-Ende abhängig [48,49]. Die Duplexe können in beiden Orientierungen in den RISC geladen werden, was ermöglicht, dass aus beiden Strängen des Duplex einer pre-microRNA biologisch aktive microRNAs entstehen können [50,51,52].

## 4.2.2 Translationsinhibierung durch microRNAs

MicroRNAs entfalten ihre inhibierende Wirkung durch sequenzspezifische Bindung an die 3'UTR ihrer Ziel-mRNA. Je nach Komplementaritätsgrad der Bindung lassen sich zwei Mechanismen unterscheiden: 1. Eine partielle Komplementarität zwischen microRNA und mRNA führt zu einer Inhibierung der Translation, jedoch nicht zu einem Abbau der mRNA. Für diese Form der Bindung ist eine möglichst vollständige Komplementarität zwischen der Seed-Sequenz der microRNA (Base 2-8) und der 3'UTR von Bedeutung (Abbildung 4.3, A). Die Seed-Sequenz ist für einzelne microRNAs phylogenetisch stark konserviert, ebenso die komplementäre Ziel-mRNA-Sequenz. 2. Die vollständige Komplementarität zwischen microRNA und der Bindungsstelle auf der 3'UTR resultiert in einer Degradation der gebundenen mRNA (Abbildung 4.3, B). Wird eine Ziel-mRNA degradiert, so wird der Schnitt zwischen den Nukleotiden durchgeführt, die an microRNA-Nukleotide 10 und 11 hybridisiert sind [53,54].



**Abbildung 4.3: Mechanismen der translationalen Inhibierung durch microRNA.** (A) Bei unvollständiger microRNA/3'UTR-Komplementarität wird die Translation der Ziel-mRNA unterdrückt. (B) Ist die Komplementarität jedoch vollständig (oder nahezu vollständig) so wird die Ziel-mRNA degradiert. Abbildung modifiziert nach Dr. Trompeter, Vorlesung Stammzellbiologie und regenerative Medizin, Uniklinik Düsseldorf.

Im humanen System sind 8 AGO-Proteine bekannt (AGO1-4 und Piwi1-4), alle von ihnen können an RNA binden aber AGO2 hat als einziges eine Nukleaseaktivität und steht daher im Verdacht, die mRNA-Degradierung zu verursachen [55,56]. Desweiteren werden an AGO2 gebundene microRNAs intrazellulär stabilisiert bzw. ihre Halbwertszeit erhöht [57].

Der exakte Mechanismus der translationalen Hemmung ist nicht genau bekannt. Es gibt jedoch Beobachtungen, die vermuten lassen, dass je nach microRNA und Ziel-mRNA verschiedene Systeme greifen können. Dabei kann eine Post-Initiations-Hemmung, wie die Degradation von Kotranslations-Peptiden [58], verstärkte vorzeitige Terminierung der Translation („ribosomal drop-off“) [59] oder beeinträchtigte Elongation beobachtet werden [60]. Andere Gruppen wiederum berichten von gestörter Translationsinitiation durch ineffiziente Ribosom-Anlagerung [61,62,63,64]. Eine weitere Theorie besagt, dass die RISC/microRNA/Ziel-mRNA-Komplexe in zytoplasmatischen „RNA processing bodies“ (p-bodies) abgesondert und gelagert werden. Dort sind sie der Translation nicht mehr zugänglich und werden teilweise abgebaut [65,66].

### **4.2.3 Bioinformatische microRNA-Zielgen-Vorhersagen**

Um sich ein Bild von der biologischen Funktion einer microRNA machen zu können, ist es nötig zu wissen, welche Proteine sie beeinflussen kann. Für diesen Zweck wurden verschiedene *in-silico*-Vorhersage-Algorithmen potentieller microRNA-Bindestellen entwickelt. Besonders häufig verwendete Programme sind TargetScan [67], PicTar [68] und miRanda [69]. Dabei werden die hinterlegten 3'UTR-Sequenzen der mRNAs auf vollständige Komplementarität zur Seed-Sequenz der ausgewählten microRNA hin abgesucht oder umgekehrt eine ausgewählte mRNA auf verschiedene microRNA-Bindestellen untersucht. Dabei gibt es verschiedene Kriterien nach denen potentielle Bindungsstellen beurteilt werden können: Wie groß ist der überlappende Seed-Bereich? Wie hoch ist die Konservierung der Bindestelle über Speziesgrenzen hinweg? Wie steht es um die thermodynamische Stabilität der Bindung? Gibt es übereinstimmende Vorhersagen verschiedener Algorithmen? Trotz aller Bemühungen, die Programme immer weiter zu verbessern, können sie nur einen groben Überblick über potentielle Bindungsmöglichkeiten geben, die (bei Interesse) jede für sich experimentell verifiziert werden müssen. Es gibt inzwischen auch Bemühungen experimentell nachgewiesenen Zielgene für einzelne microRNAs in Datenbanken zusammenzutragen (beispielsweise miRWalk, <http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>), was sich jedoch schwierig gestaltet, da es keinen allgemeinen „normierten“ Standard für Zielgen-Validierungen gibt.

Laut Vorhersagen sollen ca. 60% aller menschlichen Gene von microRNAs beeinflusst werden können [70]. Aus der Tatsache heraus, dass eine bestimmte microRNA potentiell viele verschiedene mRNAs gleichzeitig regulieren kann (ca. 200 im humanen System [68]) und einzelne mRNAs ihrerseits potentiell von vielen unterschiedlichen microRNAs beeinflusst werden können [67], ergibt sich eine erhebliche, netzwerkartige Kombinationsbreite unterschiedlichster Regulationsmöglichkeiten [71]. Die Expressions-

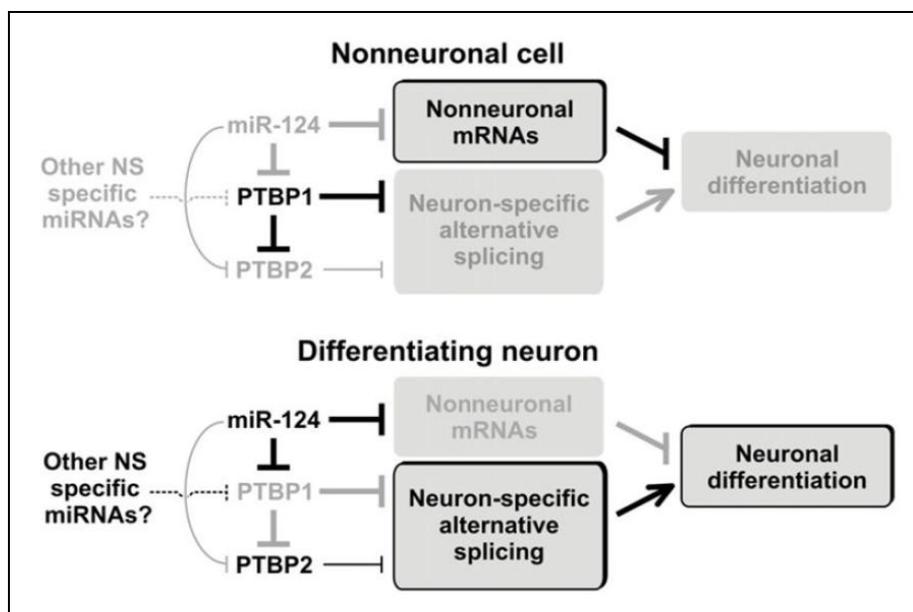
änderung einer einzigen microRNA kann sich auf die Translation hunderter Gene auswirken [72] und in aktuellen Studien zeichnet sich ab, dass microRNA-Funktionen nur verstanden werden können, wenn man das gesamte Netzwerk betrachtet und sich nicht nur auf einzelne microRNA/Zielgen-Interaktionen fokussiert [73,74,75].

#### **4.2.4 MicroRNAs in der Neurogenese**

Wie zuvor beschrieben, besitzen microRNAs ein enormes regulatorisches Potential auf das Proteom einer Zelle. Es ist daher wahrscheinlich, dass sie wesentliche Funktionen in der Neurogenese besitzen. In verschiedenen knock-out-Studien konnte bisher gezeigt werden, dass zelluläre Vorgänge wie Zellzyklusprogression oder die Entwicklung und Differenzierung von Zellen ohne funktionales microRNA-Repertoire im Allgemeinen nicht oder nur abberant funktionieren. Dies kann bis hin zur Apoptose betroffener Zellen bzw. frühembryonaler Lethalität führen [76,77,78,79]. Im speziellen Fall der Neurogenese konnte eine Störung der neuronalen Differenzierung bereits für neurale Stammzellen (NSC) der Maus belegt [80], sowie eine Degeneration ausdifferenzierter Purkinje-Zellen im Zerebellum nach Dicer-knock-out festgestellt werden [81]. Eine vergleichbare Studie an Zebrafischen zeigte, dass Dicer-knock-out in der frühen Entwicklung zu abnormalen Morphologien während der Gastrulation, Somitogenese, sowie der Herz-Entwicklung einherging und schwere Deformationen des Gehirns und des Rückenmarks zur Folge hatte [82]. Diese Studien zeigen die fundamentale Bedeutung von microRNAs für die korrekte neuronale Differenzierung auf.

Verschiedene microRNAs werden speziell in neuronalen Geweben höher exprimiert vorgefunden. Allen voran ist dabei die microRNA miR-124 zu nennen, sowie die miR-9/9\* aber auch miR-125a+b, miR-128 und die let-7-Familie [83,84,85,86]. Unter den in NSC-Differenzierung hochregulierten microRNAs wurden die miR-9, miR-124 und let-7-Mitglieder in allen bisher untersuchten Neuron-Typen vorgefunden und stellen essentielle Promotoren der NSC-Differenzierung dar. Die microRNAs der let-7-Familie unterdrücken beispielsweise die Translation von LIN28, TLX, HMGA2 und MLIN41 in Nagern [85,87,88]. TLX und HMGA2 sind essentiell für die Selbsterneuerung von NSC und müssen im Zuge der Differenzierung herunterreguliert werden, um Zellzyklus-Arrest und Differenzierung zu ermöglichen. LIN28 wiederum blockiert die pre-let-7-Prozessierung und wird seinerseits von miR-125 [85] reprimiert. MiR-9 fördert in verschiedenen Vertebraten die neuronale Differenzierung durch Hemmung von REST, einem globalen Repressor neuronaler Gene in nicht-neuronalen Geweben, sowie TLX, FOXG1, STAT3, FGF8 und FGFR1 [89,90,91,92]. Die microRNA miR-124 bildet ein gut untersuchtes Beispiel microRNA-vermittelter Regulation in der Neurogenese. Sie unterstützt die neuronale Differenzierung durch Hemmung der anti-neuronalen Phosphatase SCP1 [93], sowie von PTBP1 [94,95], einem globalen Repressor

neuronaler Splice-Varianten in nicht-neuronalen Zellen. Wie in Abbildung 4.4 gezeigt, führt die Herunterregulation von PTBP1 zusätzlich zu einer Akkumulation von PTBP2, einem weiteren Spliceregulator, der das Transkriptom der differenzierenden Zellen weiter verfeinert [94]. Ein weiterer anti-neuronaler Transkriptionsfaktor Sox9 wird durch miR-124 ebenfalls reprimiert [96]. Desweiteren ist miR-124 in Neuriten-Wachstum involviert [97] und kann bei Überexpression in HeLa-Zellen über 100 mRNAs herunterregulieren und das Transkriptom in Richtung Neuron verschieben [98]. Eine aktuelle Studie konnte sogar zeigen, dass humane Fibroblasten durch die Überexpression von miR-124 und miR-9/9\* direkt zu funktionalen Neuronen konvertiert werden können [99].



**Abbildung 4.4: Regulatorischer Einfluss von miR-124 auf die neuronale Differenzierung.** In nicht-neuronalen Zellen wird PTBP1 auf hohem Niveau exprimiert und reprimiert neuro-spezifisches Splicing, was zum Erhalt des nicht-neuronalen Status beiträgt. Während der neuronalen Differenzierung reguliert eine hohe Expression von miR-124 PTBP1 herunter und trägt damit entscheidend zum Wandel des Transkriptoms in Richtung Neuron bei. Abbildung aus Makeyev et al. 2007 [94].

Wie die oben genannten Beispiele bereits implizieren, verfügen microRNAs über ein mannigfaltiges regulatorisches Potential und stellen potentiell und nachweislich mächtige Regulatoren einer Vielzahl zellulärer Prozesse dar. Sie beeinflussen unter anderem Proliferation [100], Apoptose [101,102], Onkogenese [103], Entwicklung und Differenzierung [104,105]. Darüberhinaus üben microRNAs wichtige Funktionen im Zusammenhang mit der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen aus [106]. Aufgrund ihrer Zielgenredundanz lassen sich microRNAs als Wegweiser zu funktional relevanten Proteinen, welche für z.B. Pluripotenz und Differenzierungsprozesse relevant sind, auffassen. Die Analysen microRNA-

vermittelter Regulationsprozesse stellen daher einen wesentlichen Schritt zum Verständnis der molekularen Funktion einer Stammzelle dar.

### **4.3 Stammzellen**

Als Stammzellen bezeichnet man undifferenzierte Zellen, die sich durch symmetrische Teilung sowohl selbst erneuern, als auch durch asymmetrische Teilung differenzierende Tochterzellen hervorbringen können. Dabei unterscheidet man je nach Differenzierungspotential toti-, pluri- oder multipotente Stammzellen. Mindestens bis zum Vierzellstadium bezeichnet man die Zellen einer Zygote als totipotent (sie können jegliche Zelltypen hervorbringen, die für die Generierung eines vollständigen Organismus nötig sind) [107,108,109], danach schränkt sich diese Fähigkeit vermutlich aufgrund zu geringen Zellvolumens ein [110]. Im Laufe weiterer Teilungen bilden sich zwei erste Zelltypen heraus: die innere Zellmasse (hieraus entsteht der Fötus) und das Trophektoderm. Aus der inneren Zellmasse werden die als pluripotent bezeichneten embryonalen Stammzellen (ESC) gewonnen [111,112]. Sie können Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm), sowie Keimzellen hervorbringen, besitzen jedoch nicht mehr die Fähigkeit, sich zu einem Embryo zu organisieren. Multipotente Stammzellen können indes nur noch in einige bestimmte Richtungen differenzieren, Beispiele hierfür sind adulte Stammzellen wie neurale Stammzellen (NSC) oder hämatopoietische Stammzellen (HSC) aus dem Rückenmark.

#### **4.3.1 Embryonale Stammzellen**

Die ersten embryonalen Stammzellen wurden 1981 erfolgreich an der Universität Cambridge aus Maus-Blastozysten gewonnen und charakterisiert [111,112]. Im Jahre 1998 wurden erstmals ESC-Linien aus überzähligen, *in-vitro*-fertilisierten, humanen Blastozysten isoliert und propagiert [113]. Charakterisiert werden ESC durch verschiedene Eigenschaften und die Expression bestimmter Genprodukte. Zunächst müssen sie sich über einen langen Zeitraum in undifferenziertem Zustand kultivieren lassen und dabei ihr volles Differenzierungspotential beibehalten, desweiteren gilt die Fähigkeit zur Teratombildung und Bildung chimärer, lebensfähiger Organismen, als Qualitätsmerkmal. Auf molekularer Ebene zeichnen sich ESC durch die Expression der Oberflächenantigene SSEA-3 und -4 (Stage specific embryonic antigene), sowie TRA-1-60 und -81 (Tumor rejection antigene) [114,115,116] aus. Im Gegensatz zu differenzierten Zellen exprimieren humane ESC kein SSEA-1. Desweiteren besitzen sie eine sehr hohe Telomeraseaktivität, exprimieren in großen Mengen alkalische Phosphatase, sowie die Transkriptionsfaktoren „Octamer binding transcription Factor 4“ (Oct4), Nanog und „SRY related HMG Box gene 2“ (Sox2). Letztere sind für die Erhaltung

der Pluripotenz essentiell [117,118,119,120,121] und verstärken ihre eigene Expression sowie die der anderen beiden Pluripotenz-Faktoren in Form eines positiven feed-back-loops durch Bindung an die jeweiligen Enhancer-Regionen dieser Gene (vergleiche Abbildung 4.5). An die Oct4-Enhancer-Region binden als Beispiel mindestens 14 Transkriptionsfaktoren (Oct4 selbst, Sox2, Nanog, Sall4, Tcf3, Smad1, Stat3, Esrrb, Klf4, Klf5, E2f1, n-Myc und Zfx), an die von Nanog mindestens 9 (Nanog selbst, Klf4, Klf2, Klf5, Sall4, E2f1, Esrrb, Stat3 und Tcfcp2l1)[122,123,124]. Diese genomischen Loci sind Schlüssel-Knotenpunkte innerhalb des regulatorischen Pluripotenz-Netzwerks und je mehr Faktoren an einem Locus binden, desto höher ist dessen Transkriptionsstatus, weniger okkupierte Gene werden in murinen ESC (mESC) dagegen stillgelegt [122,125]. Oct4 erhöht zudem die Expression verschiedener Chromatin-Modulatoren, welche die Selbsterneuerung von mESC positiv regulieren [126,127].

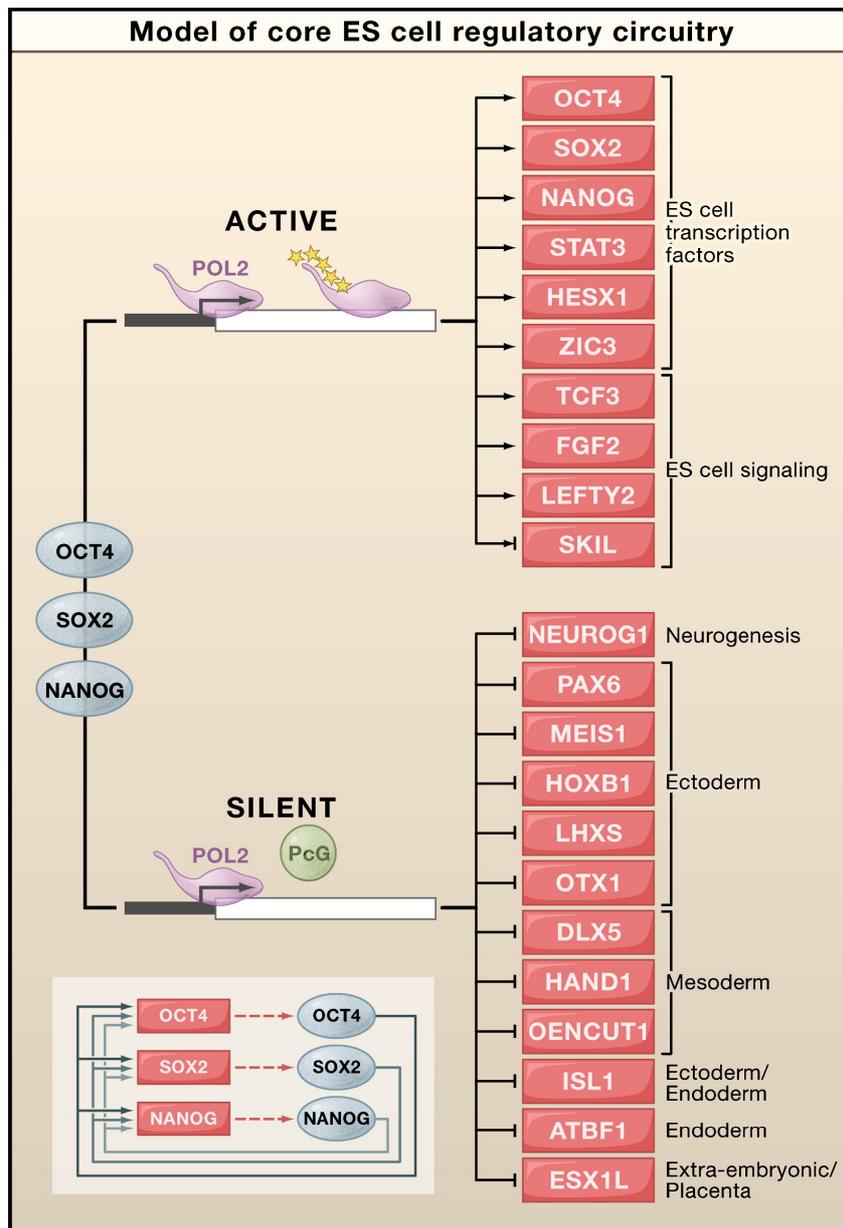


Abbildung 4.5:

**Regulatorisches Netzwerk der Pluripotenz-Faktoren Oct4, Sox2 und Nanog.** Die genannten Transkriptionsfaktoren (blau) okkupieren aktiv transkribierte ESC-spezifische Gene, um deren Transkription zu fördern und die Pluripotenz der Zelle aufrecht zu erhalten. Gleichzeitig besetzen sie nicht-transkribierte, Differenzierungs-assoziierte Gene und verhindern zusammen mit den Polycomb(PcG)-Proteinen (grün) die Transkript-Elongation dieser Gene durch die RNA-Polymerase II (Pol2, lila). Im hell unterlegten Kasten ist der auto-regulatorische feed-back-loop dargestellt in dem Oct4, Sox2 und Nanog ihre eigene Transkription und die der jeweils anderen beiden Faktoren fördern. (Abbildung aus Jaenisch and Young 2008 [128])

Auch microRNAs spielen wie bereits angedeutet eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der ESC-Pluripotenz. Dicer-defiziente ESC weisen verlangsamte Proliferation und ein gestörtes Differenzierungsverhalten durch mangelhafte Herunterregulation von Oct4 auf [129,130]. Für die microRNA miR-145 konnte gezeigt werden, dass sie die Pluripotenz-Faktoren Oct4, Sox2 und Nanog reprimiert und damit die Differenzierung von ESC fördert [106]. Ihr Fehlen in den Dicer-defizienten Zellen vermindert offenbar deren Differenzierungsfähigkeit. Eine weitere Differenzierungs-assoziierte microRNA-Gruppe sind die Mitglieder der let-7-Familie, deren reife Form in ESC nicht exprimiert wird, jedoch abundant zusammen mit miR-125 in differenzierten Zelltypen gefunden wird. Eine andere Studie konnte zeigen, dass Oct4, Sox2 und Nanog an die Promotoren der überwiegenden Mehrheit in mESC-spezifisch exprimierten microRNAs (unter anderem miR-290- und miR-302-Cluster) binden und diese auch heraufregulieren [131,132,133]. Umgekehrt binden die genannten Faktoren an Promotoren verschiedener Gewebs-spezifischer microRNAs und blockieren deren Expression, ähnlich wie es in Abbildung 4.5 für Differenzierungs-assoziierte Proteine dargestellt ist. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die microRNAs miR-291a-3p, -291b-3p, -294, -295 und -302 Zellzyklus-Defekte in DGCR8-defizienten mESC korrigieren konnten [134]. Dies geschah vor allem durch die Expressionsreduktion verschiedener CyclinE/CDK2-Inhibitoren wie p21, RBL2 und LATS2 [134]. Der Einfluss einer großen Anzahl von microRNAs auf verschiedene Differenzierungsprozesse ist bereits in der Literatur beschrieben, einen Überblick hierzu gibt Abbildung 4.6.

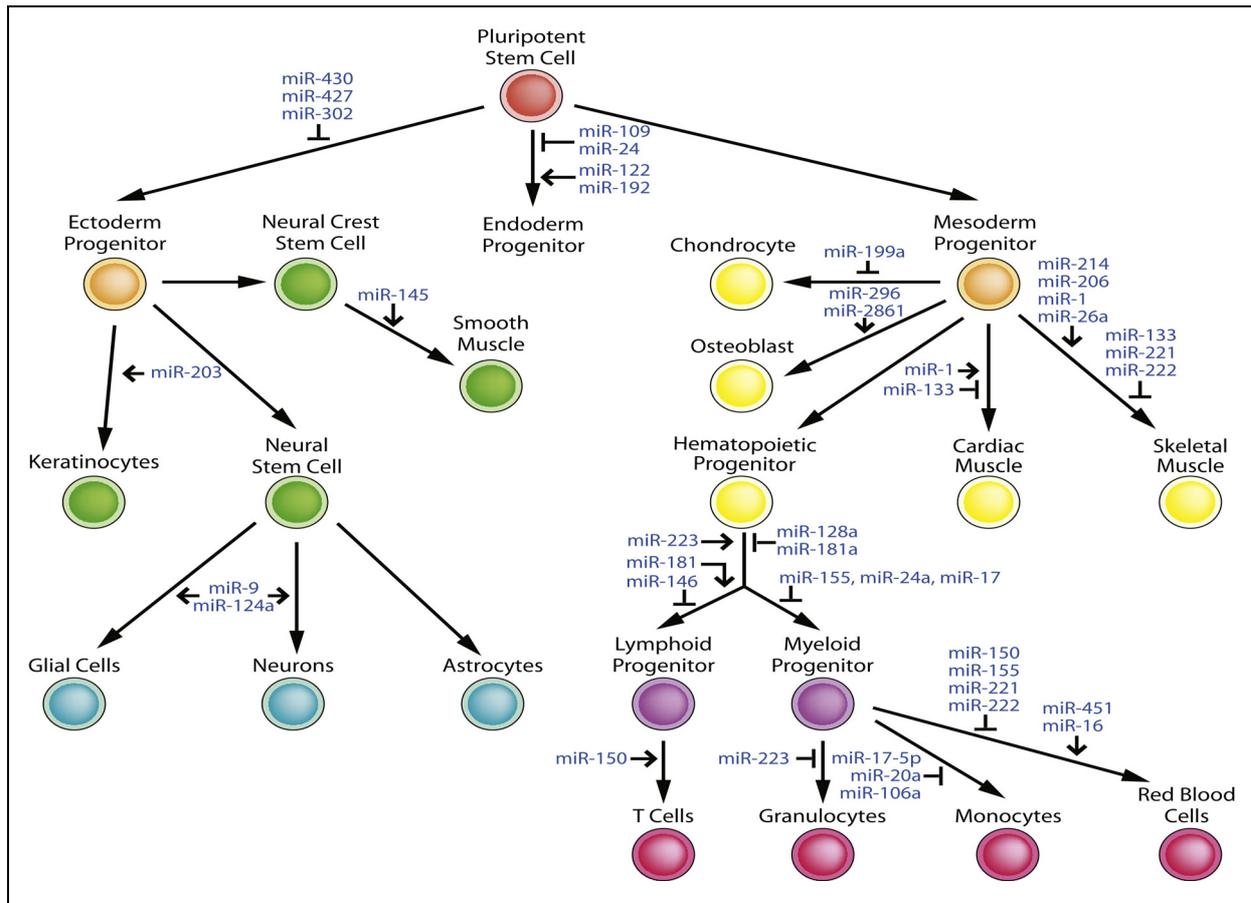


Abbildung 4.6: Regulatorischer Einfluss von microRNAs auf Differenzierungsprozesse verschiedener Zelltypen. Gezeigt ist schematisch eine Reihe von Differenzierungs-Linien ausgehend von einer pluripotenten Stammzelle hin zu verschiedenen spezialisierten Zellentypen. Beispielhaft ist der Einfluss einzelner microRNAs auf die Entwicklungsstufen dargestellt. Abbildung aus Ivey and Srivastava 2010 [135].

Seit ihrer Entdeckung werden viele Hoffnungen an die ESC geknüpft. Ihr potentiell unerschöpfliches Regenerations- sowie Differenzierungspotential macht sie zu vielversprechenden Kandidaten für die Heilung schwerer Erkrankungen wie Parkinson [136] oder Diabetes mellitus [137]. Dabei könnte der Verlust entscheidender Zelltypen durch Transplantation vordifferenzierter Zellen ersetzt werden. In weiter Zukunft hofft man ganze Organe *in vitro* nachzüchten zu können. Dafür müssen allerdings zunächst die Differenzierungsvorgänge besser verstanden werden. Die gerichtete Differenzierung und deren Analyse ist bereits intensiv betrieben worden. So wurden zum Beispiel diverse Zelltypen wie Neurone [138,139], Astrozyten [140], Kardiomyozyten [141,142], Hepatozyten [143], Osteoblasten [144,145] und Chondrozyten [146,147] erzeugt. Erste Versuche ganze Herzen und Lungen nachzubilden sind inzwischen ebenfalls unternommen worden [148,149].

Durch ihr tumorigenes Potential ist der Einsatz von hESC am Menschen jedoch sehr risikobehaftet. Tierversuche haben gezeigt, dass xenotransplantierte mESCs in geschädigten Rattenhirnen zur Läsion wandern und dort zu Neuronen ausdifferenzieren, homologe Transplantationen in Mäusen dagegen hoch-maligne Teratokarzinome hervorbrachten, unabhängig davon ob die ESCs vordifferenziert wurden oder nicht [150]. Auch humane ESC bildeten, in immundefiziente Mäuse injiziert, Teratome aus [113]. Zusätzlich ist die Gewinnung dieser Zellen ethisch sehr umstritten und wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Das Gesetz zum Schutz von Embryonen regelt seit 1990 die Einsatzmöglichkeiten von *in vitro* gezeugten Embryonen. Die Erzeugung von Embryonen, zu einem anderen Zweck als zur Herbeiführung einer Schwangerschaft, wird dort verboten und unter Strafe gestellt. Desweiteren dürfen laut Stammzellgesetz vom 1. Juli 2002 (überarbeitet 2008, <http://www.bmbf.de/de/2657.php>, Stand April 2011) ausschließlich Stammzellen eingeführt und verwendet werden, die nach dem 1. Mai 2007 gewonnen wurden.

#### **4.3.2 Induzierte pluripotente Stammzellen**

Aufgrund der gesetzlichen Restriktionen und ethischen Bedenken ist die Wissenschaft bemüht, alternative Bezugsquellen für pluripotente Stammzellen zu erschließen. Im Jahre 2006 gelang es einer Gruppe von Wissenschaftlern um Shinya Yamanaka, ausdifferenzierte, somatische Mausfibroblasten allein mittels retroviraler Transduktion von 4 Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4) zu induzierten pluripotenten Stammzellen (induced pluripotent stem cells, iPSC) zu reprogrammieren [151]. Die Überexpression von Nanog war für diesen Prozess überraschender Weise nicht nötig, dafür die der beiden Onkogene c-Myc und Klf4. In ihren Eigenschaften, der Expression von Markern, ihrer transkriptionellen Aktivitäten und ihres Differenzierungspotentials glichen die iPSC stark den ESC [151]. Ein Jahr später gelang die Reprogrammierung bereits mit humanen Fibroblasten [152,153], sowie diversen weiteren humanen Zelltypen [154,155,156,157].

Der große Vorteil der iPSC gegenüber ESC, ist ihre ethisch unbedenkliche Herkunft und die Möglichkeit „Major Histocompatibility Complex“ (MHC)-angepasste Zellen Patienten-individuell für Transplantationstherapien generieren zu können. Der große Nachteil jedoch besteht in der viralen Integration in die Zellgenome und die Tendenz der iPSC in 20% aller Transplantationen bei Mäusen Tumore zu bilden [158]. Die Reprogrammierungsprotokolle werden stetig verbessert (das Oncogen c-Myc wurde beispielsweise durch Nanog ersetzt [158]), die Anzahl benötigter Faktoren wird weiter reduziert und es werden Methoden entwickelt die ohne integrierende Lentiviren auskommen. Da die ins Genom integrierten Transgene im Verlauf der Reprogrammierung stillgelegt und die Expression der endogenen

Pendants aufgrund des für ESC bereits bekannten positiven feed-back-loops ansteigt [128,152,158,159,160], gibt es die Möglichkeit nicht-integrierende, transiente virale Vektoren [161,162] oder transiente nicht-virale Vektoren [163] einzusetzen. Desweiteren wurden auch DNA-unabhängige Methoden entwickelt um die Wahrscheinlichkeit transgener Integrate vollständig auszuschließen. Zu diesen Methoden zählt die Transfektion synthetischer mRNA der Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Sox2 und Klf4 [164], der direkte Protein-Transfer der Transkriptionsfaktoren [165,166,167], sowie die Manipulation von Zellkultur-Bedingungen [168]. Die Reprogrammierungseffizienz kann zudem mit so genannten „small molecules“ für die verschiedenen Verfahren erhöht werden [169]. Bei diesen Molekülen handelt es sich zum einen um Histon-Deacetylase- bzw. Histon-Methyltransferase-Inhibitoren [169] oder um Modulatoren bestimmter „cell-signaling pathways“ wie p53-Inhibitoren [170], CDK1/CyclinB-Inhibitoren oder TGF-beta-Inhibitoren [171,172]. Auch microRNAs können zur Reprogrammierung somatischer Zellen herangezogen werden: Mitglieder des miR-290-Clusters konnten zusammen mit Oct4-, Sox2- und Klf4-Überexpression in Mausfibroblasten den Faktor c-Myc ersetzen [173], in humanen Haarfollikel-Zellen konnte die Überexpression von miR-302 iPSC induzieren [174]. Letztendlich wird die Unabhängigkeit der generierten iPSC von den ursprünglich eingebrachten Faktoren als wichtiges Kriterium der vollständigen Reprogrammierung angesehen.

Laut neuesten Studien stellt sich jedoch heraus, dass iPSC genomisch instabil sind und im Laufe der Reprogrammierung sowie Kultur viele genomische Mutationen anhäufen, teilweise mit onkogener Auswirkung [175,176,177]. iPSC können jedoch dazu beitragen diverse Krankheitsbilder und Stoffwechselfvorgänge besser verstehen zu lernen. So ist es zuletzt verschiedenen Gruppen gelungen, Patienten-spezifische iPSC zu generieren [178,179] und in die von der Erkrankung betroffenen Zelltypen zu differenzieren. Hierdurch ist es möglich die Krankheitsverläufe und deren molekulare Ursachen am zellbasierten Modell zu erforschen, sowie unkompliziert neue Wirkstoffe auszutesten [180].

### **4.3.3 Unrestringierte somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut**

Um abgestorbene oder krankhafte Zellen ersetzen zu können, besitzen viele Organe und Gewebetypen wie Knochenmark, Leber, Fett oder Gehirn multipotente Stammzellen. Je nach ontogenetischem Alter können diese Zellen weiter unterteilt werden in fötale, neonatale und adulte Stammzellen. Die jüngsten, fötalen Zellen besitzen die schnellsten Teilungsraten und scheinen am primitivsten zu sein. Mit fortschreitender Alterung verringern sich Proliferationsfreude und Differenzierungskapazität zunehmend.

Eine spezielle Untergruppe der postembryonalen Stammzellen bilden die neo-natalen unrestringierten somatischen Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut (USSC). Galt die

Nabelschnur und das darin enthaltene Blut (human umbilical cord blood, hUCB) viele Jahre lang als Abfallprodukt einer Geburt, so ist diese Sichtweise seit der ersten erfolgreichen hUCB-Transplantation 1989 an einen Fanconi-Anämie-Patienten überholt [181]. Inzwischen hat sich das hUCB gegenüber dem Knochenmark als wichtige alternative Quelle für HSC etabliert. Da es Patienten mit hämatologischen Tumor-Erkrankungen häufig an HLA-passenden Spendern mangelt, kann das immunologisch „unreife“ hUCB auch bei großen HLA-Disparitäten zwischen Patient und Spender verhältnismäßig gefahrlos verwendet werden [182,183,184]. Ein weiterer Vorteil des hUCB ist die unmittelbare Verfügbarkeit gut charakterisierter Transplantate innerhalb verschiedener Nabelschnurblut-Banken weltweit [185,186,187]. Zwar reichen die Zellen eines einzelnen hUCB-Präparates meist nicht für die Transplantation eines Erwachsenen, dafür besteht jedoch die Möglichkeit die Zellen vor einer Transplantation *ex vivo* zu expandieren [188,189] oder zwei verschiedene Transplantate gleichzeitig zu verabreichen [190].

Die Existenz nicht-hämatopoietischer Stammzellen wurde 2004 von Kögler und Kollegen beschrieben [1] und von weiteren Gruppen bestätigt [191,192,193,194]. Diese Zellpopulation unterscheidet sich von ebenfalls im Nabelschnurblut enthaltenen mesenchymalen Stammzellen (MSC) durch ihren immunologischen Phänotyp [195,196], ihr Transkriptom [197] und längere Telomere. Auch ihr breiteres Differenzierungspotential auf klonaler Ebene in Zelltypen aller drei Keimblätter [1,198], insbesondere in neuronaler Richtung [2], unterscheidet sie von MSC aus Nabelschnurblut.

USSC exprimieren keine hämatopoietischen Oberflächenmarker wie CD45 und CD34, dafür aber CD29, CD44 und CD49c. ESC-spezifische Faktoren wie Oct4, Sox2, Nanog [199] oder hTERT [200] sind auf Protein- und Transkriptebene nicht nachweisbar, die Methylierung der Promotoregionen dieser Gene ist jedoch für somatische Zellen erstaunlich gering [201]. Dieser Befund macht sie zusammen mit ihrem geringen ontogenetischen Alter, der karyotypischen Stabilität während ihrer Kultur und ihrer guten Verfügbarkeit zu einzigartigen Reprogrammierungs-Kandidaten mit vergleichsweise hohen Reprogrammierungseffizienzen (ipUSSC [202]). Desweiteren unterscheiden sich USSC durch hohe DLK-1-Expression von MSCs. DLK-1 (auch PREF-1 genannt) ist ein Antagonist der adipogenen Differenzierung, entsprechend differenzieren USSC im Gegensatz zu MSC, nicht zu Adipozyten. Während der embryonalen Entwicklung wird DLK-1 in verschiedenen embryonalen Geweben exprimiert [203] und es wurde bereits beschrieben, dass DLK-1 den undifferenzierten Status von Stamm- und Tumorzellen aufrecht erhält [204,205,206], desweiteren korreliert ein Verlust von DLK-1 mit zunehmender Seneszenz der Zellen [199]. USSC können auch anhand ihrer HOX-Signatur von MSC aus Nabelschnurblut unterschieden werden: während USSC weitestgehend keine HOX-Gene exprimieren (vergleichbares Muster wie embryonale

Stammzellen und Gewebe), so exprimieren MSC eine ganze Reihe von HOX-Genen wie HOXA9, HOXB7, HOXC10 und HOXD8. HOX-Gene sind homöotische Transkriptionsfaktoren und legen durch charakteristische Expressionsmuster innerhalb des sich entwickelnden Embryos die Anterior-Posterior-Achse fest [207]. Es konnte desweiteren gezeigt werden, dass verschiedene Zelltypen ihre eigenen charakteristischen HOX-Expressionsmuster aufweisen [208] und diese zur Bestimmung des Ursprungsgewebes von beispielsweise MSC herangezogen werden können [209].

In einer aktuellen Studie konnte zudem durch Xenotransplantate in immundefizienten Mäusen in einem Zeitraum von 16 Monaten keinerlei tumorigenes Potential der USSC festgestellt werden [200]. Zusammen mit ihrer ethisch unbedenklichen Herkunft, der Möglichkeit zur intensiven Expansion in klinische relevanten Maßstäben, macht dies die USSC zu besonders geeigneten Kandidaten hinsichtlich Transplantations- und Zellersatztherapie-Ansätzen.

#### **4.4 Neuronale Differenzierung der USSC**

Aufgrund der bereits beschriebenen Vorteile stellen USSC ideale Kandidaten für regenerative Therapieansätze dar. Für hämatopoietische Rekonstitution werden USSC bereits erfolgreich eingesetzt, andere Einsatzmöglichkeiten werden zur Zeit ebenfalls untersucht. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass es nach Injektion nativer USSC in die Nähe akuter Rückenmarksläsionen in immunsupprimierten Ratten, zu einer Migration der USSC in Richtung der Läsion kommt. An der Läsion angekommen, unterstützen sie die axonale Regeneration, vermindern den verletzungsbedingten Gewebsverlust und tragen so zu einer deutlich messbaren Verbesserung der lokomotorischen Fähigkeiten der läsionierten Tiere bei [210]. Eine neuronale Differenzierung der implantierten USSC ist dabei nicht erkennbar. Dennoch sind Zellersatztherapien für andere Krankheitsmodelle wie Alzheimer oder Parkinson denkbar. Hierfür wäre das neuronale Differenzierungspotential der USSC von entscheidender Bedeutung.

Die neuronale Differenzierung der USSC wurde bereits 2008 mittels Retinsäure-haltigem Differenzierungsmedium (XXL-Medium) von Greschat et al. [2] im Vorfeld der vorliegenden Arbeit publiziert. Dabei konnten morphologische Veränderungen in Richtung neuronaler Erscheinung sowie auf molekularer Ebene die Expression verschiedener neuronaler Marker wie Nestin, Neurofilament (NEF),  $\beta$ -III-Tubulin (TUB), Doublecortin, Synaptophysin und Neuronal Nuclei immunzytochemisch nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die USSC im Zuge der XXL-Inkubation aus dem Zellzyklus aussteigen und ein erheblicher Teil der Zellen apoptotisch wird. Diese Befunde stimmen mit den Expressionsmustern überein, welche im sich entwickelnden Gehirn finden [2]. Eine kleine

Anzahl von mittels XXL-Medium differenzierten USSC (XXL-USSC) exprimierte zusätzlich das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH), einem typischen Marker für Dopamin- und Catecholamin-synthetisierende Neurone. Die Frequenz TH-exprimierender Zellen konnte durch 4-stündige Inkubation der XXL-USSC mit DA-Medium (Zusammensetzung siehe [2]) auf nahezu 80% erhöht werden. HPLC-Chromatographie zeigte sowohl Dopamin- als auch Serotonin-Sekretion, sowie deren Metabolite in den Zellkultur-Überständen.

Trotz dieser zahlreichen Hinweise auf neuronale Differenzierungsprozesse, konnten keine voll funktionalen Neurone unter den untersuchten XXL-USSC gefunden werden. Auf den Zellen exprimierte (und immunzytochemisch nachgewiesene), spannungsabhängige Natrium-Kanäle zeigten in Patch-Clamp-Analysen zwar eine gewissen Funktionalität in Form elektrischer Reizbarkeit (Kalzium-Ströme), jedoch keine typischen Natrium-Ströme oder Aktionspotentiale. Ähnliche Befunde wurden bereits von einem anderen Labor für Zellen aus Nabelschnurblut beschrieben [211]. Im Vergleich zur neuronalen Differenzierung einer ESC oder NSC, bleibt die Differenzierung der XXL-USSC trotz aller morphologischen und molekularen Entwicklungen in neuronale Richtung unvollständig. In der Literatur ist die neuronale Differenzierung somatischer Stammzellen (außer NSC) umstritten, da diese trotz vielfacher Bemühungen generell nicht zu voll funktionalen Neuronen ausdifferenzieren scheinen [2,211,212]. Möglicherweise kann eine genauere Betrachtung der zellulären Regulationsmechanismen während der XXL-Differenzierung Aufschluss darüber geben, wodurch ein finales Fortschreiten zum funktionalen Neuron verhindert wird und wie man diese Blockade überwinden kann.

#### **4.5 Ziel der Arbeit**

Wie bereits beschrieben differenzieren USSC in eine neuronale Richtung, welche durch Ausprägung neuronaler Marker und bestimmter Funktionalitäten gekennzeichnet ist. Dennoch liegen bislang keine Daten vor, welche die molekularen Wege beschreiben, die die USSC zur neuronalen XXL-Differenzierung heranzieht. Die vergleichsweise übersichtliche Anzahl exprimierter microRNAs in Verbindung mit deren Zielgenredundanz lassen die Analyse dieser kleinen Regulatoren als geeigneten Ansatz erscheinen, einen ersten Einblick in die molekularen Differenzierungswege zu gewinnen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss von microRNAs auf die neuronale Differenzierung von USSC untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten microRNA-Expressionsprofile sowohl von nativen als auch von neuronal differenzierten USSC analysiert und mit Hilfe bioinformatischer Methoden potentielle Zielgene ausgemacht werden. Experimentelle Zielgenvalidierungen vermitteln dann das reale regulatorische Potential differentiell exprimierter microRNAs und sollten die

Grundlage für funktionale Analysen bilden in welchen der direkte Einfluss von microRNA-Kandidaten auf die XXL-vermittelte Differenzierung von USSC examiniert werden sollte.

Durch diese experimentelle Strategie soll ein erster Eindruck der molekularen Wege der neuronalen Differenzierung von USSC gewonnen werden. Es wird sich hierbei erweisen, ob USSC im Zuge ihrer neuronalen Differenzierung molekulare Merkmale der „klassischen“ neuronalen Differenzierung embryonaler Stammzellen aufweist oder ob die USSC als somatische Stammzelle einen eigenen molekularen Weg zur Differenzierung verfolgt, eine Hypothese die durch das Fehlen ESC-spezifischer Faktoren wie Oct4, Sox2 und Nanog impliziert wird.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Plastikgefäße, Einwegartikel und Filmmaterial

Die verwendeten Plastikgefäße und Einwegartikel wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), StarLab (Ahrensburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Zur visuellen Darstellung radioaktiver Strahlung wurden Phosphoimaging Platten (BAS-MS 2025) der Firma FujiFilm (Japan) verwendet.

#### 5.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien mit dem Reinheitsgrad *pro analysis* (p.a.) wurden, falls nicht anderweitig gekennzeichnet, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Darmstadt), Roche (Mannheim), Bio-rad (München) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

#### 5.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI Prism® 7900 HT	Applied Biosystems
ABI Prism® 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems
ABI Prism® 7000	Applied Biosystems
ABI 3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems
Autoklav, 3870 EL	Systec
Bakterieninkubator	Binder
Bakterien-Schüttelinkubator, Certomat H und MO	B.Braun
CO <sub>2</sub> -Feuchtinkubator	Binder
Elektroblot-Kammer	Welabo
Elektroporator, Capacitance Extender plus	Bio-Rad
Elektroporator, Gene Pulser II	Bio-Rad
Elektroporator, Pulse Controler plus	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop, Axioplan2	Zeiss
Geldokumentationssystem, Kamera und UVT-28 M	Herolab
Gelelektrophoresekammer, GNA 200	Pharmacia Biotech
Gelelektrophoresekammer, klein	Spezialanfertigung
Heizblock, ThermoStat plus	Eppendorf
Heizschrank	Heraeus
Horizontal-Schüttler Typ 3005	Gesellschaft für Labortechnik m.b.H.
Hybridisierungs-Ofen	Hybaid; Hybridization oven
Kontaminationsmonitor, Contamat FHT 111M	FAG Kugelfischer
Lichtmikroskop, Wolivert 03	Hund
Luminometer, Lumat LB 9507	Berthold Technologies
Magnetrührer, MR 3001	Heidolph Instruments
Mikropipetten	Gilson

Multiplex Bio-Imaging System, FLA-700	FujiFilm
Multistep-Pipette	Eppendorf
NanoDrop, ND-1000	peqLab Biotechniques
Neubauer-Zellzählkammer	Brand
pH-Meter, pH523	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten
Phosphoimaging Kassette, BAS Cassette2 2025	FujiFilm
Photometer, DU 640 Spektrophotometer	Beckman coulter
Pipettierhilfe, Accu-Jet	Brand
SDS PAGE-Kammer	Spezialanfertigung
Sequenzierer, 3730 DNA Analyser	Applied Biosystems
Spannungsquellen, Power Pac basic & 3000	Bio-Rad
Sterilbank, MSC/BSS 6-2, KL2B	Clean Air Deutschland
Taumelschüttler, Polymax 1040	Heidolph Instruments
Thermocycler, GeneAmpPCR System 9700	Applied Biosystems
UV Stratalinker 1800	Stratagene
Vortex-Genie2	Scientific Industries
Wasserbad, Typ 1007	Gesellschaft für Labortechnik m.b.H.
Zentrifuge Galaxy Mini	VWR
Zentrifuge RL 5B plus, Rotoren SLA-1500 & HB-6	Sorvall
Zentrifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge, Centrifuge Micro20	Hettich-Zentrifugen

#### 5.1.4 Vektor

Der „Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector“ pmirGLO (Promega, GenBank® Accession Nummer FJ376737) wurde für eine Quantifizierung der microRNA-Wirkung auf 3'UTRs verwendet. Hierfür wurden die 3'UTRs hinter das Firefly-Luciferase-Gen (*luc2*, siehe Abbildung 5.1) kloniert und in humane Zelllinien transfiziert. Innerhalb der Zellen wurde die Firefly-Luciferase-mRNA mit der zu untersuchenden 3'UTR exprimiert und konnte so die Wirkung co-transfizierter microRNA-Mimics überprüft werden. Zur Normalisierung der Firefly-Aktivität codiert der Vektor gleichzeitig für ein Renilla-Luciferase/Neomycin-Resistenz-Fusionsgen (*hRluc-neo*).

Der humane Phosphoglyceratkinase-(PGK)-Promotor, der das Firefly-Reportergen kontrolliert, vermittelt moderate Expressionslevel. Dies ist vorteilhaft für eine Studie, die Signalreduktion aufgrund von microRNA-Wirkung erfassen möchte, da eine zu starke Expression den Transkriptionsapparat überladen und mögliche schwache Auswirkungen der microRNAs überdecken würde. Desweiteren handelt es sich um einen universellen, nicht-viralen Promotor der in Hefen, humanen, Maus- und Rattenzellen funktioniert. Das SV40 late poly(A) Signal hinter der „multiplen Klonierungsstelle“ (MCS) vermittelt den Transkriptionsstopp inklusive mRNA-Polyadenylierung. Das *Renilla*-Luciferase-Gen steht unter der Kontrolle des konstitutiven SV40 early promoter.

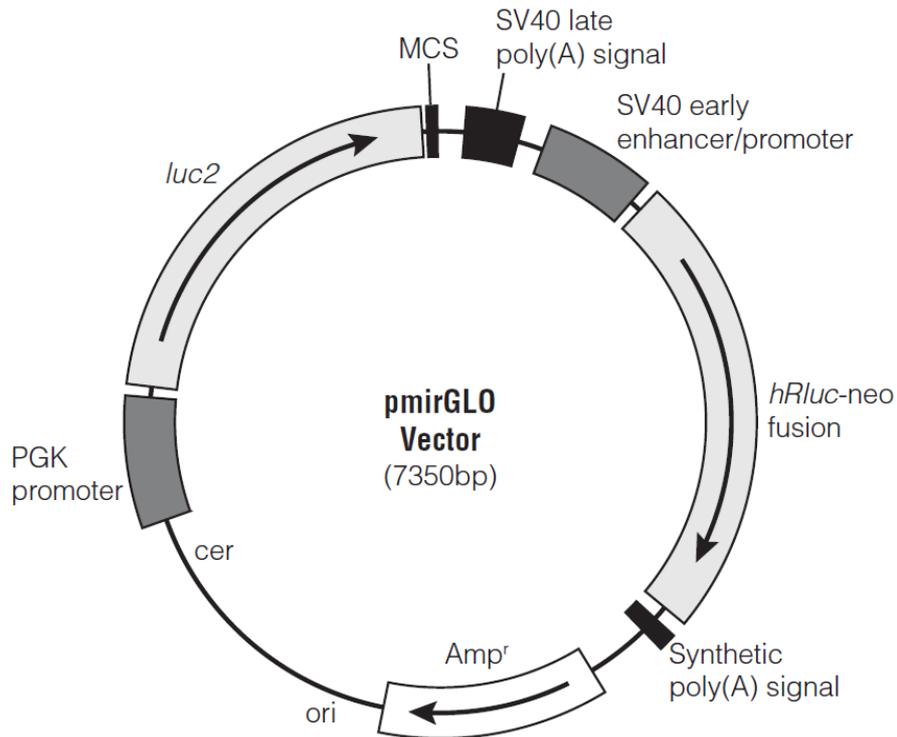


Abbildung 5.1: Übersichtskarte des Vektors pmirGLO (Abbildung nach Promega).

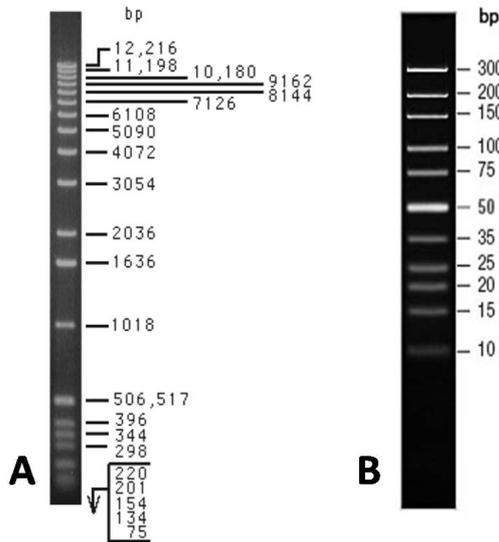
### 5.1.5 Antikörper

Primär-Antikörper	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Anti- Neurofilament (NA1297) (NEFL, NEFM, NEFH)	BioTrend	Kaninchen	1:1000
Anti-Beta-III-Tubulin (MAB 1637)	Chemicon / Millipore	Maus	1:300
Anti-Beta-Actin (A2103)	Sigma	Kaninchen	1:500
Sekundär-Antikörper	Hersteller	Nachweis	Verdünnung
Anti-Kaninchen (A11037)	Invitrogen	Fluoreszenz (Alexa 594)	1:1000
Anti-Maus (A11029)	Invitrogen	Fluoreszenz (Alexa 488)	1:1000

Tabelle 5.1: In dieser Arbeit verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen.

### 5.1.6 DNA-Größen-Standards

Als DNA-Größenstandards wurden die 1kb- Leiter von Invitrogen, sowie die GeneRuler UltraLow Range DNA-Leiter eingesetzt, gemäß Abbildung 5.2.



**Abbildung 5.2: DNA-Größenstandards.** Fragmentlängen der 1kb-DNA-Leiter von Invitrogen (A) sowie der GeneRuler UltraLow Range DNA-Leiter (Fermentas) (B). (Abbildungen nach Fermentas und Invitrogen)

### 5.1.7 Oligonukleotide

#### 5.1.7.1 Primer und weitere DNA-Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide der folgenden 3 Tabellen wurden von Thermo Electron GmbH (Ulm) bezogen.

Oligo	Sequenz 5'->3'
pmirGLO/miR-137sense	<b>cGCGGCCGC</b> tagtctacgcgtattccttaagcaataa <b>t</b>
pmirGLO/miR-137antisense	<b>ctaga</b> <u>tattgcttaagaatacgcgtagactaGCGGCCGC</u> <b>gagct</b>

**Tabelle 5.2: Oligonukleotide zur direkten Klonierung einer vollständig komplementären Bindestelle für miR-137, mit Schnittenden für *SacI*- (rot) und *XbaI*-Ligation (blau).** In Großbuchstaben ist die Restriktionsschnittstelle für *NotI* markiert, die zur Restriktionskontrolle des fertigen Konstruktes diente, die miR-137-Bindestelle ist unterstrichen dargestellt.

Gen-Symbol, Accession	Produkt- größe [bp]	Sequenz 5'->3'	T <sub>m</sub> [°C]
<b>CRIM1</b> , NM_016441	1986	<i>SacI</i> , gcatatGAGCTCggagaaacctggtaacataaaagcag	55
		<i>XbaI</i> , gcatatTCTAGActatgatgcactccaagtgccatata	56
<b>EPHA4</b> , NM_004438	2994	<i>XhoI</i> , gcatatCTCGAGgccagtactgaataaaactcaaaactc	52
		<i>SalI</i> , gcatatGTCGACgcactcttcagtggtatcaatgc	53
<b>GAPDH</b> , NM_002046	196	<i>SacI</i> , gcatatGAGCTCgacccttggaccaccagc	61
		<i>XbaI</i> , gcatatTCTAGAGagcacagggtactttattgatgg	57
<b>MECP2-1</b> , NM_004992	3324	<i>XhoI</i> , gcatatCTCGAGctttacacggagcggattgc	54
		<i>SalI</i> , gcatatGTCGACcccccttccataatgttcaagtacagac	55
<b>MECP2-2</b> , NM_004992	3232	<i>XhoI</i> , gcatatCTCGAGgcagaaggaagcagggtgtg	50
		<i>SalI</i> , gcatatGTCGACagagacatctccagtaagtgtg	49
<b>NBEA</b> , NM_015678	1590	<i>SacI</i> , gcatatGAGCTCagataaaggaagaaccaaagccaag	56
		<i>XbaI</i> , gcatatTCTAGActtccagatgttaagtatcctcccaattc	58
<b>NeuroD1</b> , NM_002500	1322	<i>SacI</i> , gcatatGAGCTCaggcagccagtttcacc	53
		<i>XbaI</i> , gcatatTCTAGAcactttcaatactattttattgcaac	49
<b>NeuroG1</b> , NM_006161	421	<i>SacI</i> , gcatatGAGCTCgtctcttggctctgtttctccgg	54
		<i>XbaI</i> , gcatatTCTAGAGaatgaagcatcttgaataaattaaagtactctcc	59
<b>NeuroG1full</b> NM_006161	680	<i>SacI</i> , gcatatGAGCTCgccctttgtagacactgttactttc	57
		<i>XbaI</i> , gcatatTCTAGAAtttcatgaagcgtctgcagtac	57
<b>NPTX1</b> , NM_002522	2194	<i>XhoI</i> , gcatatCTCGAGgtcagtggtctctggtgggtg	51
		<i>SalI</i> , gcatatGTCGACctcaacaattcatgtcatttcagcaag	58
<b>NRP1</b> , NM_003873	1728	<i>XhoI</i> , gcatatCTCGAGcgtcgtgcataggcaaagaag	55
		<i>SalI</i> , gcatatGTCGACgaacattttgaactgcctttac	51
<b>NTN4</b> , NM_021229	719	<i>XhoI</i> , gcatatCTCGAGgcatgaactttggtctgtagg	48
		<i>SalI</i> , gcatatGTCGACttatcatatggcactgtgttcatg	53
<b>NTN4full</b> , NM_021229	1208	<i>XhoI</i> , gcatatCTCGAGcattaagatggatagcacataatggcac	58
		<i>SalI</i> , gcatatGTCGACgcaagtccacaggacttcagag	59
<b>PTN</b> , NM_002825	688	<i>SacI</i> , gcatatGAGCTCaagatgtcacctgtggaacat	55
		<i>XbaI</i> , gcatatTCTAGAcagcatcaccttgattttatttctctag	56
<b>STAT3</b> , NM_003150	685	<i>SacI</i> , gcatatGAGCTCggagctgagaacggaagc	56
		<i>XbaI</i> , gcatatTCTAGAccgtgttagccaggatgg	56
<b>STAT3full</b> , NM_003150	2420	<i>XhoI</i> , gcatatCTCGAGggagctgagaacggaagc	56
		<i>SalI</i> , gcatatGTCGACacggttcctatataacggtttatttctgg	57

Tabelle 5.3: PCR-Primer für die Klonierungen der Teil- oder Gesamt-3'UTRs ausgewählter, potentieller miRNA-Zielgene. Angegeben ist das offizielle Gensymbol sowie die Gene-Bank Accession-Nummer der zugehörigen mRNA. Jeder Primer beginnt mit 6 „on-end“-Basen, die eine spätere Restriktion der PCR-Fragmente erleichtern sollen. Direkt anschließend befinden sich die jeweiligen Restriktionsschnittstellen (grau unterlegt). Die mit der Matrizen-DNA hybridisierenden Primerbereiche sind fett gekennzeichnet und ausschlaggebend für die berechneten Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>). Als Matrize wurde genomische DNA verwendet. Einzige Ausnahme hiervon stellt die 3'UTR von EPHA4 dar, bei deren Amplifizierung wegen eines Introns innerhalb der 3'UTR cDNA als Matrize eingesetzt werden musste.

3'UTR Fragment	Primername	Sequenz 5'->3'	T <sub>m</sub> (°C)
<b>CRIM1</b>	CRIM1SeqPrimer1	tgatgtgagcactggagc	55
	CRIM1SeqPrimer2	ggcagataaacaggcattcc	55
	CRIM1SeqPrimer3	aaacagcccttagcacttttatac	55
<b>EPHA4</b>	EPHA4 Seq.Primer1	gacactgatgaaacaacacccatacc	60
	EPHA4 Seq.Primer2	ggagttagctgcatattaattactgtagaac	57
<b>MECP2_1</b>	MECP2_1 SeqPrimer1	gagagggattcctaatactcagagc	60
	MECP2_1 SeqPrimer2	ccattccagaagagacaaacacgg	59
<b>MECP2_2</b>	MECP2_2 SeqPrimer1	ctgtctgctggtcacttcttctg	59
	MECP2_2 SeqPrimer2	ctctggaacaattactttaaacatagttac	55
<b>NBEA</b>	NBEASeqPrimer1	tgcattccatttccagc	53
	NBEASeqPrimer2	attcagccctaccctgc	55
<b>NEUROD1</b>	NEUROD1UTRSeqPrimer	acttggtacctttccatgctg	57
<b>NPTX1</b>	NPTX1 SeqPrimer1	gaccacccatggtgccag	62
<b>STAT3full</b>	STAT3-full seqPrimer1	aaacactgtatcagcatagcctttctg	59
	STAT3-full seqPrimer2	gtgcttacaaccttgactccc	57
<b>pmirGLO</b>	pmirGLO 5'-SeqPrimer	gcaagatccgcgagattctc	57
	pmirGLO 3'-SeqPrimer	ttattgctcagcgggtggcag	59

Tabelle 5.4: Sequenzier-Primer zur Überprüfung der Klonierungen. Alle Konstrukte für die keine Primer aufgelistet sind, wurden mit den pmirGLO-Sequenzierprimern überprüft. Die T<sub>m</sub> bezeichnet die Schmelztemperatur der Primer.

### 5.1.7.2 LNA-Oligonukleotide

Alle LNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Exiqon bezogen.

Sonde	Sequenz 5-> 3'	T <sub>m</sub> / T <sub>Hyb</sub>
LNA-hsa-miR-16-Sonde	cgCcaAtaTttAcgTgcTgcTa	74°C / 50°C
LNA-hsa-miR-24-Sonde	ctGttCctGctGaaCtgAgcCa	80°C / 55°C
LNA-hsa-miR-222-Sonde	acCcaGtaGccAgaTgtAgcT	78°C / 50°C
LNA-U6	gcAggGgcCatGctAatCttCtcTgtAtc	80°C / 55°C
hsa-mir16rev	tagcagcacgtaaattggcg	(55°C)

Tabelle 5.5: LNA-Oligonukleotide wurden als Sonden für die miRNA-Detektion beim EDC-Northernblot verwendet. Jede dritte Base, in Großbuchstaben dargestellt, steht jeweils für ein LNA-Nukleotide. Das Oligonukleotid hsa-mir16rev wurde als Größenstandard im Northernblot verwendet (vergleiche Abschnitt 5.2.1.9).

### 5.1.7.3 MicroRNA-Mimics

Bei den microRNA-Mimics handelt es sich um kommerziell erhältliche, doppelsträngige, chemisch modifizierte RNA-Moleküle, die einzelne miRNAs in der Zelle simulieren sollen und direkt in den RISC aufgenommen werden können. Chemische Modifizierungen erhöhen die Stabilität der Mimics innerhalb der Zelle und verursachen die präferentielle Aufnahme der eigentlichen Mimic in den RISC, anstatt des unerwünschten Gegenstranges. Die Mimics

wurden bei Dharmacon/Thermo Fisher bezogen. Zusätzlich kam die ON-TARGET plus Non-targeting siRNA #1 (n.t.siRNA) als Negativkontrolle zum Einsatz. Die im Auslieferungszustand lyophilisierten Oligonukleotide wurden in 1x siRNA-Puffer auf eine Konzentration von 20 pmol/µl gebracht, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

microRNA Mimic	Sequenz der microRNA-Mimic 5'->3'
hsa-miR-17	caaagugcuuacagugcagguag
hsa-miR-18a	uaaggugcaucuagugcagauag
hsa-miR-19a	ugugcaaaucuaugcaaacuga
hsa-miR-20a	uaaagugcuuauagugcagguag
hsa-miR-106b	uaaagugcugacagugcagau
hsa-miR-130a	caggcaauguuaaaagggcau
hsa-miR-137	uuauugcuuaagaauacgcguag
hsa-miR-138	agcugguguugugaaucaggccg
hsa-miR-218	uugugcuugaucuaaccaugu
hsa-miR-335	ucaagagcaauaacgaaaaaugu

Tabelle 5.6: Verwendete miRIDIAN microRNA-Mimics.

### 5.1.8 Enzyme

#### Restriktionsendonukleasen:

*XbaI*, *SacI*, *XhoI*, *Sall* (Fermentas, St.Leo-Rot)

*NotI* (Invitrogen, Karlsruhe), je 10 U/µl

#### Weitere Enzyme:

Alkalische Kälberdarm-Phosphatase (CIAP, Invitrogen, Karlsruhe),

T4-Polynukleotid-Kinase (Promega, Mannheim),

M-MLV reverse Transkriptase (Promega, Mannheim),

T4-DNA-Ligase (Fermentas, St.Leo-Rot),

Pfu-Polymerase (Fermentas, St.Leo-Rot)

### 5.1.9 Kommerzielle Kits

Kit	Vertreiber
Qiagen Long Range PCR Kit	Qiagen
Taq PCR Core Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
mirVana™ microRNA Isolation Kit	Ambion
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
TaqMan® Array Human MicroRNA A bzw. B Cards, v2.0	Applied Biosystems
TaqMan® Gene Expression MasterMix	Applied Biosystems
TaqMan® PreAmp MasterMix	Applied Biosystems
Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A bzw. B, v2.1	Applied Biosystems
Megaplex™ RT Primers, Human Pool A bzw. B, v2.1	Applied Biosystems
TaqMan® microRNA rev. Transkription Kit	Applied Biosystems
RT <sup>2</sup> First Strand Kit (C-03)	SA Biosciences/Qiagen
RT <sup>2</sup> pPCR SYBR Green/Rox MasterMix (PA-012-12)	SA Biosciences/Qiagen
Human Neurogenesis and Neural Stem Cell RT <sup>2</sup> Profiler™ (PAHS-404C-12)	SA Biosciences/Qiagen

Tabelle 5.7: In dieser Arbeit verwendete Kits.

### 5.1.10 Bakterienstamm

Der in dieser Arbeit verwendeter *E.coli* Bakterienstamm wurden zur Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet.

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<b>SURE</b>	(Kan <sup>r</sup> ) endA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14 <sup>-</sup> (mcrA) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] supE44	Stratagene

Tabelle 5.8: In dieser Arbeit verwendeter Bakterienstamm.

### 5.1.11 Humane Zelllinien

Zelllinie	Verwendungszweck
HEK293T	Validierung der Interaktion zwischen microRNA und Zielgenen
USSC SA 5/03	Neurale Differenzierung, microRNA Expressionsprofile und funktionale Analysen
USSC SA 5/73	Neurale Differenzierung, microRNA & cDNA Expressionsprofile
USSC SA 8/25	Neurale Differenzierung, microRNA Expressionsprofile

Tabelle 5.9: In dieser Arbeit verwendete humane Zelllinien und deren Verwendungszweck.

### 5.1.12 Verwendete Antibiotika

Zelllinie	Arbeitskonzentration
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml
Tetracyclin	12,5µg/ml
Kanamycin	30µg/ml

Tabelle 5.10: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika und deren Arbeitskonzentrationen.

### 5.1.13 Datenbanken und Software

#### Online-Datenbanken:

Blast:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
PubMed:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed</a>
OMIM:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM</a>
TargetScan:	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>
PicTar:	<a href="http://pictar.bio.nyu.edu/">http://pictar.bio.nyu.edu/</a>
MiRanda:	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a>
miRBase:	<a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a>
DIANA LAB:	<a href="http://diana.cslab.ece.ntua.gr/">http://diana.cslab.ece.ntua.gr/</a>
miRGen:	<a href="http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/">http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/</a>
mirWalk	<a href="http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/">http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/</a>
DAVID bioinformatic resources	<a href="http://david.abcc.ncifcrf.gov/">http://david.abcc.ncifcrf.gov/</a>

#### Software:

- SDS 2.3 (Applied Biosystems, USA),
- ApE (A plasmid Editor, Version 1.17, M. Wayne Davis),
- Chromas lite (Version 2.01, Technelysium Pty Ltd),
- Axio Vision (Release 4.7, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH)
- RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Software (Version 3.4, <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>)

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.2.1.1 RNA-Isolierung mittels mirVana Kit

Die Extraktion von kurzer und langer RNA aus USSC erfolgte mittels mirVana microRNA Isolation Kit (Ambion). Dieses Kit erlaubt die Isolation und Trennung kleiner RNA-Fractionen ( $\leq 200$  Nukleotide) von längeren ( $\geq 200$  Nukleotide).

Die Lyse der Zellen erfolgte direkt auf den Kulturplatten. Je 24-Well wurden 75  $\mu$ l Lyse/Bindepuffer eingesetzt. Nach 10-minütiger Inkubation des Lysats mit 1/10 Volumen microRNA Homogenat Additive auf Eis erfolgte die Isolierung der RNA-Fractionen durch Zugabe von einem Lysat-Volumen saurem Phenol. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch ca. 5 min bei 18.000  $\times g$  zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

#### Isolierung der langen RNA-Fraktion

Zur wässrigen Phase wurde 1/3 Volumen 100% Ethanol gegeben und kräftig durchgemischt. Das RNA-Gemisch wurde auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000  $\times g$  zentrifugiert. Dies führte zur Trennung der kleinen RNA-Fraktion von der Rest-RNA. Während die lange RNA-Fraktion an der Säule gebunden bleibt, befand sich die kleine RNA-Fraktion im Durchfluss und lagerte bis zur späteren Aufarbeitung auf Eis. Durch Zugabe von 700  $\mu$ l Wash Solution 1, gefolgt von 2x 500  $\mu$ l Wash Solution 2/3 und jeweils einer Zentrifugation, wurde die auf der Säule gebundene lange RNA-Fraktion gewaschen. Durch 1-minütige Zentrifugation bei 10.000  $\times g$  wurde die Säule getrocknet, anschließend erfolgte die Elution der langen RNA durch Zugabe von 100  $\mu$ l, 95°C heißer Elution Solution und abschließender Zentrifugation. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### Isolierung der kurzen RNA-Fraktion

Das kurze-RNA-haltige, auf Eis gelagerte Filtrat aus dem ersten Isolationsschritt wurde mit 2/3 Volumen 100% Ethanol versetzt und einige Sekunden durchgemischt. Das Gemisch wurde auf eine neue Säule gegeben und 15 Sekunden bei 10.000  $\times g$  zentrifugiert. Die Waschungen, Elution und Lagerung der aufgereinigten kurzen RNA-Fraktion erfolgt wie im obigen Abschnitt.

Es folgte eine Konzentrationsbestimmung beider RNA-Fractionen am NanoDrop (siehe Abschnitt 5.2.1.4), sowie die Integritätsprüfung der kurzen RNA-Fraktion mittels denaturierender PAGE, mit anschließender Silberfärbung.

### 5.2.1.2 Total-RNA-Isolierung mittels Qiagen RNeasy-Mini Kit

Zunächst wurden die USSC mit Kulturmedium gewaschen, anschließend das Medium möglichst restlos abgesaugt. Je 24-Well wurden 100 µl RLT-Puffer für die Lyse der Zellen eingesetzt und das Lysat nach kurzer Inkubation in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei den eingesetzten Zellmengen (maximal  $3 \times 10^5$  Zellen/Well) waren keine gesonderten Homogenisierungsschritte notwendig. Die Extraktion von total-RNA aus USSC erfolgte gemäß Herstellerangaben mittels Qiagen RNeasy-Mini Kit, inklusive 15 minütigem DNase-Verdau des noch auf der Säule gebundenen Materials. Die total-RNA wurde mit 30–50 µl RNase-freiem Wasser eluiert (1 min, 8000 x g) und bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 5.2.1.3 Aufreinigung von DNA mittels Phenolextraktion und Ethanol-Fällung

Die aufzureinigende DNA wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und gegebenenfalls mit 1x TE auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Ein Volumen PCI-Lösung wurde zugegeben und einige Sekunden lang kräftig durchmischt. Zur Phasentrennung wurde 10 min bei 18.000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig und ohne Berührung der Protein-Interphase abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur wässrigen Phase wurden nun 1/20 Volumen 5 M NaCl und 3 Volumina eisgekühlter Ethanol zugegeben und kräftig durchmischt. Das Präzipitat wurde 20 min bei 18.000 x g und  $4^\circ\text{C}$  sedimentiert, der Überstand wurde verworfen. Es folgten ein bis zwei Waschschrte mit 70%igem Ethanol und je 2 min Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  und 18.000 x g. Ein weiterer Waschschrte erfolgte mit 100%igem Ethanol. Nach abschließender Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.

Nun wurde die DNA in einem geeigneten Volumen 1x TE-Puffer aufgenommen und anschließend 10 min bei  $68^\circ\text{C}$  gelöst. Die Lagerung gelöster DNA erfolgte bei  $-20^\circ\text{C}$ .

#### PCI-Lösung:

25 Teile Phenol (pH  $\geq 7,8$ )  
24 Teile Chloroform  
1 Teil Isoamylalkohol

#### 1x TE-Puffer:

10 mM Tris base (pH 7,5)  
0,1 mM EDTA  
vor Gebrauch 20 min bei  $121^\circ\text{C}$  autoklavieren

### 5.2.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, wobei eine Absorption von 1.0 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm einer Konzentration von  $50 \mu\text{g doppelsträngiger DNA} \times \text{ml}^{-1}$ ,  $33 \mu\text{g einzelsträngiger DNA} \times \text{ml}^{-1}$  und  $40 \mu\text{g einzelsträngiger RNA} \times \text{ml}^{-1}$  entspricht. Zur Bestimmung der Protein-Verunreinigung der Probe, wurde eine gleichzeitige Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm vorgenommen. Der Quotient der Absorptionen 260 nm/ 280 nm der

DNA bzw. RNA ergibt den Grad der Reinheit, welcher zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte, wobei 2,0 der absoluten Reinheit entspricht.

Um die Nukleinsäure-Konzentration zu messen, wurde zunächst gegen einen Leerwert (Lösungsmittel ohne DNA/RNA) normalisiert und dann die Probe in geeigneter Verdünnung in am NanoDrop 1000 Spektralphotometer von Thermo Scientific gemessen. Es erlaubt die Konzentrationsbestimmung von Proben mit  $\geq 1 \mu\text{l}$  Volumen.

### 5.2.1.5 Größenauftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurden Flachbettgelkammern eingesetzt. Die Herstellung eines Agarosegels erfolgte durch Aufkochen der gewünschten Agarosemenge in 1x TBE-Puffer und nachfolgender Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (10 mg/ml) je 100 ml. Das noch flüssige Gel wurde in einen Gelschlitten entsprechender Größe gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach Aushärtung wurde die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, der Kamm entfernt, die Proben vor dem Auftragen mit 5x Ladepuffer versetzt, aufgetragen und Spannung angelegt. Die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach der angelegten Spannung, sowie der Agarose-Konzentration des Gels und dem gewünschten Auftrennungsgrad der Proben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentlängen wurde jeweils ein Größenstandard zum Vergleich mitgeführt. Die Ergebnisse der Elektrophorese wurden auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm fotografisch dokumentiert.

#### 10x TBE-Puffer:

900 mM	Tris base
900 mM	Borsäure
20 mM	EDTA

#### 5x Ladepuffer:

50 mM	Tris base (pH 7,5)
25% (v/v)	Glycerin
0,025% (w/v)	Bromphenolblau
0,025% (w/v)	Xylencyanol

### 5.2.1.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Integritätsüberprüfung der kleinen RNA-Fraktion wurden je Probe 25 ng mittels 15%igem, denaturierendem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Trennbereich liegt etwa bei 1-200 Basen. Je 15 ml-Gel wurde nach unten stehendem Rezept Harnstoff eingewogen, Acrylamid-Mix und 10x TBE zugegeben und mit A.dest. aufgefüllt. Unter Rühren und Erwärmung auf ca. 50°C wurde der Harnstoff gelöst und zum Start der Polymerisationsreaktion APS sowie TEMED zugegeben, gut vermischt und rasch in eine gereinigte Gel-Kammer gegossen. Unmittelbar vor dem Laden der Proben und nach 10-minütiger Vorlaufzeit bei 10 mA, mussten die Taschen mit 1x TBE gespült werden, um den aus dem Gel diffundierenden Harnstoff zu entfernen. Die Proben wurden 1:1 mit Gel

Loding Buffer II (Ambion) versetzt und bei 95°C für mindestens 1 min denaturiert, anschließend sofort aufgetragen oder kurzzeitig auf Eis gelagert.

15 ml PAA-Gel:

6,5 g	Harnstoff
5,6 ml	Acrylamid-Mix (40%, Bio-rad)
1,5 ml	10x TBE
ad 15 ml	H <sub>2</sub> O
70 µl	APS
15 µl	TEMED

### 5.2.1.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Integritätsüberprüfung von Primern und zur Kontrolle korrekter Hybridisierung der miR-137sense- und -antisense-Oligos wurde eine nicht-denaturierende PAGE durchgeführt. Das Vorgehen entsprach dem unter Abschnitt 5.2.1.6 beschriebenen Verfahren, mit dem Unterschied, dass kein Harnstoff verwendet wurde und der anschließende Nachweis über eine 15-minütige Ethidiumbromid-Färbung (30 µg pro 100 ml 1x TBE) erfolgte.

### 5.2.1.8 Silberfärbung von RNA im Polyacrylamid-Gel

Als sensitive Nachweismethode für Nucleinsäuren in Polyacrylamid-Gelen wurde die Silberfärbung angewendet. Hierfür wurde das Gel zunächst für 15 min in Fixierlösung geschwenkt, die nach abgießen für weitere 15 min durch Silbernitrat-Lösung ersetzt wurde. Es folgten zwei 5-minütige Waschschriffe mit A.dest. Vor dem eigentlichen Entwickeln musste das Gel zunächst mit einer kleinen Menge Entwickler-Lösung „gewaschen“ werden, um anschließend unter visueller Kontrolle so lange inkubiert zu werden bis die Banden eine geeignete Intensität erreicht hatten. Eine zusätzliche Lichtquelle kann den Färbeporgang beschleunigen. Zuletzt wurden die Gele für ca. 10 min in der Stopp-Lösung geschwenkt und zu Dokumentationszwecken eingescannt.

Fixierer:

10% (v/v)	Ethanol
0,5% (v/v)	CH <sub>3</sub> COOH

Entwickler:

1,5% (w/v)	NaOH
0,5% (v/v)	CH <sub>2</sub> O
0,008% (w/v)	NaBH <sub>4</sub>

Silbernitrat-Lösung:

0,19% (w/v)	AgNO <sub>3</sub>
-------------	-------------------

Stopp-Lösung:

0,75% (w/v)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
-------------	---------------------------------

### 5.2.1.9 EDC/LNA-Northernblot

Bei der hier beschriebenen Variante wurden gegenüber einem klassischen Northernblot mehrere Modifikationen nach [213] und [214] integriert um einen möglichst sensitiven microRNA-Nachweis zu ermöglichen. Durch chemisches kreuzvernetzen der RNA auf einer Nylon-Membran mittels 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), werden Verluste selbiger durch unvollständige UV-Quervernetzung, sowie Schädigungen der RNA durch UV-Bestrahlung verhindert, die ihrerseits zur Abschwächung der Sondenhybridisierung führen würden. Dies ist gerade für durchschnittlich 22 Basen lange microRNAs von entscheidender Bedeutung, da bereits eine einzige beschädigte/quervernetzte Base die Sondenhybridisierung deutlich beeinträchtigen kann [213]. Beim EDC-vermittelten Vernetzen wird das 5'-terminale Phosphat der RNA auf einer Nylon-Membran immobilisiert, woraus eine verbesserte Zugänglichkeit für die komplementäre Sonde resultiert. Um die Sensitivität weiter zu erhöhen, wurden 5'-radioaktiv markierte LNA-(„locked nucleic acid“)-haltige Sonden zur Detektion gewünschter microRNAs verwendet. Bei diesen speziellen Sonden handelt es sich um DNA-Oligonukleotide, deren jede dritte Base durch ein LNA-Nukleotid ersetzt wurde. LNAs stellen eine neue Klasse bizyklischer RNA-Analoga dar, deren Ribose-Ring am C2- und C4-Atom innerhalb des Zucker/Phosphat-Rückgrats, über eine 2'-O,4'-C-Methylenbrücke verbunden ist. Dadurch ist die Ribose in der 3'-*endo*-Konformation fixiert und hybridisiert zu deutlich thermostabileren Doppel-Helices als gewöhnliche RNA- oder DNA-Sonden. Man rechnet zwischen 1-8°C erhöhter Schmelztemperatur pro inseriertem LNA-Nukleotid gegenüber komplementärer DNA und zwischen 2-10°C gegenüber komplementärer RNA. Dabei wird nicht nur die Sensitivität der Hybridisation erhöht, sondern gleichzeitig auch deren Spezifität [215,216].

### PAGE und Elektrobplot

Zunächst wurden die RNA-Proben (50-500 ng kleine RNA Fraktion, Abschnitt 5.2.1.1) über ein denaturierendes, 15%iges PAA-Gel im MOPS-Puffersystem (wie Abschnitt 5.2.1.6, nur mit MOPS-Puffer anstelle von TBE), aufgetrennt. Tris-haltige Puffer wurden vermieden, da sie den EDC-vermittelten Vernetzungs-Schritt beeinflussen könnten. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt (Gel Loading Buffer II, Ambion), 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend in die gespülten Geltaschen überführt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS bei 12 mA bis der gewünschte Auftrennungsgrad erreicht wurde (Blaumarker ca. 1 cm vor unterem Gel-Ende). Als Größenreferenz wurde ein synthetisches miR-16-DNA-Oligo (hsa-miR16rev) verwendet.

10x MOPS-Puffer:

200 mM MOPS

mit NaOH auf pH 7 einstellen

Zum Blotten wurde das Gel auf eine Hybond-NX-Membran (Amersham/Pharmacia) platziert, welche vorher mit destilliertem Wasser angefeuchtet wurde. Je drei Lagen befeuchtetes 3MM Whatman Filterpapier wurden als Sandwich um Gel und Membran gelegt und in der Blotkammer platziert. Mit einer serologischen Pipette wurden Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit aus dem 6,5 x 8,5 cm großen Sandwich herausgedrückt. Der Transfer der RNA erfolgte unter Kühlung 1,5 h bei 20 V.

### EDC-vermittelte Vernetzung der RNA

Während des Blottens wurde die EDC-Lösung unmittelbar vor ihrer Anwendung hergestellt. Zunächst wurde eine 0,13 M 1-Methylimidazole/ HCl-Lösung (pH 8) vorbereitet und darin das EDC zu einer Endkonzentration von 0,16 M gelöst. Eine Lage Whatman-Filterpapier, die größer als die Membran war, wurde mit der EDC-Lösung getränkt, die Membran mittig aufgelegt (RNA-Seite nach oben) und Luftblasen-frei in Folie eingeschweißt. Es folgten 2 h Inkubation bei 55°C. Anschließend wurde die Membran mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült und sofort prehybridisiert oder trocken und geschützt aufbewahrt.

#### 0,13 M 1-Methylimidazole:

490 µl 1-Methylimidazole (12,5 M)  
ad 40 ml DEPC-H<sub>2</sub>O  
mit HCl auf pH 8 einstellen (ca. 100 µl, 25% HCl)

#### 0,16 M EDC-Lösung:

0,373 g EDC  
10 ml 0,13 M 1-Methylimidazole  
ad 12 ml mit DEPC-H<sub>2</sub>O

### Markierung der LNA-Sonden

Für den sensitiven Nachweis von microRNAs wurden die Sonden für den EDC/ LNA-Northernblot 1 h bei 37°C, mit [ $^{32}$ P]ATP 5'-endmarkiert. Anschließend wurden die Sonden mittels QIAquick Nukleotide Removal Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 100 µl EB eluiert. Je Sonde wurde 1 µl des Eluates im Scintillationszähler gemessen.

#### Markierung der Sonden:

0,5 µl Sonde (100 pmol/ µl)  
1 µl 5x forward Puffer (Invitrogen)  
1 µl T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/ µl, Invitrogen)  
2,5 µl [ $^{32}$ P]ATP [370 MBq (10 mCi)/ ml]  
1 h Inkubation bei 37°C

### Hybridisation

Je Membran wurden zu 6 ml Hybridisations-Lösung 600 µl 50x Denhards-Lösung und 30 µl gescherter und bei 95°C denaturierter Lachssperma-DNA (10 mg/ml) zugegeben. Die Membranen wurden bei Hybridisierung-Temperatur (siehe Tabelle 5.5, T<sub>hyb</sub>) 1 h prehybridisiert. Anschließend wurde für die Hybridisierung der U6-Sonde 7500 CPM/Membran eingesetzt, pro miRNA-Sonde wurden 3 Mio CPM/Membran verwendet

(zuvor jeweils für 1 min bei 95°C denaturiert). Die Hybridisation erfolgte über Nacht (ca. 16 h) bei  $T_{\text{Hyb}}$ .

Hybridisierungs-Lösung:

7,5 ml 20x SSC  
 3 ml 10% SDS  
 18 ml DEPC-H<sub>2</sub>O  
 0,6 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 M)  
 0,6 ml 50 x Denhard's je 6 ml Lösung  
 30 µl Lachssperma-DNA je 6 ml Lösung

20x SSC:

3 M NaCl  
 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat  
 pH 7,0 mit HCl einstellen

10% SDS:

50 g SDS  
 ad 500 ml mit DEPC-H<sub>2</sub>O.

1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung:

7,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 ad 40 ml mit DEPC-H<sub>2</sub>O  
 pH 7,2 mit Phosphorsäure einstellen  
 ad 50 ml mit DEPC-H<sub>2</sub>O

### Waschen und Phospho-Imaging

Um unspezifische Signale zu entfernen bzw. zu reduzieren wurden die Membranen nach erfolgter Hybridisation drei Waschschritten bei  $T_{\text{Hyb}}$  unterzogen: 2x wurde für 10 min mit WP1 gewaschen, anschließend 1x für 10 min mit dem stringenteren WP2. Anschließend wurden die Membranen mit Whatman-Filterpapier abgelöscht, in Klarsichtfolie eingeschlagen, in die Phospho-Imaging-Kassette gelegt und eine Phospho-Imaging-Platte aufgelegt. Die Expositionszeit richtete sich nach der Intensität der Strahlung, das Ergebnis konnte am Multiplex Bio-Imaging System FLA700 ausgelesen werden.

WP1:

5x SSC  
 1% SDS  
 in DEPC-H<sub>2</sub>O

WP2:

1x SSC  
 1% SDS  
 in DEPC-H<sub>2</sub>O

### 5.2.1.10 PCR - Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [217] ist eine Methode zur Amplifizierung und Modifikation definierter DNA-Fragmente *in vitro*.

Die Reaktion verläuft typischerweise in drei aufeinanderfolgenden Schritten: Zunächst wird die DNA durch Erhitzen (üblicherweise bei 94°C) denaturiert, sodass sie in Einzelsträngen vorliegt. Anschließend wird die Temperatur abgesenkt um ein Hybridisieren der Primer an die DNA- Einzelstränge zu ermöglichen („Annealing“). Die optimale Temperatur hierfür ergibt sich aus unter anderem den Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Primer und ist für jedes Primerpaar individuell zu ermitteln. Der letzte Schritt, die eigentliche Amplifikation („Elongation“), erfolgt bei optimaler Arbeitstemperatur der eingesetzten Polymerase (zumeist zwischen 68 und 72°C), dabei werden an die Matrizen-DNA hybridisierte Primer verlängert und dadurch der von ihnen flankierte Bereich amplifiziert. Diese Abfolge wird zwischen 20-

und 40-mal wiederholt. In einer optimalen PCR verdoppelt sich die Anzahl der Amplifikate bei jedem Zyklus und es ergibt sich somit ein exponentieller Anstieg der DNA-Menge.

In der vorliegenden Arbeit wurde für PCRs ein 10:1 Taq/Pfu-Gemisch eingesetzt, zur Amplifizierung längerer Fragmente (> 1 kb) kam das Qiagen Long Range PCR Kit zum Einsatz.

<u>Reaktionsansatz <i>Taq/Pfu</i>, 50 µl:</u>		<u>PCR-Programm:</u>	
2 µl	Template-DNA(ca. 100 ng/µl)	5 min	94°C - initiale Denaturierung
5 µl	10 x Reaktionspuffer		
1 µl	dNTPs (10 mM)	30 sec	94°C
0,5 µl	<i>Taq</i> (5 U/µl)	30 sec	Primer-abhängig
0,05 µl	<i>Pfu</i> (5 U/µl)	90 sec*	72°C
1 µl	5'-Primer (100 pmol/µl)		} 35 Zyklen
1 µl	3'-Primer (100 pmol/µl)		
ad 50 µl mit Nuklease-freiem A.dest.		7 min	

<u>Reaktionsansatz Long Range Kit, 50 µl:</u>		<u>PCR-Programm:</u>		
2 µl	Template-DNA (ca. 100 ng/µl)	3 min	94°C - initiale Denaturierung	
5 µl	10 x Reaktionspuffer			
2,5 µl	dNTPs (10 mM)	15 sec	94°C	
0,4 µl	Enzym-Mix (5 U/µl)	30 sec	Primer-abhängig	
0,5 µl	5'-Primer (100 pmol/µl)	1,5-3,5 min*	68°C	
0,5 µl	3'-Primer (100 pmol/µl)		} 35 Zyklen	
ad 50 µl mit Nuklease-freiem A.dest.		7 min		68°C - finale Elongation

Bei allen PCRs wurde ein „manueller Hot-Start“ durchgeführt: erst zu den fertigen, bereits auf 94°C erhitzten PCR-Reaktionen, wurden die Polymerasen zugegeben. Die Annealing-Temperatur wurde abhängig von den  $T_m$  der Primerpaare eingestellt und bewegte sich zwischen 58°C und 62°C. Das Inkrement (\*) steht für eine Verlängerung der Elongationszeit je PCR-Zyklus um 10 sec. Als Template wurde für die 3'UTR von EPHA4 cDNA eingesetzt (siehe Abschnitt 5.2.1.14), für alle übrigen 3'UTRs wurde genomische DNA aus USSC verwendet.

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde 1/20 Volumen je Reaktion über ein 0,6-1%iges Agarosegel (siehe Abschnitt 5.2.1.5) aufgetrennt und photographisch dokumentiert. Bei erfolgreicher Amplifikation der gewünschten 3'UTR-Fragmente wurde der PCR-Ansatz zur weiteren Verarbeitung mittels Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt (Abschnitt 5.2.1.3).

### 5.2.1.11 Restriktion der PCR-Produkte und Kontroll-Ligation

Um doppelsträngige DNA in definierte Fragmente zu zerlegen, verwendet man bakterielle Restriktionsendonukleasen. Die Erkennungssequenz von Restriktionsendonukleasen besteht meist aus einer palindromischen Sequenz von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Je nach Enzym entstehen 3'- bzw. 5'-überhängende Enden („sticky ends“) oder solche mit glatter Schnittkante („blunt ends“).

Die amplifizierten und aufgereinigten 3'UTR-Fragmente wurden für die spätere Klonierung in den Vektor pmirGLO mit den Enzymen *SacI/XbaI* bzw. *XhoI/SalI* geschnitten. Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 5 U Enzym/1 µg DNA in die Restriktion eingesetzt.

#### Doppelverdau *SacI/XbaI*:

5 µg PCR-Produkt  
 25 U *SacI*  
 25 U *XbaI*  
 5 µl 10 x Tango-Puffer (Fermentas)  
 ad 50 µl mit A.dest.  
 Verdau 16 h, bei 37°C

#### Doppelverdau *XhoI/SalI*:

5 µg PCR-Produkt  
 25 U *XhoI*  
 25 U *SalI*  
 10 µl 10 x Tango-Puffer (Fermentas)  
 ad 50 µl mit A.dest.  
 Verdau 16 h, bei 37°C

Nach erfolgreicher Restriktion folgte eine weitere Phenolextraktion mit anschließender Ethanolfällung. Die nun geschnittenen und aufgereinigten Inserts wurden jeweils zwei Stunden bei 20°C mit sich selbst ligiert um die Effizienz der vorangegangenen Restriktion einschätzen zu können. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Proben bei 68°C folgte die Agarose-Gelelektrophorese der gesamten Kontroll-Ligationsansätze. War die Restriktion erfolgreich und vollständig, so erscheint im Gel eine Leiter aus den entstandenen Konkatemeren.

#### Reaktionsansatz:

2 µl Insert-DNA (100 – 300 ng)  
 1 µl 10 x Ligase-Puffer  
 1 µl T4 DNA Ligase (5 U/ µl)  
 ad 10 µl mit A.dest.  
 Verdau 2 h, bei 37°C

### 5.2.1.12 Kolonie-PCR

Mit Ligationsansätzen transformierte Bakterienkulturen können mit Hilfe einer Kolonie-PCR auf gewünschte Klonierungsergebnisse hin getestet werden. Hierfür wurden zunächst so viele Wells einer 96-Well-PCR-Platte mit je 10 µl A.dest. befüllt, wie Kolonien getestet werden sollten. Gleichzeitig wurden auf einer 96-Well-Bakterienkultur-Platte ebenso viele Wells mit je 300 µl Antibiotikum-haltigem LB-Medium (siehe Abschnitt 5.2.1.17) belegt. Dann wurde eine einzelne Kolonie von der Agar-Platte mit einer sterilen Pipettenspitze

aufgenommen und zunächst in einem Well der PCR-Platte abgestrichen und anschließend das korrespondierende Well auf der Kulturplatte beimpft. Während die Kolonien im A.dest. für 10 min bei 95°C aufgeschlossen wurden, wuchsen die zugehörigen Klone auf der Kulturplatte über Nacht bei 37°C heran. Zu den 10 µl Bakterien-Lysat wurden je 15 µl PCR-Master-Mix zugegeben:

<u>Reaktionsansatz Taq, 25 µl:</u>		<u>PCR-Programm:</u>		
2,5 µl	10 x Reaktionspuffer	5 min	94°C - initiale Denaturierung	
0,5 µl	dNTPs (10 mM)			
0,13 µl	Taq (5 U/µl)	30 sec	94°C	} 35 Zyklen
0,25 µl	5'-Primer (100 pmol/µl)	30 sec	58°C	
0,25 µl	3'-Primer (100 pmol/µl)	90 sec*	72°C	
11,37 µl	Nuklease-freies A.dest.			
		7 min	72°C - finale Elongation	

Die Primer wurden so gewählt, dass sie das gewünschte Konstrukt im Vektor umspannten. In dieser Arbeit werden hierfür die pmirGLO-Sequenzierprimer (siehe Tabelle 5.4) eingesetzt. Die Fragmente wurden nach erfolgter PCR-Reaktion über ein Agarosegel aufgetrennt und aus den Übernachtskulturen konnten Klone mit passenden Insertlängen für Mini-Präparationen angeimpft werden.

### 5.2.1.13 Hybridisierung der miR-137match-Oligonukleotide

Die pmirGLO/miR-137sense und -antisense Oligonukleotide wurden zunächst in einem geeigneten Volumen 1x TE gelöst um eine Konzentration von 100 pmol/µl zu erhalten. Anschließend wurden je 200 pmol der Oligos gemischt und mit 1x TE auf 15 µl aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch auf 95°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Hierdurch wurde eine behutsame Hybridisierung, mit möglichst wenigen Fehlpaarungen, ermöglicht. Je 300 ng der einzel- und doppelsträngigen Oligonukleotide wurden zur Überprüfung der Hybridisation auf einem 15%igen PAA-Gel (siehe Abschnitt 5.2.1.7) aufgetrennt.

### 5.2.1.14 cDNA-Synthese für Klonierung

Nach Herstellerangaben wurden 2 µg fetal human brain total-RNA (Clontech) mit der Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT, Promega) umgeschrieben und bei -20°C gelagert. Die resultierende cDNA diente als Template für die 3'UTR-Klonierung von EPHA4.

### 5.2.1.15 Vektor-Präparation für Klonierung

#### Vektor-Restriktion

Der Vektor pmirGLO wurde im präparativen Maßstab mit *SacI/XbaI* sowie *XhoI/SalI* geschnitten. Der Vektor-Restriktion folgte immer eine Phenolextraktion mit Ethanol-fällung. Alle Restriktionen wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,8%iges Gel) auf Vollständigkeit überprüft.

##### Reaktionsansatz *SacI/XbaI*:

30 µg pmirGLO  
 60 U *SacI*  
 60 U *XbaI*  
 12 µl 10x Tango-Puffer (Fermentas)  
 ad 120 µl mit A.dest.  
 Verdau 3 h, 37°C

##### Reaktionsansatz *XhoI/SalI*:

30 µg pmirGLO  
 60 U *XhoI*  
 60 U *SalI*  
 24 µl 10x Tango-Puffer (Fermentas)  
 ad 120 µl mit A.dest.  
 Verdau 3 h, 37°C

#### Dephosphorylierung der geschnittenen Vektor-DNA

Um eine Konkatemerisierung durch Ligation der geschnittenen Vektoren zu verhindern, wurde die alkalische Phosphatase (CIAP) eine Stunde lang bei 37°C zur Dephosphorylierung der Vektor-DNA eingesetzt. Da die CIAP im Überschuss eingesetzt wurde, musste bei 3'-überhängenden Enden (durch *SacI* produziert, Dephosphorylierung weniger effizient) keine Inkubation der Reaktion bei 50°C erfolgen. Für die weitere Verwendung der geschnittenen Vektoren wurde eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanol-fällung vorgenommen.

##### Reaktionsansatz:

20 µg pmirGLO (geschnitten)  
 1 µl CIAP (20 U/µl)  
 4 µl 10x NEB-Puffer 3  
 ad 40 µl mit A.dest.  
 Verdau 1 h, 37°C

#### Kontroll-Ligationen

Der Erfolg der Dephosphorylierung der beiden mit *SacI/XbaI* und *XhoI/SalI* geschnittenen Vektoren wurde durch Selbstligation verifiziert. Diese wurde mit dephosphoryliertem und zum Vergleich mit nicht-dephosphoryliertem Vektor, zwei Stunden bei 20°C durchgeführt, mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese der gesamten Ansätze.

##### Reaktionsansatz Vektor, dephosphoryliert:

100 ng Vektor-DNA  
 2 µl 10 x Ligationspuffer  
 5 U T4-DNA Ligase  
 ad 20 µl mit A.dest.  
 Ligation 2 h, 20°C

##### Reaktionsansatz Vektor, nicht dephosphoryliert:

100 ng Vektor-DNA  
 2 µl 10 x Ligationspuffer  
 5 U T4-DNA Ligase  
 ad 20 µl mit A.dest.  
 Ligation 2 h, 20°C

### 5.2.1.16 Vektor-Insert-Ligation

Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte für zwei Stunden bei 20°C im stöchiometrischen Verhältnis 1:5. Als Kontrolle wurde eine Ligation des Vektors ohne Insert mitgeführt. Die Ligationsansätze wurden für die Elektroporation über das QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben gereinigt, in 30 µl 1x TE eluiert und nach der Elektroporation bei -20°C aufbewahrt.

#### Ligationsansatz Vector/ Isert:

1 µl Vektor-DNA (200 ng)  
 1 µl Insert-DNA (berechnete Menge)  
 1 µl 5 x Ligationspuffer  
 1 µl T4-DNA Ligase (5 U/ µl)  
 1 µl A.dest.  
 Ligation 2 h, 20°C

#### Kontroll-Ligationsansatz:

1 µl Vektor-DNA (200 ng)  
 -  
 1 µl 5 x Ligationspuffer  
 1 µl T4-DNA Ligase (5 U/ µl)  
 2 µl A.dest.  
 Ligation 2 h, 20°C

### 5.2.1.17 Herstellung elektrokompetenter *E.coli* SURE

Für die Erzeugung elektrokompetenter *E.coli* SURE wurde zunächst ein Verdünnungsausstrich des Original-Stammes auf einer Kanamycin/Tetracyclin-haltigen Agarplatte angefertigt. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C, wurde eine Einzelkolonie in 20 ml Kanamycin/Tetracyclin-haltiges LB-Medium überführt und weitere 16 h bei 37°C und 220 r x min<sup>-1</sup> inkubiert. 10 ml dieser Vorkultur wurden in einen Liter vorgewärmtem LB-Medium (Kanamycin/Tetracyclin-haltig) überführt und bei 37°C und 220 r x min<sup>-1</sup> bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 kultiviert. Es folgte eine einstündige Inkubation der Kultur auf Eis, gefolgt von einer Sedimentierung bei 4°C und 5000 x g, für 15 min. Das Bakteriensediment wurde nun in einem Liter eisgekühltem, 10%igem Glycerin aufgenommen, resuspendiert und erneut für 15 min bei 4°C und 5000 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal mit 500 ml und 20 ml 10% Glycerin wiederholt und die Bakterien zuletzt in einem Volumen von 3 ml letztmalig resuspendiert. Anschließend wurden die *E.coli* in 40 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in die -80°C-Kühltruhe zur Lagerung überführt.

#### LB-Medium:

20 g LB Broth (Invitrogen)  
 ad 1 Liter mit A.dest. auffüllen  
 bei 20 min bei 121°C autoklavieren  
 gegebenenfalls mit Antibiotika versetzen  
 Lagerung bei RT

#### LB-Agar:

35 g LB-Agar (Invitrogen)  
 ad 1 Liter mit A.dest. auffüllen  
 bei 20 min bei 121°C autoklavieren,  
 gegebenenfalls mit Antibiotika versetzen  
 Lagerung bei 4°C

### **5.2.1.18 Elektroporation von *E.coli* SURE**

Die zu transformierende Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation in den *E.coli*-Stamm SURE eingebracht. Hierfür wurden zunächst sterile Elektroporations-Küvetten (Firma PeqLab, 2 mm) vorgekühlt. Pro Ansatz wurde ein 40 µl Aliquot elektrokompetenter Zellen aufgetaut, mit 0,5-1 µl DNA-Lösung vermischt und in die Küvette überführt. Diese wurde in den Schlitten eingesetzt und zwischen die Kontakte des „Pulsers“ geschoben. Es wurde bei 2500 V, 200 Ω und 25 µF elektroporiert. Die elektroporierten Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 60-90 min bei 37°C inkubiert. In dieser Erholungsphase haben die Transformanten die Möglichkeit, die auf der aufgenommenen Plasmid-DNA befindlichen Antibiotika-Resistenz-Gene (hier Ampicillin) zu exprimieren. Anschließend wurden die Transformations-Ansätze auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **5.2.1.19 Plasmidextraktion mittels QIAprep Spin Miniprep Kit**

Für die Analyse von Primärklonen nach Transformation der Vektor-Insert-Ligationen wurden Mini-Präparationen entweder direkt oder nach vorheriger Verifikation mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Von einer LB-Agar-Platte wurde demnach entweder eine Einzelkolonie direkt oder die Übernachtskultur des über Kolonie-PCR positive getesteten Klons verwendet um 3 ml LB-Amp-Medium, in 3,5 cm-Petrischalen, anzupflanzen. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 2 ml dieser Kultur wurden bei 18.000 x g abzentrifugiert und die Extraktionen mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch Zugabe von 50 µl 1x TE, gefolgt von 1-minütiger Zentrifugation bei 18.000 x g wurde die Plasmid-DNA von der Säule eluiert.

### **5.2.1.20 DNA-Sequenzierung**

Bei der angewendeten Sequenzierungsmethode handelte es sich um eine Variation der Strangabbruch-Sequenzierung nach Sanger [218] bei der die Primer-Extension-Reaktion mittels einer thermostabilen Polymerase in einem zyklischen Verfahren erfolgt. Die vier, zum Strangabbruch führenden Didesoxynukleotide sind hierbei unterschiedlich Fluoreszenz-markiert und können so in einer gemeinsamen Reaktion verwendet werden.

Im Vorfeld der Sequenzierung wurden die Plasmide aus den Mini-Präparationen mit *NotI* linearisiert um die Sequenzier-PCR zu erleichtern. In dieser Arbeit wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mittels Kapillar-Elektrophorese über eine spezielle Polymer-Matrix aufgetrennt. Auftrennung und nachfolgende Analyse erfolgte im ABI 3730 DNA

Analyser, die Auswertung der erhaltenen Sequenzen wurde mit den Programmen Chromas lite und ApE vorgenommen.

Restriktionsverdau *NotI*:

2 µg Vektor  
 5 U *NotI*  
 2 µl 10x React 3-Puffer (Invitrogen)  
 ad 20 µl mit A.dest.  
 Verdau 1 h, bei 37°C

Sequenzier-PCR-Ansatz:

100 ng linearisierte Vektor-DNA  
 0,5 µl Sequenzier-Primer (10 pmol/µl)  
 1 µl 10x Reaktionspuffer  
 2 µl BigDye Terminator Enzym-Mix  
 ad 10 µl mit A.dest.

PCR-Programm:

1 min, 96°C	initiale Denaturierung	} 25 Zyklen
15 sec, 96°C	Denaturierung	
4 min, 60°C	Annealing & Elongation	

### 5.2.1.21 Maxi-Präparation von pmirGLO und pmirGLO/3'UTR-Konstrukten

Hierzu wurden 250 ml LB-Amp-Medium mit einer Einzelkolonie des gewünschten Transfektanden beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien bei 9.000 x g abzentrifugiert und die Präparation mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Maxi Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde ca. 10 min bei RT getrocknet und in 500 µl 1x TE gelöst.

### 5.2.2 In silico Methoden

Bioinformatische microRNA-Zielgenvorhersagen wurden mittels der integrativen DIANA miRGen Online-Datenbank für jede der ausgewählten microRNAs durchgeführt (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>). Dieses Webinterface vereinigt im UNION-Modus die Ergebnisse von 5 verschiedenen Vorhersage-Algorithmen (miRanda, Pictar 4-way, Pictar 5-way, TargetScan, DIANA-micro-T).

Die Filterung der vorhergesagten microRNA-Zielgene nach neuronal relevanten GeneOntology(GO)-Terms der Proteine und deren Zuordnung zu relevanten KEGG-Pathways erfolgte mittels DAVID-Datenbank (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [219].

Um die Positionen der individuellen microRNA-Bindungsstellen auf den 3'UTRs der ausgewählten potentiellen Ziel-mRNAs zu ermitteln, wurde die Vorhersage-Algorithmen PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar Vertebrate.cgi>) [68], TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) [220] und miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) [221] verwendet.

## 5.2.3 Zellbasierte Methoden

### 5.2.3.1 Kultivierung der Zelllinie HEK293T

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete adhärend wachsende, humane Zelllinie HEK293T wurde für die experimentellen Zielgenvalidierungen eingesetzt. Sie wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in 0,26 ml Kulturmedium/cm<sup>2</sup> Kulturfläche propagiert. Die Zellen sollten sich stets in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und wurden entsprechend der Versuchsplanung passagiert. Hierfür musste zunächst das alte Medium abgenommen und die Zellen durch Inkubation mit 0,03 ml 0,05% Trypsin/EDTA-Lösung /cm<sup>2</sup> Kulturfläche für ca. 2 min bei Raumtemperatur abgelöst werden. Nach erfolgter Zellablösung wurde das Trypsin durch Zugabe von FCS-haltigem Medium inaktiviert. Um verbliebene Zellverbände zu lösen wurde die Suspension kräftig durchmischt und anschließend anteilig in neue Flaschen mit vorgelegtem Kulturmedium überführt. Das überführte Volumen richtete sich nach der gewünschten Dichte der neuen Kultur.

#### Kulturmedium HEK293T:

500 ml	DMEM
10% (v/v)	FCS
2 mM	L-Glutamin
100 U/ ml	Penicillin
100 µg	Streptomycin

#### 1x Trypsin/EDTA-Lösung:

45 ml	PBS
5 ml	0,5% Trypsin/EDTA (Gibco)

### 5.2.3.2 Bestimmung der Lebend-Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer wofür die Zellen zunächst, wie unter Abschnitt 5.2.3.1 beschrieben, abgelöst werden mussten. Je 50 µl der Zellsuspension wurde dann mit 1 Volumen 0,2% (v/v) Trypanblau versetzt und in die Zählkammer pipettiert. Der membrandurchlässige Farbstoff Trypanblau färbte tote Zellen blau, während lebende Zellen hell erschienen.

Es wurden alle acht Großquadrate der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = n/Q \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Hierbei ist n die Anzahl der gezählten Zellen und Q die Anzahl der gezählten Großquadrate.

### 5.2.3.3 Lagerung von HEK293T

Da Zelllinien im Laufe der Kultur Mutationen akkumulieren, müssen Zellen frühzeitig für eine spätere Verwendung kryokonserviert werden. In dieser Form können die Linien bei  $-80^{\circ}\text{C}$  einige Monate bzw. mehrere Jahre in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

#### Kryo-Konservierung

Zunächst wurden die Zellen abgelöst und gezählt (Abschnitt 5.2.3.2), in einem 15 ml-Reaktionsgefäß 7 min bei  $500 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  sedimentiert, der Überstand verworfen und mit eisgekühlter Kryo-Lösung 1 die Zelldichte auf  $6 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je vorgekühltem Kryo-Röhrchen wurden  $500 \mu\text{l}$  der Zellsuspension aliquotiert, mit  $500 \mu\text{l}$  eisgekühlter Kryo-Lösung 2 vermischt und sofort nach  $-80^{\circ}\text{C}$  überführt. Die Lagerung erfolgte für 24-48 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , danach konnten die Zellen bei Bedarf in Stickstoff überführt werden.

#### Kryo-Lösung 1:

20% DMEM  
80% FCS

#### Kryo-Lösung 2:

80% DMEM  
20% DMSO

#### Auftauen kryokonservierter Zellen

Die Kryo-Röhrchen wurden zunächst im  $37^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad aufgetaut, der Inhalt des Röhrchens in ein 15 ml-Reaktionsgefäß mit 9 ml vorgewärmtem Kulturmedium überführt und vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei  $500 \times g$  und Raumtemperatur sedimentiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Die Zellen benötigten ca. 24 h um vollständig adhärent zu werden und konnten anschließend normal weiterkultiviert werden.

### 5.2.3.4 Experimentelle Zielgenvalidierungen in HEK293T-Zellen

Für die experimentellen Zielgenvalidierungen wurden HEK293T-Zellen mit dem Vektor pmirGLO bzw. den pmirGLO/3'UTR-Konstrukten, sowie mit den zu testenden microRNA-Mimics kotransfiziert. Hierfür wurden die inneren 24 Wells einer 48-Well-Platte mit je  $5 \times 10^4$  Zellen, in  $200 \mu\text{l}$  Aussaat-Medium bestückt, während die äußeren Wells mit je  $200 \mu\text{l}$  PBS befüllt wurden. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen nach folgendem Schema transfiziert: Je 48-Well wurden  $1 \mu\text{l}$  pmirGLO ( $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) bzw. pmirGLO/3'UTR ( $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$  oder equimolare Menge) wurden mit je  $0,5 \mu\text{l}$  microRNA-Mimic ( $5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ),  $0,5 \mu\text{l}$  n.t.siRNA oder  $0,25 \times$  siRNA-Puffer gemischt und anschließend mit Opti-MEM (Invitrogen) ad  $25 \mu\text{l}$  aufgefüllt. Parallel wurden  $0,5 \mu\text{l}$  Lipofectamine 2000 zu  $24,5 \mu\text{l}$  Opti-MEM je Well in einem separaten Reaktionsgefäß gegeben und beide Ansätze exakt 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden beide Ansätze vereinigt, gründlich durchmischt und für weitere 20 min bei

Raumtemperatur inkubiert um eine Komplexierung der Nukleinsäuren mit dem Lipid zu ermöglichen. Die resultierenden 50 µl Transfektionslösung konnten nun zu den Zellen gegeben werden. Alle Validierungen erfolgten in mindestens 2 biologischen mit je  $\geq 3$  technischen Replikaten.

5x siRNA-Puffer, 100 ml:

30 ml H<sub>2</sub>O (RNase-frei)  
 2,24 g KCl  
 0,72 g HEPES (freie Säure)  
 0,02 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
 2 ml KOH (2 M)  
 Ad 100 ml mit RNase-freiem Wasser,  
 pH 7,3-7,6, vor Gebrauch sterilfiltrieren

Aussaat-Medium HEK293T:

500 ml DMEM (4,5 g Glucose/L)  
 10% (v/v) FCS  
 2 mM L-Glutamin

Die Messungen für die Zielgenvalidierungen fanden 24 h nach Transfektion der HEK293T statt. Hierfür wurde das Medium vollständig abgenommen, die Zellen je 48-Well mit 200 µl 1x Passiv-Lysis-Puffer (Promega) für 20 min bei Raumtemperatur und unter Schwenken lysiert. Je Well wurden Firefly- und Renilla-Aktivitäten getrennt aus je 5 µl Gesamtlisat unter Zugabe von 100 µl Beetle- bzw. Renilla-Juice (P.J.K, Kleinblittersdorf) 10 sec lang am Luminometer gemessen. Die relative Firefly-Aktivität ergab sich aus dem Quotienten der absoluten Firefly- und Renilla-Meßwerte.

### 5.2.3.5 Kultivierung von USSC-Linien

Drei verschiedene USSC-Linien (SA 5/73, SA 5/03, SA 8/25) sind in dieser Arbeit verwendet und am Institut für Molekulare Neurobiologie, Universitätsklinik Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Hans-Werner Müller kultiviert und differenziert worden.

Die Kultivierung der USSC erfolgte wie für HEK293T-Zellen beschrieben, mit dem Unterschied, dass sie vor Trypsin-Zugabe ein Mal mit PBS/EDTA gespült wurden und 30% FBS im Wachstumsmedium benötigten. Nach dem Ablösen wurden die Zellen zusätzlich bei Raumtemperatur und 500 x g für 7 min pelletiert, anschließend resuspendiert. Alle eingesetzten Zellen befanden sich in Passage 5-10.

Kulturmedium USSC:

500ml DMEM (Lonza)  
 30% (v/v) FBS, hitzeinaktiviert  
 2 mM L-Glutamin (Gibco)  
 100 u/ml Penicillin (Gibco)  
 100 µg Streptomycin (Gibco)

### 5.2.3.6 Neuronale Differenzierung von USSC-Linien

Die neuronale Induktion der USSC Linien wurde mit Hilfe des XXL-Mediums wie in [2] beschrieben, durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/24-Well auf mit Poly-D-Lysin (1 mg/ml) und Laminin (13 µg/ml) beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Nach 24 h wurden die USSC 1x mit Kulturmedium gewaschen und anschließend mit 1ml XXL-Medium je Well induziert. Bis zum Endpunkt der Differenzierung wurde das XXL-Medium alle 2-3 Tage erneuert. Anhand von immunzytochemischen Färbungen der Marker Neurofilament und  $\beta$ -III-Tubulin wurde die Differenzierung am Endpunkt überprüft. Sowohl die Differenzierung als auch die Immunfärbungen wurden von Frau Marion Hendricks (Neurologische Klinik, Molekulare Neurobiologie, unter Leitung von Prof. Dr. H.W. Müller, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt.

#### XXL-Medium:

500ml	DMEM (Glutamax)
15%	FCS
100 U/ml	Penicillin/ Streptomycin
500 µM	IBMX
1000 µM	db-cAMP
50 ng/ml	$\beta$ -NGF
20 ng/ml	bFGF
10 µM	all- <i>trans</i> Retinsäure

### 5.2.3.7 Immunzytochemische Färbung von USSC

Die auf Deckgläschen wachsenden Zellen wurden zunächst für 15 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach 3 Waschungen mit PBS wurden die Zellen für mindestens 1 h mit 90 µl Blockinglösung je Deckgläschen (0,03% Triton-X100, 10% „normal goat serum“ (NGS) in PBS) bei RT permeabilisiert und blockiert. Nach weiteren 3 PBS-Waschungen wurde der primäre Antikörper entsprechend Tabelle 5.1 in PBS/0,1% Triton-X100/10% NGS verdünnt und 90 µl der Verdünnung je Deckgläschen über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte nach weiteren 3 PBS-Waschungen in der entsprechenden Verdünnung (in PBS, Tabelle 5.1) für mindestens 4 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurde erneut 3x mit PBS gewaschen und die Kernfärbung mit DAPI (1 mg/ml, 20-30 sec Inkubation bei Raumtemperatur) durchgeführt und ein letztes Mal mit PBS gewaschen. Zum Eindeckeln kam Fluoromount G (SouthernBiotec) zum Einsatz, die Aufbewahrung der Präparate erfolgte trocken und dunkel bei 4°C.

### 5.2.3.8 microRNA-Quantifizierung mittels TaqMan Megaplex Array

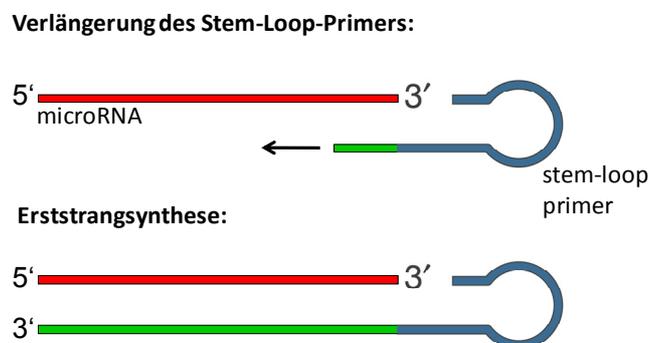
Zur Erstellung von microRNA-Profilen wurde in dieser Arbeit der human TaqMan microRNA Megaplex Array (Pool A + B) verwendet mit dem sich die Expression von 377 verschiedenen microRNAs plus Kontrollen (U6-RNA, RNU44, RNU48, negativ-Kontrolle) [222]. Dieser Assay gliederte sich in drei Schritte: zunächst erfolgte die reverse Transkription der microRNA-Population, diese wurde gefolgt von einer Pre-Amplifikation der gewonnenen cDNA und schließlich erfolgte die quantitative TaqMan Realtime-PCR im 384-Well-Format (Low Density Array).

#### Reverse Transkription

Zunächst wurden 10-30 ng kleiner mirVana-RNA-Fraktion (siehe Abschnitt 5.2.1.1) mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O auf 3 µl aufgefüllt, 4,5 µl RT-Mastermix zugegeben und das Gemisch ≥ 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die reverse Transkription in einem ABI 9700 Thermocycler vorgenommen.

<u>Reverse Transkriptions-Mastermix, 4,5 µl:</u>		<u>RT-Programm:</u>		
0,8 µl	Megaplex RT-Primers (10x, Pool A oder B)	2 min,	16°C	} 40 Zyklen
0,2 µl	dNTPs (100 mM)	1 min,	42°C	
0,8 µl	10x RT Puffer	1 sec,	50°C	
0,9 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)			
0,2 µl	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	5 min,	85°C	
1,5 µl	MultiScribe RT (50 U/ml)			
0,1 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)			

Die verwendeten Primer besitzen an ihrem 5'-Ende eine universelle Stem-loop-Struktur und binden an ihrem 3'-Ende spezifisch an die revers zu transkribierende microRNA um anschließend als Ausgangspunkt für die cDNA-Synthese zu dienen. Das Prinzip ist in Abbildung 5.3 schematisch dargestellt.



**Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der RT-Reaktion.** Der stem-loop-Primer (blau) bindet mit seinem microRNA-spezifischen Ende (grün) an die Ziel-microRNA (rot) und wird während der RT-Reaktion verlängert. Der universelle Teil des Primers bildet eine loop-Struktur. Modifiziert, nach Applied Biosystems.

## Pre-Amplifikation der cDNA

Um die Sensitivität der eigentlichen quantitativen Realtime-PCR zu steigern, wurde die cDNA aus der zuvor durchgeführten reversen Transkription zunächst pre-amplifiziert. Dabei kamen microRNA-spezifische *Forward*-Primer, sowie universelle *Reverse*-Primer zum Einsatz. Das Prinzip ist in Abbildung 5.4 gezeigt.

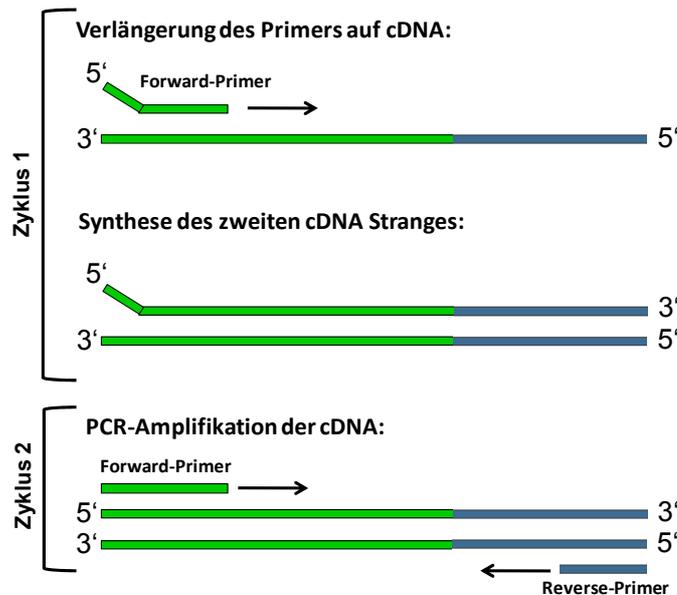


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der ersten beiden Amplifikations-Zyklen in der Pre-Amplifikation. Zunächst wird die cDNA mittels microRNA-spezifischer *Forward*-Primer (grün) amplifiziert. Im zweiten Zyklus kann dann der universelle *Reverse*-Primer (blau) an das 3'-Ende des amplifizierten Erst-Stranges binden und ebenfalls verlängert werden. Modifiziert, nach Applied Biosystems.

Für die Pre-Amplifikation wurden 2,5 µl der RT-Reaktion mit 22,5 µl PreAmp-Mastermix vermischt, für ≥ 5 min auf Eis inkubiert und die Amplifikation am ABI 9700 Thermocycler durchgeführt.

### PreAmp-Mastermix, 22,5 µl:

2,5 µl	Megaplex PreAmp-Primer (10x, Pool A oder B)
12,5 µl	PreAmp Mastermix (2x)
7,5 µl	Nukelase-freies H <sub>2</sub> O

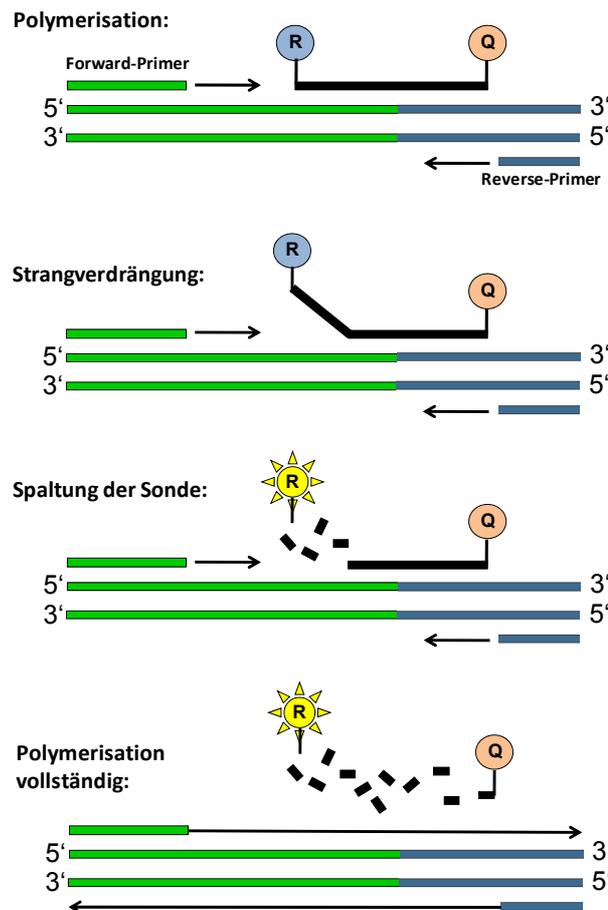
### PCR-Programm:

10 min, 95°C	} 12 Zyklen
2 min, 55°C	
2 min, 72°C	
15 sec, 95°C	
4 min, 60°C	

## Quantitative Realtime-PCR-Reaktion

In der quantitativen Realtime-PCR wurden die gleichen Primer verwendet wie für die Pre-Amplifikation. Zusammen mit den TaqMan-Sonden waren sie innerhalb der Reaktions-Reservoirs des Low Density Arrays im lyophilisierten Zustand vorgelegt. Die TaqMan-

Sonden besitzen am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter und am 3'-Ende einen Quencher. Die Sonden sind für jede einzelne microRNA so ausgewählt, dass sie mit einem Bereich den spezifischen microRNA-Teil des Amplifikates, sowie mit dem anderen Bereich den universellen Primer-Teil hybridisieren. Bei der Elongation wird die TaqMan-Sonde vom 5'-Ende aus exonukleolytisch von der verwendeten Polymerase abgebaut, wodurch sich der Reporter räumlich vom Quencher entfernt und aufleuchtet (siehe Abbildung 5.5). Dieses Signal wird registriert und nimmt in seiner Intensität proportional zum amplifizierten PCR-Produkt zu.



**Abbildung 5.5: Fluoreszenz-Nachweis der microRNA-Amplifikation mittels TaqMan-Sonde.** Während der Strangsynthese wird die TaqMan-Sonde von der Polymerase exonukleolytisch abgebaut, der Reporter dadurch räumlich vom Quencher getrennt, wodurch er aufleuchten kann. Abbildung modifiziert, nach Applied Biosystems.

Das Pre-Amplifikat aus dem vorherigen Schritt wurde zunächst 1:4 mit 0,1x TE (pH 8,0) verdünnt und in die eigentliche Realtime-PCR-Reaktion eingesetzt. Nach Herstellerangaben wurde der qPCR-Mastermix in den Low Density Array appliziert und in die Reaktions-Reservoirs hineinzentrifugiert. Die Belegung des Arrays und das PCR-Programm wurden

von der mitgelieferten CD in die SDS2.3-Software geladen und die PCR-Reaktion am ABI Prism 7900 HT durchgeführt.

Realtime-PCR-Mastermix, 900 µl:

450 µl	TaqMan Universal PCR Mastermix (2x)
9 µl	verdünntes PreAmp-Produkt
441 µl	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O

### Auswertung der Rohdaten

Die gewonnenen Rohdaten wurden mittels SDS2.3 Software in Ct-Werte umgerechnet. Hierfür wurde die automatische Baseline-Berechnung des Programms verwendet und der Threshold, wie vom Hersteller empfohlen, für alle Proben auf 0,2 gesetzt. Die resultierenden Cts wurden über den Mittelwert der U6-RNA-Cts normalisiert ( $dCt = Ct_{\text{microRNA}} - Ct_{U6}$ ). Die Expressionsveränderung wird mittels ddCT angegeben ( $ddCt = dCt_{\text{XXL-USSC}} - dCt_{\text{nativ}}$ ), der Faktor der Expressionsveränderung berechnet sich mittels  $2^{-ddCt}$ .

#### 5.2.3.9 MicroRNA-vermittelte Translationsrepression im zeitlichen Verlauf

Um die Effekte endogener USSC-microRNAs unter XXL-Behandlung auf die potentiellen Zielgene testen zu können, wurden die Linie SA5/03 in p8-9 zunächst in 500µl Aussaatmedium wie unter 5.2.3.6 beschrieben ausplattiert. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen nach folgendem Schema transfiziert: Je 1 µl pmirGLO bzw. pmirGLO/3'UTR (200 ng/µl bzw eine equimolare Menge pmirGLO/3'UTR) wurden je 24-Well mit Opti-MEM auf 50 µl aufgefüllt. Parallel wurden 1 µl Lipofectamine 2000 zu 49 µl Opti-MEM je Well in einem separaten Reaktionsgefäß gegeben und beide Ansätze exakt 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden beide Ansätze vereinigt, gründlich durchmischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die resultierenden 100 µl Transfektionslösung zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h wurde die neuronale Differenzierung für 5 Tage wie unter 5.2.3.6 beschrieben durch Zugabe von XXL-Medium induziert.

Die Messung der Luciferase-Aktivitäten erfolgte an zwei Zeitpunkten: (i) 24 h nach Transfektion (d0) und (ii) 5 Tage nach XXL-Induktion (d5). An d0 wurden die Zellen mit 100 µl 1x Passiv-Lysis-Puffer bei Raumtemperatur je Well lysiert und am zweiten Zeitpunkt (d5) wurden wegen der geringeren Zelldichte je 4 Wells pro Transfektionsbedingung sequentiell mit 100 µl Gesamtvolumen für je 10 min, bei 4°C lysiert. Für die Firefly- und Renilla-Messungen wurden je 20 µl Lysat und 100 µl Beatle- bzw. Renilla-Juice verwendet und für 10 sec am Luminometer gemessen. Es wurden jeweils 4 biologische, mit 3-4 technischen Replikaten je pmirGLO und pmirGLO/3'UTR-Konstrukt gemessen und ausgewertet.

### 5.2.3.10 Neurogenesis and Neural Stem Cell Array

Um den funktionalen Einfluss von microRNAs auf die neuronale Differenzierung von USSC zu untersuchen, wurden die 10 bereits aus den Validierungen (Abschnitt 5.2.3.4) bekannten microRNAs während der XXL-induzierten Differenzierung der Linie SA5/03 überexprimiert. Die Effekte der Überexpression wurden immunzytochemisch dokumentiert, sowie mittels qPCR-basierter Neurogenesis and Neural Stem Cell Arrays analysiert.

#### Transiente Überexpression von microRNAs mittels microRNA-Mimics in XXL-USSC

Zunächst wurden  $1,5 \times 10^4$  Zellen je 24-Well auf Laminin-beschichteten Deckgläschen (25-35 je Bedingung) in USSC-Kulturmedium (siehe Abschnitt 5.2.3.5) ausplattiert und nach 24 h die Transfektion vorgenommen. Ein experimenteller Ansatz umfasste jeweils fünf verschiedene Bedingungen: **A**) untransfizierte Zellen, **B**) mit n.t.siRNA (negativ Kontrolle) transfizierte, **C**) mit 10 verschiedenen microRNA-Mimics transfizierte (10er-batch, enthaltend miR-17, -18a, -19a, -20a,-106b, -130a, -137, -138, -218,-335), **D**) mit 7 verschiedenen microRNA-Mimics transfizierte (7er-batch, enthaltend miR-18a, -19a, -130a, -137, -138, -218, -335) und **E**) mit 3 verschiedenen microRNA-Mimics transfizierte Zellen (3er-batch, miR-17, -20a, -106b).

Je 24-Well der Bedingungen **C-E** wurde 1 pmol pro eingesetzter microRNA-Mimic und batch (equimolare microRNA-Mimic-Mengen für jeden batch, also 3-10 pmol pro Bedingung) auf 50 µl mit DMEM aufgefüllt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Für die Bedingung **B** wurden insgesamt 10 pmol n.t.siRNA je 24-Well eingesetzt, auch auf 50 µl mit DMEM aufgefüllt und 5 min bei RT inkubiert. Parallel dazu wurde je 24-Well 1 µl Dharmafect 1 (Dharmacon) mit 49 µl DMEM gemischt und ebenfalls 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die microRNA-Mimic- und Dharmafect 1-Gemische 1:1 vereinigt, sorgfältig durchmischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Die vereinigten Ansätze wurden nun mit 400 µl USSC-Transfektionsmedium aufgefüllt, das Kulturmedium von den Zellen sorgfältig abgesaugt und die Transfektionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 500 µl zu den Zellen gegeben. Zum Zeitpunkt der Transfektion wurde bei den Zellen der Bedingung **A** lediglich das Kulturmedium durch USSC-Transfektionsmedium ersetzt.

Nach weiteren 24 h wurde das Transfektions-Medium durch XXL-Medium (siehe Abschnitt 5.2.3.6) ersetzt und die Zellen für 5-7 Tage andifferenziert.

#### USSC-Transfektionsmedium:

500ml DMEM (Lonza)  
15% (v/v) FBS, hitzeinaktiviert  
2 mM L-Glutamin (Gibco)

## Immunzytochemische Färbung

Nach 5-7 Tagen XXL-Induktion wurden je Bedingung **A-E** 3 Deckgläschen für die immunzytochemische Färbung entnommen. Die Zellen wurden entsprechend Abschnitt 5.2.3.7 mit Anti-Actin-Antikörpern (siehe Tabelle 5.1) und DAPI gefärbt, fluoreszenzmikroskopisch analysiert und dokumentiert.

## Neurogenesis and Neural Stem Cell Array

Um den funktionalen Einfluss der überexprimierten microRNA-Mimics auf die XXL-Differenzierung der USSC auf Transkriptebeine überprüfen zu können, wurde der Neurogenesis and Neural Stem Cell Array verwendet. Hierbei handelt es sich um einen qPCR-basierten Array im 96-Well-Format, bei dem die Primer-Paare für 84 neuronal-relevante, sowie 5 house-keeping Gene und weitere interne Kontrollen bereits Herstellerseitig in den Wells vorgelegt sind.

Wie in Abschnitt 5.2.1.2 beschrieben, wurde aus den Zellen der Bedingungen **A-E** mit Hilfe des RNeasy Mini Kit total-RNA isoliert und für den Array verwendet. Zunächst wurden zur Entfernung möglicher genomischer DNA (gDNA) Verunreinigungen 700-900 ng total-RNA mit 2 µl 5x gDNA Elimination Buffer vermischt und ad 10 µl mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O aufgefüllt, für 5 min bei 42°C inkubiert und sofort für ≥ 1 min auf Eis gestellt. Zu den 10 µl gDNA-Elimination-Mix wurden 10 µl reverse Transkription-Mastermix gegeben, gemischt und exakt für 15 min bei 42°C inkubiert, anschließend wurde die Reaktion sofort für 5 min bei 95°C gestoppt.

### Reverse Transkription-Mastermix, 10 µl:

4 µl	BC3 (5x RT Buffer)
1 µl	P2 (Primer & External Control Mix)
2 µl	RE3 (RT Enzyme Mix 3)
3 µl	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O

Die so erhaltene cDNA wurde mit 91 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt und 102 µl davon in die qPCR eingesetzt. Der angesetzte Mastermix enthielt einen Überschuss und wurde in 25 µl-Aliquots in die mit Primern vorbelegten Wells der 96-Well-Platte appliziert. Die Realtime-PCR erfolgte im ABI Prism 7900HT.

### qPCR-Mastermix, 2550 µl:

1275 µl	2x SABiosciences RT <sup>2</sup> qPCR Master Mix
102 µl	verdünnte cDNA
1173 µl	Nukelase-freies H <sub>2</sub> O

### PCR-Programm:

10 min, 95°C	} 40 Zyklen
15 sec, 95°C	
1 min, 60°C	
20 min, Schmelzkurvenanalyse	

### **Auswertung der Rohdaten**

Die gewonnenen Rohdaten wurden mittels SDS2.3 Software in Ct-Werte umgerechnet. Hierfür wurde die Baseline manuell nach Herstellerangaben gesetzt, der Threshold wurde für alle Proben auf 0,24 festgesetzt. Die resultierenden Cts wurden weiterhin über die Web-basierte RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Software Version 3.4 von SABiosciences (siehe Abschnitt 5.1.13) über den Mittelwert der Cts von fünf house-keeping-Genen normalisiert ( $dCt = Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{MW house-keeping Gene}}$ ) und analysiert. Die Expressionsveränderung wird mittels ddCT angegeben ( $ddCt = dCt_{\text{XXL-USSC}} - dCt_{\text{nativ}}$ ), der Faktor der Expressionsveränderung berechnet sich mittels  $2^{-(ddCt)}$ .

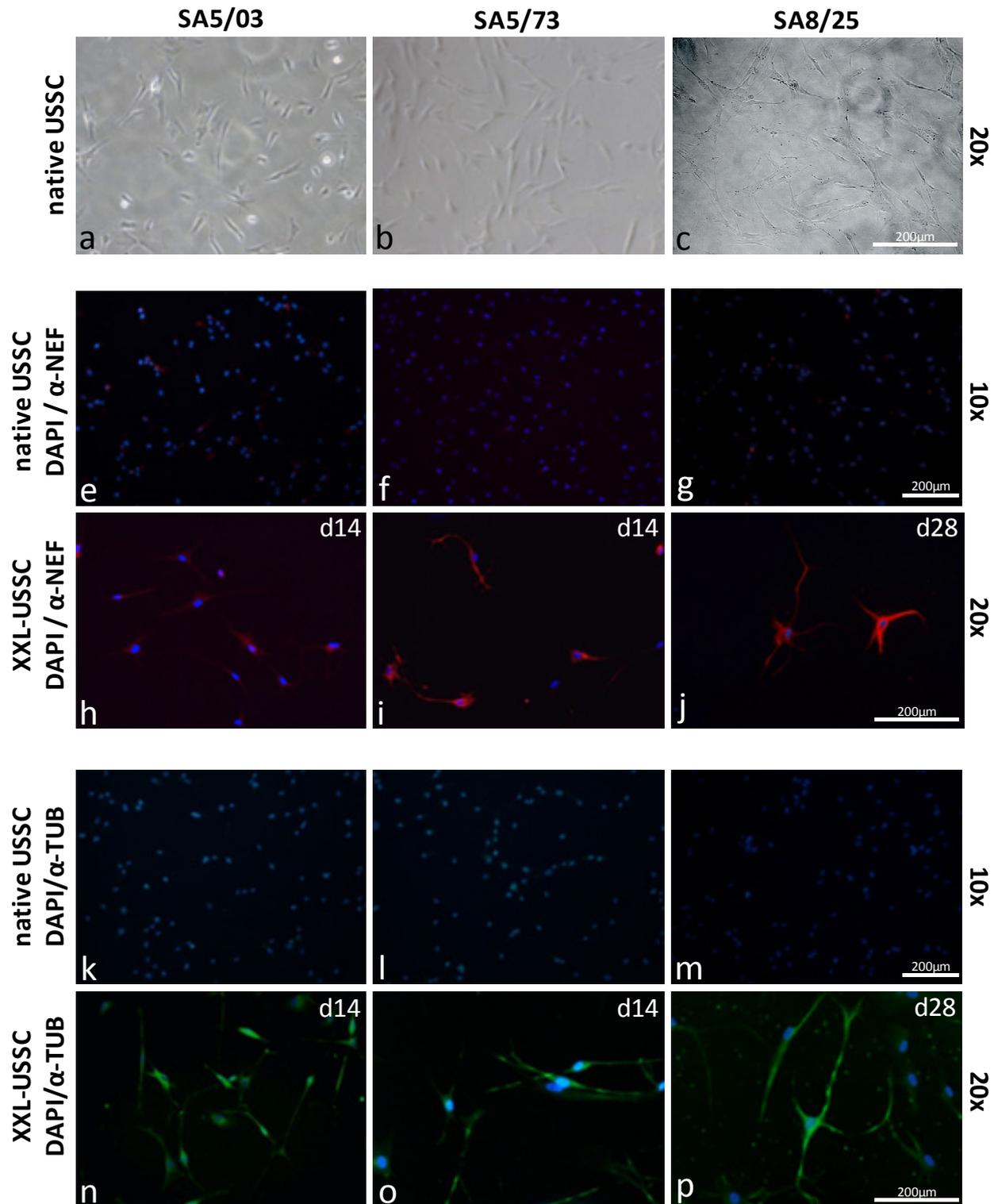
## 6 Ergebnisse

In vielen Studien konnten für microRNAs bereits entscheidende Funktionen in diversen zellulären Prozessen wie Zellzyklus, Apoptose, Differenzierung und Onkogenese nachgewiesen werden. Da einzelne microRNAs gleichzeitig potentiell Einfluss auf verschiedene Proteine nehmen können und Proteine ihrerseits von mehreren verschiedenen microRNAs parallel reguliert werden können, ist es ein naheliegender Gedanke, microRNAs als komplexes Netzwerk zur Proteinexpressionsregulation zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit sollte der funktionale Einfluss von microRNAs auf die XXL-vermittelte neuronale Differenzierung von USSC [2] als Modellsystem untersucht werden. Für die Klärung dieser Fragestellung wurden drei verschiedene USSC-Linien, die je unabhängigen Spendern entstammten, eingesetzt. Zunächst musste ein Überblick über die exprimierten microRNA-Populationen geschaffen und eine Abgrenzung relevanter microRNA-Kandidaten vorgenommen werden. Im zweiten Schritt galt es über bioinformatische Zielgenvorhersagen und *in silico*-Analysen die biologische Relevanz der Kandidaten-microRNAs für die neuronale Differenzierung von USSC herzustellen und vielversprechende Interaktionspartner auf Seiten der microRNAs und Proteine zu ermitteln. Um diese Interaktionen zu validieren, wurden funktionale Assays etabliert mit deren Hilfe es möglich war den Einfluss sowohl einzelner als auch parallel mehrerer microRNAs auf ihre Zielproteine zu untersuchen.

### 6.1 Vergleichende microRNA-Profil-Analytik

#### 6.1.1 XXL-Differenzierung von USSC-Linien

In der vorliegenden Arbeit wurden die USSC-Linien SA5/03, SA5/73 und SA8/25 jeweils nativ und unter XXL-Konditionen differenziert, verwendet. Die XXL-induzierte Differenzierung von USSC ist zunächst mit einem abrupten Proliferationsstopp und anschließend mit einer starken Apoptose der Zellen verbunden; am stärksten war hiervon die Linie SA5/73 betroffen. Dies hatte zur Konsequenz, dass die Differenzierung bei Verwendung handhabbarer Ansätze längstens auf 14 Tage ausgedehnt werden konnte, weil zu späteren Zeitpunkten nicht mehr genügend Zellen zur Analyse vorhanden waren. Eine Ausnahme hiervon bildete die Linie SA8/25, deren schwächere Apoptoseneigung eine Differenzierung über 28 Tage hinweg erlaubte. Die Differenzierungen und ihre Analysen wurden von Marion Hendricks im Labor für Molekulare Neurobiologie (Universitätsklinikum Düsseldorf) unter der Leitung von Prof. Dr. H.W. Müller durchgeführt und die zellulären Materialien für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die drei Zelllinien wurden wie in Material und Methoden (Abschnitt 5.2.3.6) beschrieben ausgesät und differenziert.



**Abbildung 6.1: Neuronale Differenzierung der USSC Linien SA5/03 (linke Spalte), SA5/73 (mittlere Spalte) und SA8/25 (rechte Spalte) mittels XXL-Induktion.** Zeile eins: lichtmikroskopische Aufnahmen nativer USSC SA5/03 (a), SA5/73 (b), SA8/25 (c). Zeilen zwei und drei: Expression von NEF in nativen (e-g) und XXL-differenzierten USSC (h-j) der oben genannten Linien. Zeilen vier und fünf: Expression von TUB in nativen (k-m) und XXL-differenzierten USSC (n-p) der drei Linien. Die XXL-USSC zeigen an Tag 14 bzw. 28 eine deutliche neuronale Morphologie mit kompakten Zellkörpern und langen Ausläufern, sowie eine deutlich erhöhte NEF- und TUB-Expression. Rechts außen ist die Vergrößerung der Aufnahmen in der jeweiligen Zeile angegeben, sowie die zugehörigen Größenmaßstäbe.

Die Linie SA5/03 wurde in zwei technischen Replikaten (genannt SA5/03 (a) und (b)) differenziert; als weitere biologische Differenzierungsreplikate kamen je ein Ansatz der Linien SA5/73 und SA8/25 hinzu. Die Differenzierungen wurden nach folgenden Kriterien hin analysiert: (i) Zellmorphologie nach XXL-Induktion, (ii) Immunfluoreszenzanalyse der neuronalen Marker Neurofilament (NEF, alle drei Ketten) sowie  $\beta$ -III-Tubulin (TUB). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.1 dokumentiert. Alle differenzierten Zellen zeigten im Gegensatz zu den nativen Zellen eine deutliche neuronale Morphologie mit kompakten Zellkörpern und ausgeprägten Ausläufern. Weiterhin zeigte sich, dass native USSC nur marginale Mengen NEF exprimieren, wohingegen XXL-USSC einen deutlichen Anstieg der NEF-Expression an den Tagen 14 bzw. 28 (SA8/25) zeigten.

### **6.1.2 Vergleichende microRNA-Expressionsanalysen**

Zur Messung der microRNA-Expressionsprofile wurde der ABI Megaplex TaqMan-Assay Pool A eingesetzt, welcher auf einer microRNA-spezifischen qPCR-Reaktion basiert (siehe Abschnitt 5.2.3.8). Mit ihm können die 377 meistexprimierten microRNAs in ihrer Expression erfasst werden (Pool A), seltener microRNAs und Gegenstrang-microRNAs (miR\*) sind im Assay Pool B zu finden. Für die Analyse wurden für die Linien SA5/03 und SA5/73 je an zwei, für die Linie SA8/25 an drei Zeitpunkten mittels mirVana-Kit (Ambion) RNAs isoliert und in große (>200 Basen) und kleine (<200 Basen) Fraktion aufgetrennt. Der erste Zeitpunkt, als d0 definiert, lag 24 h nach Aussaat der USSC und unmittelbar vor der XXL-Induktion der Zellen; weitere Zeitpunkte waren 14 Tage (d14 XXL) bzw. 28 Tage nach XXL-Induktion (d28 XXL). Die kleinen RNA-Fractionen wurde vor der weiteren Verwendung gelelektrophoretisch (PAGE) aufgetrennt, anschließend mittels Silberfärbung sichtbar gemacht und so auf ihre Integrität hin überprüft. In Abbildung 6.2 sind RNA-Proben aller drei Linien zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Es fiel auf, dass mit fortschreitendem Differenzierungsgrad der unspezifische Hintergrund der RNAs zunahm. Während an d0 mehrere distinkte Banden gut zu erkennen waren, zeichneten sich diese nach 14 Tagen weniger deutlich ab. Bei der Linie SA8/25 zeigte sich dieser Hintergrund zwar auch an d14 XXL, deutlicher jedoch an d28 XXL.

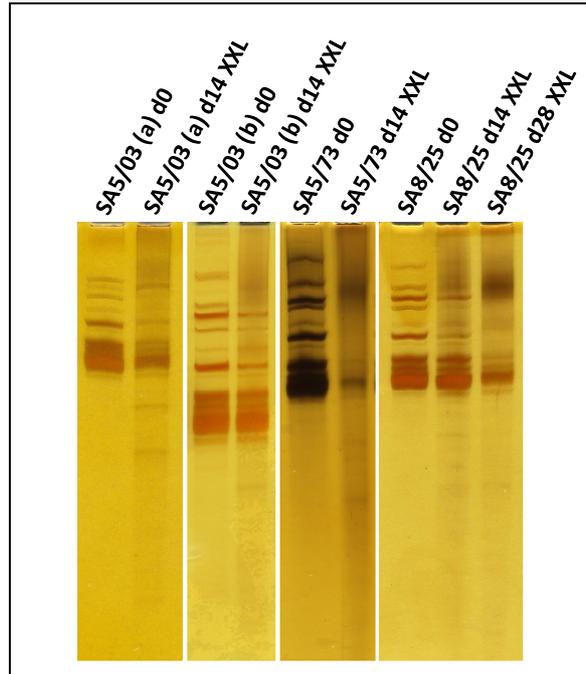


Abbildung 6.2: Silberfärbungen von je 20 ng kleiner RNA-Fraktion nach Aufreinigung mittels mirVana-Kit und Auftrennung über ein 15%iges PAA-Gel. Dargestellt sind Präparationen der Linien SA5/03 (Differenzierungen a und b) und SA5/73 an d0 und d14 XXL, sowie SA8/25 an d0, d14 XXL und d28 XXL.

Zur folgenden microRNA-Expressionsanalyse wurden wie bereits im Material und Methoden-Teil beschrieben, 30ng kleine RNA-Fraktion je Probe mittels spezifischer Stem-Loop-Primer in cDNA umgeschrieben, über 12 Zyklen pre-amplifiziert und letztlich in die quantitative real-time PCR des Megaplex-Assays eingesetzt. Die Rohdaten wurden mit Hilfe der Software SDS2.3 ausgewertet und die Cyclethreshold-(Ct)-Werte der einzelnen microRNAs ermittelt.

Als Normalisatoren auf RNA-Menge und -Qualität wurden im verwendeten Assay der Firma ABI U6-RNA (spliceosomale snRNA [223]), sowie RNU44 und RNU48 (snoRNAs [224]) verwendet. U6 war dabei mit vier Messpunkten vorgegeben, RNU44 und 48 wurden in je nur einem technischen Replikate gemessen. Abbildung 6.3 zeigt die Ct-Werte der Normalisatoren in allen durchgeführten Analysen. Dabei zeigte sich, dass der Normalisator U6 nur geringen Schwankungen (<1Ct) unterlag und somit die qualitativ schwächeren RNAs der differenzierten USSC (Abbildung 6.2) dennoch einwandfreie PCR-Ergebnisse im Assay ergaben. Es wurde daher U6 als Normalisator herangezogen und durch Subtraktion  $Ct_{\text{microRNA}} - Ct_{\text{U6}}$  die dCt-Werte gebildet.

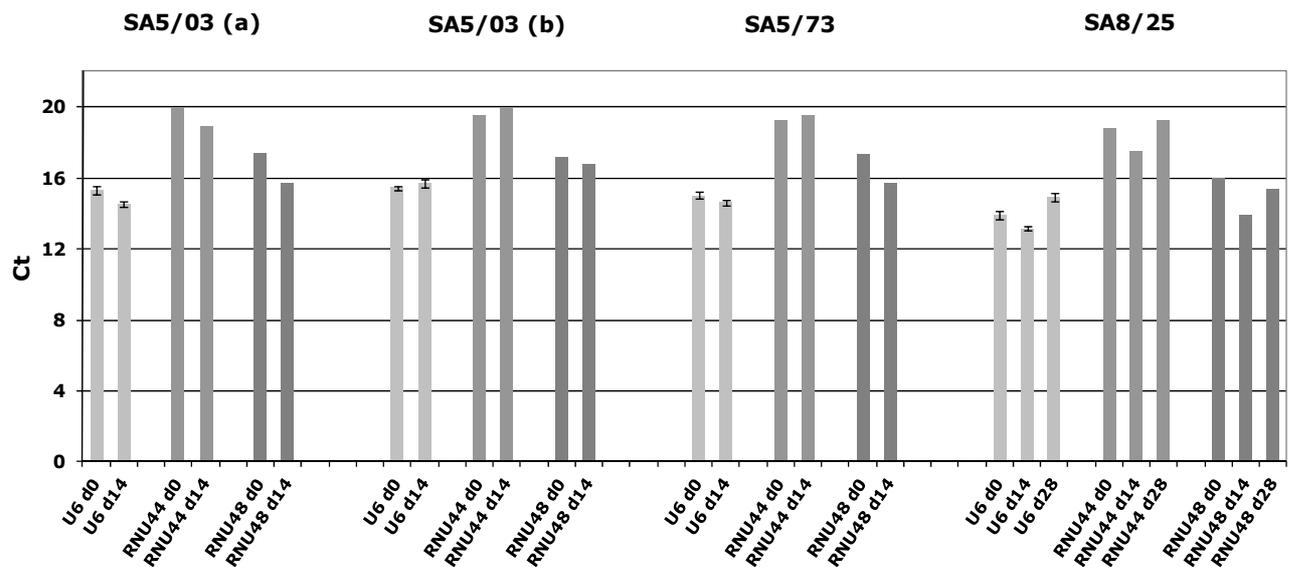


Abbildung 6.3: Vergleich der Expression verschiedener Kontroll-RNAs zwischen den Linien und innerhalb einzelner Differenzierungen. Die U6-RNA-Expression wird im TaqMan-Megaplex Assay in 4 technischen Replikaten bestimmt, während die RNU44 und 48 im Assay je nur als Einzelmessungen verfügbar sind. Die Angabe der Standardabweichung ist deshalb nur für die U6-RNA möglich.

Um die PCR-basierten Messergebnisse des TaqMan-Assays punktuell zu verifizieren, wurde nun der Expressionsverlauf der microRNAs miR-16, -24 und -222 mittels LNA/EDC-Northernblot analysiert. Als Sonden kamen hierbei  $^{32}\text{P}$ -markierte LNA-Oligonukleotide zum Einsatz. Die radioaktiven Hybridisationssignale wurden im Phospho-Imager eingescannt und quantifiziert. Abbildung 6.4 vergleicht die Messverfahren Northernblot und TaqMan-Assay anhand des Expressionsverlaufes der drei oben genannten microRNAs. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse beider Verfahren sehr gut übereinstimmten.

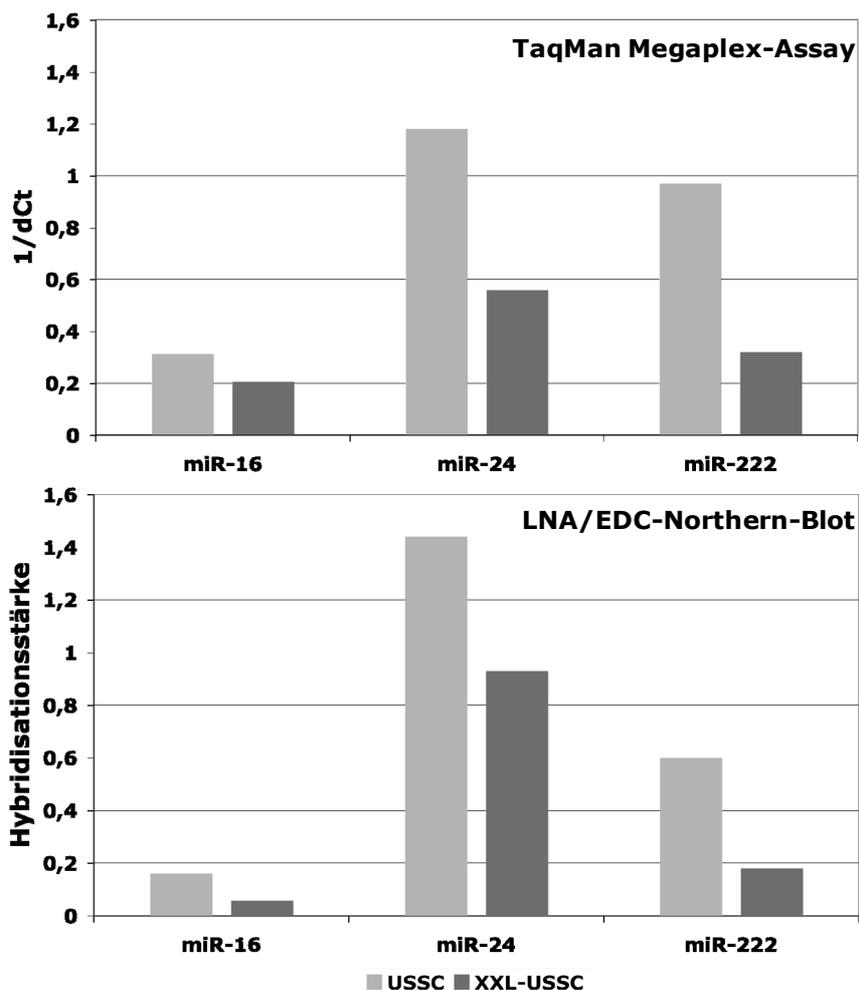


Abbildung 6.4: Verifizierung der TaqMan Megaplex Expressionsdaten mittels LNA/EDC-Northernblot. Das obere Diagramm zeigt die im TaqMan-Megaplex gemessenen Expressionen (1/dCt) der microRNAs miR-16, -24 und -222 in USSC (hellgrau) und XXL-USSC (dunkelgrau) der Linie SA5/03. Im unteren Diagramm ist die Expression derselben microRNAs (aus dem identischen Probenmaterial wie für den TaqMan-Assay verwendet), mittels LNA/EDC-Northernblot gezeigt.

Gemäß den Vorgaben von ABI und eigenen, im Vorfeld gewonnenen Erfahrungswerten hinsichtlich Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurden alle microRNAs mit einem Ct <31 als exprimiert betrachtet.

Zusammengefasst stellte sich die microRNA-Expression wie folgt dar:

SA5/03 (a) nativ: <b>185</b> microRNAs	SA5/03 (a) d14 XXL: <b>171</b> microRNAs
SA5/03 (b) nativ: <b>178</b> microRNAs	SA5/03 (b) d14 XXL: <b>160</b> microRNAs
SA5/73 nativ: <b>185</b> microRNAs	SA5/73 d14 XXL: <b>180</b> microRNAs
SA8/25 nativ: <b>185</b> microRNAs	SA8/25 d14 XXL: <b>199</b> microRNAs
	SA8/25 d28 XXL: <b>154</b> microRNAs

In XXL-USSC geht die Zahl exprimierter microRNAs zurück. Das Verhalten der Linie SA8/25 impliziert, dass die längere Differenzierungsdauer (28 Tage) gegenüber den anderen Linien (je 14 Tage) mit einer langsameren Differenzierung einhergeht, da an Tag 14 keine Reduktion der Anzahl exprimierter microRNAs zu erkennen war, sondern im Gegenteil sogar ein leichter Anstieg verzeichnet werden konnte (vollständige Expressionsprofile siehe Anhang, Tabelle 8.1 und Tabelle 8.2).

Als differentiell exprimiert wurden microRNAs bewertet, die in einem genügenden Abstand zum Rauschhintergrund lagen ( $<Ct$  30) und mindestens um den Faktor zwei ( $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ) verändert vorgefunden wurden. Bei einem Vergleich der Profile stellte sich heraus, dass in allen untersuchten Zelllinien keine der exprimierten microRNAs in den jeweils differenzierten Zellen hochreguliert wurde. Vielmehr beschränkte sich die differentielle Expression von microRNAs ausschließlich auf die Herunterregulation. In allen verwendeten Linien und Differenzierungsansätzen konnte ein gemeinsames Set von 18 microRNAs identifiziert werden, welches nach 14 Tagen XXL-Behandlung herunterreguliert vorlag. Bei der Linie SA8/25 wurde nach 14 Tagen eine im Vergleich zu den Linien SA5/03 und SA5/73 schwächere Herunterregulation dieses Sets beobachtet, dafür war diese an Tag 28 teilweise deutlich stärker als bei den anderen Linien an Tag 14. In Abbildung 6.5 sind die Expressionsstärken der 18 microRNAs an den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt, sowie der Faktor um den sie reguliert wurden. Unter den am stärksten herunterregulierten microRNAs fanden sich miR-138, -335, -18a, -20a, -431, -22 und -130a.

Bemerkenswerterweise konnte keine Expression der neuronal-spezifischen miR-9 und miR-124 [83,84] gemessen werden, die im Gehirn hochexprimierte miR-138 [225] gehörte sogar zu den am stärksten herunterregulierten microRNAs. Die in humanen embryonalen Stammzellen hochexprimierten microRNAs miR-302a und miR-302c konnten ebenfalls nicht detektiert werden. Die ebenfalls Stammzell-spezifische miR-302b konnte in sehr geringen Mengen in nativen USSC der Linien SA5/73 ( $Ct$  29,0) und SA8/25 ( $Ct$  30,3) detektiert werden.

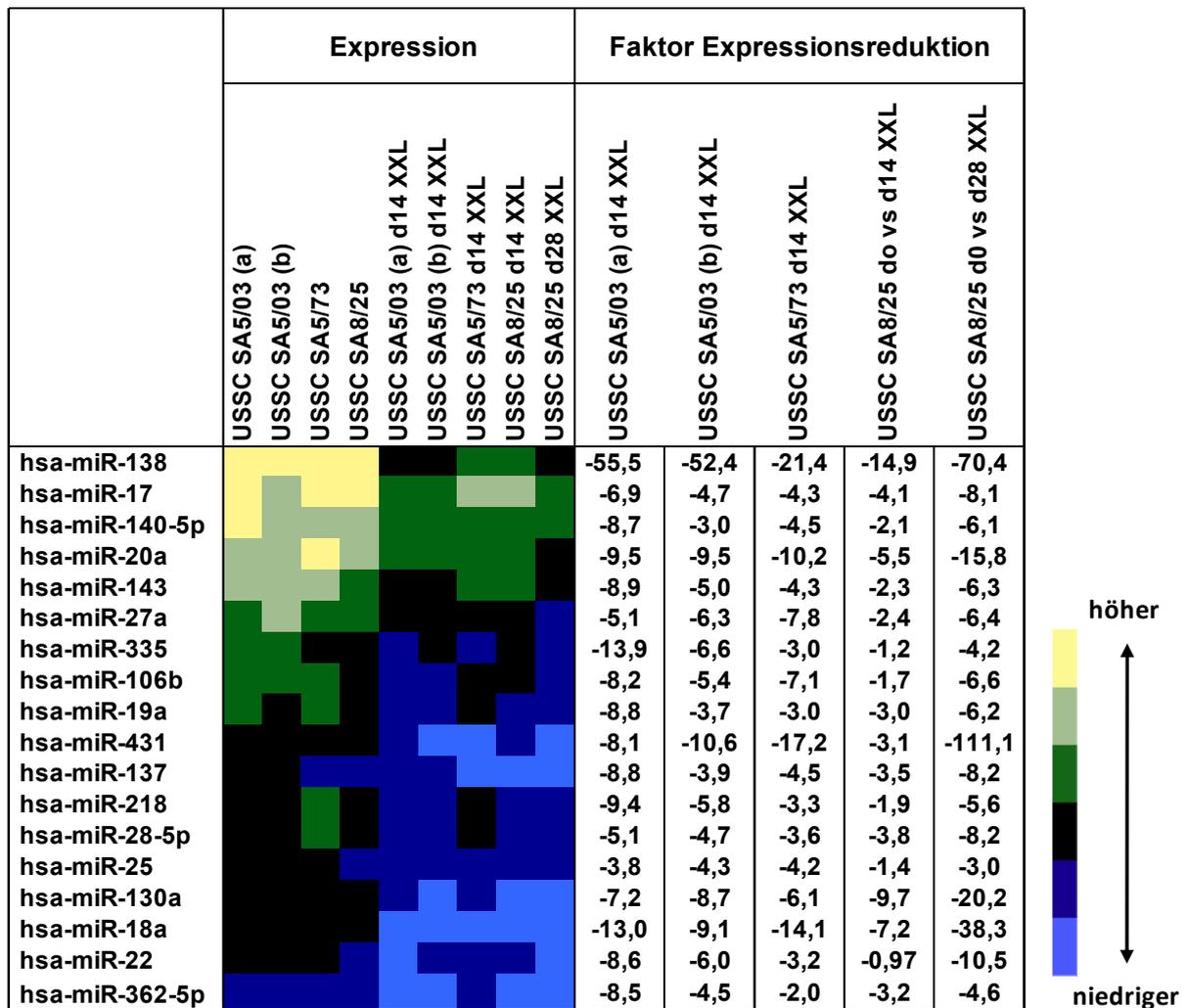


Abbildung 6.5: Differentielle Expression von microRNAs während der XXL-Differenzierung der USSC-Linien SA5/03, SA5/73 und SA8/25. Die Heatmap zeigt die Expression von 18 microRNAs der genannten Linien, die mit Hilfe von quantitativer Real-time PCR erhoben wurden, sowie den Faktor ihrer Reduktion während der Differenzierung. Verglichen werden jeweils die drei Linien an Tag 14 der XXL-Induktion (bzw. zusätzlich an Tag 28 bei SA8/25) mit dem jeweiligen nativen USSC-Linien.

Abundant und auf hohem Niveau exprimiert waren in nativen wie auch in XXL-USSC die miR-125b, die für Neuriten-Auswuchs eine Rolle spielt [226], sowie miR-145, die als Differenzierungs-spezifische microRNA gilt, da sie die Pluripotenz-Faktoren Oct4, Sox2 und KLF4 reprimiert (siehe Einleitung Kapitel 4.3.1, Seite 19).

## 6.2 Zielgenvorhersagen für die 18 herunterregulierten microRNAs

Nachdem durch die Expressionsprofilvergleiche während der neuronalen Differenzierung eine Gruppe von 18 microRNAs als Kandidaten für funktionale Relevanz abgegrenzt werden konnte, musste nun der Bezug zu ihrer biologischen Funktion geschaffen werden. Da alle in die Analyse einbezogenen microRNAs im Zuge der XXL-Behandlung reprimiert wurden, können im Gegenzug die von ihnen erfassten Proteine hochreguliert werden, um

gegebenenfalls eine Funktion im Zuge der neuronalen Differenzierung wahrzunehmen. Da letztlich Proteine die Zielmoleküle einer microRNA-vermittelten regulatorischen Aktivität darstellen, ist eine Identifikation der Zielgene für die Gruppe von 18 herunter regulierten microRNAs für das Verständnis der biologischen Funktion dieser microRNAs unerlässlich. Ein erster Schritt in diese Richtung liegt in der Anwendung bioinformatischer Algorithmen, welche mittels der Analyse spezifischer Basenpaarungen unter besonderer Gewichtung der Seed-Sequenz, zwischen microRNAs und 3'UTRs relevanter Proteine in der Lage sind, mit einer gewissen Sicherheit Zielgene für bestimmte microRNAs vorherzusagen. Viele dieser Algorithmen sind mittlerweile Internet-basiert, und das Internet-Portal mirGen fasst einige der wichtigsten Algorithmen (DIANA-microT, PicTar, TargetScan und miRanda) zusammen. Im UNION-Modus zeigte dieses Portal alle von den vorgenannten Algorithmen vorhergesagten Zielgene für eine bestimmte microRNA an. Dieser Modus wurde verwendet um potentielle Zielgene für die Gruppe von 18 microRNAs zu identifizieren.

Abzüglich aller Redundanzen ergab sich eine Gesamtmenge von 9053 individuellen Zielgenvorhersagen. Bedingt durch die Zielgenvielfalt individueller microRNAs musste die resultierende Proteinliste mit Hilfe der sogenannten GO-Terms auf Proteine reduziert werden, welche im konkreten funktionalen Kontext mit neuronaler Entwicklung, Differenzierung und Funktion stehen. In der Gene-Ontology-Datenbank [227] sind Proteinen Kurzbeschreibungen zugeordnet, die Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins erlauben. Die DAVID-Datenbank gestattet es Proteinlisten nach bestimmten GO-Terms zu filtern. Die Liste von 9053 potentiellen Zielgenen wurde daher in zwei Schritten gefiltert. Im ersten Schritt wurden alle Proteine herausgefiltert, in deren Gene-Ontology-Bezeichnung die Phrasen „nerv“, „neur“, „axon“, „brain“, „synap“ „development“, „differentiation“ oder „morphology“ enthalten waren (8-GO-Terms-Bedingung). GO-Terms wie z.B. „heart-development“ wurden dabei nicht berücksichtigt. 2122 der 9053 potentiellen Zielgene genügten den 8-GO-Terms-Bedingungen.

Die 5-GO-Terms-Bedingung welche nur die Phrasen „nerv“, „neur“, „axon“, „brain“ oder „synap“ umfasst, bildete ein stringenteres Auswahlkriterium und lieferte folglich nur noch 711 potentielle Zielgene mit neuronaler Relevanz. Viele der neuronal relevanten Zielgene wurden dabei von mehr als einer microRNA potentiell erfasst. Tabelle 6.1 fasst diejenigen potentiellen Zielgene zusammen, deren 3'UTRs die meisten potentiellen Bindungsstellen für die Gruppe von 18 microRNAs tragen.

Gen-Symbol	Accession	GO Terms	Anzahl vorhergesagter microRNAs	Gen-Symbol	Accession	GO Terms	Anzahl vorhergesagter microRNAs
<b>MECP2</b>	NM_004992	neuron maturation	13	<b>NTN4</b>	NM_021229	neuron remodeling	5
<b>NEUROD1</b>	NM_002500	neurogenesis	11	<b>GPR98</b>	NM_032119	neuropeptide signaling pathway	5
<b>NBEA</b>	NM_015678	post-Golgi vesicle-mediated transport	10	<b>EPB41L1</b>	NM_012156, NM_177996	cytoskeletal protein binding	5
<b>EPHA4</b>	NM_004438	axon guidance, signal transduction	10	<b>NPTX1</b>	NM_002522	synaptic transmission, calcium ion binding	5
<b>NDEL1</b>	NM_001025579, NM_030808	neuron migration, cell differentiation,	10	<b>SYN2</b>	NM_133625	neurotransmitter secretion	5
<b>NR4A3</b>	NM_173200, NM_173199, NM_006981, NM_173198	regulation of transcription	8	<b>RAB14</b>	NM_016322	neurotransmitter secretion	5
<b>NRP1</b>	NM_003873, NM_001024628	nervous system development	7	<b>BTG3</b>	NM_006806	negative regulation of progression through mitotic cell cycle	5
<b>PAFAH1B1</b>	NM_000430	neuron migration, neuroblast proliferation, nervous system development	7	<b>RIMS4</b>	NM_182970	neurotransmitter transport	5
<b>CELSR2</b>	NM_001408	neuropeptide signaling pathway	7	<b>RTN2</b>	NM_206900	signal transduction	5
<b>ZFHX1B</b>	NM_014795	neural crest cell migration	6	<b>RUNX1</b>	NM_001001890, NM_001754	neuron differentiation	5
<b>NOVA2</b>	NM_002516	RNA binding, nucleus	6	<b>SLC6A8</b>	NM_005629	neurotransmitter:sodium symporter activity	5
<b>CUGBP2</b>	NM_006561, NM_001025077, NM_001025076	neuromuscular junction development	6	<b>NRP2</b>	NM_018534, NM_201267, NM_201266, NM_003872	nervous system development	5
<b>PPP3CB</b>	NM_021132	calcineurin complex	6	<b>SV2A</b>	NM_014849	neurotransmitter transport	5
<b>NEUROG1</b>	NM_006161	cell differentiation, nervous system development	6	<b>DLGAP2</b>	NM_004745	neurofilament, nerve-nerve synaptic transmission	5
<b>LPHN3</b>	NM_015236	neuropeptide signaling pathway,	6	<b>DCBLD2</b>	NM_080927	negative regulation of cell growth	5
<b>HIF1A</b>	NM_001530, NM_181054	neural crest cell migration	6	<b>SYNGAP1, ZBTB9</b>	NM_152735, NM_006772	intracellular, regulation of small GTPase mediated signal transduction,	5
<b>NR4A2</b>	NM_006186, NM_173172, NM_173173, NM_173171	neuron differentiation	6	<b>ELAVL2</b>	NM_004432	regulation of transcription	5
<b>GRM7</b>	NM_000844, NM_181874, NM_181875	neuroprotection, synaptic transmission	6	<b>GPM6A</b>	NM_005277, NM_201591, NM_201592	integral to membrane	5
<b>NPAS2</b>	NM_002518	circadian sleep/wake cycle, central nervous system development	6	<b>KCNMB4</b>	NM_014505	regulation of neurotransmitter secretion	5
<b>CRIM1</b>	NM_016441	nervous system development	5	<b>LMO3</b>	NM_001001395	regulation of transcription	5

**Tabelle 6.1: Darstellung der 40 am häufigsten vorhergesagten neuronal relevanten (GO-Terms) Zielgene für das Set von 18 herunterregulierten microRNAs während der neuronalen Differenzierung von USSC.** Sortiert nach Trefferhäufigkeit, werden hier die offiziellen Gen-Symbole, Auszüge aus den neuronal relevante GO-Terms, sowie Accession-Nummern der Proteine angegeben.

Aufgrund der Tatsache, dass microRNAs vor allem über ihre 6 Nukleotide lange Seed-Sequenz an ihre Ziel-mRNAs hybridisieren und Vorhersage-Algorithmen sinnvollerweise genau diesen Bereich für ihre Berechnungen heranziehen, ergeben sich durch ähnliche Basenabfolgen Redundanzen unter den Zielgenen für verschiedene microRNAs. Die microRNAs miR-17, -20a und -106b besitzen beispielsweise eine identische Seed-Sequenz und folgerichtig auch eine Vielzahl gemeinsam vorhergesagter Zielgene. Darüber hinaus weisen die 3'UTRs der Proteine NEUROD1, NBEA, EPHA4 und NPTX1 beispielsweise putative Bindestellen für  $\geq 10$  der 18 microRNAs auf. Um den möglichen biologischen Einfluss der vorhergesagten microRNA-Zielproteine auf die neuronale Differenzierung der USSC-Linien weiter zu bekräftigen, wurden die Proteinlisten in der DAVID-Datenbank verschiedenen neuronal-relevanten KEGG-Pathways zugeordnet. In KEGG-Pathways werden Proteine an funktionalen Abläufen beteiligte Proteine in Gruppen zusammengefasst und deren Interaktionen untereinander, sowie zu angrenzenden Pathways in schematischer Form dargestellt. Die Pathways mit den meisten potentiellen Zielgenen für die Gruppe der 18 microRNAs zählten „Axon Guidance“, „TGF-beta Signaling“, „WNT Signaling“, „MAPK Signaling“ und „Long-term Potentiation“.

Tabelle 6.2 fasst den potentiellen Einfluss der microRNAs auf die fünf oben genannten Pathways zusammen. Es zeigte sich, dass die 18 microRNAs putativ einen erheblichen Einfluss auf die Expression der Mitglieder dieses Pathways ausüben können. Die microRNA miR-106b erfasst Proteine aller fünf Pathways, die microRNAs miR-138, -17, -130a, -137, -19a, -20a, sowie miR-25 erfassen Proteine von wenigstens drei der genannten Pathways. Nur wenige microRNAs (miR-145-5p, -143, -18a, -27a, -362-5p und -431) haben keine potentiellen Zielgene innerhalb dieser Pathways.

microRNAs	Axon Guidance (79)	TGF $\beta$ Signaling (54)	WNT Signaling (71)	MAPK Signaling (126)	Long-term Potentiation (25)
hsa-mir-138	18		16	21	
hsa-mir-17	9	11	12	19	
hsa-mir-106b	18	11	14	24	5
hsa-mir-130a	11	8			7
hsa-mir-137	19	8		21	7
hsa-mir-19a	24	12	20		12
hsa-mir-20a	16	10	13		
hsa-mir-218	13				6
hsa-mir-22		16		25	
hsa-mir-25	21			16	
hsa-mir-28-5p	12				
hsa-mir-335			14		
hsa-mir-140-5p	<b>keine vorhergesagten Zielgene in diesen Pathways</b>				
hsa-mir-143					
hsa-mir-18a					
hsa-mir-27a					
hsa-mir-362-5p					
hsa-mir-431					
<b>vorherg. Gene/ Gene insgesamt</b>	<b>45/79 (57%)</b>	<b>27/54 (50%)</b>	<b>32/71 (45%)</b>	<b>53/126 (42%)</b>	<b>14/25 (56%)</b>

Tabelle 6.2: Verteilung potentieller Zielgene der 18 während XXL-Differenzierung herunterregulierten, microRNAs auf neuronal-relevante KEGG-Pathways. Angegeben sind die einzelnen KEGG-Pathways mit der Anzahl enthaltener Proteine, sowie die Anzahl von Proteinen die im jeweiligen Pathway von bestimmten microRNAs potentiell reguliert werden. Die unterste Zeile fasst die Ergebnisse zusammen und zeigt wie viele Proteine des jeweiligen Pathways insgesamt potentiell reguliert werden.

Abbildung 6.6 zeigt beispielhaft die potentiellen Zielgene für die Gruppe von 18 microRNAs auf dem Pathway „Axon Guidance“. 57% der Proteine dieses Pathways gehören zu diesen potentiellen Zielgenen und werden von 10 microRNAs der 18 erfasst. Einige Proteine wie z.B. EphrinB, ROBO1, PlexinA und PAK werden potentiell von bis zu 9 dieser microRNAs erfasst. Abbildungen der vier verbliebenen Pathways finden sich im Anhang (Abbildung 8.1 bis Abbildung 8.4).

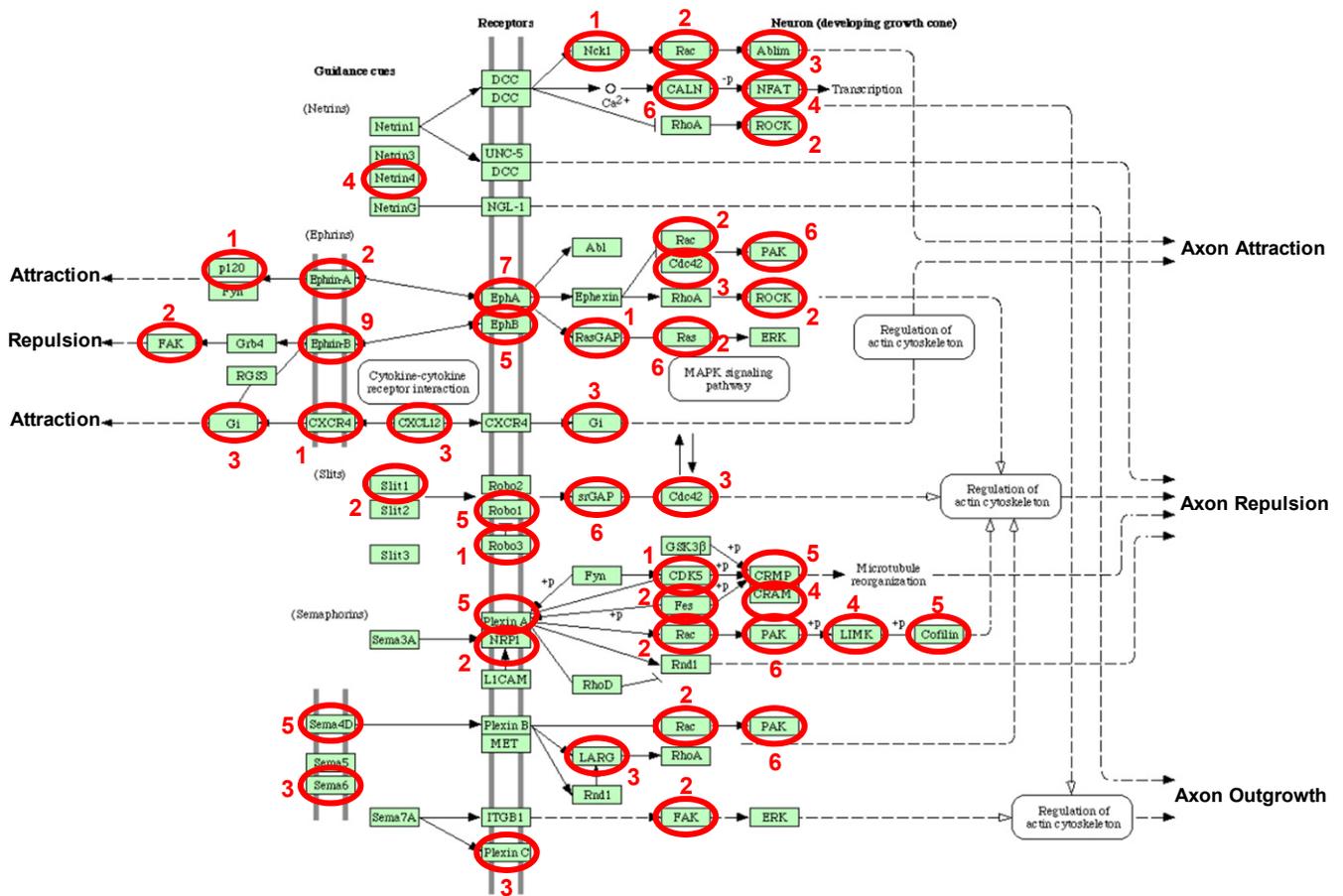


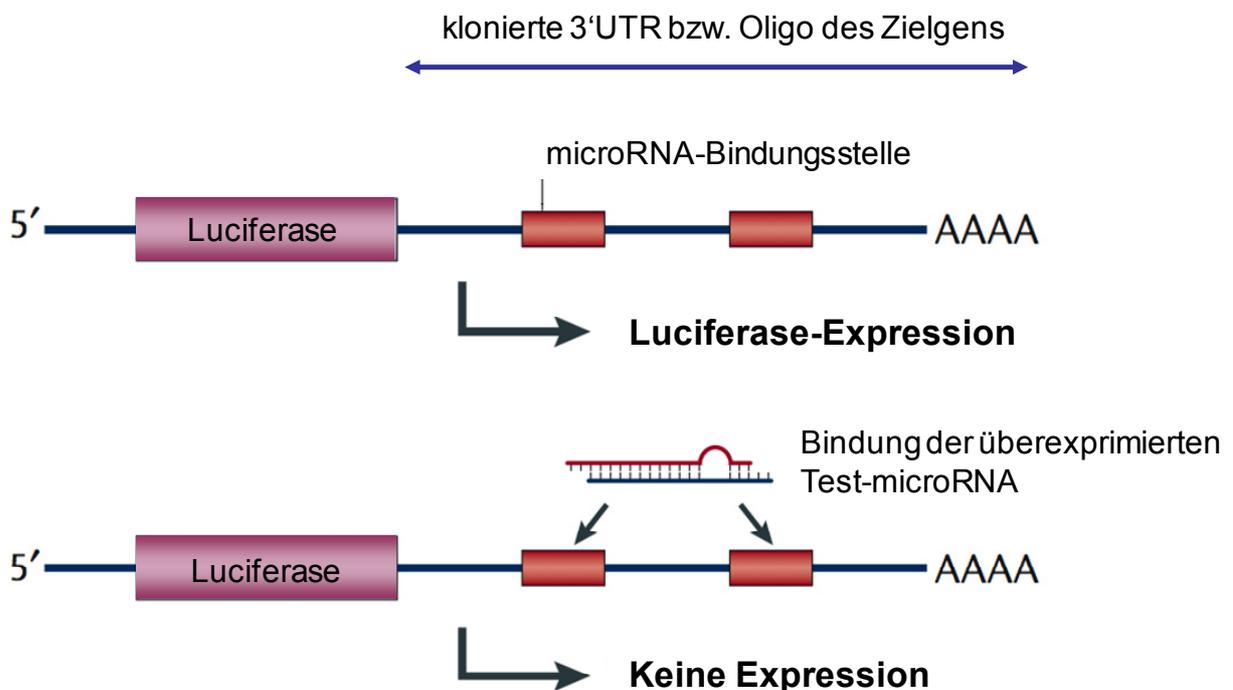
Abbildung 6.6: Potentielle microRNA-Zielgene im „Axon Guidance“ KEGG-Pathway. Die grünen Boxen stehen für die einzelnen Proteine im Pathway, während die roten Ovale vorhergesagte microRNA/Zielgen-Interaktionen symbolisieren. Die roten Zahlen benennen die Anzahl der potentiell regulierenden individuellen microRNAs. Die Abbildung wurde entnommen aus der KEGG-Pathway-Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) und um die microRNA-Daten ergänzt.

Zusammenfassend ergab die bioinformatische Analyse, dass die potentiellen Zielgene der 18 herunterregulierten microRNAs das Potential besitzen einen erheblichen Einfluss auf die neuronale Entwicklung und Differenzierung zu nehmen. Insbesondere fällt auf, dass viele der microRNAs nicht nur ein relevantes potentielles Zielgen besitzen, sondern mehrere Proteine gleichzeitig als putative Ziele in Frage kommen. Umgekehrt werden auch viele Zielgene von mehr als einer der 18 microRNAs potentiell reguliert. Die bemerkenswerte Häufung putativer Zielgene in den für neuronale Entwicklung und Differenzierung relevanten Pathways deutet zusätzlich das Potential im Kontext der Neuroentwicklung an. Nichtsdestotrotz ist diese Analyse zunächst lediglich *in silico* präsent und bedarf einer umfangreichen experimentellen Validierung, bevor sie als biologische Realität gewertet werden kann.

## 6.3 Experimentelle Zielgenvalidierungen

### 6.3.1 Prinzip des Luciferase-Assays

Das in der einschlägigen Literatur gängige Prinzip der experimentellen Zielgenvalidierung besteht darin, 3'UTRs oder Teile hiervon, z.T. aber auch nur doppelsträngige Oligonukleotide an das 3'-Ende von Reporter genen wie Luciferase oder  $\beta$ -Galaktosidase zu klonieren und in Kotransfektionsansätzen mit Normalisierungsvektoren und überexprimierten microRNAs den Einfluss letzterer auf die Reporter genaktivität zu erfassen (Abbildung 6.7), welche durch die Bindung von microRNAs an die 3'UTR-Anteile reduziert wird. Im Kontext der Validierung von Zielproteinen für eine größere Anzahl von microRNAs erscheint ein solcher Ansatz unpraktikabel, zumal gemeinhin nicht der Einfluss überexprimierter microRNAs auf die offenen Leserahmen der Reporter gene selbst erfasst wird.



**Abbildung 6.7: Prinzip der experimentellen Validierung potentieller microRNA/Zielgen-Interaktionen.** Eine 3'UTR bzw. ein Oligonukleotid mit den zu testenden microRNA-Bindestellen wird an das 3'-Ende eines Reporter gens (hier: Firefly-Luciferase) kloniert. Die Aktivität des Reporter gens wird durch microRNA-Bindung reduziert. Modifiziert nach Kosik 2006 [228].

Um den in dieser Arbeit zu erwartenden Mengen an putativen microRNA-Zielgeninteraktionen in der experimentellen Validierung gerecht zu werden, wurde ein modifizierter Ansatz etabliert. Dieser fußt auf dem Vektor pmirGLO (Abschnitt 5.1.4), welcher die Firefly- als auch die Renilla-Luciferase von getrennten Promotoren aus exprimiert. Mess- und Normalisierungs-Reporter gene befinden sich so auf einem Vektor und die Messung

kann nicht durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen getrennter Vektoren kompromittiert werden. Die Anwendung von microRNA-Mimics, effizient transfizierbare, chemisch modifizierte doppelsträngige RNA-Moleküle (kommerziell erhältlich), vermeidet die umständliche Klonierung und funktionale Überprüfung von Expressionskonstrukten der jeweiligen pri-microRNAs.

Als zelluläres System kamen HEK293T-Zellen zur Anwendung. Die Verwendung eukaryotischer Zelllinien der gleichen Spezies wie die zu untersuchenden Zellen ist in der Literatur akzeptiert [132,229,230] und erlaubt das effiziente Verarbeiten umfangreicherer Ansätze. Darüber hinaus sind HEK293T-Zellen im Gegensatz zu USSC (i) unbegrenzt verfügbar und lassen sich (ii) wesentlich effizienter transfizieren, was zu besser reproduzierbaren Messergebnissen führte.

Der in der Praxis gewählte Ansatz bestand darin, nach Klonierung der relevanten 3'UTR-Fragmente an das 3'Ende der Firefly-Luciferase in pmirGLO, den leeren Vektor (pmirGLO) und den 3'UTR-Vektor (pmirGLO/3'UTR) getrennt in HEK293T zu transfizieren. Der Vergleich der jeweils gegen Renilla normalisierten Firefly-Aktivitäten reflektiert den Einfluss endogener HEK293T-microRNAs auf die jeweilige 3'UTR. Beide relativen Aktivitäten werden auf 100% gesetzt und nun paarweise die Kotransfektionen von pmirGLO + microRNA-Mimic und pmirGLO/3'UTR + microRNA-Mimic durchgeführt. Erstere erfasst den Einfluss der jeweiligen microRNA-Mimic auf Firefly und Renilla *per se*, eine wie sich zeigte (s.u., Abbildung 6.10) notwendige Kontrolle, die zweite Kotransfektion bringt dann die 3'UTR ins Spiel und erlaubt die Analyse des Einflusses der microRNA auf die 3'UTR selbst. Die normalisierten Firefly-Aktivitäten beider Kotransfektionen werden jeweils in prozentuale Relation zu ihren microRNA-Mimic-freien Gegenstücken gesetzt und bilden so das fertige Resultat.

Durch die Strukturierung der Kotransfektionen microRNA-Mimic mit (i) Leervektor und (ii) 3'UTR-Vektor entfällt die Notwendigkeit von Mutagenesen der 3'UTRs, um die Spezifität der Interaktion zu zeigen. Zwar wird so nicht zwangsläufig eine punktuelle, vorhergesagte Bindungsstelle validiert, sehr wohl aber der Einfluss einer microRNA auf die 3'UTR, was der *in vivo*-Situation wesentlich näher kommt. Als weitere Spezifitätskontrolle wurde in jedem experimentellen Ansatz eine unspezifische kleine RNA getestet (n.t.siRNA), um Einflüsse des Transfektionssystem auszuschließen und die Sequenzspezifität der jeweiligen microRNA-Zielgen-Interaktion zu bestätigen.

### 6.3.2 Ausgewählte Proteine und microRNAs

Aus der Liste potentieller Zielgene für die 18 microRNAs wurden, im Hinblick auf ihre neuronalen Funktionen und die Anzahl putativer Bindestellen, 11 Proteine (CRIM1, EPHA4, MECP2, NBEA, NEUROD1, NEUROG1, NPTX1, NRP1, NTN4, PTN und STAT3) für eine experimentelle Zielgenvalidierung ausgewählt. Außerdem wurde das house-keeping-Gen GAPDH einbezogen, da interessanterweise drei microRNAs potentielle Bindungsstellen auf dessen 3'UTR aufwiesen. Die putativen Zielgene wurden vor der Klonierung noch einmal in jedem der drei Algorithmen nach möglichen microRNA-Bindestellen abgesucht, da die miRGen-Datenbank nicht so häufig aktualisiert wird wie die zugrundeliegenden Einzel-Algorithmen und somit unter Umständen einzelne Bindestellen übersehen werden könnten.

Tabelle 6.3 zeigt die Anzahl der putativen Bindestellen für die 18 genannten microRNAs. Die 10 microRNAs mit den meisten potentiellen Zielgenen wurden für die weiteren Analysen ausgewählt (miR-17, -18a, -19a, -20a, -106b, -130a, -137, -138, -218 und -335).

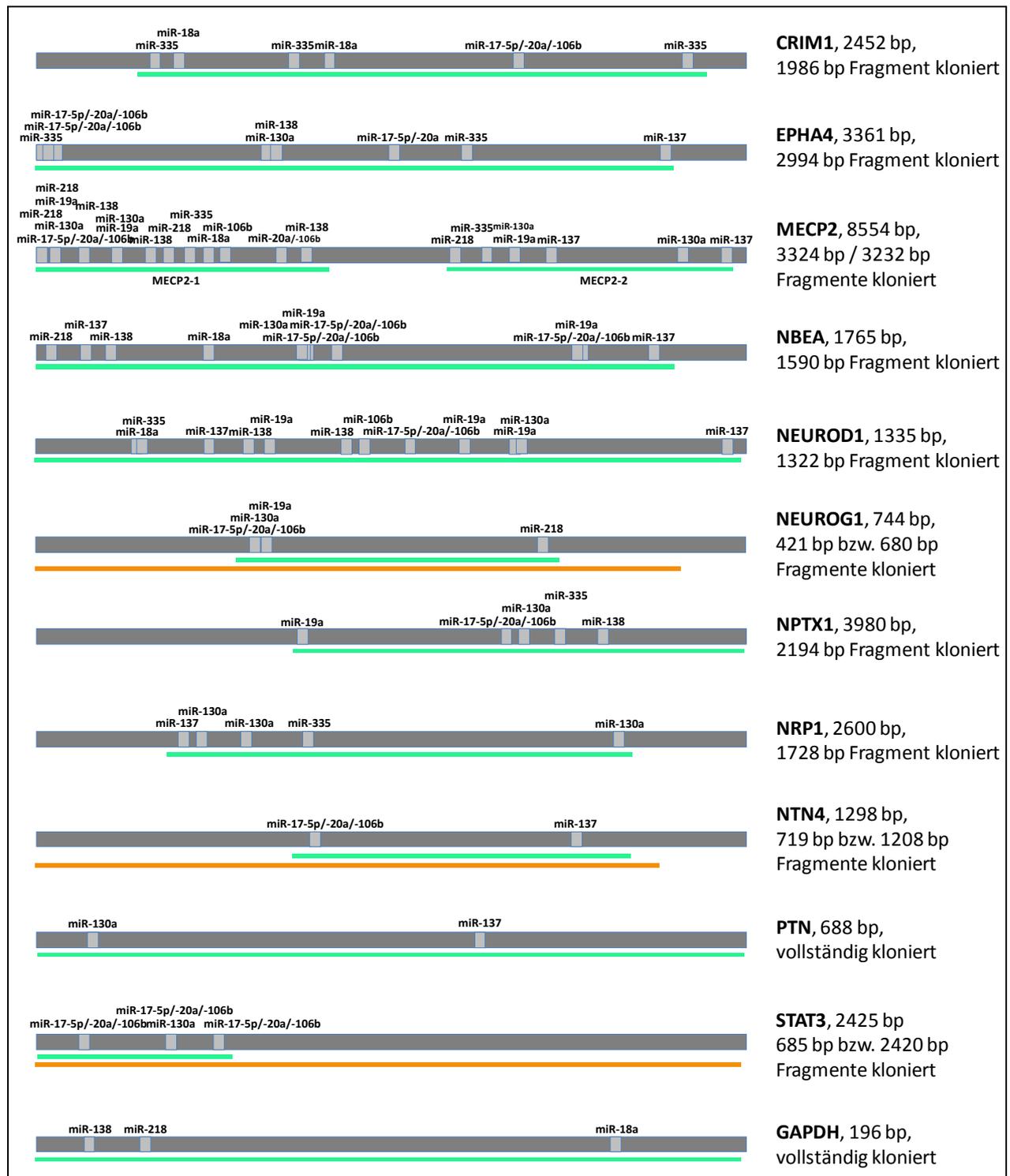
Gen-Symbol	Anzahl verschiedener microRNAs/Protein																Accession			
		miR-106b	miR-130a	miR-137	miR-138	miR-140-5p	miR-143	miR-17	miR-18a	miR-19a	miR-20a	miR-218	miR-22	miR-25	miR-27a	miR-28-5p		miR-335	miR-362-5p	miR-431
MECP2	13	3	4	1	3	-	-	1	1	4	2	4	2	2	-	2	2	-	-	NM_004992
NEUROD1	11	2	1	2	2	-	-	1	1	3	1	-	-	2	1	-	1	-	-	NM_002500
NBEA	10	3	1	2	1	-	1	3	1	2	3	1	-	-	-	-	-	-	-	NM_015678
NPTX1	10	1	1	-	1	-	1	1	-	1	1	-	-	2	-	-	1	1	-	NM_002522
EPHA4	10	2	1	1	1	-	-	3	-	-	3	-	-	-	1	1	2	1	-	NM_004438
NEUROG1	6	1	1	-	-	-	-	1	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	NM_006161
CRIM1	5	1	-	-	-	-	-	1	2	-	1	-	-	-	-	-	3	-	-	NM_016441
NRP1	5	-	3	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	NM_003873
NTN4	5	1	-	1	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	NM_021229
STAT3	4	3	1	-	-	-	-	3	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	NM_003150
PTN	2	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NM_002825
GAPDH	3	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	NM_002046

Tabelle 6.3: Übersicht der ausgewählten Gene für die experimentellen Validierungen. Dargestellt sind die für die Zielgenvalidierungen ausgewählten Gene mit den offiziellen Accession-Nummern der zugehörigen mRNA, sowie vorhergesagte Interaktionen mit den 18 differentiell exprimierten microRNAs. Rot hervorgehoben sind die 10 für Zielgenvalidierungen ausgewählten microRNAs. Es ergeben sich 135 individuelle potentielle Bindestellen bei 71 3'UTR/microRNA-Interaktionen.

### 6.3.3 Klonierung zu testender 3'UTR-Fragmente

Die Länge der klonierten Fragmente richtete sich nach der Gesamtlänge der 3'UTRs, sowie nach der Lage relevanter microRNA-Bindestellen. Im Fall von MECP2 musste die 3'UTR aufgrund ihrer enormen Länge von 8,5 kb geteilt werden um Schwierigkeiten sowohl bei der Klonierung als auch bei späterer Transfektion in die Zellen zu vermeiden. In Abbildung 6.8 sind diese Informationen tabellarisch zusammengefasst.

Der Vektor pmirGLO wurde mit den Enzympaaren *XhoI/SalI* bzw. *SacI/XbaI* geschnitten und dephosphoryliert. Die gewünschten Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert, wobei die geeigneten Restriktionsschnittstellenpaare (*XhoI/SalI* bzw. *SacI/XbaI*) über die jeweiligen Primer integriert wurden. Als Template kam genomische DNA zum Einsatz mit Ausnahme der Klonierung der EPHA4-3'UTR; letztere weist ein Intron auf und somit wurde hier auf cDNA zurückgegriffen. Die PCR-Amplifikate wurden gelelektrophoretisch analysiert, geeignet restriktionsverdaut und in den jeweils passend vorbereiteten pmirGLO ligiert. Zusätzlich zu den 3'UTRs der genannten Zielgene wurde ein Kontroll-Konstrukt generiert, welches eine vollständig komplementäre Bindestelle für hsa-miR-137 aufwies. Das benötigte Insert wurde als Strang und Gegenstrang synthetisiert, renaturiert und ebenfalls in den Vektor ligiert.



**Abbildung 6.8:** Schematische Darstellung der 3'UTRs zu validierender Gene und der in pmirGLO einklonierten Fragmente. Die grauen Balken stellen schematisch die 3'UTRs der zu klonierenden Gene dar. Potentielle microRNA-Bindestellen sind als hellgrau Boxen dargestellt. Unter den 3'UTRs sind als grüne Linien die klonierten Bereiche für Zielgenvalidierungen gekennzeichnet, in orange sind die Bereiche markiert, die ausschließlich für das Zeitverlaufs-Experiment (siehe Abschnitt 6.4) kloniert wurden. Neben den 3'UTRs stehen die Namen der Proteine, die Länge der 3'UTR und der jeweils klonierten Bereiche.

Die Ligationsansätze wurden in E.coli SURE elektroporiert, vermehrt und positive Klone mittels Kolonie-PCR oder Testrestriktionen isolierter Plasmid-Mini-Präparationen selektiert. Diese wurden sequenziert und anschließend je ein Klon korrekter Sequenz für die Maxi-Präparation ausgewählt. Alle selektierten Konstrukte wurden vor ihrer Verwendung im Assay ein weiteres Mal zur Kontrolle verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 6.9).

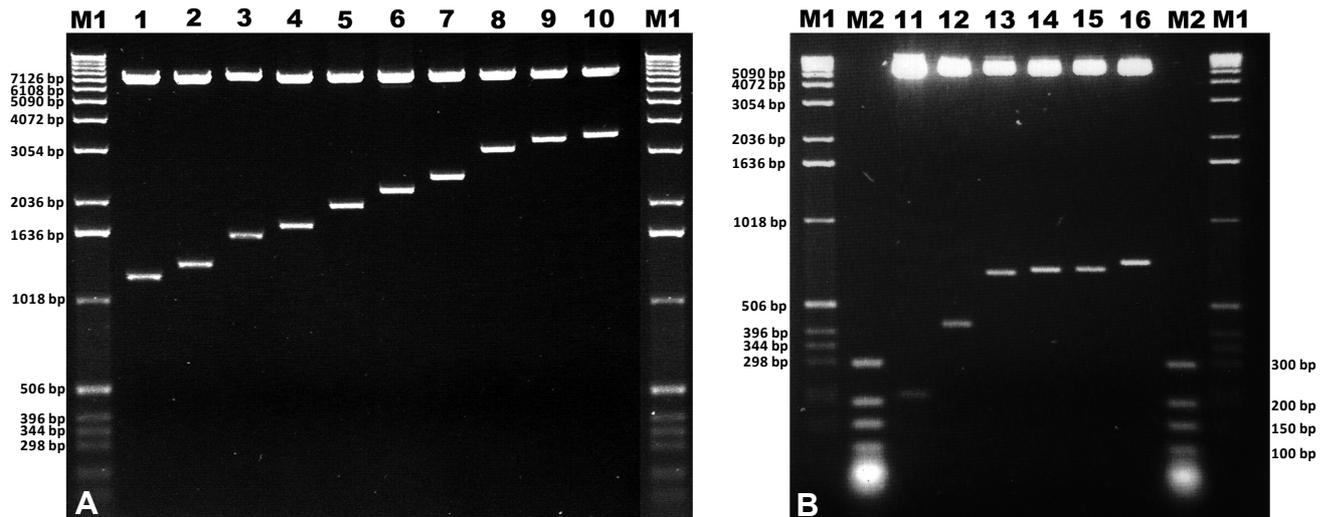


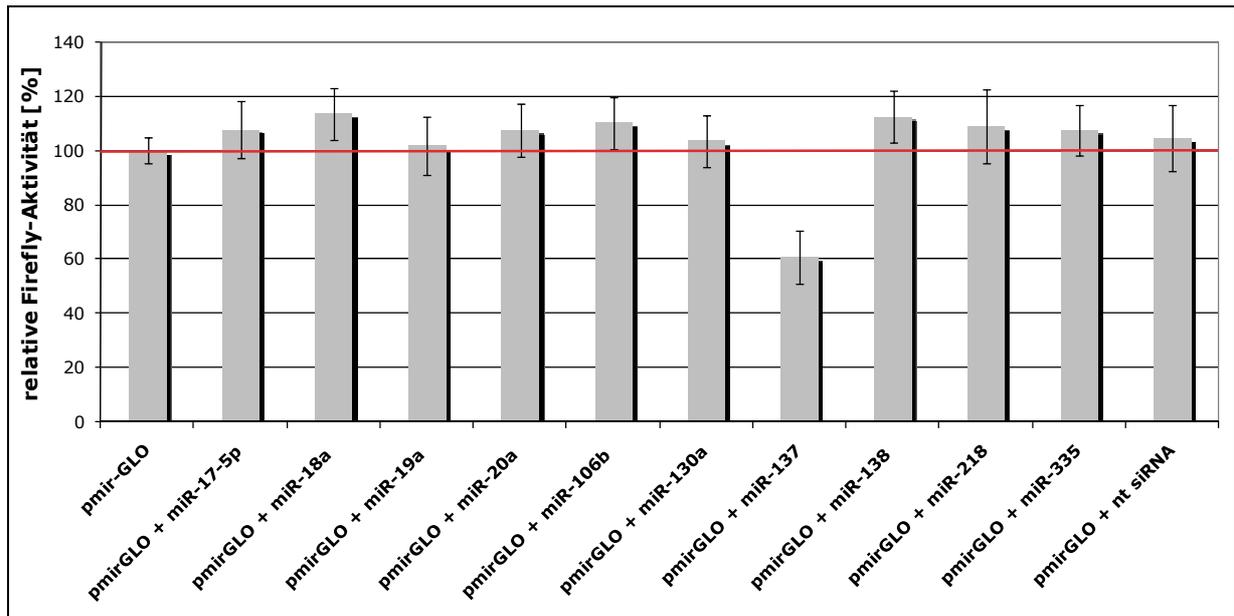
Abbildung 6.9: Kontrollverdau aller 3'UTR-Konstrukte.

**A)** Je 200 ng der mit *SacI/XbaI* bzw. *XhoI/SalI* geschnittenen pmirGLO/3'UTR-Konstrukte wurden auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. In den Spalten sind von links nach rechts folgende Konstrukte aufgetragen: **1)** NTN4-full, **2)** NEUROD1, **3)** NBEA, **4)** NRP1, **5)** CRIM1, **6)** NPTX1, **7)** STAT3-full, **8)** EPHA4, **9)** MECP2-2, **10)** MECP2-1.

**B)** Zu sehen sind ebenfalls mit *SacI/XbaI* bzw. *XhoI/SalI* geschnittene pmirGLO/3'UTR-Konstrukte, aufgetragen auf einem 1,5%igen Agarosegel. Von rechts nach links sind die klonierten Fragmente von **11)** GAPDH (1 µg), **12)** NEUROG1 (500 ng), **13)** PTN, **14)** NEUROG1-full, **15)** STAT3, **16)** NTN4 (jeweils 400 ng) zu erkennen. M1 steht für die 1kb-Leiter von Invitrogen, M2 steht für die Ultra Low Range DNA-Leiter von Fermentas. Die Konstrukte mit dem Namenszusatz „full“ wurden ausschließlich im Zeitverlauf-Experiment (Abschnitt 6.4) eingesetzt und nicht in den Zielgenvalidierungen.

### 6.3.4 Zielgenvalidierungen

Im Zuge der Etablierung des Assays stellte sich heraus, dass bestimmte microRNA-Mimics Einfluss auf die Luciferase-Aktivitäten nahmen. Abbildung 6.10 fasst daher ein Experiment zusammen, welches den Einfluss der verwendeten microRNA-Mimics auf pmirGLO demonstriert. Speziell microRNA-Mimic miR-137 wies einen erheblichen Einfluss auf die Reporter-gen-Aktivitäten auf und unterstreicht somit die Notwendigkeit, diese Kontrolle stets mitzuführen.



**Abbildung 6.10: Untersuchung des regulatorischen Einflusses von microRNA-Mimics auf die Luciferase-Aktivitäten des pmirGLO-Vektors.** Verglichen wird die relative Luciferase-Aktivität des leeren Vektors pmirGLO mit den relativen Luciferase-Aktivitäten aus den Kotransfektionen pmirGLO + microRNA-Mimics. Gezeigt sind Mittelwerte aus 3 biologischen mit je 3 technischen Replikaten und zugehöriger Standardabweichung. Anhand der relativen Aktivitätsveränderung zwischen pmirGLO und pmirGLO + microRNA-Mimics lässt sich der Einfluss einzelner microRNA-Mimics auf pmirGLO ermessen, dabei übte die miR-137 einen besonders starken reduzierenden Einfluss auf die relative Firefly-Aktivität des Vektors aus.

Die eigentlichen Zielgenvalidierungen wurden nach dem in Abschnitt 6.3.1 beschriebenen Schema in mindestens 2 biologischen Replikaten, bestehend aus stets je 3-4 technischen Replikaten durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Transfektionseffizienz der Mimics wurde das pmirGLO/137match-Konstrukt verwendet.

Für die Versuchsreihen wurden die Zellen 24 h nach Aussaat transfiziert und nach weiteren 24 h Inkubation bei normalen Kulturbedingungen schonend lysiert und die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Abbildung 6.11 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Zielgenvalidierung von NRP1. Die microRNAs miR-130a und -137 zeigten eine signifikante Reduktion der relativen Firefly-Aktivitäten der pmirGLO/NRP1-3'UTR + microRNA-Mimic Kotransfektion verglichen mit der pmirGLO + microRNA-Mimic Kotransfektion. Bei der microRNA miR-335 war eine Reduktion nicht zu beobachten. Zu beachten ist der prägnante Einfluss von miR-137 auf die Luciferase-Aktivitäten von pmirGLO. Bei pmirGLO/137match war die relative Firefly-Aktivität massiv reduziert, was die vollständige Sequenzkomplementarität zwischen microRNA-Mimic und Ziel-3'UTR widerspiegelt. Die prozentuale Reduktion stellt somit auch ein Maß für die microRNA-3'UTR Interaktion dar. Zusammenfassend konnte NRP1 somit als Zielgen für miR-130a und miR-137 identifiziert werden, miR-335 hingegen erfasst die NRP1-3'UTR nicht.

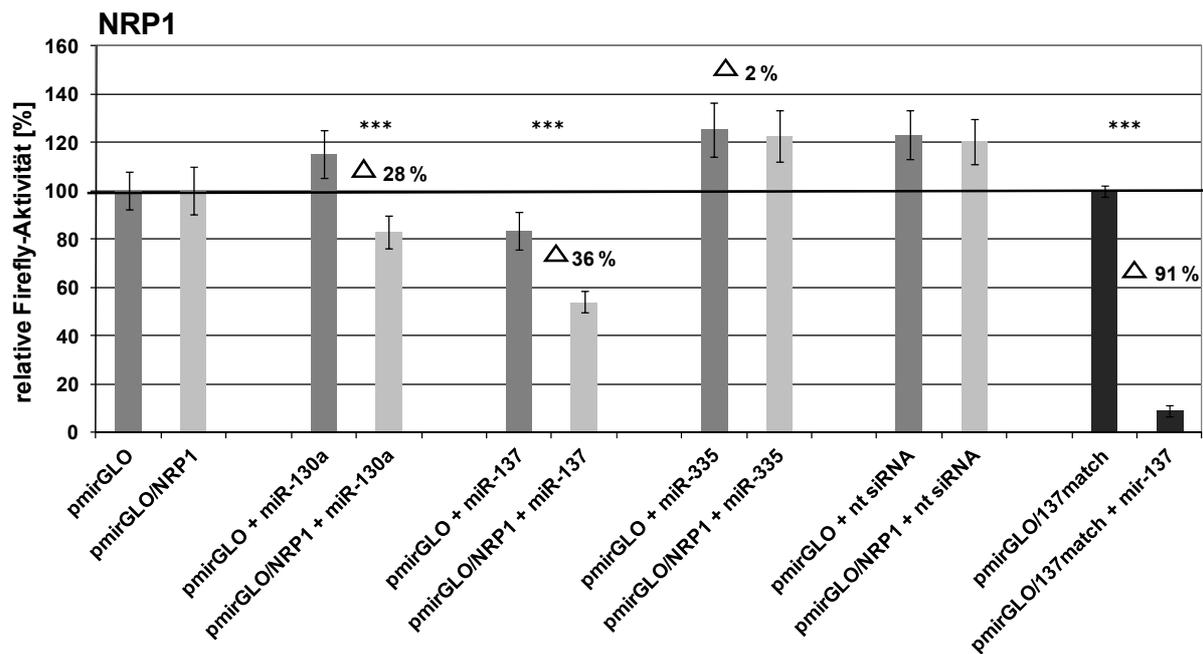
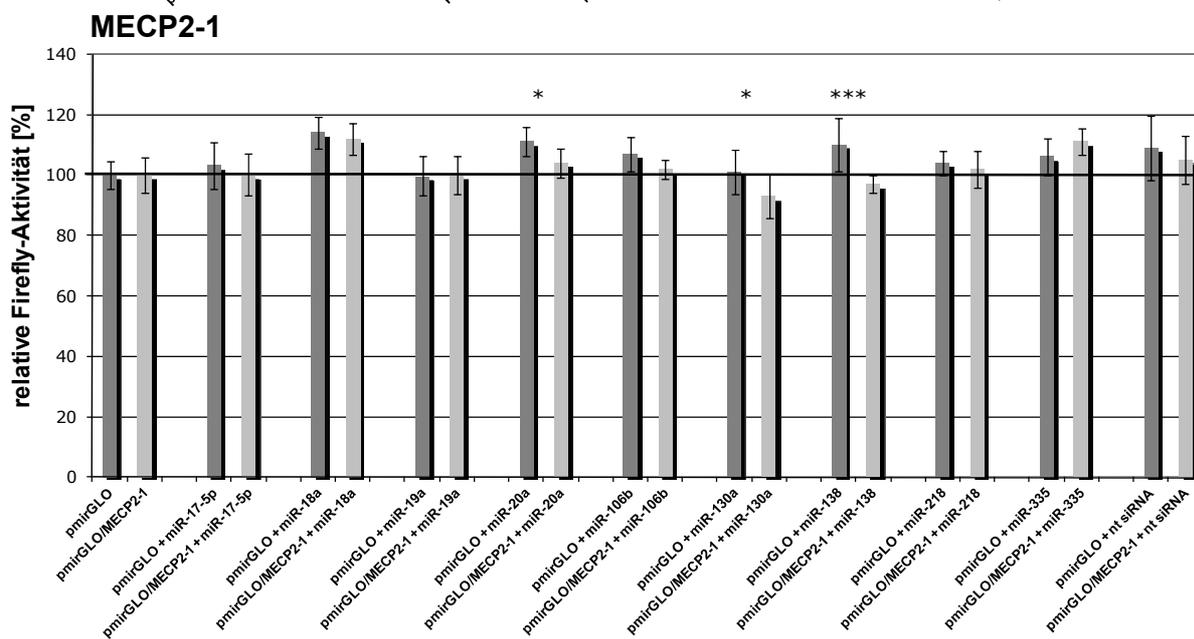
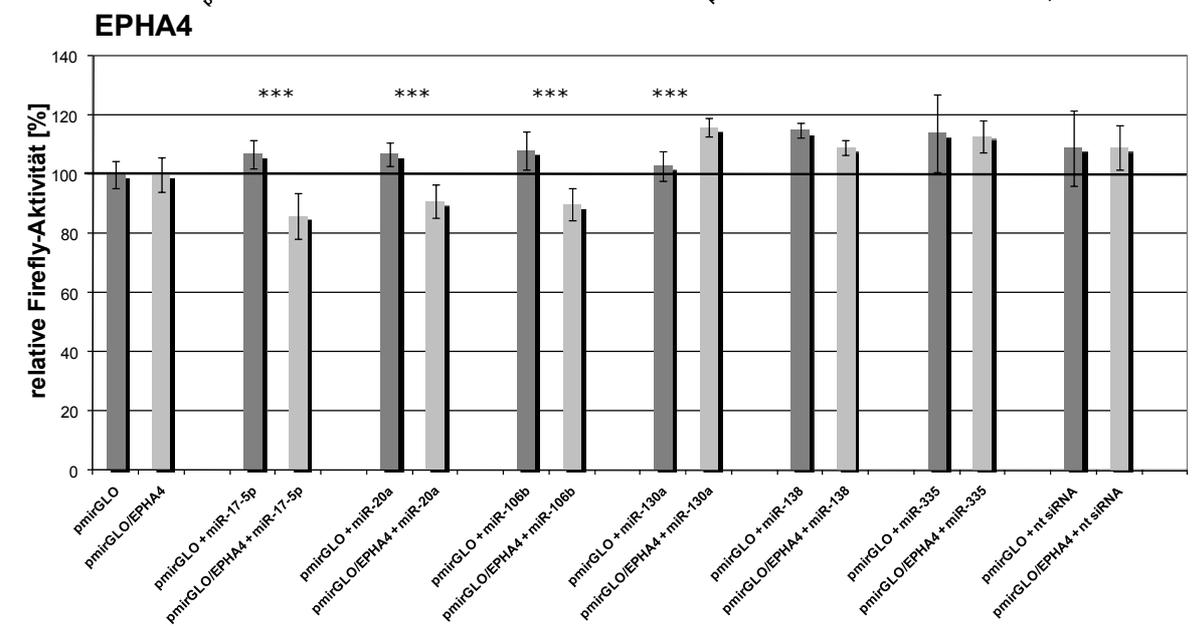
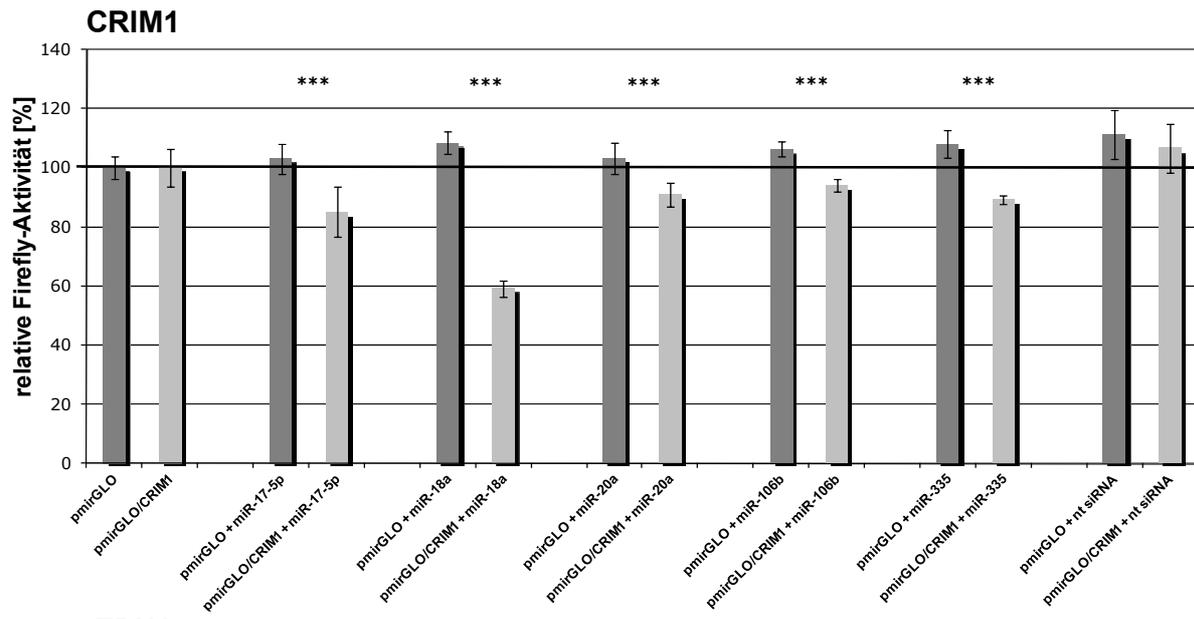
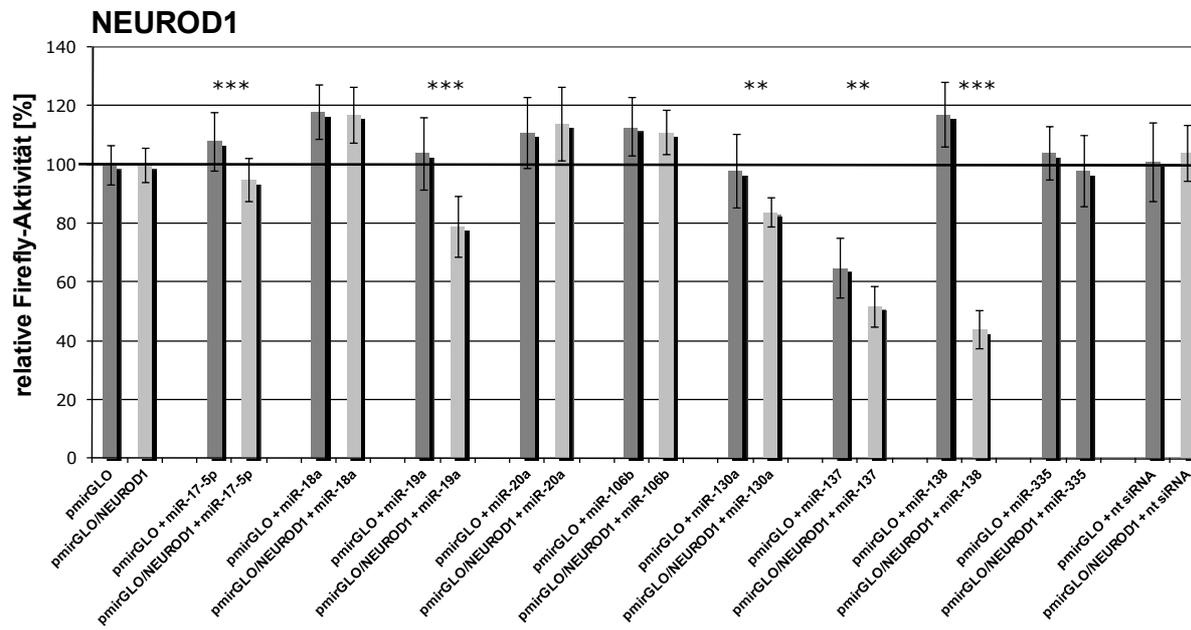
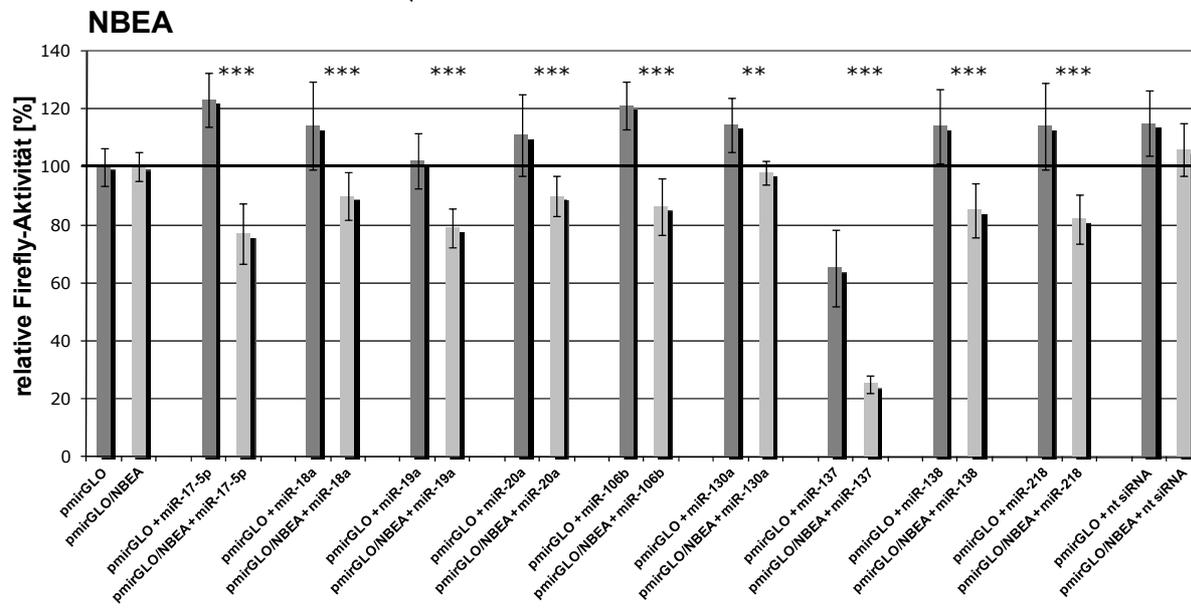
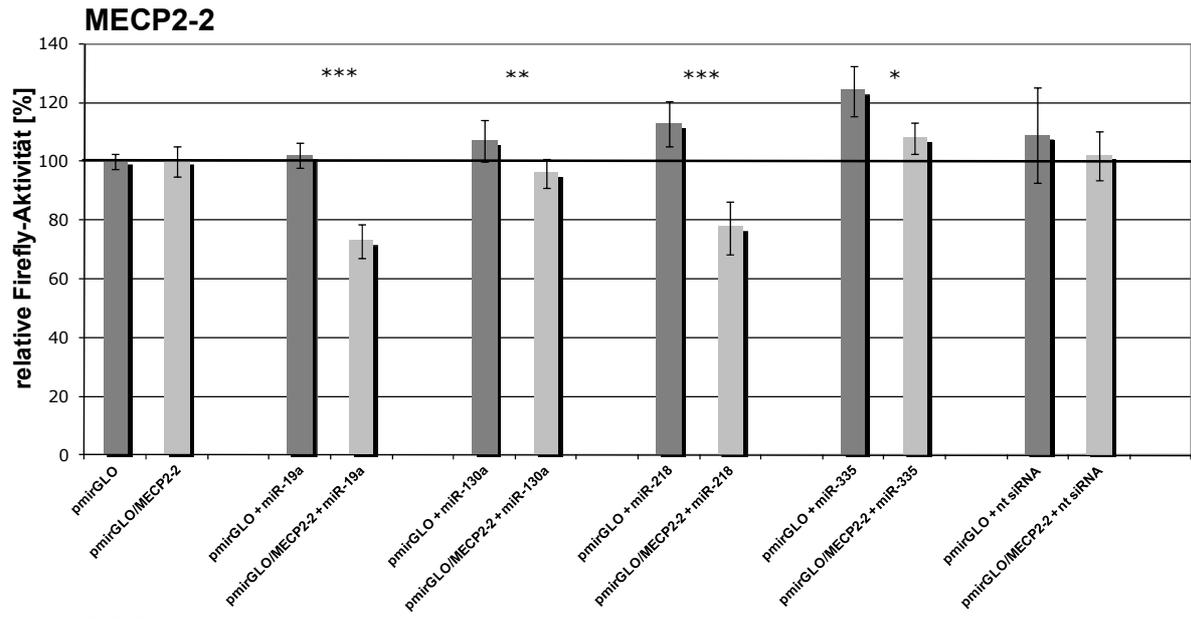
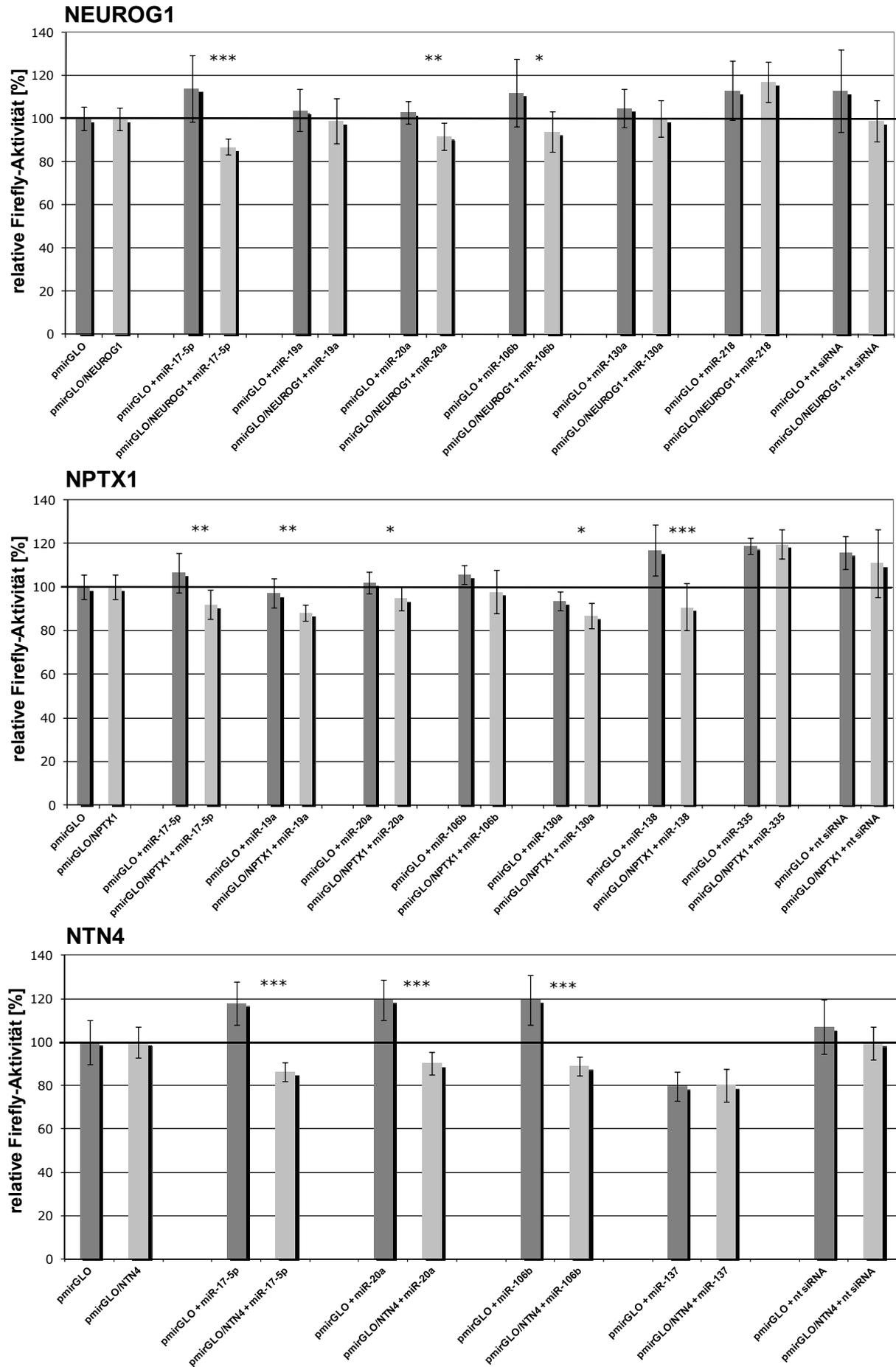


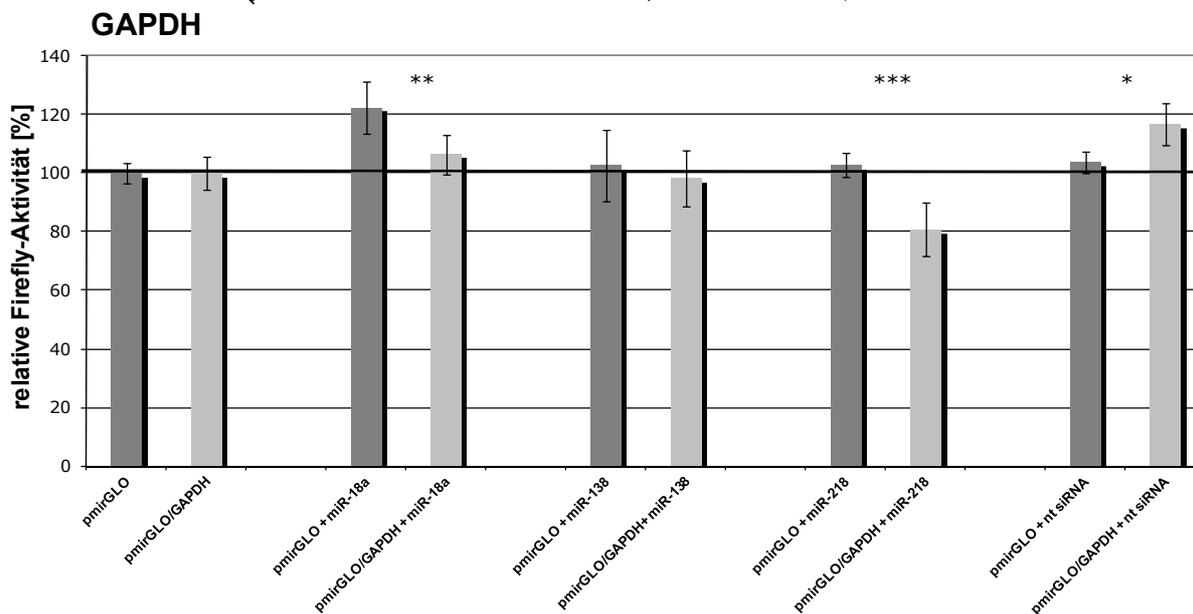
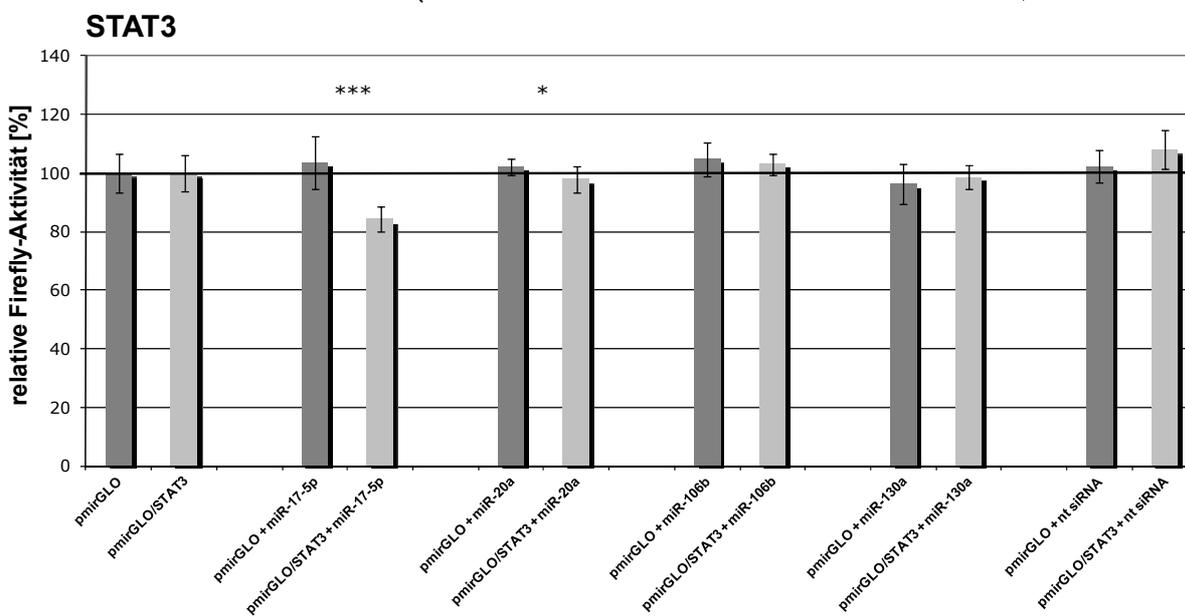
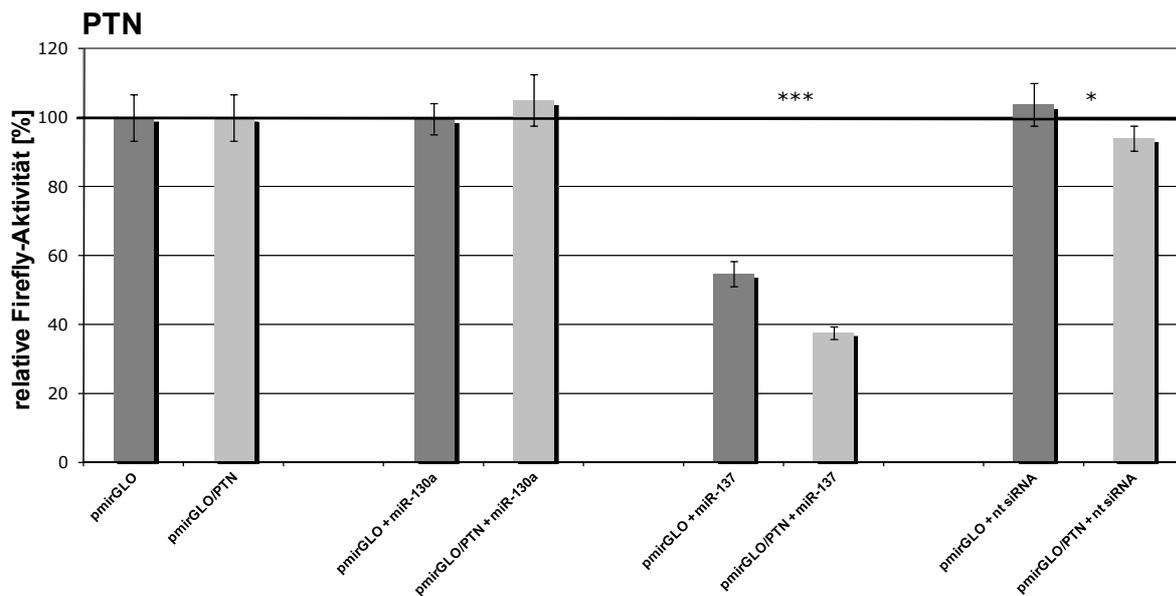
Abbildung 6.11: Experimentelle Validierung der Interaktionen zwischen NRP1 und den microRNAs miR-130a, miR-137 und miR-335. Die dunkelgrauen Säulen stehen für pmirGLO-(Ko-)Transfektionen mit den jeweiligen Mimics, die hellgrauen für (Ko-)Transfektionen von pmirGLO/NRP1-3'UTR. Die Reduktion der relativen Firefly-Aktivitäten zwischen pmirGLO + microRNA-Mimic und pmirGLO/NRP1-3'UTR + microRNA-Mimic ist in Prozent über den zusammengehörigen Säulenpaaren abgebildet und reflektiert die microRNA-Wirkung auf die NRP1-3'UTR. Das letzte Säulenpaar (schwarz) zeigt die Wirkung von miR-137 auf das Konstrukt pmirGLO/137match und fungierte in jedem experimentellen Ansatz als systemische Positivkontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 biologischen mit jeweils 3 technischen Replikaten mitsamt statistischer Analyse. (Student's T-Test, \*, $p < 0,05$ ; \*\*, $p < 0,01$ ; \*\*\*, $p < 0,001$ ).

Da sich für NRP1 bereits abzeichnete, dass die prozentualen Reduktionen der relativen Firefly-Aktivitäten sehr unterschiedlich ausfallen würden, wurde eine Reduktion um  $\geq 20\%$  fortan als positiv gewertet. Im Folgenden werden nun die vollständigen Validierungen aller verbleibenden 11 Proteine dargestellt (Abbildung 6.12).









**Abbildung 6.12: Experimentelle Zielgenvalidierungen ausgesuchter microRNA/Zielgen-Interaktionsvorhersagen.** Dargestellt sind in alphabetischer Reihenfolge die Ergebnisse der Validierungen für **CRIM1, EPHA4, MECP2-1, MECP2-2, NBEA, NEUROD1, NEUROG1, NPTX1, NTN4, PTN, STAT3** und **GAPDH**. Angegeben sind neben dem Name des Proteins, die relativen Firefly-Aktivitäten für pmirGLO + microRNA-Mimic (Ko-)Transfektionen (dunkelgraue Säulen) und pmirGLO/3'UTR + microRNA-Mimic (Ko-)Transfektionen (hellgraue Säulen). Die Reduktion der relativen Firefly-Aktivitäten zwischen pmirGLO + microRNA-Mimic und pmirGLO/3'UTR + microRNA-Mimic ist ein Maß für den regulatorischen Einfluss der microRNA-Mimic. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 biologischen mit jeweils 3 technischen Replikaten mitsamt statistischer Analyse. (Student's T-Test, \*,p<0,05; \*\*,p<0,01; \*\*\*,p<0,001).

Abbildung 6.13 fasst die Ergebnisse in Form einer kreuztabellarischen Darstellung der jeweiligen prozentualen Reduktionen der relativen Firefly-Aktivitäten zusammen. Von insgesamt 71 vorhergesagten und untersuchten microRNA/3'UTR-Interaktionen konnten 23 (32%) mit einer deutlichen Aktivitätsreduktion von ≥20% bestätigt werden. Desweiteren konnten 22 schwache aber statistisch signifikante Effekte (<20%) von microRNAs auf 3'UTRs festgestellt werden, 26 Messungen lieferten kein statistisch signifikantes Ergebnis.

	mir-17	mir-18a	mir-19a	mir-20a	mir-106b	mir-130a	mir-137	mir-138	mir-218	mir-335	microRNAs / 3'-UTR	val. microRNAs / 3'-UTR
MECP2-1	1	2	0	1	1	8		12	2	-5	14	2
MECP2-2			28			10	n/a		31	13		
NEUROD1	12	1	24	-3	2	14	20	62		6	9	3
NBEA	37	30	24	19	29	14	62	25	28		9	7
NPTX1	14		9	7	8	7		22		-1	7	1
EPHA4	20			15	17	-11	n/a	5		1	6	1
NEUROG1	24		5	11	16	5			-4		6	1
CRIM1	17	45		12	11					18	5	1
NRP1						28	36			2	3	2
NTN4	27			25	26		0				4	3
STAT3	19			4	2	-2					4	1
PTN						-6	31				2	1
<b>GAPDH</b>		13						4	21		3	1
<b>pot. Zielproteine / microRNA</b>	9	5	5	9	9	9	5	6	4	6		
<b>val. Zielproteine / microRNA</b>	4	2	3	1	2	1	4	3	3	0		

≤ 5 %  
  > 5 %  
  ≥ 20 %  
  ≥ 30 %

**Abbildung 6.13: Zusammenfassung aller durchgeführten microRNA-Zielgenvalidierungen in HEK293T.** Untersucht wurden die Interaktionen von 10 ausgewählten microRNA-Mimics (miR-17, -18a, -19a, -20a, -106b, -130a, -137, -138, -218, -335) mit 3'UTRs 11 vorhergesagter, neuronal-relevanter Proteine (CRIM1, EPHA4, MECP2, NBEA, NEUROD1, NEUROG1, NPTX1, NRP1, NTN4,

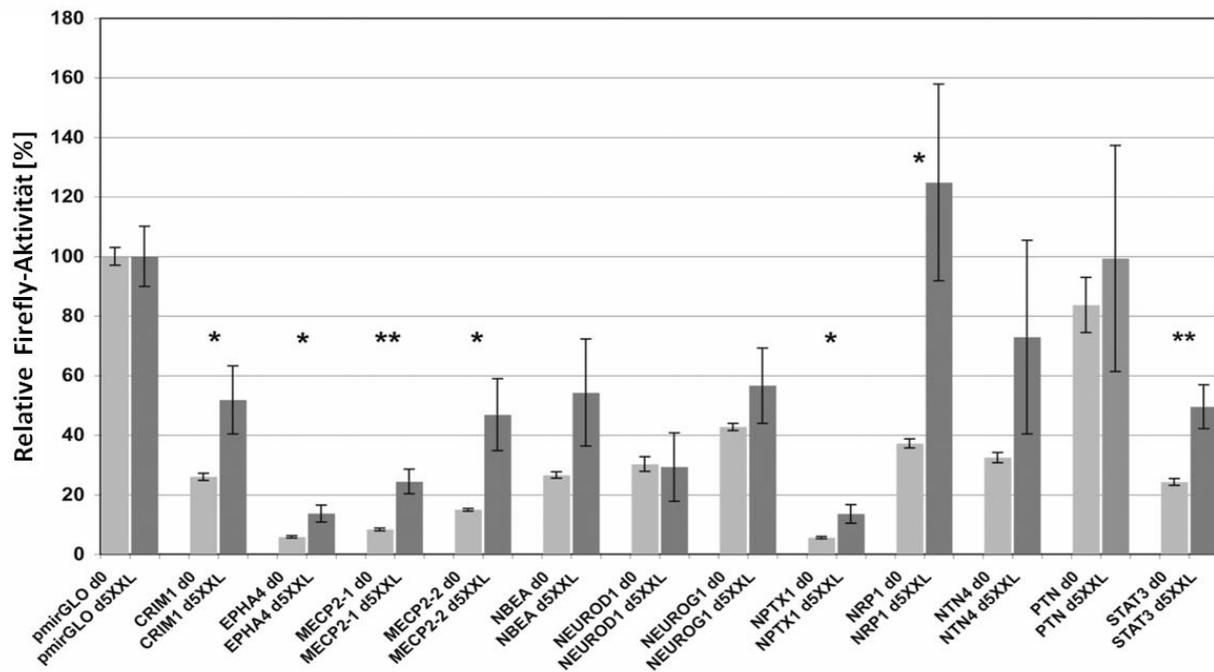
PTN, STAT3) zuzüglich des Housekeeping-Genes GAPDH. In den farbigen Feldern sind die prozentualen Reduktionen (wie in Abbildung 6.11 beschrieben) der normalisierten Firefly-Aktivitäten der pmirGLO/3'UTR + microRNA-Mimic-Kotransfektionen im Vergleich zu den pmirGLO + microRNA-Mimic-Kotransfektionen gezeigt. Rot: kein oder kein signifikanter microRNA-Effekt ( $\leq 5\%$  Firefly-Aktivitätsreduktion), orange: schwacher aber signifikanter microRNA-Effekt ( $> 5\%$ ,  $p \leq 0,05$ ), hellgrün: deutlicher microRNA-Effekt ( $\geq 20\%$ ), dunkelgrün: starker microRNA-Effekt ( $\geq 30\%$ ); n/a: nicht analysiert. Von 71 analysierten individuellen microRNA/3'UTR-Interaktionen wurden 23 also positiv gewertet (hell- und dunkelgrüne Felder).

Mit Ausnahme von STAT3 konnte für jedes der getesteten Proteine eine positive Validierung verzeichnet werden. Der Effekt von miR-17 auf die STAT3-3'UTR fiel jedoch nur sehr knapp mit 1% unter den subjektiv gewählten „Cut-off“ von 20%. Zusammenfassend konnten sehr variable Interaktions-Intensitäten beobachtet werden. Am stärksten waren die Effekte der miR-138 und miR-137 auf NEUROD1 respektive NBEA, mit jeweils 62% relativer Firefly-Aktivitätsreduktion. Die geringste, aber dennoch signifikante Reduktion zeigten miR-20a und miR-130a auf die NPTX1-3'UTR. Für die miR-335 konnte als einzige der getesteten microRNA-Mimics keine positive Validierung nachgewiesen werden, wobei auch hier mit 18% Reduktion bei CRIM1 der „Cut-off“ nur knapp verpasst wurde. Desweiteren konnte keine Korrelation zwischen 3'UTR-Länge, der Anzahl vorhergesagter Bindestellen und der Anzahl positiver Validierungen festgestellt werden. Die meisten nachgewiesenen Interaktionen konnten unter den gewählten Proteinen für miR-17 (4/9) und miR-137 (4/5) festgestellt werden.

#### 6.4 Zeitlicher Verlauf microRNA-vermittelter Translationsrepression

Nachdem nun eine Vielzahl verschiedener netzwerkartiger Interaktionen zwischen dem ausgesuchten Set herunterregulierter microRNAs und einer Auswahl der vorhergesagten neuronal-relevanten Zielgene in HEK293T-Zellen nachgewiesen werden konnten, zielte der nächste Schritt darauf ab, den Einfluss der sich während der XXL-Differenzierung verändernden microRNA-Populationen auf die translationale Effizienz der validierten Zielgene zu messen. Zu diesem Zweck wurden die 3'UTR-Konstrukte aus den Zielgenvalidierungen als Repräsentanten der Proteine in USSC transfiziert und die relativen Luciferase-Aktivitäten vor und 5 Tage nach XXL-Induktion gemessen werden. Für die Zielgene NEUROG1, NTN4 und STAT3 wurden verlängerte, den Großteil der 3'UTR umspannende Konstrukte kloniert, da nicht nur die Effekte der in den Zielgenvalidierungen getesteten microRNAs erfasst werden sollte, sondern die möglichst aller endogen exprimierten microRNAs auf die entsprechende 3'UTR. Da die 18 microRNAs während der Differenzierung herunterreguliert werden und keine microRNAs hochreguliert werden, sollte theoretisch die translationale Hemmung auf die 3'UTRs abnehmen und die relative Firefly-Luciferaseaktivität zunehmen. Da jedoch die USSC während der XXL-Behandlung stark in

die Apoptose gehen und die Zahl der überlebenden Zellen bereits an Tag 5 deutlich abnahm, wurde für die Messungen die Linie SA5/03 gewählt. Sie zeigte eine vergleichsweise geringere Apoptoserate nach 5 Tagen XXL-Induktion, dennoch war eine Ausweitung der Messung auf einen späteren Zeitpunkt nicht möglich.



**Abbildung 6.14: Effekte endogener microRNAs der USSC-Linie SA5/03 auf die 3'UTRs vorhergesagter Zielgene während der XXL-Differenzierung.** PmirGLO/3'UTR-Konstrukte wurden in die USSC transfiziert welche anschließend 5 Tage lang mit XXL andifferenziert wurden. Gezeigt sind die normalisierten Firefly-Aktivitäten von pmirGLO sowie der 3'UTR-Konstrukte. Diese wurden in nativen (d0, hellgrau) sowie andifferenzierten (d5, dunkelgrau) Zellen gemessen und zueinander in Bezug gesetzt, der Messwert für pmirGLO bildet hier jeweils die Referenz. Die Ergebnisse setzten sich aus 3 biologischen Experimenten mit jeweils mindestens drei technischen Replikaten zusammen. Gezeigt ist außerdem der SEM (standard error of the mean) und die statistische Signifikanz (Student's T-Test, unpaired, \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ).

Abbildung 6.14 zeigt die relativen Firefly-Aktivitäten der einzelnen 3'UTRs gemessen 24 h nach Transfektion und vor XXL-Induktion, sowie die Werte 5 Tage nach XXL-Induktion. Die Werte für pmirGLO wurden wie bei den Validierungen auf 100% gesetzt, sie normalisieren den Effekt der endogenen microRNA-Wirkung auf die Luciferasen. Vergleich man nun die Messungen der nativen Zellen mit denen nach 5 Tagen Differenzierung, so stellte man bei allen 3'UTR-Konstrukten (bis auf NEUROD1) fest, dass sich die relative Firefly-Aktivität erhöht hatte. Bereits nach einer vergleichsweise kurzen Differenzierungszeit von 5 Tagen konnte bei 7 von 12 gemessenen 3'UTRs (CRIM1, EPHA4, MECP2-1 und -2, NPTX1, NRP1 und STAT3) eine statistisch signifikante Erhöhung der relativen Firefly-Aktivität festgestellt werden. Diese Tendenz war für alle Konstrukte außer NEUROD1 zu sehen, jedoch nur bei den genannten Konstrukten statistisch signifikant. Diese Beobachtungen stehen in Einklang

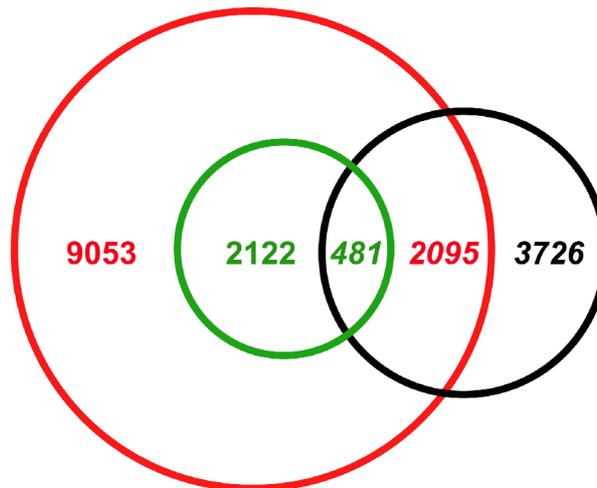
mit einer Reduktion der microRNA-vermittelten Translationshemmung im Zuge der XXL-Differenzierung.

## 6.5 Globale Genexpressionsanalyse

Nachdem die Analysen der differentiellen microRNA-Expression in USSC und XXL-USSC und die experimentellen Validierungen neuronal relevanter Zielgene ergaben, dass die differentielle microRNA-Expression auf eine Verminderung microRNA-vermittelter translationaler Repression hindeutet, sollte nun durch eine globale Transkriptom-Analyse geklärt werden, ob parallel neuronal relevante Gene in XXL-USSC transkriptionell aktiviert werden. Hierbei kam die CHIP-Hybridisations-Plattform der Firma Illumina zum Einsatz; die weitere Aufarbeitung der in dieser Arbeit präparierten RNAs, sowie die eigentliche Hybridisation und Auswertung wurden von Frau Dr. Sandra Weinhold im Rahmen eines größeren Projektes zur globalen Transkriptionsanalyse verschiedener somatischer Stammzellen in Kooperation mit und in dem Labor von Dr. James Adjaye (MPI Berlin) angefertigt. Als Ausgangsmaterial dienten die Fraktionen langer RNA (>200 Basen) welche im Rahmen der Präparationen kleiner RNA-Fraktionen für die microRNA-Analysen dieser Arbeit gewonnen wurden (Material und Methoden, Abschnitt 5.2.1.1).

Es wurde das Transkriptom nativer USSC (SA5/03, SA5/73, SA8/25) sowie die mRNA-Expression von XXL-USSC (SA5/03, SA5/73, je Tag 14; SA8/25, Tage 14 und 28) analysiert. Da lediglich die differentielle Transkriptomanalyse der Linie SA5/73 auswertbare Ergebnisse erbrachte, werden im Folgenden nur die Daten dieser Linie besprochen.

In nativen Zellen wurden ca. 17.000 Gene exprimiert vorgefunden, 3726 davon wurden während der XXL-Differenzierung um den Faktor  $\geq 2$  heraufreguliert. Vergleichende Analysen der 9053 *in silico* vorhergesagten Zielgene (UNION) für die 18 herunterregulierten microRNAs und der 3726 heraufregulierten Gene in XXL-USSC ergaben eine Schnittmenge von 2095 Genen (Abbildung 6.15). Dies entspricht 23,1% aller vorhergesagten und 56% der in XXL-USSC heraufregulierten Gene. Betrachtet man die Unterguppe der 2122 nach 8-GO-Terms gefilterten Gene, so finden sich 481 (22,7%) unter den in XXL hochregulierten Transkripten (Abbildung 6.15). Unter den 711 stringenter nach 5-GO-Terms gefilterten Zielgenen finden sich immerhin noch 125 (17,6%) in XXL-USSC hochregulierte mRNAs. Alle Schnittmengen aus vorhergesagten und hochregulierten Genen stellen je eine statistisch signifikante Anreicherung vorhergesagter Zielgene in der Gruppe hochregulierter Transkripte dar (UNION:  $p \leq 0,001$ ; 8-GO-Terms:  $p \leq 0,001$ ; 5-GO-Terms:  $p \leq 0,05$ , hypergeometrische Verteilung, Fabian Kruse, Labor für molekulare Neurobiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf).



**Abbildung 6.15: Schnittmengen zwischen vorhergesagten microRNA-Zielgenen und tatsächlich während XXL-Differenzierung in SA5/73 heraufregulierter Gene.** Insgesamt wurden 3726 Gene in XXL-USSC der Linie SA5/73 hochreguliert vorgefunden (schwarzer Kreis). Aus der Gesamtsumme von 9053 für die 18 microRNAs vorhergesagten Zielgenen (roter Kreis), waren 2095 tatsächlich hochreguliert. In der Untergruppe von 2122 nach 8-GO-Terms gefilterten vorhergesagten Zielgenen (grüner Kreis) wurden 481 in XXL-USSC hochreguliert.

Wie aus Abbildung 6.16 hervorgeht, wurden von den 11 in den experimentellen Zielgenvalidierungen analysierten Genen fünf (PTN, STAT3, NRP1, NTN4, NPTX1) hochreguliert gefunden, die verbliebenen 6 (CRIM1, EPHA4, MECP2, NBEA, NEUROD1, NEUROG1) zeigten keine signifikante Expressionsänderung. GAPDH wurde, wie erwartet, nur sehr geringfügig hochreguliert (1,6-fach).

Nur eine bemerkenswert kleine Gruppe von 115 Genen wurde in XXL-USSC SA5/73 gegenüber den nativen Zellen um einen Faktor  $\geq 2$  herunterreguliert gefunden. Die Analyse der biologischen Funktion mittels der DAVID-Datenbank ergab, dass 37% dieser Gruppe den „Cell Cycle“, „Cell Proliferation“ und weiteren Zellzyklus-verwandten GO-Terms zugeordnet werden konnten. Die Integration der herunterregulierten Gene in KEGG-Pathways ergab, dass der Pathway „Cell Cycle“ die meisten Proteine aus der Gruppen der herunterregulierten Transkripte auf sich vereinigen konnte. Zu den am stärksten reprimierten Genen gehörten Mitglieder der Cyclin-Familie und der Cyclin-abhängigen Kinasen.

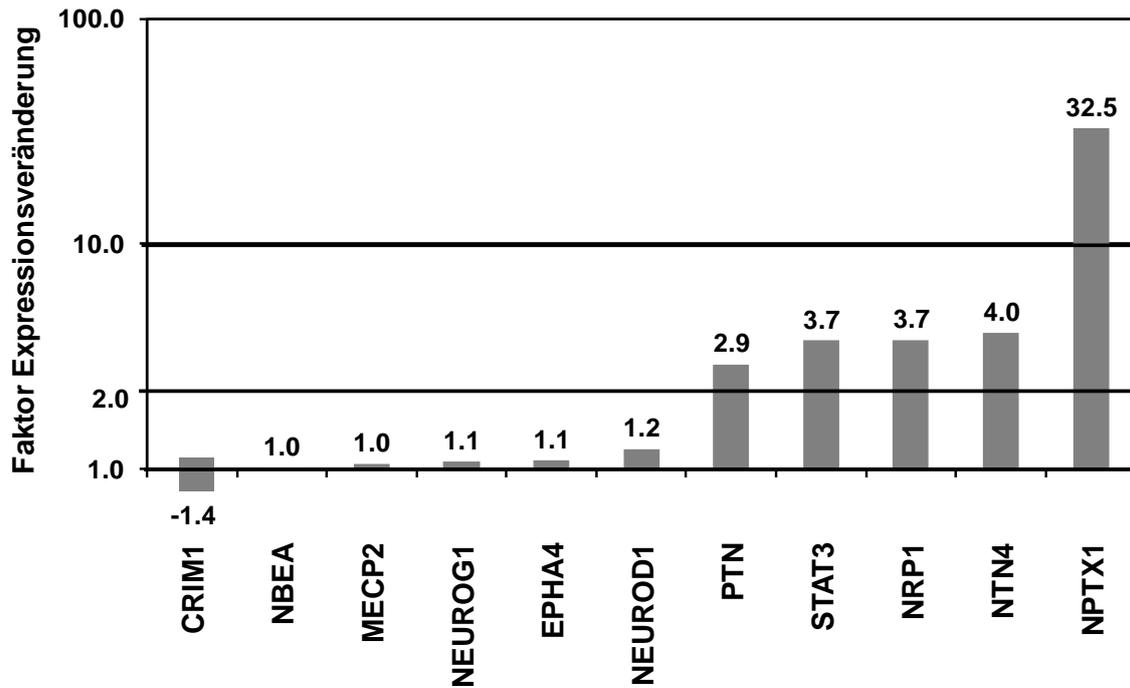


Abbildung 6.16: Analyse der 11 validierten microRNA-Zielgene in SA5/73 an d0 und d14 XXL, mittels Illumina-Array. Gezeigt ist die Expressionsveränderung der 11 für die Validierungen ausgewählten microRNA-Zielgene in logarithmischer Skalierung während der 14-tägigen XXL-Differenzierung der Linie SA5/73.

## 6.6 Funktionale Analyse von 10 ausgewählten microRNAs

Um die funktionalen Aspekte der oben beschriebenen microRNAs im Kontext der neuronalen Differenzierung von USSC näher beleuchten zu können, erschien es unabdingbar, die Quantifizierung neuronal differenzierter USSC, welche bis dato nur durch morphologische Inspektion und Expressionsanalyse der neuronalen Marker NEF und TUB erfolgt war, auf eine breitere Basis zu stellen. Der humane „Neurogenesis and Neural Stem Cell PCR Array“ (SA Biosciences) ermöglicht die parallele Analyse der Transkription von 84 hierfür relevanten Genen mittels quantitativer PCR. Dies erlaubt einen tieferen Einblick in die neuronale Differenzierung von USSC und bietet die Möglichkeit Reaktionen der Zelle auf exogene Manipulationen wie siRNA-, microRNA- und Protein-Überexpressionen genauer zu erfassen.

### 6.6.1 Genexpression im Zuge der neuronalen Differenzierung

Im ersten Abschnitt wurden zunächst native USSC und XXL-USSC dieser Analyse unterworfen. Hierfür wurde die Linie SA5/03 wegen ihrer geringeren Apoptoserate in drei biologischen Replikaten für 5 bis 7 Tage mit XXL-andifferenziert. Da sich Differenzierungsprozesse nicht immer mit gleicher Kinetik entwickeln, mussten die Differenzierungsansätze täglich beobachtet werden. Es musste ein Kompromiss gefunden werden zwischen möglichst langer Differenzierungszeit und einer dennoch ausreichenden

Lebendzellzahl für total-RNA-Präparation. Es stellte sich heraus, dass dies die Tage 5 bzw. 7 (2x d5 und 1x d7) nach XXL-Induktion waren. Zu späteren Zeitpunkten wären die Apoptoseraten zu hoch um noch genügende RNA-Mengen isolieren zu können.

Die total-RNA-Präparation nativer Zellen erfolgte aus 20 Wells 24 h nach Aussaat mittels RNeasy Mini Kit (Abschnitt 5.2.1.2). Nach weiteren 24 h wurde die neuronale Differenzierung mittels XXL-Medium induziert und nach 5 bis 7 Tagen ein weiteres Mal total-RNA aus 20-22 Wells präpariert. Nach reverser Transkription und anschließender qPCR wurden die Ergebnisse mittels SDS2.3 Software, sowie der SA-Biosciences-eigenen, Web-basierten Software analysiert und ausgewertet. Die Cts wurden für jedes Gen aus drei Replikaten gemittelt und zur Normalisierung der Mittelwert fünf verschiedener Housekeeping-Gene (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB) herangezogen. Hierüber wurden dann die dCTs ermittelt. Gemäß Herstellerempfehlungen zählten Gene mit einem Ct<35 als exprimiert.

<b>ACHE</b> 6,79 0,026751	<b>ADORA1</b> -11,85 0,1242029	<b>ADORA2A</b> 2,01 0,025475	<b>ALK</b> 1,07	<b>APBB1</b> 1,49	<b>APOE</b> 1,57	<b>ARNT2</b> -5,4 0,010958	<b>ARTN</b> -2,06 0,1505164	<del>ASCL1</del>	<b>BAI1</b> 1,35	<b>BDNF</b> 2,01 0,1487399	<del>BMP15</del>
<b>BMP2</b> 1276,01 0,1262932	<del>BMP4</del>	<b>BMP8B</b> -1,04	<b>CDK5R1</b> 1,18	<b>CDK5RAP1</b> 1,37	<b>CDK5RAP2</b> -1,49	<b>CDK5RAP3</b> 1,19	<b>CHRM2</b> 2,36 0,2169035	<b>CXCL1</b> 16,28 0,0685654	<b>DLG4</b> 1,8	<b>DLL1</b> 2,64 0,093101	<b>DRD1</b> 1,1
<del>DRD2</del>	<b>DVL3</b> 1,18	<b>EFNB1</b> 1,57	<b>EGF</b> -1,27	<b>EP300</b> 1,16	<b>ERBB2</b> -1,05	<b>FEZ1</b> 1,7	<del>FGF13</del>	<b>FGF2</b> 6,38 0,024411	<b>FLNA</b> -2,14 0,035854	<b>GDNF</b> -1,26	<b>GNAO1</b> -1,43
<b>GPI</b> 1,6	<del>GRIN1</del>	<b>HDAC4</b> 2,06 0,041475	<b>HDAC7</b> -1,69	<b>HES1</b> 1,46	<b>HEY1</b> -1,11	<b>HEY2</b> 4,34 0,000977	<b>HEYL</b> 1,75	<b>IL3</b> 2,67 0,1327601	<b>INHBA</b> 7,71 0,0816618	<b>MDK</b> 2,21 0,0541833	<b>MEF2C</b> 2,32 0,2811899
<b>MLL</b> -1,14	<b>NCOA6</b> -2,15 0,000465	<b>NDN</b> 1,87	<b>NDP</b> -1,94	<del>NEUROD1</del>	<b>NOG</b> -2,29 0,1813431	<b>NOTCH2</b> 5,12 0,022864	<b>NPTX1</b> 35,11 0,0521538	<b>NRCAM</b> 1,78	<b>NRG1</b> 1,4	<b>NRP1</b> 2,11 0,0606524	<b>NRP2</b> 5,13 0,004888
<b>NTN1</b> 1,53	<b>ODZ1</b> 1,55	<b>PAFAH1B1</b> -1,33	<b>PARD3</b> 2,12 0,0783325	<b>PARD6B</b> -1,04	<del>PAX3</del>	<b>PAX5</b> 1,38	<b>PAX6</b> 1,43	<b>POU3F3</b> 2,88 0,1279466	<del>POU4F1</del>	<b>PTN</b> 1,39	<b>RAC1</b> -1,06
<b>ROBO1</b> 7,07 0,001142	<b>RTN4</b> -1,63	<b>S100A6</b> -3,79 0,005538	<b>S100B</b> 1,26	<b>SEMA4D</b> -1,18	<b>SHH</b> 28,4 0,2984907	<b>SLIT2</b> -1,14	<b>SOX8</b> 7,63 0,030683	<b>STAT3</b> 2,13 0,0930962	<del>TNR</del>	<b>VEGFA</b> 9,92 0,001457	<b>YWHAH</b> -4,12 0,005163

**Abbildung 6.17: Darstellung der differentiellen Expression neuronal relevanter Gene in XXL-differenzierten USSC verglichen mit nativen Zellen.** Gemessen wurde die Expression mittels des „human Neurogenesis and neural Stem Cell Array“ (SA Biosciences). In jedem Feld ist das offizielle Gensymbol des untersuchten Gens, darunter (bei exprimierten Genen) der Faktor der Expressionsveränderung in XXL-USSC verglichen mit nativen USSC und darunter wiederum der p-Value (bei einer differentiellen Expression) dargestellt. 25 Gene wurden hochreguliert (grün markiert), 8 Gene wurden herunterreguliert (orange) gefunden. Nicht differentiell exprimierte Gene sind nicht farbmakiert und nicht exprimierte Gene mit einem roten Kreuz gekennzeichnet. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen biologischen Replikaten dar und wurden über den Mittelwert von fünf Housekeeping-Genen normalisiert.

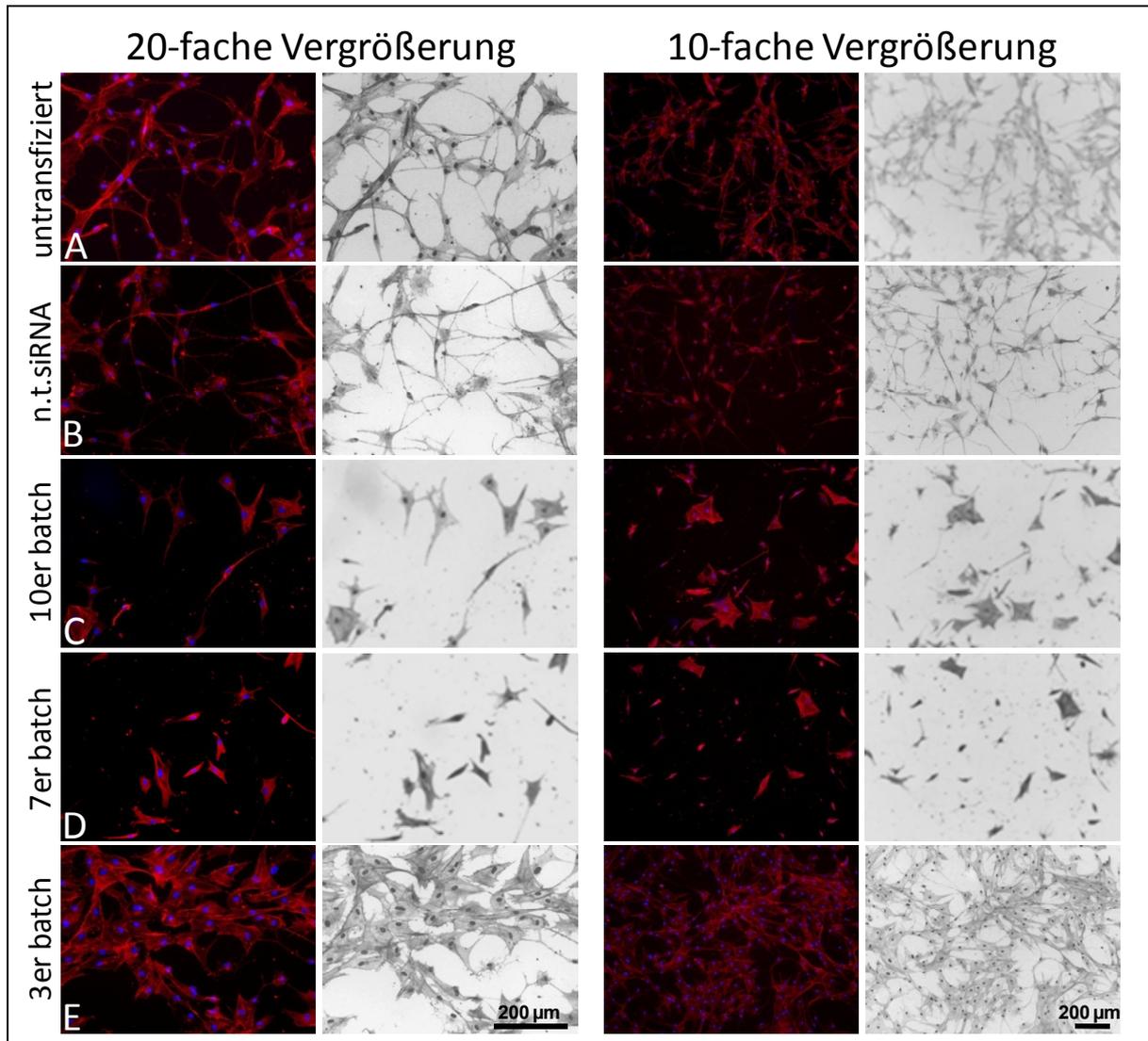
In Abbildung 6.17 ist in Form einer einfachen Heatmap der Faktor der Expressionsveränderung in nativen und XXL-differenzierten Zellen dargestellt. Gene mit einer Expressionsveränderungen  $\geq |2|$  wurden als differentiell exprimiert angesehen. Unter den am stärksten hochregulierten Genen finden sich BMP2 (Faktor 1276), NPTX1 (35x),

SHH (28x), CXCL1 (16x) und VEGFA (9,9x), am deutlichsten herunterreguliert wurde ADORA1. Die Gene ASCL1, BMP15, BMP4, DRD2, FGF13, GRIN1, NeuroD1, Pax3, POU4F1 und TNR waren nicht exprimiert.

### 6.6.2 Einfluss von microRNA-Mimics auf die XXL-Differenzierung von USSC

Im zweiten Schritt sollte nun der regulatorische Einfluss der 10 aus den Validierungen bekannten microRNA-Mimics auf die XXL-Differenzierung von USSC-Linie SA5/03 untersucht werden. Hierfür wurden drei microRNA-Mimic-Gruppen ausgewählt: die erste Gruppe umfasste alle 10 microRNA-Mimics (miR-17, -18a, -19a, -20a, -106b, -130a, -137, -138, -218, -335, genannt „10er-batch“), die zweite Gruppe setzte sich aus 7 Mimics zusammen (miR-18a, -19a, -130a, -137, -138, -218, -335, genannt „7er-batch“) und die dritte Gruppe bestand aus 3 Mimics (miR-17, -20a, -106b, genannt „3er-batch“). Mit dem 10er-batch sollte zunächst der regulatorische Einfluss aller microRNA-Mimics zusammen untersucht werden. Hinter der Zusammenstellung der beiden Subgruppen verbirgt sich der Gedanke, eine erste grobe Unterteilung der microRNAs in funktionale Gruppen vorzunehmen. So ist für die microRNAs des 3er-batches bereits bekannt, dass sie wichtige regulatorische Funktionen in der Zellzyklus-Progression ausüben, indem sie die Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F erhöhen und somit die G1/S-Transition promovieren [73]. Da die USSC während der XXL-vermittelten neuronalen Differenzierung nach ca. 24 h in einen abrupten Zellzyklus-Arrest eintreten, war es eine interessante Fragestellung ob diese microRNAs einen Einfluss auf den Arrest haben würden und welche Auswirkungen dies auf die Differenzierung haben könnte. Zu diesem Zweck beinhaltete der 7er-batch alle microRNA-Mimics des 10er-batches, abzüglich der miR-17, -20a und 106b des 3er-batches. Alle microRNA-Mimics wurden jeweils equimolar eingesetzt. Um unspezifische Effekte der exogenen RNA-Moleküle auf die neuronale Differenzierung ermessen zu können, wurde die n.t.siRNA als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

Wie im Abschnitt 6.6.1 wurden hier ebenfalls drei biologische Replikate aller vier Differenzierungsansätze angefertigt und die identischen Differenzierungsbedingungen eingehalten. Die plattierten Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit 10 pmol n.t.siRNA bzw. 1pmol je microRNA-Mimic und Well transfiziert, weitere 24 h später dann mit XXL-Medium induziert und für 5-7 Tage differenziert. Aus 22 (n.t.siRNA- und 3er-batch-Ansätze) bzw. 32 Wells (10er- und 7er-batch-Ansätze) wurde total-RNA präpariert. Zusätzlich zu den qPCR-Analysen wurden je Bedingung 3 Deckgläschen fixiert und mit DAPI und mit Fluoreszenzmarkierten  $\beta$ -Actin-Antikörpern angefärbt um morphologische Veränderungen sichtbar machen zu können.



**Abbildung 6.18:** Darstellung der microRNA-Mimic-vermittelten morphologischen Unterschiede der USSC-Linie SA5/03 nach 5 Tagen XXL-Differenzierung. Die beiden linken Spalten zeigen Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung und die rechten beiden zeigen Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung. Für die Bedingung **(A)** untransfizierte, **(B)** n.t.siRNA transfiziert, **(C)** 10er-batch transfiziert, **(D)** 7er-batch und **(E)** 3er-batch transfizierte Zellen sind zwei Fotos in je zwei Varianten gezeigt: links ist das IF-Bild zu sehen, rechts daneben ein schwarz/weiß-Negativ desselben Bildes um die Konturen der Zellen besser erkennen zu können. Gefärbt wurde mit DAPI und anti- $\beta$ -Actin-Antikörpern.

Die Abbildung 6.18 zeigt exemplarisch die Ergebnisse dieser Färbungen nach 5 Tagen XXL-Differenzierung. Die untransfizierten und mit n.t.siRNA-transfizierten Zellen zeigten nach dieser kurzen Differenzierungsdauer bereits deutliche neuronale Morphologien. Die Zellkörper erschienen kompakt und bildeten lange, zum Teil verzweigte und vernetzte Ausläuferstrukturen. Wie erhofft, zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede in Morphologie und Zelldichte zwischen der untransfizierten Referenz und der Negativ-Kontrolle. Betrachtete man dagegen den 10er-batch bzw. ebenso den 7er-batch, so wurden dramatische Veränderungen in der Morphologie als auch der Zelldichte sichtbar. Die

wenigen, verbliebenen Zellen hatten ein sehr uneinheitliches Erscheinungsbild. Manche Zellen wiesen eine flache, breite Struktur auf, andere wiederum hatten sehr kleine Zellkörper, einige spindelförmig, manche rundlich und bildeten keine bzw. nur sehr wenige Ausläuferstrukturen. Betrachtete man nun die Zellen des 3er-batches, so zeigte sich wiederum ein anderes Bild. Die Zelldichte war augenscheinlich etwas höher als in den Kontroll-Differenzierungen und die Zellen wiesen eine ähnliche Morphologie wie proliferierende USSC auf. Die Zellkörper erschienen groß, flach und durchscheinend und bildeten nur vereinzelt Ausläuferstrukturen aus. Die in der IF sichtbaren Zelldichteunterschiede spiegelten sich ebenfalls in den extrahierten RNA-Ausbeute je Well wieder (Daten nicht gezeigt).

Betrachtete man nun die Transkript-Expressionen in den mit n.t.siRNA-transfizierten XXL-USSC, so stellte sich heraus, dass sich - bis auf die Ausnahme von GNAO1 - im Vergleich zur untransfizierten Referenz, keine differentiell exprimierten Gene fanden. In Abbildung 6.19 ist dies in Form der oben bereits eingeführten, einfachen Heatmap dargestellt. Dies entsprach dem Bild, dass sich bereits in den Immunfluoreszenzanalysen abzeichnete: sowohl untransfizierte als auch mit n.t.siRNA transfizierte Zellen schienen in ihrer Morphologie und Expression neuronal relevanter Gene identisch, die exogen zugeführten microRNA-Mimics schienen die Zellen nicht zu beeinträchtigen.

ACHE -1.14	ADORA1 1.66	ADORA2A -1.01	ALK 1.18	APBB1 1.26	APOE -1.12	ARNT2 1.05	ARTN 1.45	<del>ASCL1</del>	BAI1 1.82	BDNF 1.1	<del>BMP15</del>
BMP2 1.24	<del>BMP4</del>	BMP8B -1.03	CDK5R1 1.02	CDK5RAP1 -1.19	CDK5RAP2 1.14	CDK5RAP3 1.27	CHRM2 -1.01	CXCL1 1.52	DLG4 1.07	DLL1 -1.84	DRD1 1.08
<del>DRD2</del>	DVL3 1.14	EFNB1 1.08	EGF 1.12	EP300 1.05	ERBB2 -1.34	FEZ1 -1	<del>FGF13</del>	FGF2 1.36	FLNA -1.26	GDNF 1.22	GNAO1 -2 0.157913
GPI 1.1	<del>GRIN1</del>	HDAC4 1.2	HDAC7 1.08	HES1 -1.15	HEY1 1.23	HEY2 -1.07	HEYL 1.08	IL3 1.03	INHBA 1.13	MDK -1.58	MEF2C 1.07
MLL -1.06	NCOA6 1.06	NDN 1.12	NDP 1.45	<del>NEUROD1</del>	<del>NOG</del>	NOTCH2 1.01	NPTX1 -1.04	NRCAM 1.54	NRG1 1.37	NRP1 -1.01	NRP2 1.11
NTN1 -1.18	ODZ1 1.17	PAFAH1B1 1.35	PARD3 -1.08	PARD6B 1.84	<del>PAX3</del>	PAX5 1.11	PAX6 1.11	POU3F3 -1.26	<del>POU4F1</del>	PTN -1.02	RAC1 -1.07
ROBO1 1.35	RTN4 1.05	S100A6 1.06	S100B -1.25	<del>SEMA4D</del>	SHH 1.18	SLIT2 -1.34	SOX8 1.1	STAT3 -1.2	<del>TNR</del>	VEGFA -1.14	YWHAH 1

Abbildung 6.19: Expressionsvergleich n.t.siRNA-transfizierter XXL-USSC mit untransfizierten XXL-USSC. Details zur Symbolik siehe Abbildung 6.17. In orange markiert ist das einzige herunterregulierte Gen. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen biologischen Replikaten dar und wurden über den Mittelwert von fünf house-keeping-Genen normalisiert.

Erweitert man die Vergleiche auf die drei Batch-Varianten, so stellte man fest, dass sich die teilweise drastischen morphologischen Veränderungen nicht in der Transkription der betrachteten Gene zum gewählten Zeitpunkt niederschlugen. Die nachfolgende Abbildung 6.20 (A-C) zeigt die Transkriptionsunterschiede der drei verschiedenen batch-transfizierten XXL-USSC-Populationen verglichen mit der untransfizierten Referenz-Differenzierung. Für die 10er-batch-Transfektanden ergaben sich zwei hoch- (APOE, NPTX1) und drei herunter regulierte Gene (CXCL1, NDP, NRG1), 11 Gene wurden nicht exprimiert.

**A**

ACHE 1,34	ADORA1 1,91	ADORA2A 1,19	ALK -1,14	APBB1 1,2	APOE 5,23 0,193927	ARNT2 -1,3	ARTN -1,01	ASCL1	BAI1 1,48	BDNF -1,21	BMP15
BMP2 -1,2	BMP4	BMP8B -1,35	CDK5R1 -1,23	CDK5RAP1 -1,4	CDK5RAP2 -1,37	CDK5RAP3 -1,06	CHRM2 -1,14	CXCL1 -3,89 0,198799	DLG4 -1,09	DLL1 -1,35	DRD1 1
DRD2	DVL3 1,1	EFNB1 1,1	EGF -1,48	EP300 -1,11	ERBB2 -1,46	FEZ1 -1,35	FGF13	FGF2 -1,02	FLNA -1,3	GDNF 1,11	GNAO1 -1,55
GPI 1,07	GRIN1	HDAC4 -1,08	HDAC7 1,03	HES1 -1,01	HEY1 1,62	HEY2 -1,04	HEYL -1,27	IL3 -1,28	INHBA -1,46	MDK -1,04	MEF2C -1,76
MLL -1,14	NCOA6 -1,02	NDN -1,27	NDP -2,64 0,353873	NEUROD1	NOG	NOTCH2 -1,23	NPTX1 2,03 0,205826	NRCAM 1,91	NRG1 -2,23 0,066056	NRP1 -1,46	NRP2 1,52
NTN1 1,11	ODZ1 1,07	PAFAH1B1 1,21	PARD3 -1,25	PARD6B 1,67	PAX3	PAX5 -1,12	PAX6 1,24	POU3F3 -1,23	POU4F1	PTN -1,12	RAC1 -1,05
ROBO1 1,04	RTN4 1,04	S100A6 1,22	S100B -1,17	SEMA4D 1,28	SHH -1,09	SLIT2 -1,31	SOX8 -1,24	STAT3 -1,03	TNR	VEGFA -1,54	YWHAH 1,36

**B**

ACHE 1,96	ADORA1 1,71	ADORA2A -1,18	ALK -1,56	APBB1 1,07	APOE 2,06 0,16648	ARNT2 -1,22	ARTN 1,21	ASCL1	BAI1 1,3	BDNF -1,3	BMP15
BMP2 1,13	BMP4	BMP8B 1,11	CDK5R1 -1,15	CDK5RAP1 -1,22	CDK5RAP2 -1,04	CDK5RAP3 -1,05	CHRM2 -1,1	CXCL1 -5,38 0,116983	DLG4 -1,06	DLL1 1,06	DRD1 1,08
DRD2	DVL3 1,06	EFNB1 -1,13	EGF 1,51	EP300 -1,1	ERBB2 -1,25	FEZ1 1,07	FGF13	FGF2 -1,05	FLNA 1,06	GDNF -1,37	GNAO1 1,35
GPI -1,17	GRIN1	HDAC4 -1,16	HDAC7 -1,03	HES1 -1,4	HEY1 3,27 0,296407	HEY2 -1,11	HEYL -1,2	IL3 -1,75	INHBA -1,6	MDK -1,61	MEF2C -1,25
MLL -1,33	NCOA6 -1,03	NDN -1,06	NDP -1,36	NEUROD1	NOG	NOTCH2 1,06	NPTX1 1,98	NRCAM 2,33 0,282305	NRG1 -3,01 0,050583	NRP1 -1,41	NRP2 1,62
NTN1 -1,01	ODZ1 1,11	PAFAH1B1 1,05	PARD3 -1,28	PARD6B 1,29	PAX3	PAX5 -1,25	PAX6 1,17	POU3F3 -1,66	POU4F1	PTN -2,21 0,191579	RAC1 1,02
ROBO1 -1,31	RTN4 -1,02	S100A6 1,28	S100B 1,02	SEMA4D -1,29	SHH 1,59	SLIT2 -1,22	SOX8 -1,12	STAT3 1,17	TNR	VEGFA -1,29	YWHAH 1,48

ACHE -1.28	<del>ADORA1</del>	ADORA2A 1.28	ALK -1.22	APBB1 1.11	APOE 5.24 0.086181	ARNT2 1.15	ARTN 1.02	<del>ASCL1</del>	BAI1 1.4	BDNF 1.25	<del>BMP15</del>
BMP2 -1.85	<del>BMP4</del>	BMP8B -1.24	CDK5R1 1	CDK5RAP1 -1.13	CDK5RAP2 1.08	CDK5RAP3 -1.02	CHRM2 -1.13	CXCL1 1.85	DLG4 1.06	DLL1 -1.07	DRD1 1.03
<del>DRD2</del>	DVL3 1.09	EFNB1 1.11	EGF 1.06	EP300 1.05	ERBB2 1.03	FEZ1 1.01	<del>FGF13</del>	FGF2 -1.08	FLNA 1.16	GDNF 1.22	GNAO1 -1.53
GPI -1.06	<del>GRIN1</del>	HDAC4 -1.14	HDAC7 1.04	HES1 1.73	HEY1 2.33 0.009451	HEY2 1.6	HEYL -1.09	IL3 -1.14	INHBA -1.12	MDK 2.46 0.069042	MEF2C -1.09
MLL -1.14	NCOA6 1.06	NDN -1.14	NDP -1.14	<del>NEUROD1</del>	<del>NOG</del>	NOTCH2 -1.39	NPTX1 -1.09	NRCAM -1.05	NRG1 -1.21	NRP1 1.02	NRP2 -1.63
NTN1 -1.21	ODZ1 -1.14	PAFAH1B1 -1.02	PARD3 1.02	PARD6B 1.91	<del>PAX3</del>	PAX5 -1.16	PAX6 -1.05	POU3F3 -1.26	<del>POU4F1</del>	PTN -1.14	RAC1 -1.01
ROBO1 -1.06	RTN4 1.18	S100A6 -1.47	S100B -1.91	<del>SEMA4D</del>	SHH 1.11	SLIT2 1.14	SOX8 1.35	STAT3 -1.04	<del>TNR</del>	VEGFA -1.18	YWHAH -1.12

Abbildung 6.20: Darstellung der Transkriptions-Veränderungen in microRNA-Mimic-transfizierten und XXL-differenzierten USSC. Gezeigt sind die (A) 10er-batch-transfizierten, (B) 7er-batch-transfizierten und (C) 3er-batch-transfizierten XXL-USSC verglichen mit untransfizierten XXL-USSC. Für Symbolik-Details siehe Abbildung 6.17. Die angegebenen Faktoren stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen biologischen Replikaten dar und wurden über den Mittelwert von fünf house-keeping-Genen normalisiert.

Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich für die beiden anderen transfizierten USSC-Populationen: Bei den 7er-batch-Transfektanden fanden sich drei hochregulierte (APOE, HEY1, NRCAM) und drei herunterregulierte Transkripte (CXCL1, NRG1, PTN), für die 3er-batch-Transfektanden ergaben sich nur drei hochregulierte Transkripte (APOE, HEY1, MDK). Das Transkript von APOE fand sich wie für den 10er-batch auch in den 7er- und 3er-batch Transfektanden hochreguliert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der beschriebenen Experimente, dass microRNAs in deutlichem Umfang an der neuronalen Differenzierung von USSC beteiligt sind. Wenngleich weniger als singuläre Schalter fungierend, sondern offensichtlich in einem komplexen Netzwerk agierend, konnten eine ganze Serie von microRNAs identifiziert werden, deren differentielle Expression deutlichen Einfluss auf die Expression neuronal relevanter Zielgene zu nehmen vermag. Dies zeigt, dass die differenzierende Zelle hier koordinierte Regulationen auf microRNA-Ebene vornimmt, die es ermöglichen, ganze Gruppen neuronal relevanter Zielgene „freizuschalten“.

Die in den Abbildungen 6.1 bis 6.16 dargestellten Ergebnisse gelangten bereits zur Veröffentlichung [231].

## 7 Diskussion

Hinter dem schlichten Wort „Genexpression“ verbirgt sich eine große Anzahl vielfältiger Regulationsmechanismen deren Ziel es ist, einen bestimmten molekularen Phänotyp innerhalb einer Zelle zu modellieren. Auf DNA-Ebene kennt man als Regulatoren beispielsweise Promotoren, Enhancer, Silencer, sowie epigenetische Modifikationen und Transkriptionsfaktoren. Auf Ebene der RNA spielte bislang vor allem alternatives Splicing eine wesentliche Rolle, welches vor allem die Varianten eines exprimierten Proteins beeinflussen kann. Posttranslational gibt es durch Beeinflussung der korrekten Faltung, Komplexierung und Modifikationen wie Abspaltung von Signalsequenzen, Phosphorylierung, Acetylierung und Glycosylierung wiederum unterschiedliche Regulationsmöglichkeiten auf dem Weg zum funktionalen Protein. Eine verhältnismäßig neu entdeckte Art der Expressionsregulation stellt die microRNA-vermittelte RNA-Interferenz dar. Posttranskriptionale Genregulation durch microRNAs und deren potentiell und nachweislich immense Auswirkungen auf zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Apoptose, Pluripotenz und pathologische Entwicklungen, gewann in den letzten Jahren vermehrt an Aufmerksamkeit. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun den Einfluss von microRNAs auf die XXL-vermittelte, neuronale Differenzierung von USSC zu untersuchen.

### 7.1 MicroRNA-Expression der USSC und vergleichende Analyse

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Analysen von microRNA-Expressions-Profilen fußten auf der RT-PCR-basierten TaqMan-Analytik. Obgleich manche microRNAs extreme Sequenzhomologien aufweisen und sich häufig nur in einer einzigen Basen voneinander unterscheiden, konnte die hohe Spezifität des Assays bereits dokumentiert werden [222]. Dennoch wurde in dieser Arbeit zusätzlich mittels eines hochsensitiven Northernblots der Expressionsverlauf dreier ausgewählter microRNAs vergleichend analysiert und die Ergebnisse des TaqMan-Assays bestätigt.

Die vergleichende Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR erstellter microRNA-Profile von USSC und XXL-USSC konnte einen Einblick in die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen der XXL-vermittelten neuronalen Differenzierung gewähren. Untersucht wurden im Pool A des TaqMan-Megaplex-Assays je Probe jeweils 377 individuelle microRNAs. Die Analyse von Pool B erbrachte in einem Testlauf nur sehr wenige zusätzlich exprimierte microRNAs und wurde für die Charakterisierung der Differenzierung nicht weiter verwendet (Daten nicht gezeigt).

### **7.1.1 MicroRNA-Expressionsprofile nativer USSC**

Betrachtet man die microRNA-Expression nativer USSC der Linien SA5/03, SA5/73 und SA8/25 (siehe Anhang, Tabelle 8.1 und Tabelle 8.2) so fällt auf, dass die ESC-spezifischen microRNA miR-372, miR-302a und miR-302c nicht nachgewiesen werden konnten und die miR-302b nur sehr geringfügig exprimiert war. Diesen microRNAs konnten (wie bereits in der Einleitung erwähnt) entscheidende regulatorische Funktionen im Erhalt der Pluripotenz von ESC nachgewiesen werden, desweiteren wurden sie erfolgreich für die Reprogrammierung humaner Fibroblasten zu iPS-Zellen eingesetzt [232,233]. Die in nativen USSC hoch exprimierte microRNA miR-145 reprimiert die Pluripotenz-Faktoren OCT4, SOX2 und KLF4 und leitet so eine linienspezifische Differenzierung ein. Tumorwachstum kann ebenfalls durch Repression von OCT4 durch miR-145 gehemmt werden [106,234,235]. Aus Sicht der microRNAs ähnelt die USSC demnach eher einer differenzierten somatischen Zelle als einer pluripotenten ESC. Diese Erkenntnis wird unterstützt durch die Tatsache, dass weder auf Transkript- [199] noch auf Protein-Ebene (Springer, Trompeter, Uhrberg, nicht publizierte Daten) eine OCT4-Expression in USSC nachgewiesen werden konnte. Dennoch differenziert die USSC auf klonaler Ebene in Zelltypen aller drei Keimblätter [198] und es stellt sich die Frage ob möglicherweise ein alternativer Regulationsweg als der in ESC bekannte für diese Plastizität verantwortlich ist [236]. Dies könnte der biologisch unterschiedlichen Herkunft der Zellen geschuldet sein: während ESC vermutlich ihren Ursprung in primitiven Keimbahnzellen haben [237], entstammen die USSC einem fetalen, somatischen Umfeld.

### **7.1.2 Differentielle microRNA-Expression in XXL-USSC**

Eine Hochregulation bestimmter microRNAs während der neuronalen XXL-Differenzierung impliziert, dass sie anti-neuronale Proteine hemmen und herunterregulierte microRNAs eher neuro-relevante Proteine als Zielgene haben, welche dann unter Wegfall der microRNA-vermittelten Repression exprimiert werden könnten. Im Hinblick auf die Zielgenredundanz kann aber auch ein Einfluss nicht-differentiell exprimierter microRNAs nicht von vornherein ausgeschlossen werden. Es besteht vielmehr die Möglichkeit, dass einzelne microRNAs in nativen USSC und XXL-USSC gleichartig exprimiert sind, in den unterschiedlichen Transkriptomen dieser Zellen aber unterschiedliche Zielgene regulieren. Die Beschränkung der Untersuchungen auf differentiell exprimierte microRNAs sollte in dieser Arbeit jedoch die Chance erhöhen, funktional relevante Kandidaten zu identifizieren, da die Mehrzahl aller exprimierten microRNAs während der XXL-Differenzierung nicht differentiell exprimiert wurde.

Auffälligerweise konnten weder in nativen, noch in XXL-USSC nennenswerten Mengen von Hirn-spezifischen microRNAs miR-9, -124, -135a, -135b, -153, -183 und -219 nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Differenzierung nach 14 Tagen (bzw. 28 Tagen bei SA8/25) noch nicht weit genug fortgeschritten um die Hochregulation dieser microRNAs beobachten zu können, zumal die funktionalen Untersuchungen, wie Messungen der spannungsabhängigen Natriumkanäle, in der Referenzliteratur [2] zu späteren Differenzierungszeitpunkten ( $\geq 3$  Wochen) vorgenommen wurden. Die Erstellung von microRNA-Profilen war zu diesen Zeitpunkten jedoch aufgrund der starken Apoptose-Neigung unter XXL-Bedingungen nicht in handhabbaren Maßstäben zu realisieren. Anhand der microRNA-Expressions-Kinetik von USSC SA8/25 wurde deutlich, dass diese Linie erst nach 28 Tagen XXL-Differenzierung den microRNA-Expressionsstatus der anderen beiden Linien (SA5/03, SA5/73) nach 14 Tagen Differenzierung erreicht hatte, was eine langsamere Differenzierung der SA8/25 andeutete. Die geringere Tendenz zur Apoptose der SA8/25 bietet demnach keine Möglichkeit, die Analyse auf fortgeschrittenere Differenzierungsstadien auszuweiten. MicroRNA miR-124 wird in ESC bereits in undifferenziertem Zustand auf niedrigem Niveau exprimiert, in USSC dagegen nicht. Auch kann man die 14-tägige XXL-Differenzierung von USSC nicht direkt mit einer über mehrere Wochen durchgeführten ESC-Differenzierung vergleichen. Es handelt sich bei diesen beiden Zellen um verschiedene Zellsysteme deren Entwicklung nur partiell parallel verläuft. Betrachtet man zusätzlich die Expression der miR-124 in der Maus-Entwicklung, so erreicht diese microRNA ihr Expressionsmaximum erst 14 Tage postnatal [86]. In weiteren Experimenten müsste untersucht werden, weshalb in XXL-USSC keine miR-124-Expression zu beobachten ist. Dies könnte beispielsweise an einer epigenetischen Repression durch Methylierung der Promotorelemente liegen, wie sie in manchen Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte [238,239] oder verdichteten Chromatin-Strukturen entscheidender Bereiche. Es wäre außerdem zu untersuchen, ob die insgesamt nicht ganz vollständige Differenzierung der XXL-USSC zu funktionalen Neuronen im Fehlen dieser neuronal-spezifischen microRNAs begründet ist.

Unter den während der XXL-Differenzierung nicht-differentiell exprimierten microRNAs fanden sich einige, die im murinen und humanen Hirngewebe [84] angereichert sind. Am stärksten waren dabei die microRNAs let-7b und let-7e in USSC und XXL-USSC exprimiert, aber auch die anderen microRNAs der Let-7-Gruppe konnten mit mittlerer Expressionsstärke in USSC und XXL-USSC gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1 und Tabelle 8.2). Für diese microRNA-Familie ist bekannt, dass sie in Überexpressions-Experimenten die Zellproliferation hemmt und neuronale Differenzierung und Synapsenformation in der Maus *in vitro* und *in vivo* fördert [85,240,241]. Desweiteren fanden sich die Hirn-angereicherten

microRNAs miR-125a-3p, -125a-5p, -125b, -128, -132 und -139 in nativen wie auch XXL-USSC exprimiert. Für die miR-125b ist beschrieben, dass sie das Wachstum und die Verzweigung von Dendriten fördert, sowie in die Synapsenformation durch Neurotransmitter-Rezeptor-Komposition beeinflusst [242]. Außerdem sind miR-125a und -125b in der Maus als positive Regulatoren der neuronalen Differenzierung beschrieben worden [85,243]. Auch die miR-132 wird in der Literatur als Regulator von Dendriten- und Synapsenformation, sowie der Synapsenphysiologie beschrieben [242,244,245,246,247]. Die als pro-neuronal bekannte miR-128 hemmt durch Regulation mitogener Kinasen den Zellzyklus und fördert neuronale Differenzierung in Glioblastomen und fungiert dort gleichzeitig als Tumorsuppressor [248]. Ob die Präsenz der genannten microRNAs generell das neuronale Differenzierungspotential von USSC erhöht, verbleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Beim Vergleich der microRNA-Expressionsprofile von USSC und XXL-USSC fiel weiterhin auf, dass in allen drei Linien ausschließlich gemeinsam herunterregulierte, nicht aber gemeinsam hochregulierte microRNAs gefunden wurden. Jede Linie für sich zeigte zwar 1-3 verschiedene, leicht hochregulierte microRNAs, was aber eher auf Linien-spezifische Effekte zurückzuführen war und mit einem generellen Differenzierungsmechanismus aller Wahrscheinlichkeit nach nichts zu tun hat. Allen Linien gemeinsam ist dagegen die Gruppe der 18 herunterregulierten microRNAs bestehend aus Mitgliedern der miR-17-92-Familie und Paralogen (miR-17, -18a, -19a, -20a, -106b, -25), sowie den microRNAs miR-22, -27a, -28-5p, -130a, -137, -138, -140-5p, -143, -218, -335, -362-5p und -431.

Für miR-138 sowie Mitglieder der miR-17-92 Familien sind bereits Funktionen im neuronalen Kontext beschrieben. Die miR-138, welche zu den am stärksten herunterregulierten microRNAs in XXL-USSC gehörte, wurde bisher im adulten Maus-Gehirn als hochexprimiert beschrieben [249] und auch im humanen Gehirn exprimiert vorgefunden. Diese wird aber vor allem während der Oligodendrozyten-Differenzierung in Mäusen stark hochreguliert [250] und wurde daneben hauptsächlich im onkologischen Kontext untersucht [251,252,253]. Die XXL-gesteuerte Differenzierung von USSC stellt keine Oligodendrozyten-Differenzierung dar; insofern bildet die Beobachtung der Herunterregulation der miR-138 in XXL-USSC zunächst keinen Widerspruch zur o.g. Literatur. Die mit Northernblot und TaqMan-qPCR-Array analysierten Expressionsmuster von miR-138 im homogenisierten Mäusehirn [249] differenzieren nicht zwischen Neuronen und anderen neuralen Zellen wie Astrozyten oder Oligodendrozyten. Auch deswegen ist die Beobachtung der in USSC herunterregulierten miR-138 zunächst nicht als widersprüchlich zu bewerten. Desweiteren konnten Siegel et al [225] nachweisen, dass die miR-138 ein negativer Regulator des Dendritenwachstums ist und die durch miR-138 schrumpfenden Dendriten zusätzlich eine reduzierte postsynaptische Funktion besitzen.

In großer Übereinstimmung zu den in dieser Arbeit gefundenen USSC-microRNA-Daten steht die beschriebene Expressions-Reduktion des miR-17-92-Clusters (miR-17, -18a, -19a, -19b, -20a, -92 und die Paraloge miR-19b, -106a, -106b, -363, -92, -93) während der RA-induzierten neuronalen Differenzierung der humanen Neuroblastoma-Linie SH-SY5Y [254]. Von diesem Cluster, sowie weiterer paraloger microRNAs, finden sich in der XXL-USSC alle microRNAs, bis auf die Ausnahme der miR-363, reprimiert. Die vergleichbaren molekularen Veränderungen von USSC und SH-SY5Y deuten an, dass der neuronale Differenzierungsprozess von USSC auf molekularer Ebene ähnlich dem von SH-SY5Y abläuft, obgleich es sich um völlig unterschiedliche Zellsysteme handelt. Daraus ergibt sich die interessante Fragestellung warum USSC diesen Differenzierungsprozess in die offensichtlich richtige Richtung leiten, ihn im Gegensatz zur SH-SY5Y jedoch nicht vollenden.

Ergänzend zu den in dieser Arbeit validierten Zielgenen der miR-17 und -20a, konnten in der Arbeit von Beveridge et al. [254] drei weitere neuronal relevante und während der Neurodifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen hochregulierte Gene (BCL2, MEF2D und MAP3K12) als Zielgene dieser microRNAs experimentell validiert werden. Für diese beiden microRNAs und zusätzlich für die miR-106b wurde von uns inzwischen publiziert, dass sie in USSC Zellzyklus-Progression bzw. genauer die G1/S-Transition durch Erhöhung der E2F-Aktivität unterstützen [73]. Da die USSC unter XXL-Einfluss in einen abrupten Zellzyklusarrest eintreten, ist die Herunterregulation dieser Zellzyklus-fördernden microRNAs in diesem Kontext vermutlich essentiell.

## 7.2 Bioinformatische Zielgenvorhersagen

Um die biologische Bedeutung der in allen drei XXL-USSC-Linien gemeinsam herunterregulierten 18 microRNAs besser einschätzen zu können, wurden für jede einzelne dieser microRNAs umfangreiche bioinformatische Zielgenvorhersagen durchgeführt. Solche Vorhersagen basieren vornehmlich auf der Tatsache, dass microRNAs über eine vollständige Hybridisierung der sogenannten „Seed“-Sequenz (Nukleotide 2-8 der microRNA), ihre Zielgene identifizieren. Diese Algorithmen suchen demnach auf den 3'UTRs von mRNAs nach Komplementaritäten mit microRNA-Seed-Sequenzen. Die am häufigsten verwendeten Algorithmen sind PicTar [220], TargetScan [68] und miRanda [221]. Dabei werden die Thermodynamik der möglichen Bindung, die Komplementarität außerhalb der Seed-Sequenz, die Konservierung der Bindestelle zwischen verschiedenen Arten und die Anzahl der vorhergesagten Bindestellen pro microRNA und Zielgen als Kriterien für die Bindungswahrscheinlichkeit berücksichtigt [68,220,221]. Der miRanda-Algorithmus berücksichtigt zudem auch G:U Basenpaarungen und erhöht damit die Anzahl vorhergesagter Zielgene, was jedoch durch geringere Spezifität zu mehr falsch-positiven

---

Vorhersagen führen kann [221]. Laut miRanda werden je nach Modellorganismus 74% bis 92% aller proteincodierenden Gene durch microRNAs kontrolliert, mit bis zu einigen tausend Zielsequenzen je microRNA [221]. Der PicTar-Algorithmus postuliert dagegen eine Anzahl von ca. 200 Zielgenen je microRNA [68], laut TargetScan können etwa 30% aller Gene von microRNAs reguliert werden [220]. Mit Hilfe der DIANA miRGen Datenbank [255] kann die Vorhersage von putativen Zielgenen im UNION-Modus aus der Kombination aller drei Algorithmen erfolgen, unabhängig davon wie viele Algorithmen eine individuelle microRNA-Bindestellen anzeigen.

Bei der Untersuchung putativer Zielgene für die 18 herunterregulierten microRNAs zeigte sich, dass viele für die Neuroentwicklung relevanten Proteine potentielle Bindungsstellen für verschiedenste microRNAs aus der Gruppe der 18 herunterregulierten aufwiesen. So wird z.B. das Protein MECP2 potentiell von 13 der 18 microRNAs reguliert und das Protein NEUROD1 von 11 der 18 microRNAs. Die Proteine NBEA und EPHA4 verfügen über potentielle Bindungsstellen für je 10 aus 18 herunterregulierten microRNAs (siehe auch Abbildung 6.3). Diese Liste lässt sich weiter fortsetzen und demonstriert, dass offensichtlich ein paralleler Einfluss einer ganzen *Gruppe* von microRNAs und weniger der Einfluss *einzelner* microRNAs vorliegt. Umgekehrt wurden für die miR-106b 85 unterschiedliche potentielle neuro-relevante Zielproteine identifiziert, für miR-130a 104 potentielle neuro-relevante Zielgene, für miR-137 68 Zielgene und für miR-138 54. Auch diese Zielprotein-Liste lässt sich weiter fortsetzen und somit wird an dieser Stelle erstmals der netzwerkartige Einfluss von microRNAs deutlich. Im hochregulierten Zustand (native USSC) können die 18 microRNAs offensichtlich ein ganzes Repertoire neuro-relevanter Proteine dämpfen und ihre Expression im Zuge der XXL-Differenzierung durch Herunterregulation freigeben. Der Tabelle 6.1 ist zu entnehmen welche 40 Zielproteine die meisten vorhergesagten Bindestellen für unterschiedliche microRNAs aus der Gruppe der 18 in XXL-USSC herunterregulierten, besitzen. Diese ausgeprägten Zielgenredundanzen zwischen den individuellen microRNAs reflektieren erneut die netzwerkartig verwobene potentielle Einwirkung der microRNAs auf mögliche Zielgene während der XXL-Differenzierung der untersuchten USSC-Linien.

Nach Abzug gefundener Redundanzen ergaben sich insgesamt 9053 mögliche Zielgene für die Gesamtheit der 18 microRNA. Die entscheidende Frage war nun die nach der biologischen Einordnung der gefundenen Zielgene: Welchen zellulären Stoffwechselwegen konnten diese möglichen Zielproteine zugeordnet werden? Wie schon angedeutet, zeigte sich, dass eine große Menge neuronal relevanter Proteine innerhalb der 9053 potentiellen Zielgene enthalten waren. Beispielsweise definierte die 8-GO-Bedingung 2122 potentielle neurorelevante Zielgene. Daneben fanden sich jedoch auch mögliche Zielgene anderer

Differenzierungswege, sowie mitogener und metabolischer Prozesse. Dies ist nicht weiter verwunderlich, denn microRNAs erfüllen in unterschiedlichen Gewebetypen, in Abhängigkeit vom individuellen Transkriptom der Zelle, teilweise völlig unterschiedliche Funktionen. So sind microRNAs - entgegen der ursprünglichen Meinung - selten ausschließlich spezifisch in einem einzigen Gewebe exprimiert, sondern eher in einer mehr oder weniger streng definierten Signatur innerhalb verschiedener Zelltypen zu finden. Ein Beispiel hierfür bietet die microRNA miR-124: obwohl sie bis zu 48% aller microRNA-Moleküle im Hirngewebe von Mäusen ausmacht [256] und wesentliche Funktionen in neuronalen Zellen ausübt (siehe Einleitung, Abschnitt 4.2.4), wird sie ebenso in anderen Organen wie Pankreas exprimiert und übt dort ebenfalls regulative Funktionen aus [257]. Weiter untermauert wird die Bedeutung der 18 microRNAs für die neuronale Differenzierung nach Zuordnung der vorhergesagten, nach 8-GO-Terms gefilterten Zielgene zu einzelnen neuronal-relevanten KEGG-Pathways („Axon Guidance“, „TGF-beta Signaling“, „WNT Signaling“, MAPK Signaling“ und „Long-term Potentiation“) in der DAVID-Datenbank: zwischen 42% und 57% der in diesen 5 Pathways involvierten Gene erwiesen sich als potentielle Zielgene von 1-10 der 18 herunterregulierten microRNAs (vergleiche Tabelle 6.2).

Der „Axon Guidance“-Signalweg besitzt eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Formation neuronaler Netzwerke. Axone werden mit Hilfe verschiedener Faktoren wie Netrinen, Ephrinen, Slits und Semaphorinen in ihrer Wachstumsrichtung maßgeblich beeinflusst. Die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion an den Wachstumskegeln der Axone führt über Rho-GTPasen zur Re-Organisation des axonalen Zytoskellets, welche über die Wachstumsrichtung der Axone entscheidet [258,259,260,261,262]. „Long-term Potentiation“ steht für eine dauerhafte, gesteigerte synaptische Übertragungseffizienz (Langzeitpotenzierung, LTP) und stellt die molekulare Basis für Lernprozesse und Erinnerungsvermögen dar [263]. Es wird vermutet, dass bestimmte Faktoren des LTP-Pathways zur Aktivierung von ERK/MAPK-Signalwegen führen [264]. Die mehrstufigen MAPK-Signalkaskaden haben großen Einfluss auf verschiedene zelluläre Vorgänge wie Zellzyklus, Proliferation, Apoptose und Differenzierung, so auch auf die neuronale Differenzierung [265,266,267]. Die morphogenen WNT-Proteine haben ebenfalls ein breites Wirkspektrum und sind essentiell für verschiedene Entwicklungsprozesse wie Zelltyp-Spezifikation, Proliferation und Kontrolle asymmetrischer Zellteilung [268,269,270]. Interaktionen mit Mitgliedern der MAPK-Signalkaskaden und Rho-GTPasen beeinflussen den Zellzyklus und die Zytoskell-Modellierung. Verschiedene „bone morphogenic proteins“ (BMPs) des TGF-beta-Signalweges beeinflussen über die Aktivierung von SMAD-Proteinen (SMAD1/4/5/8) die Expression vieler (unter anderem für die Neurogenese wichtiger) Gene [271,272]. TGF-beta steuert ebenfalls über SMADs Funktionen wie Neurogenese, Proliferation, Angiogenese, Immunsuppression sowie die

Induktion von Apoptose [273,274,275,276,277]. Die einzelnen Signalwege lassen sich nur schlecht voneinander trennen da sie an verschiedenen Stellen ineinandergreifen und sich gegenseitig beeinflussen.

Eine koordinierte Herunterregulation der Gruppe von 18 microRNAs während der XXL-vermittelten neuronalen Differenzierung von USSC könnte daher über den Einfluss auf die beschriebenen und weiteren Signalwege, eine entscheidende Bedeutung für die Expressionserhöhung einer Vielzahl von funktional zusammenwirkenden, neuronal relevanten Proteinen während dieses Differenzierungsprozesses zukommen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es jedoch noch nicht möglich, den Einfluss der microRNAs hochauflösend auf die Zielproteine in den Pathways darzustellen. Der in den Abbildungen angedeutete regulatorische Einfluss der microRNAs trifft sowohl aktivierende als auch hemmende Proteine der jeweiligen Pathways und der regulatorische Netto-Gesamt-Einfluss der microRNAs hängt von vielerlei Faktoren ab (mRNA-Menge, mRNA-Stabilität, Effizienz der microRNA-Wirkung, sowie microRNA-unabhängige Protein:Protein-Interaktionen). Über die Nettowirkung der microRNAs auf die Pathways kann daher nur spekuliert werden. Dennoch weist die erhebliche Häufung von microRNA-Zielgenen in den jeweiligen Pathways auf ein erhebliches regulatorisches Potential der Gruppe von 18 microRNAs hin.

### 7.3 Experimentelle Zielgenvalidierungen

Um nun die netzwerkartige Verknüpfung der microRNAs mit ihren Zielgenen in der USSC-Differenzierung experimentell zu untermauern, wurde eine Gruppe neuro-relevanter potentieller Zielgene ausgesucht, die eine kreuzweise Vernetzung mit ihren potentiell regulierenden microRNAs aufweisen (Tabelle 6.3).

Für die experimentellen Überprüfungen bioinformatisch vorhergesagter microRNA/Zielgen-Interaktionen haben sich Luciferase-basierte Reporteragen-Assays bewährt. Der in dieser Arbeit verwendete Assay unterscheidet sich in einigen Punkten von den in der Literatur üblichen Vorgehensweisen. Zum einen bietet der verwendete Vektor pmirGLO den Vorteil, dass die Reportergene Firefly und Renilla auf einem Plasmid vorhanden sind. Somit entfällt die Notwendigkeit ein separates Reporteragenplasmid zur Normalisierung einzusetzen, was Probleme schwankender Transfektionseffizienzen zueinander im Vorfeld vermeidet. Andererseits werden beide Reportergene von nur mittelstark aktiven Promotoren aus transkribiert, um zu verhindern, dass eine zu große Transkriptmenge das microRNA-Regulationssystem saturiert. Außerdem wurde in dieser Arbeit auf microRNA-Mimics zurück gegriffen und darauf verzichtet, jede einzelne microRNA in Form ihrer pri-microRNA in ein separates Expressionsplasmid zu klonieren. Solche Konstrukte bedürfen der individuellen Überprüfung auf Expression und korrekte posttranskriptionelle Prozessierung der Inserts

mittels Northernblot. Die microRNA-Mimics sind hingegen für höhere intrazelluläre Stabilität chemisch modifiziert, lassen sich bei einer intrazellulären Halbwertszeit von 7 Tagen effizient transfizieren und wurden als Ersatz für Überexpressionskonstrukte verwendet. Als zelluläres System wurde die Zelllinie HEK293T gewählt. Diese hatte gegenüber der USSC einige wesentliche Vorteile: sie war unbegrenzt verfügbar, ließ sich problemlos und flexibel expandieren, war selbst mit langen Vektor-Konstrukten unproblematisch zu transfizieren und führte dadurch zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Verwendung Spezies-identischer Zelllinien wie HEK293 oder HeLa für Zielgenvalidierungen im humanen System ist in der Literatur akzeptiert [132,229,230]. Die Verwendung von USSC würde aufgrund der deutlich schlechteren Transfektionseffizienz zu einer erheblich herabgesetzten Reproduzierbarkeit der Messungen führen, was in Konsequenz eine erhebliche Erhöhung der nötigen Anzahl biologischer Replikate der Transfektionen zur Folge hätte. Angesichts der limitierten Verfügbarkeit von USSC erschien dies im Kontext der vorliegenden Arbeit unpraktikabel.

Wie bereits im Ergebnisteil ausgeführt und bezüglich der experimentellen Durchführung beschrieben, lag der Fokus dieser Arbeit nicht auf der Validierung individueller microRNA/Bindungsstellen-Interaktionen, sondern auf der experimentellen Validierung des Einflusses einer bestimmten microRNA auf große Teile von 3'UTRs bzw. auf vollständige 3'UTRs. Die Spezifität der jeweiligen Interaktion microRNA/3'UTR wurde in diesem System durch den unmittelbaren Vergleich der Kotransfektionen von pmirGLO + microRNA-Mimic und pmirGLO/3'UTR + microRNA-Mimic sichergestellt. Interessanterweise zeigte sich, dass miR-137 einen erheblichen reduktiven Einfluss auf die relative Firefly-Aktivität des leeren pmirGLO ausübte. Sequenzvergleiche der miR-137-Sequenz mit den ORFs von Firefly und Renilla ergaben die potentielle Möglichkeit von Interaktionen zwischen miR-137 und Firefly-, sowie Renilla-ORF (Daten nicht gezeigt). Da microRNAs ihre biologische Wirkung auf dem selben biochemischen Weg entfalten wie siRNAs und letztere voll komplementär zu bestimmten Bereichen innerhalb der ORF des zu inhibierenden Proteins gestaltet werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch bestimmte microRNAs bei genügender Sequenzkomplementarität zu Reportergenen selbige siRNA-artig beeinflussen. Diese Erfahrung unterstreicht die zwingende Notwendigkeit, nicht nur den Einfluss endogener microRNAs der HEK293T auf die zu testende 3'UTRs hin zu untersuchen, sondern ebenfalls Einflüsse von microRNA-Mimics auf die jeweils verwendeten Reportergene zu analysieren.

In Abbildung 6.13 sind die Ergebnisse der 71 durchgeführten microRNA/Zielgeninteraktions-Validierungen zusammengefasst. Das Spektrum der Interaktionsintensitäten war breit gefächert und reichte von nicht messbarer Interaktion, über schwache aber signifikante Interaktion, bis hin zu deutlichen bis starken regulatorischen Effekten einzelner microRNAs

auf ihre Zielsequenzen. Berücksichtigt man die Vielzahl der auf die Regulation einflussnehmenden Parameter wie Komplementarität innerhalb und außerhalb der Seed-Sequenz, thermodynamische Stabilität der Bindung, Anzahl der vorhandenen Bindestellen pro 3'UTR-Bereich oder sterische Zugänglichkeit der Bindestelle, so ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich und zeigt, dass der Assay unterschiedlich starke microRNA-Zielgeninteraktionen herauszuarbeiten vermag. Bezeichnet man die Firefly-Aktivitätsreduktion eines Interaktions-Paares von  $\geq 20\%$  als positiv validiert, so konnten 23 von 71 Zielgenvorhersagen bestätigt und eine Vielzahl bislang unbekannter microRNA-Ziele identifiziert werden.

NEUROD1, NEUROG1. NEUROD1 gehört wie NEUROG1 zur großen Gruppe der „basic helix-loop-helix“(bHLH)-Transkriptionsfaktoren, welche sehr häufig an der Definierung von Zellschicksalen beteiligt sind und von der Fliege bis zum Säuger hoch konserviert sind. NEUROD1 ist sowohl für die Differenzierung von  $\beta$ -Zellen des Pankreas [278], als auch der Entwicklung von Neuronen von entscheidender Bedeutung [279]. Höchste NEUROD1-Expressionsniveaus werden während der Differenzierung des zerebralen Kortex gemessen, während in ausreifenden Neuronen deutlich niedrigere Expressionsniveaus gemessen werden [280,281]. NEUROG1 verstärkt seinerseits die NEUROD1-Expression und beide Faktoren treiben gemeinsam die Expression weiterer neuronaler Transkriptionsfaktoren an und bilden letztlich ein robustes regulatorisches Netzwerk in der neuronalen Differenzierung [282]. Drei von 9 vorhergesagten microRNA-Bindestellen konnten für die 3'UTR von NEUROD1 validiert werden. Dabei handelte es sich um Bindestellen für die miR-19a, -137 und -138, wobei letztere mit 62% die stärkste Reduktion der Firefly-Aktivität zeigte. Signifikante aber eher schwache Effekte zeigten die beiden microRNAs miR-17 und -130a. Alle diese NEUROD1-Interaktionen werden in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben, bislang wurden in der Literatur Bindestellen für miR-19b [283] und miR-124 experimentell validiert [284], letztere konnte in unserem Assay jedoch nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch für NEUROG1, bislang als microRNA-Zielgen nicht beschrieben, konnten mit miR-17, sowie in abgeschwächter Form miR-20a und -106b regulierende microRNAs identifiziert werden.

NBEA. NBEA wird für die korrekte Entwicklung und Funktion spezieller Synapsen benötigt [285,286], eine abberante Expression dieses Proteins korreliert bei betroffenen Patienten mit Autismus [286,287] oder Myelomen [288]. NBEA, ebenfalls bislang als microRNA-Zielgen nicht beschrieben, zeigte im Validierungs-Assay die meisten positiven Resultate: es konnte als Zielgen von 7 aus 9 microRNA identifiziert werden. Firefly-Aktivitätsreduktionen über  $>20\%$  wurden während der Interaktion mit den microRNAs miR-17, -18a, -19a, -106b, -137,

-138 und -218 verzeichnet, miR-20a und -130a zeigten etwas geringere aber dennoch signifikante Reduktionen.

CRIM1. CRIM1 wird neben der Expression in Hirn und Auge auch in diversen anderen Organen der Maus vorgefunden und ist entscheidend an deren embryonaler Genese sowie an der ZNS-Entwicklung beteiligt [289,290]. Dieses Protein ist außerdem als negativer Regulator der Proteine BMP-4 sowie BMP-7 bekannt und damit als Antagonist der Osteodifferenzierung beschrieben worden [291,292]. Für CRIM1 konnte zum ersten Mal die Interaktion mit miR-18a positiv validiert werden, statistisch signifikante Reduktionen unter 20% zeigten jedoch auch miR-17, -20a und -335. In der Literatur wurde CRIM1 kürzlich als Zielgen für miR-20a [292] und -20b [293] beschrieben, was sich zumindest für erstere in den Ergebnissen dieser Arbeit reflektiert. MiR-20a und -20b sind extrem Sequenz-homolog und gemeinsame Zielgene daher zu erwarten.

PTN. PTN ist ein in Maus-NSCs stark exprimiertes Protein, welches durch Verstärkung der Expression von NR4A2/Nurr1 und TH wesentlich zum dopaminergen Phänotyp von Neuronen beiträgt [294], wie er beispielsweise bei XXL-USSC beobachtet werden kann [2] und wurde in dieser Arbeit erstmals als Zielgen für die miR-137 beschrieben.

NPTX1. Über ihre Coiled-Coil-Domänen gehen die Proteine NPTX1 und NARP/NPTX2 Komplexe mit AMPA-Glutamatrezeptoren ein und spielen dadurch eine wichtige Rolle bei der exzitatorischen Synaptogenese [295]. Epigenetische Modifikationen, wie beispielsweise Methylierungsereignisse, spielen sowohl für die Gehirnentwicklung als auch die Entstehung neurologischer Funktionsstörungen, eine entscheidende Rolle [296,297]. Erstmals beschrieben wurde in dieser Arbeit die Interaktion von NPTX1 mit miR-138, auch miR-17 zeigt eine abgeschwächte Interaktion.

MECP2. Der im Gehirn abundant exprimierte Transkriptionsfaktor MECP2 ( $1,6 \times 10^7$  Moleküle je Zellkern [298]) kann spezifisch an methylierte CpG-Inseln binden [299] und die Transkription betroffener Gene hemmen [300]. Während MECP2 in Stammzellen verzichtbar erscheint [301], führt eine Dysregulation des Proteins während der Differenzierung zu einer erheblichen neurologischen Entwicklungsstörung betroffener Patienten (Rett-Syndrom, [302]). Für MECP2 wurden die meisten Bindestellen vorhergesagt, jedoch konnten nur 2 bestätigt werden: miR-19a und -218, signifikante Reduktionen waren aber auch bei miR-130a, -138 und -335 messbar. Bislang wurden für dieses Proteine Interaktionen mit miR-132 [303], mit der ESC-spezifischen miR-302c [174] und miR-212 [304] gezeigt.

NRP1, EPHA4, NTN4. Auswachsene Axone werden während der neuronalen Entwicklung durch „attraktive“ bzw. „repulsive“ Signale zu ihren Zielen geleitet. Das transmembrane Glykoprotein NRP1 fungiert (wie NRP2 auch) als Rezeptor für Klasse-3 Semaphorine und

besitzt damit eine Funktion als repulsives Element in dieser axonalen Führung [305]. Auch der axonale Rezeptor EPHA4 fungiert zusammen mit seinem Liganden Ephrin-A3 als negatives Führungssignal und vermittelt den Kollaps von axonalen Wachstumskegeln („growth cones“) [306]. NTN4 hingegen fördert als attraktives Signal das Auswachsen von Neuriten aus explantierten Ratten-*Bulbus olfactorius* [307]. NRP1 ist bislang als Ziel für die microRNAs miR-9 und -181b bekannt [308], in dieser Arbeit konnten nun mit der miR-130a und -137 zwei neue Regulatoren validiert werden. NTN4 wurde als gemeinsames Ziel der microRNAs miR-17, -20a und -106b neu identifiziert und EPHA4 konnte erstmals als Ziel von miR-17 beschrieben werden.

STAT3. Der zytoplasmatische Transkriptionsfaktor STAT3 wird durch Phosphorylierung aktiviert und spielt eine entscheidende Rolle in verschiedensten zellulären Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose [309]. STAT3 wird unter anderem auch in NSC des Ratten-Hippocampus während der Differenzierung zu Neuronen und Astrozyten exprimiert [310]. Für STAT3 wurden bislang Interaktionen mit verschiedenen microRNAs (wie miR-21 [311], miR-17 und -20a [312], miR-20b) postuliert, jedoch bislang nicht experimentell nachgewiesen. Dies konnte zumindest für die miR-17 in der vorliegenden Arbeit nachgeholt werden, wenn auch die Interaktion knapp unter den Cut-Off von 20% fiel.

Bemerkenswerterweise konnte auch für GAPDH eine positive microRNA-Bindung für die miR-218 nachgewiesen werden, eine schwächere Interaktion war aber auch mit miR-18a messbar. Insgesamt konnten 55 statistisch signifikante 3'UTR/microRNA-Interaktionen nachgewiesen werden von denen bisher nur eine (CRIM1/miR-20a) bereits in der Literatur beschrieben war [292].

Da die Grenze für eine positive Validierung von  $\geq 20\%$  rein subjektiv gesetzt wurde und auch kleinere Firefly-Aktivitätsreduktionen statistisch signifikant gemessen wurden, kann man Interaktionen mit Firefly-Aktivitätsreduktionen  $< 20\%$  jedoch nicht ohne weiteres als „negativ“ oder „nicht vorhanden“ bezeichnen. Die biologische Regulation verläuft stufenlos und es kann im gewählten Assay nicht eindeutig geklärt werden, ab welchem Wert keine biologisch relevante Zielgen-Repression mehr zu erwarten ist. Die reale intrazelluläre Wirkung einer microRNA hängt ohnehin von den in der Zelle gegebenen stöchiometrischen Relationen microRNA/Ziel-mRNA ab. Darüberhinaus spielt die Anzahl von Bindungsstellen für eine bestimmte microRNA auf einer gegebenen 3'UTR eine Rolle und nicht zuletzt definiert die thermodynamische Stabilität der microRNA/3'UTR-Bindung die Effektivität der microRNA-Wirkung. Der in dieser Arbeit eingesetzte Assay basiert auf Überexpression sowohl von microRNA(-Mimics) als auch von pmirGLO-Konstrukten und erfasst somit primär die grundlegende microRNA/Ziel-mRNA-Interaktion.

Obwohl in dieser Arbeit nur eine begrenzte Gruppe von microRNAs und Zielgenen auf ihre regulatorische Beziehung zueinander getestet werden konnte, demonstrieren die Ergebnisse ganz klar eine netzwerkartige Verknüpfung der 18 microRNAs auf Proteine, die neuronale Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse beeinflussen.

#### **7.4 Kinetik microRNA-vermittelter Translationsrepression**

Die Überexpressionsexperimente der Zielgenvalidierungen in HEK293T-Zellen konnten eine Vielzahl theoretischer microRNA/3'UTR-Interaktionen experimentell bestätigen. Es blieb jedoch die Frage offen, in wie weit die tatsächlichen Veränderungen der Population endogener microRNAs in USSC während der XXL-Differenzierung die Abundanz der validierten Zielgene beeinflussen. Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der relativen Firefly-Expressionen eines pmirGLO/3'UTR-Konstrukts im Zuge der XXL-Differenzierung vermag hier Auskunft zu geben. Für die Proteine NEUROG1, NTN4 und STAT3 wurde mit neu generierten full-length-3'UTR-Konstrukten gearbeitet, ansonsten kamen die bereits in den Validierungen verwendeten pmirGLO/3'UTR-Konstrukte zum Einsatz. Die nun weitgehend in ihrer vollen Länge vertretenen 3'UTRs garantierten eine umfassende Sensitierung von Veränderungen der endogenen microRNA-Populationen im Zuge der XXL-Differenzierung.

Vor dem Hintergrund der schlechten Transfizierbarkeit der USSC *per se* und deren Apoptoseneigung während der XXL-Inkubation, war es in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung, dass die Expression der Mess- und Normalisierungs-Luciferase von einem gemeinsamen Konstrukt aus erfolgte. Mit zwei separaten Vektoren für Firefly- und Renilla-Expression wäre diese Art der Messung nicht möglich gewesen. Da sich während einer Zeitspanne von 5 Tagen durch Verlust von Zellen und Abbau der Plasmide innerhalb verbliebener Zellen die Verhältnisse der Vektoren zueinander drastisch verändern könnten, wäre eine Normalisierung auf diesem Wege nicht mehr möglich gewesen. Bereits im gewählten Setup waren die Standardabweichungen dennoch so beträchtlich, dass eine erhöhte Anzahl biologischer Replikate für eine signifikante Aussage nötig war. Auch musste berücksichtigt werden, dass sich Promotoraktivitäten der beiden Luciferasen während der XXL-Differenzierung verändern können und zu Verfälschungen der Ergebnisse führen könnten. Diesem Umstand wurde durch die Messung des „leeren“ Vektors als Referenz für die relativen Luciferase-Aktivitäten zu beiden Messzeitpunkten begegnet. Wie der Abbildung 6.14 zu entnehmen ist, werden in nativen Zellen die relativen Firefly-Aktivitäten der 3'UTR-Konstrukte durch endogene microRNAs um bis zu 95% gegenüber dem 3'UTR-freien Vektor pmirGLO reduziert.

Nach nur 5 Tagen der XXL-Inkubation (maximale Reduktion der microRNAs erst am Tag 14 erwartet), konnte im Vergleich zu nativen Zellen bereits eine erhöhte relative Firefly-Aktivität

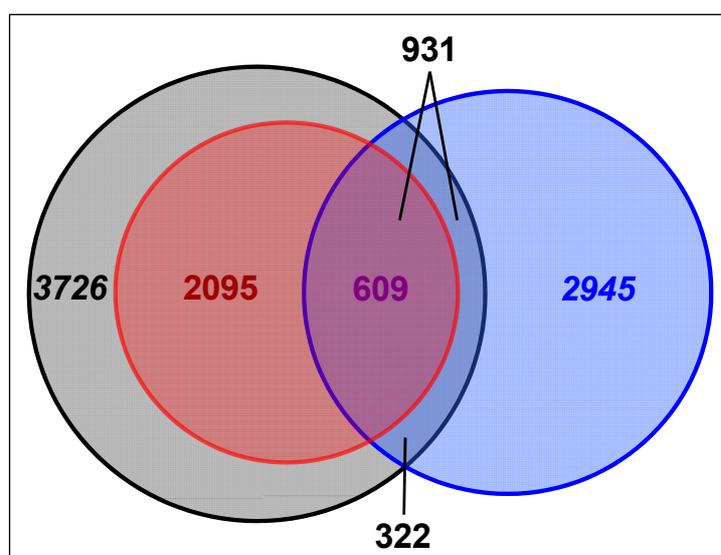
von 10 aus 11 getesteten pmirGLO/3'UTR-Konstrukten gemessen werden, 6 davon statistisch signifikant. Dieses Ergebnis deutet trotz Schwierigkeiten in der Messung ein weiteres Mal auf einen entscheidenden funktionalen Einfluss der 18 microRNAs bzw. der microRNA-Gesamtpopulation bei der Regulation der untersuchten Proteine durch translationale Hemmung via ihrer 3'UTRs hin. Durch Veränderung der microRNA-Gesamtpopulation während der XXL-vermittelten USSC-Differenzierung fällt offensichtlich das breitgefächerte Repressions-Netzwerk der microRNAs ein Stück weit weg, so dass neuronal-relevante Proteine vermehrt translatiert werden könnten. Vornehmlich werden diese Effekte den 18 herunterregulierten microRNAs (aber weiterhin auf reduziertem Niveau exprimierten) zuzuschreiben sein. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte microRNAs eine Rolle spielen.

## **7.5 Globale Genexpressionsanalysen**

Die Resultate der differentiellen microRNA-Analyse, die aus deren Ergebnissen abgeleiteten Zielgenvalidierungen, als auch das Experiment zur Kinetik microRNA-vermittelter Translationsrepression zeigten, dass die Veränderungen der endogenen microRNA-Populationen im Zuge der neuronalen Differenzierung der USSC auf eine mögliche Hochregulation Neurodifferenzierungs-relevanter Gene hindeuten. Gleichwohl stellen microRNAs posttranskriptionale Regulatoren dar und somit erhebt sich die Frage, ob im Zuge der Neurodifferenzierung der USSC neurodifferenzierungsrelevante Gene parallel auch auf Transkriptionsebene hochreguliert werden. Die mittels Illumina generierten Transkriptom-Daten zeigen eindeutig, dass eine überstatistische Menge an potentiellen Zielgenen für die 18 herunterregulierten microRNAs (2095 Gene, Abbildung 6.15) unter den in XXL-USSC hochregulierten Transkripten zu finden waren. Dies impliziert nicht nur eine neuro-orientierte Transkriptom-Änderung differenzierender USSC, sondern unterstützt auch die These, dass Regulation der Transkription und posttranskriptionale Regulation durch microRNAs, gleichwohl sie unabhängige Prozesse darstellen, einem gemeinsamen biologischen Ziel dienen: der Umstellung des Expressionsprofils einer somatischen Stammzelle in die Richtung eines differenzierten Neurons. Weiterhin reflektierte sich der unter XXL-Bedingungen auftretende Zellzyklusarrest in einem auffällig hohen Anteil Zellzyklus-relevanter Gene unter den in XXL-USSC herunterregulierten Transkripten.

Eine weitere interessante Parallelität zeigen die Daten der Neurodifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen [254] auf. Nicht nur, dass wie oben erwähnt, starke Ähnlichkeiten in der differentiellen microRNA-Expression zwischen sich differenzierenden USSCs und neurodifferenzierenden SH-SY5Y-Zellen bestehen, eine vergleichende Analyse der entsprechenden mRNA-Transkriptionsprofile ergab eine erhebliche Anreicherung von in

beiden Zellsystemen gemeinsam hochregulierten Transkripten (Abbildung 7.1). Dies ist auch deswegen bemerkenswert, weil SH-SY5Y-Zellen bereits die microRNAs miR-9 und -124 exprimieren und darüberhinaus zu funktionalen Neuronen ausdifferenzieren können [254]. Die Parallelitäten der dynamischen Expressionsmuster von microRNAs und mRNAs zwischen beiden Zellsystemen deuten darauf hin, dass auch die USSC im Zuge der XXL-Differenzierung einem neuronalen Zustand zustrebt, wenngleich dieser Differenzierungsprozess unter XXL-Bedingungen unvollständig verbleibt.



**Abbildung 7.1: Partiiell übereinstimmende Genexpressionsveränderungen in neuronal differenzierenden USSC und SH-SY5Y-Zellen.** Der grau unterlegte Kreis repräsentiert die Gesamtheit der in XXL-USSC hochregulierten Gene (3726), blau unterlegt sind die während neuronaler Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen hoch-regulierten Gene (2945) [254]. Die rot unterlegte Teilmenge repräsentiert alle in XXL-USSC hochregulierten und gleichzeitig für die Gruppe der 18 microRNAs vorhergesagten Zielgene. In den beiden Differenzierungen werden übereinstimmend 931 Gene hochreguliert, 609 davon sind als Zielgene der 18 in XXL-USSC herunter-regulierten microRNAs vorhergesagt.

Zusammenfassend bilden Transkriptom-Analysen eine hochauflösend gemessene Ergänzung zu den microRNA-Expressionsdaten. Einschränkend muss jedoch hier gesagt werden, dass nur für eine von drei getesteten USSC-Linien, nämlich USSC SA5/73, derartige Expressionsdaten gewonnen werden konnten, da die extrem hohe Apoptoserate an Tag 14 bzw. Tag 28 während der Differenzierung der anderen Zelllinien eine effiziente Generierung von Daten verhinderte. Nicht nur für die Beurteilung der USSC-Differenzierung *per se*, sondern auch für die Messung des funktionalen Einflusses der 18 herunterregulierten microRNAs, wäre es jedoch wünschenswert eine USSC-Analytik zur Verfügung zu haben, welche über einfache morphologische Inspektion und Messung des Expressionsstatus weniger Neurodifferenzierungs-Marker hinaus, einen genaueren Einblick in die molekularen Veränderungen der sich differenzierenden USSC ermöglicht. Der RT-PCR basierte humane Neurogenesis and Neural Stem Cell Array verknüpft in diesem Kontext eine gegenüber hybridisationsbasierten Arrays deutlich erhöhte Sensitivität und fokussiert sich auf 84 Transkripte die für Neuro-Differenzierung und -Entwicklung relevant sind. Der Vorteil erhöhter Sensitivität erlaubt kompaktere Differenzierungsansätze, was im Gegenzug und im

---

Lichte der nur limitiert zur Verfügung stehenden USSC-Mengen vielseitigere funktionale Analysen von microRNAs gestattet.

## 7.6 Funktionale microRNA-Analysen

Vor dem Hintergrund 18 herunterregulierter microRNAs erscheint die gängige Technik zur Überexpression von microRNAs, nämlich die Expressionsvektor-basierte Einbringung von pri-microRNA-Strukturen in die zu untersuchende Zelle, nicht nur wegen des damit verbundenen Klonier- und Kontrollaufwandes, wenig praktikabel. MicroRNA-Mimics hingegen transfizieren effizient in die USSC und bieten den eleganten Vorteil, dass sie nicht nur als Einzel-Mimics, sondern auch gruppenweise als „batches“ transfiziert werden können und die erzielte Überexpression die Herunterregulation der 18 microRNAs realitätsnäher konterkariert. Desweiteren können die batche in funktionale Untergruppen für detailliertere Analysen untergliedert werden. Gemeinsam mit morphologischen Analysen sollte der humane Neurogenesis and Neural Stem Cell Array dann als Ausleseparameter zur Reaktion der neuronalen Differenzierung der USSCs auf transfizierte microRNA-Mimics dienen. Initial zeigte sich in der Tat, dass im Zuge der XXL-Differenzierung der USSC eine erhebliche Anzahl von positiven Neurodifferenzierungsmodulatoren hochreguliert wurden, verbunden mit einer transkriptionellen Repression einiger Neuroinhibitoren; eine erneute Unterstützung der These, dass XXL-USSC in eine neuronale Richtung differenzieren (Abbildung 6.17).

Bei den funktionalen Analysen von mit microRNA-Mimic-batch transfizierten XXL-USSC zeigte sich jedoch, dass die im Neurogenesis-Array vertretenen Gene gegenüber untransfizierten XXL-USSC keine Veränderung aufwiesen, obgleich die parallel beobachteten morphologischen Veränderungen eindeutig auf einen funktionalen Einfluss der microRNAs hinwiesen. Letzterer zeigte sich insbesondere nach Überexpression von miR-17, -20a und -106b als deutliche Erhöhung der beobachteten Zellzahl, was in Übereinstimmung mit von uns publizierten Daten steht [73]. Auf Transfektion mit dem 10er- bzw. 7er-batch (siehe Abbildung 6.18) reagierten die XXL-induzierten Zellen hingegen mit erhöhten Sterberaten und zeigten schwächer ausgeprägte neuronale Morphologien. Dabei zeigten interessanterweise die im 10er-batch enthaltenen microRNAs miR-17, -20a und -106b ihre Zellzyklus-aktivierende Wirkung bei gemeinsamer Transfektion mit den anderen microRNAs nicht mehr. Letztlich bedürfen diese Experimente jedoch einer weiteren Verfeinerung; dazu gehören eine Titration der verwendeten microRNA-Mengen als auch eine Aufspaltung in kleinere Gruppen.

Es bleibt festzuhalten, dass die 10 getesteten microRNAs offensichtlich die Neurodifferenzierung beeinflussen können, dass sich dieser funktionale Einfluss jedoch noch nicht auf Transkriptionsebene (human Neurogenesis and Neural Stem Cell Array)

niederschlägt. Dies schließt auch die im human Neurogenesis and Neural Stem Cell Array Array vertretenen validierten Zielgene (PTN, STAT3, NRP1, NPTX1) ein, obgleich diese 4 Gene im Illumina Array an Tag 14 hochreguliert gefunden wurden und sich dieses Ergebnis mit Ausnahme von PTN an den Tagen 5-7 der XXL-Differenzierung im human Neurogenesis and Neural Stem Cell Array bestätigte. Im konkreten Fall waren die Tage 5-7 der Differenzierung eventuell noch zu früh, um indirekte microRNA-Effekte auf Transkriptionsebene zu messen. Die morphologischen Beobachtungen zeigten jedoch, dass intrazelluläre Veränderungen vorgegangen sein müssen, bei microRNAs als posttranskriptionalen Regulatoren ist daher anzunehmen, dass diese Veränderungen primär auf Reduktion der Zielgen-Proteinmengen durch microRNAs zurückzuführen sind und sich zu dem vergleichsweise frühen Zeitpunkt von 5-7 Tagen noch nicht auf Transkriptionsebene äußern.

Dennoch konnte in den vorgenannten Analysen das biologische Potential der 18 microRNAs bereits deutlich dargestellt werden. Es zeigte sich, dass obgleich microRNAs miR-9 und miR-124 nicht hochreguliert wurden, die beobachteten Veränderungen der microRNA-Populationen dennoch einen erheblichen Einfluss auf die Neurodifferenzierung zu nehmen vermögen. Eine genauere molekulare Analyse der Wirkungsweise dieser microRNAs ist zukünftigen Arbeiten vorbehalten.

## **7.7 Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass microRNAs als komplexes Netzwerk mit einer Vielzahl von putativen und validierten Zielgenen auf die neuronale Differenzierung von USSC einwirken. Anhand von 10 ausgesuchten microRNAs konnte der regulatorische Einfluss der herunterregulierten microRNA-Population auf neuronal relevanten Gene demonstriert werden. Die ersten funktionalen Analysen dieser microRNAs implizierten einen auf morphologischer Ebene bereits gut sichtbaren Einfluss auf die Neurodifferenzierung von USSC, welcher sich jedoch noch nicht auf Transkriptionsebene niederschlug. Es ist daher notwendig funktionale Analysen von microRNAs durch quantitative Proteom-Analysen zu unterstützen, um unmittelbare Auswirkungen von microRNAs auf Zielproteine zu erfassen. In-cell Western oder massenspektrometrische Messungen würden die translationalen Regulationen der überexprimierten microRNA-Mimics vermutlich deutlicher offenbaren als es bisher mRNA-Quantifizierungen verschiedenster Art erlauben. Auf dieser Basis wäre es dann möglich, die Einflüsse der herunterregulierten microRNAs durch Aufteilung in kleinere Untergruppen genauer zu bestimmen. Letztlich können solche Analysen auch auf die Wirkungsweise individueller microRNAs heruntergebrochen werden.

Die Beobachtung, dass zu keinem Zeitpunkt in USSC die neurospezifischen microRNAs miR-9 und miR-124 gefunden werden, wirft die Frage auf, inwieweit das Fehlen dieser microRNAs die neuronale Differenzierung von USSC behindert. MicroRNA-Mimic-basierte Überexpressionen von miR-9 und miR-124 im Zuge der XXL-Differenzierung könnten helfen diese Frage zu klären. Auch eine parallele Untersuchung der Ursachen der Nicht-Expression dieser microRNAs, mit Fokus auf die Promotoren der miR-9 und -124 Gene, ist anzustreben. Eine aktuelle Studie zeigt, dass es möglich ist, humane Fibroblasten durch Überexpression von miR-124 und miR-9/9\* zu Neuronen zu konvergieren [99]. Diese Resultate untermauern die Bedeutung von miR-9 und miR-124 für die neuronale Differenzierung und es ergibt sich die Hypothese, durch ektopische Expression dieser microRNAs die neuronale Andifferenzierung der USSC zu vervollständigen.

MicroRNAs stellen ein interessantes Werkzeug zum tieferen molekularen Verständnis von Differenzierungsprozessen dar [313]. Als Wegweiser fungierend lenken microRNAs den Blick auf funktional relevante Proteine im Kontext einer Differenzierung. Ausgehend von dieser Idee, vermag die vergleichende Betrachtung und Analyse der neuronalen Differenzierung von USSC und ipUSSC einen vertieften Einblick in die Molekularbiologie der Neurodifferenzierung zu liefern. Die vollständige neuronale Differenzierung von ipUSSC kann hierbei als Referenz dienen um die von der USSC beschrittenen molekularen Wege genauer zu analysieren und im Hinblick auf ihre Funktionalität zu bewerten. All dies folgt dem Ziel USSC zu funktional aktiven Neuronen zu differenzieren ohne dabei die mit lentiviralen genomischen Integraten behafteten Wege der Transdifferenzierung [314] zu beschreiten.

## 8 Anhang

### 8.1 MicroRNA-Expressionsprofile

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die mittels TaqMan Megaplex Assays erhobenen microRNA-Expressionsprofile nativer und XXL-differenzierter USSC der Linien SA5/03, SA5/73 und SA8/25. Die Normalisierung für die individuellen Messungen erfolgte über die gemittelten U6-RNA-Cts, die sich wie folgt darstellten: SA5/03 (a) Ct 15,3 (nativ) und Ct 14,6 (d14 XXL); SA5/03 (b) Ct 15,4 (nativ) und Ct 15,7 (d14 XXL); SA5/73 Ct 15,0 (native) und Ct 14,6 (d14 XXL); SA8/25 Ct 13,9 (nativ), Ct 13,2 (d14 XXL) und Ct 14,9 (d28 XXL). Unter Einbeziehung der Normalisierung für die individuellen Differenzierungen galt eine microRNA als nicht exprimiert wenn die dCts folgende Werte überschritten: SA5/03 (a) dCts  $\geq$  15,7 (nativ) und 16,4 (d14 XXL); SA5/03 (b) dCts  $\geq$  15,6 (nativ) und 15,3 (d14 XXL); SA5/73 dCts  $\geq$  16,0 (nativ) und 16,4 (d14 XXL); SA8/25 dCts  $\geq$  17,1 (nativ), 17,8 (d14 XXL) und 16,1 (d28 XXL). Die Expressionsveränderung ist in ddCts und der Faktor der Expressionsveränderung in  $2^{\Delta}(\text{ddCts})$  angegeben.

Tabelle 8.1: microRNA-Expressionsprofile von SA5/03 (a) und (b), sowie von SA5/73 (nativ und d14 XXL).

microRNA	SA5/03 (a)				SA5/03 (b)				SA5/73			
	dCt nativ	dCt d14 XXL	ddCt	$2^{\Delta}(\text{ddCt})$	dCt nativ	dCt d14 XXL	ddCt	$2^{\Delta}(\text{ddCt})$	dCt d0	dCt d14XXL	ddCt d14 XXL	$2^{\Delta}(\text{ddCt})$
hsa-let-7a-4373169	6.7	7.7	1.04	<b>0.49</b>	6.4	7.1	0.72	<b>0.61</b>	5.6	7.8	2.23	<b>0.21</b>
hsa-let-7b-4395446	4.3	4.5	0.23	<b>0.86</b>	4.1	3.9	-0.22	<b>1.17</b>	3.2	4.1	0.86	<b>0.55</b>
hsa-let-7c-4373167	9.6	11.3	1.64	<b>0.32</b>	9.5	10.7	1.19	<b>0.44</b>	8.1	9.9	1.77	<b>0.29</b>
hsa-let-7d-4395394	7.8	9.1	1.28	<b>0.41</b>	7.7	8.6	0.91	<b>0.53</b>	7.6	8.8	1.27	<b>0.41</b>
hsa-let-7e-4395517	3.7	4.8	1.08	<b>0.47</b>	3.8	4.4	0.62	<b>0.65</b>	3.7	4.1	0.44	<b>0.74</b>
hsa-let-7f-4373164	9.9	11.7	1.78	<b>0.29</b>	10.4	11.5	1.13	<b>0.46</b>	10.0	11.5	1.55	<b>0.34</b>
hsa-let-7g-4395393	7.1	8.0	0.83	<b>0.56</b>	7.4	8.3	0.87	<b>0.55</b>	7.5	8.7	1.19	<b>0.44</b>
hsa-miR-100-4373160	3.0	3.8	0.78	<b>0.58</b>	2.6	3.9	1.32	<b>0.40</b>	2.5	4.2	1.73	<b>0.30</b>
hsa-miR-101-4395364	14.7	15.0	0.33	<b>0.80</b>	15.0	16.3	1.28	<b>0.41</b>	14.1	15.2	1.13	<b>0.46</b>
hsa-miR-103-4373158	9.2	9.6	0.45	<b>0.73</b>	8.8	9.7	0.88	<b>0.54</b>	8.8	9.8	1.02	<b>0.49</b>
hsa-miR-105-4395278	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	17.2	-7.82	<b>226.14</b>
hsa-miR-106a-4395280	4.6	6.9	2.35	<b>0.20</b>	5.0	7.2	2.25	<b>0.21</b>	3.6	5.8	2.21	<b>0.22</b>
hsa-miR-106b-4373155	8.3	11.4	3.03	<b>0.12</b>	8.7	11.1	2.43	<b>0.19</b>	8.1	10.9	2.83	<b>0.14</b>
hsa-miR-107-4373154	14.0	15.5	1.50	<b>0.35</b>	14.3	15.1	0.77	<b>0.59</b>	14.3	14.2	-0.06	<b>1.04</b>
hsa-miR-10a-4373153	12.6	13.9	1.28	<b>0.41</b>	12.3	13.8	1.56	<b>0.34</b>	13.5	14.4	0.89	<b>0.54</b>
hsa-miR-10b-4395329	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-122-4395356	24.6	18.4	-6.25	<b>76.15</b>	24.6	13.9	-10.70	<b>1663.42</b>	25.0	15.6	-9.36	<b>658.66</b>
hsa-miR-124-4373295	17.7	20.8	3.10	<b>0.12</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	16.2	-8.76	<b>433.97</b>
hsa-miR-125a-3p-4395310	11.7	13.0	1.32	<b>0.40</b>	12.8	12.5	-0.30	<b>1.23</b>	12.8	13.9	1.09	<b>0.47</b>
hsa-miR-125a-5p-4395309	7.3	7.8	0.51	<b>0.70</b>	7.2	7.1	-0.06	<b>1.04</b>	7.2	7.1	-0.04	<b>1.03</b>
hsa-miR-125b-4373148	3.9	3.4	-0.50	<b>1.42</b>	3.5	3.3	-0.26	<b>1.20</b>	3.0	3.7	0.70	<b>0.62</b>
hsa-miR-126-4395339	13.1	12.8	-0.21	<b>1.16</b>	13.6	12.1	-1.52	<b>2.88</b>	12.1	11.0	-1.15	<b>2.22</b>
hsa-miR-127-3p-4373147	4.4	5.2	0.70	<b>0.61</b>	4.5	5.3	0.82	<b>0.57</b>	4.6	6.5	1.93	<b>0.26</b>
hsa-miR-127-5p-4395340	16.0	17.1	1.08	<b>0.47</b>	16.1	16.9	0.81	<b>0.57</b>	16.6	16.8	0.23	<b>0.86</b>
hsa-miR-128-4395327	12.6	13.1	0.45	<b>0.73</b>	12.2	12.7	0.51	<b>0.70</b>	12.2	12.9	0.67	<b>0.63</b>
hsa-miR-129-3p-4373297	13.6	15.6	2.08	<b>0.24</b>	13.4	15.9	2.50	<b>0.18</b>	13.6	14.7	1.13	<b>0.46</b>
hsa-miR-129-5p-4373171	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	19.8	24.3	4.52	<b>0.04</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-130a-4373145	10.0	12.9	2.84	<b>0.14</b>	10.0	13.1	3.12	<b>0.11</b>	9.8	12.4	2.62	<b>0.16</b>
hsa-miR-130b-4373144	10.1	12.4	2.37	<b>0.19</b>	9.8	12.3	2.50	<b>0.18</b>	9.4	12.3	2.95	<b>0.13</b>
hsa-miR-132-4373143	5.7	5.8	0.10	<b>0.93</b>	6.2	5.5	-0.74	<b>1.67</b>	6.2	5.3	-0.90	<b>1.87</b>
hsa-miR-133a-4395357	24.6	18.3	-6.33	<b>80.73</b>	17.0	15.4	-1.61	<b>3.05</b>	14.4	15.4	0.98	<b>0.51</b>
hsa-miR-133b-4395358	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	18.5	17.4	-1.06	<b>2.08</b>
hsa-miR-134-4373299	7.2	7.9	0.74	<b>0.60</b>	7.2	6.9	-0.29	<b>1.22</b>	7.5	7.2	-0.31	<b>1.24</b>
hsa-miR-135a-4373140	21.7	25.5	3.80	<b>0.07</b>	21.6	24.3	2.74	<b>0.15</b>	23.0	25.4	2.40	<b>0.19</b>
hsa-miR-135b-4395372	13.5	18.3	4.80	<b>0.04</b>	13.9	24.3	10.44	<b>0.00</b>	14.7	16.5	1.79	<b>0.29</b>
hsa-miR-136-4373173	20.4	25.5	5.08	<b>0.03</b>	24.6	22.2	-2.33	<b>5.04</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-137-4373301	9.4	12.6	3.13	<b>0.11</b>	9.7	11.6	1.95	<b>0.26</b>	11.2	13.3	2.18	<b>0.22</b>
hsa-miR-138-4395395	3.5	9.2	5.75	<b>0.02</b>	3.7	9.4	5.71	<b>0.02</b>	3.7	8.1	4.42	<b>0.05</b>
hsa-miR-139-3p-4395424	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	15.9	-8.65	<b>401.00</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-139-5p-4395400	17.0	14.9	-2.10	<b>4.28</b>	15.7	13.2	-2.49	<b>5.63</b>	16.3	15.3	-1.08	<b>2.12</b>

microRNA	SAS/03 (a)				SAS/03 (b)				SAS/73			
	dCt nativ	dCt d14 XXL	ddCt	2 <sup>-</sup> (ddCt)	dCt nativ	dCt d14 XXL	ddCt	2 <sup>-</sup> (ddCt)	dCt d0	dCt d14 XXL	ddCt d14 XXL	2 <sup>-</sup> (ddCt)
hsa-miR-140-3p-4395345	10.2	13.1	2.89	0.13	10.6	12.4	1.85	0.28	11.9	13.4	1.47	0.36
hsa-miR-140-5p-4373374	4.7	7.8	3.11	0.12	5.4	7.0	1.57	0.34	6.3	8.4	2.15	0.22
hsa-miR-141-4373137	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	18.2	-6.73	105.91
hsa-miR-142-3p-4373136	13.8	15.0	1.25	0.42	15.1	19.3	4.20	0.05	16.0	20.6	4.65	0.04
hsa-miR-142-5p-4395359	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-143-4395360	6.2	9.4	3.15	0.11	6.7	9.0	2.32	0.20	6.6	8.7	2.09	0.23
hsa-miR-1-4395333	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-145-4395389	3.5	5.2	1.71	0.30	3.4	4.9	1.47	0.36	3.3	4.4	1.06	0.48
hsa-miR-146a-4373132	6.4	8.9	2.54	0.17	7.3	8.8	1.49	0.36	5.6	3.1	-2.48	5.57
hsa-miR-146b-3p-4395472	24.6	16.4	-8.21	295.23	24.6	24.3	-0.26	1.20	18.1	17.1	-1.00	2.00
hsa-miR-146b-5p-4373178	10.3	11.3	1.04	0.49	11.3	10.5	-0.81	1.75	10.4	9.2	-1.20	2.30
hsa-miR-147-4373131	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-147b-4395373	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	21.0	-3.60	12.16	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-148a-4373130	17.8	17.8	-0.05	1.04	17.8	16.5	-1.38	2.61	25.0	17.4	-7.56	188.35
hsa-miR-148b-4373129	13.6	14.9	1.28	0.41	14.3	15.7	1.39	0.38	13.6	14.1	0.57	0.67
hsa-miR-149-4395366	8.3	8.3	0.02	0.99	8.4	7.3	-1.08	2.11	8.3	8.9	0.60	0.66
hsa-miR-150-4373127	15.9	14.9	-1.03	2.04	17.8	13.4	-4.40	21.07	16.0	14.1	-1.83	3.54
hsa-miR-152-4395170	7.7	9.2	1.59	0.33	8.2	9.0	0.76	0.59	8.1	9.0	0.91	0.53
hsa-miR-153-4373305	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-154-4373270	18.4	18.8	0.41	0.75	15.6	24.3	8.75	0.00	16.4	20.0	3.56	0.08
hsa-miR-155-4395459	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-15a-4373123	12.0	15.5	3.49	0.09	12.5	15.0	2.53	0.17	12.3	12.6	0.37	0.77
hsa-miR-15b-4373122	7.3	9.0	1.71	0.31	7.8	8.9	1.09	0.47	7.1	10.2	3.12	0.11
hsa-miR-16-4373121	3.2	4.8	1.65	0.32	4.4	4.9	0.48	0.72	3.5	5.2	1.71	0.31
hsa-miR-17-4395419	4.4	7.2	2.80	0.14	5.3	7.5	2.23	0.21	3.9	6.0	2.10	0.23
hsa-miR-181a-4373117	9.1	9.1	-0.02	1.01	9.2	9.3	0.11	0.93	9.4	8.5	-0.97	1.96
hsa-miR-181c-4373115	16.6	17.0	0.48	0.72	16.9	18.0	1.11	0.46	15.7	15.6	-0.11	1.08
hsa-miR-182-4395445	19.5	25.5	5.91	0.02	19.1	24.3	5.27	0.03	25.0	18.5	-6.52	91.58
hsa-miR-183-4395380	18.6	25.5	6.86	0.01	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	19.8	-5.19	36.44
hsa-miR-184-4373113	24.6	20.8	-3.84	14.33	24.6	16.8	-7.76	216.17	25.0	17.9	-7.10	136.88
hsa-miR-185-4395382	12.4	13.9	1.53	0.35	12.5	14.6	2.12	0.23	12.2	13.0	0.72	0.61
hsa-miR-186-4395396	7.0	7.6	0.59	0.66	8.0	7.4	-0.63	1.55	7.4	6.4	-0.97	1.96
hsa-miR-187-4373307	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	15.4	-9.62	785.18
hsa-miR-188-3p-4395217	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-18a-4395533	10.3	14.0	3.70	0.08	10.7	13.9	3.19	0.11	9.7	13.5	3.80	0.07
hsa-miR-18b-4395328	12.6	16.2	3.61	0.08	12.4	16.9	4.53	0.04	12.0	16.4	4.30	0.05
hsa-miR-190-4373110	19.8	16.3	-3.44	10.86	18.5	24.3	5.85	0.02	17.8	25.4	7.63	0.01
hsa-miR-191-4395410	4.4	3.9	-0.47	1.39	5.0	3.1	-1.84	3.59	3.7	2.5	-1.19	2.29
hsa-miR-192-4373108	13.4	14.3	0.92	0.53	13.1	13.4	0.33	0.79	13.4	13.4	-0.02	1.02
hsa-miR-193a-3p-4395361	15.0	18.4	3.40	0.09	15.6	18.7	3.06	0.12	16.3	17.6	1.30	0.41
hsa-miR-193a-5p-4395392	6.2	7.3	1.14	0.46	5.0	6.4	1.42	0.37	5.1	7.2	2.13	0.23
hsa-miR-193b-4395478	5.6	6.1	0.55	0.68	4.5	5.5	1.02	0.49	5.7	6.4	0.64	0.64
hsa-miR-194-4373106	14.6	14.2	-0.34	1.27	14.4	13.7	-0.70	1.62	14.9	14.7	-0.29	1.22
hsa-miR-195-4373105	10.2	12.2	1.92	0.26	11.2	12.0	0.83	0.56	10.4	12.4	1.97	0.25
hsa-miR-196b-4395326	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-197-4373102	9.1	8.4	-0.65	1.57	8.7	7.4	-1.34	2.53	8.4	7.5	-0.95	1.93
hsa-miR-198-4395384	24.6	17.2	-7.41	170.01	24.6	15.5	-9.13	560.01	17.5	16.3	-1.21	2.31
hsa-miR-199a-3p-4395415	3.9	6.2	2.29	0.21	12.4	15.5	3.08	0.12	12.5	15.0	2.48	0.18
hsa-miR-199a-5p-4373272	12.3	14.4	2.05	0.24	5.2	6.5	1.35	0.39	3.7	6.8	3.07	0.12
hsa-miR-199b-5p-4373100	13.6	17.3	3.71	0.08	14.5	18.2	3.72	0.08	13.9	16.5	2.61	0.16
hsa-miR-19a-4373099	8.4	11.5	3.14	0.11	9.2	11.1	1.89	0.27	8.2	9.9	1.65	0.32
hsa-miR-19b-4373098	4.0	6.6	2.62	0.16	4.7	6.6	1.93	0.26	3.9	5.6	1.73	0.30
hsa-miR-200a-4378069	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-200b-4395362	17.7	15.5	-2.19	4.56	17.0	24.3	7.33	0.01	16.2	15.4	-0.82	1.77
hsa-miR-200c-4395411	14.4	14.1	-0.29	1.22	14.2	13.1	-1.06	2.09	14.0	12.4	-1.63	3.10
hsa-miR-202-4395474	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-203-4373095	13.5	16.5	3.05	0.12	18.8	16.0	-2.81	7.02	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-204-4373094	15.4	25.5	10.06	0.00	16.9	16.3	-0.57	1.49	18.7	16.5	-2.19	4.55
hsa-miR-205-4373093	17.4	25.5	8.01	0.00	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-208-4373091	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-208b-4395401	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-20a-4373286	5.3	8.6	3.25	0.11	5.5	8.7	3.25	0.10	4.2	7.5	3.35	0.10
hsa-miR-20b-4373263	9.0	11.7	2.63	0.16	9.3	11.9	2.56	0.17	7.2	9.6	2.34	0.20
hsa-miR-210-4373089	6.7	9.7	2.97	0.13	7.6	9.0	1.34	0.40	8.0	7.9	-0.02	1.02
hsa-miR-211-4373088	24.6	19.0	-5.61	48.85	24.6	24.3	-0.26	1.20	17.4	16.9	-0.50	1.41
hsa-miR-212-4373087	9.8	10.3	0.44	0.74	10.5	9.8	-0.74	1.67	10.7	9.2	-1.44	2.71
hsa-miR-21-4373090	4.8	5.9	1.04	0.49	5.1	5.9	0.80	0.57	5.7	5.8	0.10	0.93
hsa-miR-214-4395417	4.5	6.5	1.92	0.26	4.9	6.6	1.70	0.31	4.4	6.4	2.03	0.24
hsa-miR-215-4373084	15.7	16.4	0.71	0.61	15.2	16.1	0.94	0.52	15.3	15.1	-0.20	1.15
hsa-miR-216a-4395331	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	19.3	25.4	6.07	0.01
hsa-miR-216b-4395437	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	18.3	25.4	7.11	0.01
hsa-miR-217-4395448	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	19.2	-5.79	55.17
hsa-miR-218-4373081	9.5	12.7	3.23	0.11	10.5	13.0	2.53	0.17	8.5	10.2	1.71	0.31
hsa-miR-219-1-3p-4395206	15.6	19.1	3.49	0.09	16.1	16.3	0.15	0.90	16.5	25.4	8.92	0.00
hsa-miR-219-2-3p-4395501	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-219-5p-4373080	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-220-4373078	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-220b-4395317	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-220c-4395322	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-221-4373077	4.0	5.8	1.76	0.29	3.2	5.8	2.56	0.17	3.7	7.2	3.55	0.09

microRNA	SAS/03 (a)				SAS/03 (b)				SAS/73			
	dCt nativ	dCt d14XXL	ddCt	2 <sup>-</sup> (ddCt)	dCt nativ	dCt d14XXL	ddCt	2 <sup>-</sup> (ddCt)	dCt d0	dCt d14XXL	ddCt d14XXL	2 <sup>-</sup> (ddCt)
hsa-miR-222-4395387	1.0	3.1	2.09	0.24	1.1	2.8	1.73	0.30	0.9	3.0	2.06	0.24
hsa-miR-223-4395406	8.7	8.8	0.04	0.97	16.5	11.5	-4.94	30.77	15.6	13.5	-2.05	4.14
hsa-miR-22-4373079	10.6	13.7	3.10	0.12	10.3	12.9	2.58	0.17	10.3	12.0	1.66	0.32
hsa-miR-224-4395210	7.5	8.8	1.23	0.43	7.9	9.3	1.38	0.38	7.2	8.3	1.14	0.45
hsa-miR-23a-4373074	10.5	11.9	1.43	0.37	9.8	11.0	1.21	0.43	10.0	12.0	1.98	0.25
hsa-miR-23b-4373073	15.2	14.4	-0.80	1.75	13.4	12.8	-0.60	1.52	12.9	11.3	-1.58	2.98
hsa-miR-24-4373072	0.9	1.8	0.94	0.52	1.4	1.7	0.21	0.87	0.8	1.0	0.23	0.85
hsa-miR-25-4373071	9.7	11.7	1.94	0.26	9.8	11.9	2.10	0.23	9.5	11.5	2.07	0.24
hsa-miR-26a-4395166	6.3	7.9	1.64	0.32	6.5	7.6	1.12	0.46	6.1	7.2	1.11	0.46
hsa-miR-26b-4395167	8.4	10.1	1.66	0.32	8.7	10.2	1.54	0.34	8.7	10.0	1.26	0.42
hsa-miR-27a-4373287	7.2	9.6	2.36	0.19	6.9	9.5	2.65	0.16	7.2	10.1	2.96	0.13
hsa-miR-27b-4373068	10.2	12.0	1.79	0.29	10.2	12.0	1.78	0.29	9.7	11.0	1.36	0.39
hsa-miR-28-3p-4395557	8.7	10.4	1.70	0.31	8.9	9.6	0.67	0.63	7.6	8.3	0.74	0.60
hsa-miR-28-5p-4373067	9.5	11.9	2.34	0.20	9.8	12.0	2.23	0.21	8.8	10.7	1.83	0.28
hsa-miR-296-3p-4395212	24.6	16.1	-8.47	355.43	16.6	24.3	7.72	0.00	17.0	15.7	-1.23	2.34
hsa-miR-296-5p-4373066	11.0	11.2	0.14	0.91	10.6	10.1	-0.42	1.33	11.4	11.5	0.10	0.93
hsa-miR-298-4395301	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	19.9	-5.11	34.46
hsa-miR-299-3p-4373189	24.6	25.5	0.85	0.55	17.6	24.3	6.76	0.01	18.7	25.4	6.67	0.01
hsa-miR-299-5p-4373188	13.4	16.2	2.83	0.14	14.3	15.0	0.72	0.61	14.7	15.9	1.25	0.42
hsa-miR-29a-4395223	4.8	7.5	2.67	0.16	5.3	7.0	1.63	0.32	4.8	6.4	1.59	0.33
hsa-miR-29b-4373288	12.5	14.7	2.25	0.21	11.6	13.2	1.62	0.33	12.1	13.4	1.25	0.42
hsa-miR-29c-4395171	7.8	10.3	2.55	0.17	8.1	10.1	1.98	0.25	8.1	9.7	1.62	0.33
hsa-miR-301a-4373064	10.8	12.3	1.51	0.35	11.2	12.4	1.19	0.44	10.4	12.4	1.96	0.26
hsa-miR-301b-4395503	15.4	16.1	0.76	0.59	14.8	16.0	1.13	0.46	14.2	15.2	1.00	0.50
hsa-miR-302a-4378070	24.6	20.1	-4.48	22.30	24.6	24.3	-0.26	1.20	16.7	19.4	2.66	0.16
hsa-miR-302b-4378071	17.6	25.5	7.88	0.00	15.8	24.3	8.52	0.00	14.0	18.7	4.76	0.04
hsa-miR-302c-4378072	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	18.3	25.4	7.13	0.01
hsa-miR-30b-4373290	6.6	7.8	1.19	0.44	6.7	7.1	0.41	0.75	7.0	6.8	-0.18	1.14
hsa-miR-30c-4373060	5.7	6.8	1.05	0.48	6.5	6.3	-0.21	1.15	5.7	5.1	-0.63	1.55
hsa-miR-31-4395390	1.0	2.8	1.76	0.30	1.6	2.8	1.25	0.42	2.8	3.9	1.12	0.46
hsa-miR-320-4395388	4.0	4.6	0.56	0.68	4.1	4.3	0.13	0.91	4.2	4.3	0.05	0.97
hsa-miR-323-3p-4395338	9.6	9.6	-0.01	1.01	10.3	8.9	-1.41	2.66	9.7	9.3	-0.38	1.31
hsa-miR-32-4395220	17.3	16.8	-0.46	1.37	16.6	24.3	7.74	0.00	15.7	16.9	1.20	0.44
hsa-miR-324-3p-4395272	11.6	12.1	0.54	0.69	11.7	12.3	0.57	0.67	11.6	11.7	0.18	0.89
hsa-miR-324-5p-4373052	12.6	12.6	0.00	1.00	10.8	12.7	1.97	0.25	11.1	13.0	1.94	0.26
hsa-miR-325-4373051	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-326-4373050	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-328-4373049	9.4	7.8	-1.63	3.10	8.6	7.2	-1.38	2.61	9.8	7.9	-1.91	3.75
hsa-miR-329-4373191	15.3	15.9	0.61	0.65	15.1	15.9	0.81	0.57	15.8	17.2	1.46	0.36
hsa-miR-330-3p-4373047	14.6	14.2	-0.42	1.34	15.5	14.2	-1.31	2.48	15.3	15.0	-0.25	1.19
hsa-miR-330-5p-4395341	17.7	25.5	7.78	0.00	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-331-3p-4373046	8.0	7.2	-0.78	1.72	7.3	7.0	-0.27	1.20	7.5	7.3	-0.17	1.12
hsa-miR-331-5p-4395344	17.0	25.5	8.49	0.00	15.5	16.2	0.66	0.63	15.9	16.1	0.24	0.85
hsa-miR-335-4373045	7.8	11.6	3.80	0.07	7.9	10.6	2.71	0.15	9.6	11.5	1.89	0.27
hsa-miR-337-5p-4395267	11.9	13.7	1.85	0.28	11.4	12.9	1.55	0.34	12.2	14.0	1.81	0.29
hsa-miR-338-3p-4395363	18.5	25.5	6.94	0.01	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-339-3p-4395295	11.0	10.8	-0.16	1.11	10.4	10.8	0.35	0.78	10.5	10.1	-0.36	1.29
hsa-miR-339-5p-4395368	10.3	11.5	1.16	0.45	10.6	11.4	0.75	0.59	10.2	11.2	0.96	0.51
hsa-miR-33b-4395196	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-340-4395369	11.5	14.9	3.44	0.09	12.3	14.1	1.83	0.28	11.9	13.4	1.53	0.35
hsa-miR-342-3p-4395371	8.6	9.0	0.42	0.75	9.1	8.1	-0.97	1.95	8.6	7.5	-1.16	2.24
hsa-miR-342-5p-4395258	17.7	18.9	1.21	0.43	24.6	18.8	-5.75	53.64	17.7	17.9	0.19	0.88
hsa-miR-345-4395297	10.0	11.0	0.98	0.51	10.6	10.9	0.31	0.81	9.2	9.4	0.18	0.89
hsa-miR-346-4373038	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	15.3	-9.26	611.62	25.0	15.9	-9.08	542.98
hsa-miR-34a-4395168	8.5	5.9	-2.56	5.89	8.3	6.7	-1.59	3.02	6.5	5.2	-1.34	2.54
hsa-miR-34c-5p-4373036	13.9	17.5	3.57	0.08	14.8	18.2	3.34	0.10	12.6	15.4	2.85	0.14
hsa-miR-361-5p-4373035	11.5	11.7	0.25	0.84	10.6	11.1	0.44	0.74	11.4	11.3	-0.08	1.06
hsa-miR-362-3p-4395228	17.3	19.4	2.06	0.24	16.9	16.5	-0.39	1.31	16.6	17.8	1.16	0.45
hsa-miR-362-5p-4378092	11.2	14.3	3.09	0.12	11.0	13.2	2.18	0.22	11.4	12.4	1.01	0.50
hsa-miR-363-4378090	19.8	19.7	-0.14	1.10	20.9	24.3	3.40	0.09	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-365-4373194	6.2	7.9	1.73	0.30	5.6	7.2	1.65	0.32	6.0	8.0	2.00	0.25
hsa-miR-367-4373034	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	16.4	25.4	9.05	0.00
hsa-miR-369-3p-4373032	13.8	16.4	2.59	0.17	16.2	24.3	8.13	0.00	15.6	16.7	1.06	0.48
hsa-miR-369-5p-4373195	14.9	16.0	1.08	0.47	14.0	15.1	1.04	0.49	14.7	16.3	1.61	0.33
hsa-miR-370-4395386	7.5	9.3	1.80	0.29	7.8	9.3	1.57	0.34	7.8	10.1	2.33	0.20
hsa-miR-371-3p-4395235	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-372-4373029	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	19.0	-5.94	61.44
hsa-miR-373-4378073	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-374a-4373028	7.2	9.0	1.83	0.28	8.1	9.0	0.88	0.54	7.7	8.1	0.42	0.75
hsa-miR-374b-4381045	7.4	8.3	0.86	0.55	8.3	7.8	-0.48	1.40	8.1	7.6	-0.49	1.40
hsa-miR-375-4373027	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	25.0	25.4	0.44	0.74
hsa-miR-376a-4373026	5.5	8.2	2.66	0.16	6.6	8.2	1.62	0.33	7.1	8.9	1.80	0.29
hsa-miR-376b-4373196	14.6	19.1	4.45	0.05	15.0	24.3	9.30	0.00	16.2	25.4	9.23	0.00
hsa-miR-376c-4395233	4.7	7.4	2.76	0.15	5.9	7.8	1.87	0.27	6.5	8.4	1.94	0.26
hsa-miR-377-4373025	16.6	17.4	0.84	0.56	24.6	24.3	-0.26	1.20	16.9	25.4	8.51	0.00
hsa-miR-379-4373349	7.5	9.7	2.22	0.21	7.8	9.8	1.92	0.26	8.0	10.1	2.05	0.24
hsa-miR-380-4373022	16.6	25.5	8.81	0.00	24.6	16.8	-7.76	217.24	16.7	25.4	8.74	0.00
hsa-miR-381-4373020	16.2	25.5	9.30	0.00	15.6	24.3	8.77	0.00	17.0	16.9	-0.16	1.12
hsa-miR-382-4373019	5.9	7.2	1.33	0.40	6.6	7.4	0.83	0.56	7.0	8.5	1.47	0.36
hsa-miR-383-4373018	24.6	25.5	0.85	0.55	24.6	24.3	-0.26	1.20	16.0	25.4	9.46	0.00

microRNA	SAS/03 (a)				SAS/03 (b)				SAS/73			
	dCt nativ	dCt d14XXL	ddCt	2 <sup>-Δ(ΔdCt)</sup>	dCt nativ	dCt d14XXL	ddCt	2 <sup>-Δ(ΔdCt)</sup>	dCt d0	dCt d14XXL	ddCt d14 XXL	2 <sup>-Δ(ΔdCt)</sup>
hsa-miR-384-4373017	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-409-5p-4395442	13.1	14.1	1.01	<b>0.50</b>	13.4	14.5	1.12	<b>0.46</b>	13.3	14.9	1.63	<b>0.32</b>
hsa-miR-410-4378093	8.0	9.6	1.55	<b>0.34</b>	8.9	10.0	1.11	<b>0.46</b>	9.2	11.2	2.01	<b>0.25</b>
hsa-miR-411-4381013	7.1	9.2	2.03	<b>0.24</b>	8.2	9.6	1.47	<b>0.36</b>	8.5	9.8	1.30	<b>0.41</b>
hsa-miR-412-4373199	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-422a-4395408	17.3	16.9	-0.36	<b>1.28</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-423-5p-4395451	11.7	12.3	0.54	<b>0.69</b>	10.5	11.8	1.25	<b>0.42</b>	11.3	12.0	0.73	<b>0.60</b>
hsa-miR-424-4373201	13.2	17.7	4.51	<b>0.04</b>	12.8	17.1	4.28	<b>0.05</b>	14.6	25.4	10.83	<b>0.00</b>
hsa-miR-425-4380926	11.1	11.3	0.18	<b>0.88</b>	11.6	10.7	-0.89	<b>1.85</b>	10.7	10.6	-0.03	<b>1.02</b>
hsa-miR-429-4373203	17.7	25.5	7.71	<b>0.00</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-431-4395173	9.0	12.0	3.02	<b>0.12</b>	9.6	13.0	3.40	<b>0.09</b>	9.2	13.3	4.10	<b>0.06</b>
hsa-miR-433-4373205	9.0	9.1	0.10	<b>0.93</b>	9.2	9.3	0.15	<b>0.90</b>	9.5	11.0	1.46	<b>0.36</b>
hsa-miR-448-4373206	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-449a-4373207	20.0	25.5	5.47	<b>0.02</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-449b-4381011	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	22.6	17.7	-4.90	<b>29.80</b>
hsa-miR-450a-4395414	14.6	25.5	10.82	<b>0.00</b>	15.0	24.3	9.31	<b>0.00</b>	16.8	25.4	8.58	<b>0.00</b>
hsa-miR-450b-3p-4395319	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-450b-5p-4395318	14.1	25.5	11.34	<b>0.00</b>	17.3	24.3	7.07	<b>0.01</b>	16.0	25.4	9.44	<b>0.00</b>
hsa-miR-451-4373360	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-452-4395440	11.1	10.5	-0.57	<b>1.48</b>	11.6	10.5	-1.13	<b>2.20</b>	10.5	9.9	-0.62	<b>1.54</b>
hsa-miR-453-4395429	15.3	16.5	1.19	<b>0.44</b>	18.7	24.3	5.67	<b>0.02</b>	16.1	19.3	3.22	<b>0.11</b>
hsa-miR-454-4395434	7.7	9.7	1.97	<b>0.26</b>	9.0	9.8	0.81	<b>0.57</b>	7.4	9.1	1.68	<b>0.31</b>
hsa-miR-455-3p-4395355	9.8	11.5	1.69	<b>0.31</b>	10.1	11.4	1.25	<b>0.42</b>	10.4	13.3	2.90	<b>0.13</b>
hsa-miR-455-5p-4378098	10.5	13.3	2.77	<b>0.15</b>	11.8	13.5	1.72	<b>0.30</b>	11.5	14.4	2.82	<b>0.14</b>
hsa-miR-483-5p-4395449	24.6	15.8	-8.82	<b>452.49</b>	17.5	14.1	-3.43	<b>10.76</b>	17.0	12.6	-4.39	<b>20.94</b>
hsa-miR-484-4381032	6.0	6.3	0.25	<b>0.84</b>	5.6	5.5	-0.07	<b>1.05</b>	5.5	5.1	-0.46	<b>1.38</b>
hsa-miR-485-3p-4378095	7.5	9.8	2.36	<b>0.19</b>	7.9	9.3	1.41	<b>0.38</b>	8.1	10.2	2.03	<b>0.24</b>
hsa-miR-485-5p-4373212	12.0	11.2	-0.74	<b>1.67</b>	11.6	10.9	-0.71	<b>1.64</b>	12.0	11.6	-0.42	<b>1.34</b>
hsa-miR-486-3p-4395204	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	18.5	-6.52	<b>91.51</b>
hsa-miR-486-5p-4378096	16.9	17.0	0.06	<b>0.96</b>	17.6	17.5	-0.19	<b>1.14</b>	15.4	16.0	0.56	<b>0.68</b>
hsa-miR-487a-4378097	15.1	17.4	2.31	<b>0.20</b>	16.1	18.4	2.29	<b>0.20</b>	16.4	19.1	2.65	<b>0.16</b>
hsa-miR-487b-4378102	9.0	10.3	1.38	<b>0.38</b>	9.9	10.1	0.23	<b>0.85</b>	10.1	11.1	1.03	<b>0.49</b>
hsa-miR-488-4395468	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-489-4395469	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	18.1	-6.49	<b>89.88</b>	18.0	17.4	-0.54	<b>1.45</b>
hsa-miR-490-3p-4373215	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-491-3p-4395471	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	19.7	25.4	5.67	<b>0.02</b>
hsa-miR-491-5p-4381053	12.8	12.1	-0.70	<b>1.62</b>	12.9	11.3	-1.58	<b>2.99</b>	12.7	11.1	-1.60	<b>3.04</b>
hsa-miR-492-4373217	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-493-4395475	9.7	11.3	1.64	<b>0.32</b>	10.4	11.7	1.22	<b>0.43</b>	10.8	12.5	1.75	<b>0.30</b>
hsa-miR-494-4395476	7.8	9.4	1.57	<b>0.34</b>	8.5	9.1	0.54	<b>0.69</b>	8.1	9.5	1.38	<b>0.38</b>
hsa-miR-495-4381078	7.1	9.4	2.37	<b>0.19</b>	7.8	9.3	1.55	<b>0.34</b>	7.7	9.9	2.16	<b>0.22</b>
hsa-miR-496-4386771	24.6	19.6	-5.02	<b>32.38</b>	17.8	17.3	-0.49	<b>1.40</b>	16.4	25.4	8.97	<b>0.00</b>
hsa-miR-499-3p-4395538	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-499-5p-4381047	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-500-4395539	12.5	14.1	1.60	<b>0.33</b>	12.6	14.7	2.07	<b>0.24</b>	13.6	14.1	0.45	<b>0.73</b>
hsa-miR-501-3p-4395546	16.8	18.7	1.92	<b>0.26</b>	15.3	24.3	9.00	<b>0.00</b>	15.9	25.4	9.47	<b>0.00</b>
hsa-miR-501-5p-4373226	13.8	25.5	11.69	<b>0.00</b>	14.1	14.5	0.39	<b>0.77</b>	14.6	13.1	-1.42	<b>2.68</b>
hsa-miR-502-3p-4395194	15.0	17.0	1.95	<b>0.26</b>	15.0	16.8	1.80	<b>0.29</b>	15.8	17.3	1.52	<b>0.35</b>
hsa-miR-502-5p-4373227	15.2	25.5	10.27	<b>0.00</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	16.4	16.8	0.42	<b>0.75</b>
hsa-miR-503-4373228	14.9	25.5	10.51	<b>0.00</b>	14.6	24.3	9.77	<b>0.00</b>	16.2	25.4	9.17	<b>0.00</b>
hsa-miR-504-4395195	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-505-4395200	13.6	18.4	4.82	<b>0.04</b>	16.3	16.3	0.08	<b>0.95</b>	14.2	18.0	3.79	<b>0.07</b>
hsa-miR-506-4373231	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-507-4373232	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-508-3p-4373233	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-508-5p-4395203	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-509-3-5p-4395266	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-509-5p-4395346	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-510-4395352	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-511-4373236	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-512-3p-4381034	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	18.1	-6.88	<b>117.84</b>
hsa-miR-512-5p-4373238	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-513-5p-4395201	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-515-3p-4395480	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-515-5p-4373242	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-516a-5p-4395527	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-516b-4395172	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-517a-4395513	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	18.5	-6.45	<b>87.71</b>
hsa-miR-517b-4373244	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	21.6	-3.39	<b>10.52</b>
hsa-miR-517c-4373264	24.6	20.0	-4.59	<b>24.04</b>	21.0	18.2	-2.77	<b>6.80</b>	25.0	18.1	-6.85	<b>115.06</b>
hsa-miR-518a-3p-4395508	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-518a-5p-4395507	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-518b-4373246	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-518c-4395512	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-518d-3p-4373248	16.8	25.5	8.70	<b>0.00</b>	24.6	17.5	-7.13	<b>139.60</b>	18.5	25.4	6.94	<b>0.01</b>
hsa-miR-518d-5p-4395500	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-518e-4395506	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-518f-4395499	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-519a-4395526	24.6	21.7	-2.86	<b>7.24</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-519c-3p-4373251	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>

microRNA	SAS/03 (a)				SAS/03 (b)				SAS/73			
	dCt nativ	dCt d14XXL	ddCt	2 <sup>-</sup> ·(ddCt)	dCt nativ	dCt d14XXL	ddCt	2 <sup>-</sup> ·(ddCt)	dCt d0	dCt d14XXL	ddCt d14XXL	2 <sup>-</sup> ·(ddCt)
hsa-miR-519d-4395514	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	20.9	-3.64	<b>12.47</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-519e-4395481	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	17.7	24.3	6.59	<b>0.01</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-520a-3p-4373268	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-520a-5p-4378085	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-520b-4373252	24.6	19.1	-5.52	<b>46.04</b>	24.6	18.9	-5.65	<b>50.27</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-520d-5p-4395504	14.8	16.5	1.67	<b>0.31</b>	16.8	16.8	0.08	<b>0.95</b>	20.5	25.4	4.88	<b>0.03</b>
hsa-miR-520e-4373255	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-520f-4373256	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-520g-4373257	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-521-4373259	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-522-4395524	20.7	25.5	4.75	<b>0.04</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-523-4395497	24.6	20.1	-4.51	<b>22.73</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	18.2	-6.77	<b>109.04</b>
hsa-miR-524-5p-4395174	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-525-3p-4395496	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	19.2	-5.78	<b>54.80</b>
hsa-miR-525-5p-4378088	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-526b-4395493	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-532-3p-4395466	10.4	10.6	0.16	<b>0.89</b>	10.1	10.3	0.17	<b>0.89</b>	10.5	9.7	-0.72	<b>1.65</b>
hsa-miR-532-5p-4380928	8.8	10.4	1.63	<b>0.32</b>	9.2	10.3	1.07	<b>0.48</b>	9.4	9.5	0.11	<b>0.92</b>
hsa-miR-539-4378103	6.3	6.9	0.59	<b>0.66</b>	7.4	6.8	-0.65	<b>1.57</b>	7.0	7.6	0.69	<b>0.62</b>
hsa-miR-541-4395312	16.6	16.9	0.26	<b>0.83</b>	17.5	16.1	-1.42	<b>2.67</b>	18.3	17.3	-1.01	<b>2.02</b>
hsa-miR-542-3p-4378101	15.8	25.5	9.66	<b>0.00</b>	16.7	24.3	7.64	<b>0.01</b>	16.1	20.3	4.18	<b>0.06</b>
hsa-miR-542-5p-4395351	16.4	25.5	9.06	<b>0.00</b>	18.5	19.9	1.47	<b>0.36</b>	21.6	25.4	3.86	<b>0.07</b>
hsa-miR-544-4395376	17.2	25.5	8.29	<b>0.00</b>	17.1	24.3	7.22	<b>0.01</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-545-4395378	15.2	17.7	2.49	<b>0.18</b>	24.6	16.8	-7.82	<b>226.49</b>	16.1	19.4	3.32	<b>0.10</b>
hsa-miR-548a-3p-4380948	19.1	25.5	6.38	<b>0.01</b>	24.6	16.5	-8.08	<b>270.42</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-548a-5p-4395523	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-548b-3p-4380951	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-548b-5p-4395519	19.0	19.2	0.24	<b>0.85</b>	19.3	24.3	4.98	<b>0.03</b>	19.6	20.4	0.79	<b>0.58</b>
hsa-miR-548c-3p-4380993	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-548c-5p-4395540	21.1	18.9	-2.23	<b>4.68</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	17.3	25.4	8.12	<b>0.00</b>
hsa-miR-548d-3p-4381008	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	16.3	24.3	8.04	<b>0.00</b>	19.3	25.4	6.11	<b>0.01</b>
hsa-miR-548d-5p-4395348	17.5	22.2	4.72	<b>0.04</b>	17.0	24.3	7.29	<b>0.01</b>	19.0	21.1	2.11	<b>0.23</b>
hsa-miR-551b-4380945	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-556-3p-4395456	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-556-5p-4395455	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-561-4380938	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-570-4395458	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-574-3p-4395460	5.1	4.4	-0.69	<b>1.61</b>	5.3	3.6	-1.75	<b>3.37</b>	5.1	3.5	-1.53	<b>2.89</b>
hsa-miR-576-3p-4395462	14.0	16.7	2.64	<b>0.16</b>	14.4	16.2	1.81	<b>0.29</b>	14.4	18.4	4.00	<b>0.06</b>
hsa-miR-576-5p-4395461	18.5	18.7	0.19	<b>0.87</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	17.8	25.4	7.59	<b>0.01</b>
hsa-miR-579-4395509	14.3	17.1	2.77	<b>0.15</b>	15.2	24.3	9.12	<b>0.00</b>	16.8	17.0	0.25	<b>0.84</b>
hsa-miR-582-3p-4395510	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-582-5p-4395175	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-589-4395520	24.6	19.8	-4.81	<b>27.98</b>	20.2	24.3	4.11	<b>0.06</b>	16.7	20.2	3.48	<b>0.09</b>
hsa-miR-590-5p-4395176	9.8	12.4	2.58	<b>0.17</b>	10.6	11.9	1.31	<b>0.40</b>	10.0	11.3	1.28	<b>0.41</b>
hsa-miR-597-4380960	15.7	17.2	1.53	<b>0.35</b>	15.2	17.3	2.04	<b>0.24</b>	15.3	18.4	3.16	<b>0.11</b>
hsa-miR-598-4395179	12.4	13.9	1.55	<b>0.34</b>	12.4	13.1	0.65	<b>0.64</b>	13.4	12.8	-0.53	<b>1.44</b>
hsa-miR-615-3p-4386777	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-615-5p-4395464	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-616-4395525	18.3	19.2	0.85	<b>0.55</b>	18.2	24.3	6.14	<b>0.01</b>	18.6	18.0	-0.62	<b>1.53</b>
hsa-miR-618-4380996	18.2	19.7	1.45	<b>0.37</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	17.2	25.4	8.20	<b>0.00</b>
hsa-miR-624-4395541	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-625-4395542	14.3	16.6	2.28	<b>0.21</b>	14.5	16.5	1.97	<b>0.25</b>	14.9	15.8	0.84	<b>0.56</b>
hsa-miR-627-4380967	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	19.2	25.4	6.24	<b>0.01</b>
hsa-miR-628-5p-4395544	12.0	12.7	0.71	<b>0.61</b>	13.8	11.8	-2.08	<b>4.22</b>	13.9	12.0	-1.97	<b>3.90</b>
hsa-miR-629-4395547	16.1	23.2	7.04	<b>0.01</b>	15.8	16.5	0.74	<b>0.60</b>	15.1	16.3	1.18	<b>0.44</b>
hsa-miR-636-4395199	16.4	15.9	-0.48	<b>1.39</b>	24.6	15.7	-8.90	<b>476.73</b>	16.9	16.1	-0.86	<b>1.82</b>
hsa-miR-642-4380995	24.6	18.4	-6.22	<b>74.30</b>	18.7	15.3	-3.35	<b>10.20</b>	25.0	18.9	-6.04	<b>65.78</b>
hsa-miR-651-4381007	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	18.9	24.3	5.42	<b>0.02</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-652-4395463	13.2	14.7	1.46	<b>0.36</b>	13.2	16.9	3.74	<b>0.07</b>	13.2	15.2	2.04	<b>0.24</b>
hsa-miR-653-4395403	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-654-3p-4395350	13.1	14.6	1.49	<b>0.36</b>	14.3	14.2	-0.09	<b>1.07</b>	14.1	15.2	1.09	<b>0.47</b>
hsa-miR-654-5p-4381014	11.6	11.2	-0.36	<b>1.28</b>	11.6	11.2	-0.40	<b>1.32</b>	11.9	12.1	0.23	<b>0.85</b>
hsa-miR-655-4381015	9.9	12.9	3.06	<b>0.12</b>	11.2	13.1	1.94	<b>0.26</b>	11.7	14.2	2.47	<b>0.18</b>
hsa-miR-660-4380925	10.5	12.4	1.93	<b>0.26</b>	11.8	12.9	1.16	<b>0.45</b>	11.3	12.4	1.13	<b>0.46</b>
hsa-miR-671-3p-4395433	10.6	11.1	0.48	<b>0.72</b>	10.4	10.7	0.32	<b>0.80</b>	10.2	10.5	0.34	<b>0.79</b>
hsa-miR-672-4395438	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	21.4	-3.58	<b>11.93</b>
hsa-miR-674-4395193	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-708-4395452	8.3	11.7	3.41	<b>0.09</b>	8.4	11.6	3.22	<b>0.11</b>	9.7	8.7	-0.98	<b>1.97</b>
hsa-miR-744-4395435	10.1	9.4	-0.68	<b>1.61</b>	10.0	9.5	-0.52	<b>1.44</b>	9.8	9.3	-0.48	<b>1.40</b>
hsa-miR-758-4395180	10.4	12.3	1.92	<b>0.26</b>	10.9	11.4	0.55	<b>0.68</b>	10.4	12.4	1.98	<b>0.25</b>
hsa-miR-871-4395465	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-872-4395375	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-873-4395467	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-874-4395379	17.7	25.5	7.73	<b>0.00</b>	24.6	15.2	-9.36	<b>655.05</b>	17.7	25.4	7.70	<b>0.00</b>
hsa-miR-875-3p-4395315	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-876-3p-4395336	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	19.8	25.4	5.66	<b>0.02</b>
hsa-miR-876-5p-4395316	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	19.8	25.4	5.62	<b>0.02</b>
hsa-miR-885-3p-4395483	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-885-5p-4395407	14.6	18.9	4.29	<b>0.05</b>	16.9	14.9	-2.04	<b>4.12</b>	15.0	16.4	1.43	<b>0.37</b>

microRNA	SA5/03 (a)				SA5/03 (b)				SA5/73			
	dCt nativ	dCt d14 XXL	ddCt	2 <sup>Δ</sup> -(ddCt)	dCt nativ	dCt d14 XXL	ddCt	2 <sup>Δ</sup> -(ddCt)	dCt d0	dCt d14XXL	ddCt d14 XXL	2 <sup>Δ</sup> -(ddCt)
hsa-miR-886-3p-4395305	8.4	9.9	1.48	<b>0.36</b>	7.7	9.2	1.46	<b>0.36</b>	9.3	11.0	1.67	<b>0.31</b>
hsa-miR-886-5p-4395304	6.9	9.0	2.11	<b>0.23</b>	7.3	7.8	0.58	<b>0.67</b>	7.5	9.1	1.63	<b>0.32</b>
hsa-miR-887-4395485	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-888-4395323	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-889-4395313	11.5	13.8	2.30	<b>0.20</b>	12.3	13.3	0.95	<b>0.52</b>	12.2	14.0	1.79	<b>0.29</b>
hsa-miR-890-4395320	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-891a-4395302	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-891b-4395321	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-892a-4395306	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-92a-4395169	6.2	7.4	1.18	<b>0.44</b>	5.6	7.3	1.68	<b>0.31</b>	5.4	7.2	1.88	<b>0.27</b>
hsa-miR-93-4373302	7.0	9.4	2.39	<b>0.19</b>	7.1	9.2	2.01	<b>0.25</b>	6.5	8.6	2.14	<b>0.23</b>
hsa-miR-9-4373285	18.7	25.5	6.79	<b>0.01</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	15.7	25.4	9.76	<b>0.00</b>
hsa-miR-95-4373011	16.7	18.9	2.16	<b>0.22</b>	18.0	16.3	-1.68	<b>3.21</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-96-4373372	24.6	25.5	0.85	<b>0.55</b>	24.6	24.3	-0.26	<b>1.20</b>	25.0	25.4	0.44	<b>0.74</b>
hsa-miR-98-4373009	10.4	12.0	1.59	<b>0.33</b>	10.6	10.8	0.15	<b>0.90</b>	10.5	12.5	2.00	<b>0.25</b>
hsa-miR-99a-4373008	3.2	4.0	0.86	<b>0.55</b>	2.7	4.1	1.42	<b>0.37</b>	1.3	4.6	3.33	<b>0.10</b>
hsa-miR-99b-4373007	6.4	6.4	0.07	<b>0.96</b>	5.8	6.1	0.25	<b>0.84</b>	6.3	7.0	0.68	<b>0.62</b>

Tabelle 8.2: microRNA-Expressionsprofile von USSC-Linie SA8/25 (USSC d0, d14 XXL und d28 XXL).

microRNA	dCt SA8/25			ddCt SA8/25		2 <sup>Δ</sup> -(ddCt) SA8/25	
	nativ	d14 XXL	d28 XXL	d0vs d14	d0 vs d28	d0 vs d14	d0 vs d28
hsa-let-7a-4373169	7.1	7.3	8.9	0.13	1.73	<b>0.91</b>	<b>0.30</b>
hsa-let-7b-4395446	5.0	5.3	6.0	0.32	1.09	<b>0.80</b>	<b>0.47</b>
hsa-let-7c-4373167	8.3	10.4	11.0	2.08	2.69	<b>0.24</b>	<b>0.16</b>
hsa-let-7d-4395394	8.2	8.8	9.8	0.52	1.51	<b>0.70</b>	<b>0.35</b>
hsa-let-7e-4395517	3.7	4.6	5.5	0.94	1.82	<b>0.52</b>	<b>0.28</b>
hsa-let-7f-4373164	10.9	11.5	11.9	0.62	0.98	<b>0.65</b>	<b>0.51</b>
hsa-let-7g-4395393	8.1	8.6	9.9	0.55	1.81	<b>0.68</b>	<b>0.28</b>
hsa-miR-100-4373160	3.5	3.5	5.1	-0.01	1.58	<b>1.01</b>	<b>0.33</b>
hsa-miR-101-4395364	15.3	15.7	17.4	0.44	2.13	<b>0.74</b>	<b>0.23</b>
hsa-miR-103-4373158	9.4	9.5	11.1	0.11	1.77	<b>0.93</b>	<b>0.29</b>
hsa-miR-105-4395278	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-106a-4395280	4.6	6.3	7.7	1.78	3.11	<b>0.29</b>	<b>0.12</b>
hsa-miR-106b-4373155	9.7	10.4	12.4	0.78	2.72	<b>0.58</b>	<b>0.15</b>
hsa-miR-107-4373154	14.9	15.0	16.6	0.07	1.76	<b>0.96</b>	<b>0.30</b>
hsa-miR-10a-4373153	13.0	13.9	15.7	0.95	2.72	<b>0.52</b>	<b>0.15</b>
hsa-miR-10b-4395329	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-122-4395356	18.2	16.7	17.5	-1.50	-0.68	<b>2.84</b>	<b>1.60</b>
hsa-miR-124-4373295	20.0	18.8	25.1	-1.19	5.02	<b>2.29</b>	<b>0.03</b>
hsa-miR-125a-3p-4395310	12.7	12.9	13.9	0.19	1.23	<b>0.88</b>	<b>0.43</b>
hsa-miR-125a-5p-4395309	6.9	7.2	7.6	0.30	0.71	<b>0.81</b>	<b>0.61</b>
hsa-miR-125b-4373148	4.2	4.3	5.3	0.13	1.13	<b>0.92</b>	<b>0.46</b>
hsa-miR-126-4395339	12.6	11.2	12.0	-1.40	-0.62	<b>2.64</b>	<b>1.53</b>
hsa-miR-127-3p-4373147	5.2	6.2	7.5	0.98	2.27	<b>0.51</b>	<b>0.21</b>
hsa-miR-127-5p-4395340	19.1	17.6	25.1	-1.51	5.91	<b>2.85</b>	<b>0.02</b>
hsa-miR-128-4395327	12.7	12.9	13.6	0.25	0.94	<b>0.84</b>	<b>0.52</b>
hsa-miR-129-3p-4373297	13.9	14.3	15.5	0.38	1.57	<b>0.77</b>	<b>0.34</b>
hsa-miR-129-5p-4373171	18.2	18.7	25.1	0.54	6.87	<b>0.69</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-130a-4373145	10.6	13.9	14.9	3.28	4.33	<b>0.10</b>	<b>0.05</b>
hsa-miR-130b-4373144	10.7	12.6	15.0	1.88	4.26	<b>0.27</b>	<b>0.05</b>
hsa-miR-132-4373143	6.5	5.6	6.4	-0.93	-0.13	<b>1.90</b>	<b>1.10</b>
hsa-miR-133a-4395357	17.1	17.1	21.1	0.03	4.01	<b>0.98</b>	<b>0.06</b>
hsa-miR-133b-4395358	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-134-4373299	7.2	7.4	8.5	0.17	1.24	<b>0.89</b>	<b>0.42</b>
hsa-miR-135a-4373140	25.0	26.8	25.1	1.82	0.08	<b>0.28</b>	<b>0.95</b>
hsa-miR-135b-4395372	15.5	18.7	25.1	3.17	9.54	<b>0.11</b>	<b>0.00</b>
hsa-miR-136-4373173	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-137-4373301	11.6	13.4	14.6	1.82	3.04	<b>0.28</b>	<b>0.12</b>
hsa-miR-138-4395395	4.4	8.3	10.5	3.90	6.13	<b>0.07</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-139-3p-4395424	26.0	17.4	25.1	-8.57	-0.92	<b>381.30</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-139-5p-4395400	16.6	14.6	15.6	-2.03	-1.00	<b>4.10</b>	<b>2.00</b>
hsa-miR-140-3p-4395345	11.7	12.8	14.3	1.09	2.60	<b>0.47</b>	<b>0.16</b>
hsa-miR-140-5p-4373374	5.8	7.4	7.4	1.52	3.38	<b>0.35</b>	<b>0.10</b>
hsa-miR-141-4373137	19.7	26.8	25.1	7.07	5.33	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>
hsa-miR-142-3p-4373136	12.7	19.0	18.8	6.29	6.12	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-142-5p-4395359	20.4	23.5	25.1	3.15	4.68	<b>0.11</b>	<b>0.04</b>
hsa-miR-143-4395360	7.3	8.5	10.0	1.18	2.66	<b>0.44</b>	<b>0.16</b>
hsa-miR-1-4395333	19.1	17.9	25.1	-1.19	5.96	<b>2.29</b>	<b>0.02</b>
hsa-miR-145-4395389	3.4	4.7	5.6	1.27	2.22	<b>0.41</b>	<b>0.22</b>
hsa-miR-146a-4373132	8.7	7.6	9.2	-1.00	0.53	<b>2.00</b>	<b>0.69</b>
hsa-miR-146b-3p-4395472	18.5	26.8	25.1	8.26	6.52	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>

microRNA	dCt SA8/25			ddCt SA8/25		2 <sup>Δ-(ddCt)</sup> SA8/25	
	nativ	d14 XXL	d28 XXL	d0vs d14	d0 vs d28	d0 vs d14	d0 vs d28
hsa-miR-146b-5p-4373178	10.2	10.2	11.4	-0.03	1.17	<b>1.02</b>	<b>0.44</b>
hsa-miR-147-4373131	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-147b-4395373	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-148a-4373130	16.8	14.4	15.1	-2.41	-1.73	<b>5.30</b>	<b>3.31</b>
hsa-miR-148b-4373129	14.9	14.8	15.1	-0.10	0.21	<b>1.07</b>	<b>0.86</b>
hsa-miR-149-4395366	8.6	8.9	9.9	0.31	1.31	<b>0.81</b>	<b>0.40</b>
hsa-miR-150-4373127	18.6	16.0	16.9	-2.60	-1.69	<b>6.07</b>	<b>3.22</b>
hsa-miR-152-4395170	8.5	9.0	10.4	0.52	1.87	<b>0.70</b>	<b>0.27</b>
hsa-miR-153-4373305	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-154-4373270	18.0	18.0	25.1	-0.01	7.01	<b>1.01</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-155-4395459	26.0	23.0	25.1	-2.98	-0.92	<b>7.87</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-15a-4373123	12.6	13.3	14.5	0.67	1.86	<b>0.63</b>	<b>0.28</b>
hsa-miR-15b-4373122	8.6	10.7	12.2	2.11	3.59	<b>0.23</b>	<b>0.08</b>
hsa-miR-16-4373121	3.5	4.9	6.5	1.39	3.04	<b>0.38</b>	<b>0.12</b>
hsa-miR-17-4395419	4.5	6.5	7.5	2.03	3.02	<b>0.24</b>	<b>0.12</b>
hsa-miR-181a-4373117	9.9	9.3	10.4	-0.66	0.45	<b>1.59</b>	<b>0.73</b>
hsa-miR-181c-4373115	17.1	17.6	20.8	0.58	3.73	<b>0.67</b>	<b>0.08</b>
hsa-miR-182-4395445	26.0	21.3	25.1	-4.63	-0.92	<b>24.69</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-183-4395380	23.2	22.0	25.1	-1.25	1.82	<b>2.38</b>	<b>0.28</b>
hsa-miR-184-4373113	19.0	20.0	25.1	0.95	6.02	<b>0.52</b>	<b>0.02</b>
hsa-miR-185-4395382	13.6	13.8	15.2	0.19	1.56	<b>0.88</b>	<b>0.34</b>
hsa-miR-186-4395396	7.3	6.8	8.5	-0.52	1.22	<b>1.43</b>	<b>0.43</b>
hsa-miR-187-4373307	26.0	18.3	25.1	-7.68	-0.92	<b>204.50</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-188-3p-4395217	26.0	21.3	25.1	-4.63	-0.92	<b>24.73</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-18a-4395533	10.5	13.3	15.8	2.84	5.26	<b>0.14</b>	<b>0.03</b>
hsa-miR-18b-4395328	12.6	15.4	19.0	2.88	6.43	<b>0.14</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-190-4373110	16.7	16.7	25.1	-0.02	8.31	<b>1.01</b>	<b>0.00</b>
hsa-miR-191-4395410	4.6	3.1	4.0	-1.54	-0.59	<b>2.90</b>	<b>1.51</b>
hsa-miR-192-4373108	14.5	13.0	14.3	-1.49	-0.19	<b>2.82</b>	<b>1.14</b>
hsa-miR-193a-3p-4395361	18.2	19.3	25.1	1.13	6.89	<b>0.46</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-193a-5p-4395392	5.9	7.9	8.5	2.04	2.59	<b>0.24</b>	<b>0.17</b>
hsa-miR-193b-4395478	6.6	7.0	7.5	0.37	0.85	<b>0.78</b>	<b>0.56</b>
hsa-miR-194-4373106	15.3	14.9	16.3	-0.46	0.95	<b>1.37</b>	<b>0.52</b>
hsa-miR-195-4373105	12.0	11.9	14.7	-0.08	2.66	<b>1.06</b>	<b>0.16</b>
hsa-miR-196b-4395326	18.4	26.8	25.1	8.44	6.70	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-197-4373102	8.6	8.1	8.3	-0.46	-0.33	<b>1.37</b>	<b>1.25</b>
hsa-miR-198-4395384	26.0	17.9	25.1	-8.06	-0.92	<b>266.05</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-199a-3p-4395415	14.1	16.1	17.5	1.99	3.42	<b>0.25</b>	<b>0.09</b>
hsa-miR-199a-5p-4373272	5.6	7.1	8.6	1.53	3.01	<b>0.35</b>	<b>0.12</b>
hsa-miR-199b-5p-4373100	15.7	18.2	18.7	2.52	2.96	<b>0.17</b>	<b>0.13</b>
hsa-miR-19a-4373099	9.5	11.1	12.1	1.60	2.63	<b>0.33</b>	<b>0.16</b>
hsa-miR-19b-4373098	5.0	6.4	8.0	1.38	2.99	<b>0.38</b>	<b>0.13</b>
hsa-miR-200a-4378069	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-200b-4395362	17.3	16.5	25.1	-0.81	7.75	<b>1.75</b>	<b>0.00</b>
hsa-miR-200c-4395411	14.6	13.4	14.1	-1.26	-0.49	<b>2.39</b>	<b>1.40</b>
hsa-miR-202-4395474	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-203-4373095	16.0	15.2	18.1	-0.76	2.14	<b>1.70</b>	<b>0.23</b>
hsa-miR-204-4373094	17.3	18.5	20.0	1.17	2.69	<b>0.44</b>	<b>0.15</b>
hsa-miR-205-4373093	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-208-4373091	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-208b-4395401	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-20a-4373286	5.6	8.1	9.6	2.47	3.98	<b>0.18</b>	<b>0.06</b>
hsa-miR-20b-4373263	8.6	10.2	11.7	1.65	3.12	<b>0.32</b>	<b>0.12</b>
hsa-miR-210-4373089	7.6	7.7	9.0	0.14	1.38	<b>0.91</b>	<b>0.39</b>
hsa-miR-211-4373088	26.0	20.1	25.1	-5.85	-0.92	<b>57.84</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-212-4373087	11.4	10.5	11.6	-0.90	0.21	<b>1.86</b>	<b>0.86</b>
hsa-miR-21-4373090	6.2	5.7	7.2	-0.47	1.04	<b>1.38</b>	<b>0.49</b>
hsa-miR-214-4395417	4.9	6.9	7.9	1.95	2.99	<b>0.26</b>	<b>0.13</b>
hsa-miR-215-4373084	16.9	16.0	17.4	-0.83	0.52	<b>1.78</b>	<b>0.70</b>
hsa-miR-216a-4395331	19.1	26.8	25.1	7.71	5.97	<b>0.00</b>	<b>0.02</b>
hsa-miR-216b-4395437	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-217-4395448	18.6	26.8	25.1	8.24	6.49	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-218-4373081	10.1	11.0	12.5	0.94	2.48	<b>0.52</b>	<b>0.18</b>
hsa-miR-219-1-3p-4395206	16.9	19.7	25.1	2.72	8.11	<b>0.15</b>	<b>0.00</b>
hsa-miR-219-2-3p-4395501	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-219-5p-4373080	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-220-4373078	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-220b-4395317	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-220c-4395322	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-221-4373077	4.6	7.1	8.4	2.57	3.83	<b>0.17</b>	<b>0.07</b>
hsa-miR-222-4395387	1.2	3.3	4.7	2.16	3.57	<b>0.22</b>	<b>0.08</b>
hsa-miR-223-4395406	17.1	15.8	15.7	-1.29	-1.36	<b>2.44</b>	<b>2.56</b>
hsa-miR-22-4373079	11.5	11.5	14.9	-0.04	3.39	<b>1.03</b>	<b>0.10</b>
hsa-miR-224-4395210	8.1	9.1	10.6	1.00	2.54	<b>0.50</b>	<b>0.17</b>
hsa-miR-23a-4373074	10.8	11.7	13.4	0.81	2.53	<b>0.57</b>	<b>0.17</b>
hsa-miR-23b-4373073	12.4	12.1	13.4	-0.32	1.01	<b>1.25</b>	<b>0.50</b>
hsa-miR-24-4373072	1.3	1.5	2.9	0.23	1.60	<b>0.85</b>	<b>0.33</b>
hsa-miR-25-4373071	11.2	11.7	12.7	0.53	1.56	<b>0.69</b>	<b>0.34</b>
hsa-miR-26a-4395166	6.8	7.5	8.9	0.71	2.14	<b>0.61</b>	<b>0.23</b>
hsa-miR-26b-4395167	9.1	9.6	11.0	0.52	1.92	<b>0.70</b>	<b>0.26</b>

microRNA	dCt SA8/25			ddCt SA8/25		2 <sup>Δ</sup> -(ddCt) SA8/25	
	nativ	d14 XXL	d28 XXL	d0vs d14	d0 vs d28	d0 vs d14	d0 vs d28
hsa-miR-27a-4373287	8.7	10.0	11.4	1.24	2.68	0.42	0.16
hsa-miR-27b-4373068	10.6	11.7	13.1	1.16	2.56	0.45	0.17
hsa-miR-28-3p-4395557	8.1	9.3	10.3	1.12	2.13	0.46	0.23
hsa-miR-28-5p-4373067	9.7	11.6	12.8	1.93	3.03	0.26	0.12
hsa-miR-296-3p-4395212	18.7	16.0	17.9	-2.74	-0.84	6.68	1.79
hsa-miR-296-5p-4373066	12.7	11.8	12.2	-0.85	-0.42	1.80	1.34
hsa-miR-298-4395301	26.0	26.8	18.5	0.83	-7.47	0.56	177.23
hsa-miR-299-3p-4373189	20.6	26.8	25.1	6.20	4.46	0.01	0.05
hsa-miR-299-5p-4373188	14.8	16.3	17.3	1.44	2.45	0.37	0.18
hsa-miR-29a-4395223	6.9	7.3	8.3	0.44	1.35	0.74	0.39
hsa-miR-29b-4373288	15.0	15.2	15.3	0.20	0.29	0.87	0.82
hsa-miR-29c-4395171	10.0	10.8	11.8	0.72	1.74	0.61	0.30
hsa-miR-301a-4373064	10.7	12.3	13.8	1.58	3.03	0.33	0.12
hsa-miR-301b-4395503	14.6	14.8	15.8	0.18	1.23	0.88	0.43
hsa-miR-302a-4378070	18.9	26.8	25.1	7.86	6.12	0.00	0.01
hsa-miR-302b-4378071	16.3	18.9	25.1	2.58	8.75	0.17	0.00
hsa-miR-302c-4378072	19.6	26.8	25.1	7.23	5.49	0.01	0.02
hsa-miR-30b-4373290	7.6	6.9	8.4	-0.68	0.82	1.60	0.57
hsa-miR-30c-4373060	6.3	5.5	6.8	-0.82	0.52	1.76	0.70
hsa-miR-31-4395390	3.0	3.8	5.4	0.79	2.38	0.58	0.19
hsa-miR-320-4395388	4.5	4.7	5.8	0.27	1.32	0.83	0.40
hsa-miR-323-3p-4395338	10.4	9.3	10.2	-1.06	-0.21	2.08	1.15
hsa-miR-32-4395220	16.4	17.0	16.5	0.61	0.08	0.66	0.94
hsa-miR-324-3p-4395272	12.2	12.1	13.8	-0.11	1.60	1.08	0.33
hsa-miR-324-5p-4373052	12.7	14.1	14.8	1.38	2.17	0.38	0.22
hsa-miR-325-4373051	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-326-4373050	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-328-4373049	9.9	8.0	8.4	-1.96	-1.53	3.90	2.89
hsa-miR-329-4373191	17.0	16.6	17.9	-0.34	0.90	1.27	0.53
hsa-miR-330-3p-4373047	15.1	14.3	15.0	-0.87	-0.15	1.83	1.11
hsa-miR-330-5p-4395341	20.2	26.8	25.1	6.62	4.88	0.01	0.03
hsa-miR-331-3p-4373046	8.3	8.0	9.2	-0.28	0.96	1.22	0.51
hsa-miR-331-5p-4395344	14.7	17.0	25.1	2.32	10.37	0.20	0.00
hsa-miR-335-4373045	9.6	9.8	11.6	0.24	2.07	0.85	0.24
hsa-miR-337-5p-4395267	13.2	14.4	16.6	1.20	3.40	0.44	0.09
hsa-miR-338-3p-4395363	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-339-3p-4395295	11.3	10.8	11.5	-0.45	0.25	1.37	0.84
hsa-miR-339-5p-4395368	11.2	11.7	12.3	0.47	1.06	0.72	0.48
hsa-miR-33b-4395196	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-340-4395369	12.4	13.9	15.1	1.53	2.67	0.35	0.16
hsa-miR-342-3p-4395371	8.7	7.9	8.9	-0.78	0.19	1.72	0.88
hsa-miR-342-5p-4395258	26.0	16.8	19.4	-9.20	-6.52	587.47	92.08
hsa-miR-345-4395297	10.2	9.9	11.4	-0.25	1.19	1.19	0.44
hsa-miR-346-4373038	26.0	26.8	18.2	0.83	-7.81	0.56	224.27
hsa-miR-34a-4395168	10.0	8.8	9.2	-1.27	-0.79	2.41	1.73
hsa-miR-34c-5p-4373036	16.2	17.5	19.0	1.29	2.82	0.41	0.14
hsa-miR-361-5p-4373035	11.9	11.8	13.1	-0.09	1.14	1.06	0.46
hsa-miR-362-3p-4395228	18.6	20.2	25.1	1.54	6.41	0.34	0.01
hsa-miR-362-5p-4378092	11.5	13.2	13.7	1.69	2.21	0.31	0.22
hsa-miR-363-4378090	21.2	21.5	25.1	0.35	3.89	0.78	0.07
hsa-miR-365-4373194	7.5	8.4	9.3	0.88	1.79	0.54	0.29
hsa-miR-367-4373034	18.8	26.8	25.1	7.97	6.23	0.00	0.01
hsa-miR-369-3p-4373032	16.4	17.6	20.1	1.17	3.75	0.45	0.07
hsa-miR-369-5p-4373195	16.1	16.6	19.1	0.45	2.96	0.73	0.13
hsa-miR-370-4395386	8.7	9.6	11.0	0.88	2.32	0.54	0.20
hsa-miR-371-3p-4395235	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-372-4373029	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-373-4378073	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-374a-4373028	9.2	9.3	10.4	0.12	1.25	0.92	0.42
hsa-miR-374b-4381045	8.7	8.2	9.3	-0.42	0.60	1.34	0.66
hsa-miR-375-4373027	18.7	19.5	25.1	0.75	6.34	0.59	0.01
hsa-miR-376a-4373026	8.2	7.7	10.3	-0.50	2.09	1.41	0.23
hsa-miR-376b-4373196	26.0	19.4	25.1	-6.59	-0.92	96.23	1.89
hsa-miR-376c-4395233	7.3	8.0	9.9	0.64	2.55	0.64	0.17
hsa-miR-377-4373025	19.1	21.1	25.1	1.98	5.98	0.25	0.02
hsa-miR-379-4373349	8.6	9.8	11.2	1.23	2.65	0.43	0.16
hsa-miR-380-4373022	26.0	19.4	25.1	-6.62	-0.92	98.54	1.89
hsa-miR-381-4373020	19.3	20.3	25.1	1.02	5.75	0.49	0.02
hsa-miR-382-4373019	7.6	8.1	9.0	0.48	1.36	0.72	0.39
hsa-miR-383-4373018	17.1	26.8	25.1	9.66	7.92	0.00	0.00
hsa-miR-384-4373017	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-409-5p-4395442	13.9	14.2	14.7	0.29	0.85	0.82	0.56
hsa-miR-410-4378093	9.5	10.3	11.8	0.72	2.22	0.61	0.21
hsa-miR-411-4381013	9.5	9.8	11.5	0.28	1.96	0.82	0.26
hsa-miR-412-4373199	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-422a-4395408	18.7	18.2	25.1	-0.59	6.31	1.50	0.01
hsa-miR-423-5p-4395451	11.8	12.3	13.4	0.49	1.59	0.71	0.33
hsa-miR-424-4373201	15.4	17.5	17.0	2.10	1.62	0.23	0.32
hsa-miR-425-4380926	12.1	10.9	12.4	-1.21	0.32	2.32	0.80
hsa-miR-429-4373203	26.0	26.8	19.8	0.83	-6.13	0.56	69.99

microRNA	dCt SA8/25			ddCt SA8/25		2 <sup>Δ</sup> -(ddCt) SA8/25	
	nativ	d14 XXL	d28 XXL	d0vs d14	d0 vs d28	d0 vs d14	d0 vs d28
hsa-miR-431-4395173	9.8	11.5	16.6	1.66	6.79	<b>0.32</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-433-4373205	9.0	9.6	10.5	0.56	1.43	<b>0.68</b>	<b>0.37</b>
hsa-miR-448-4373206	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-449a-4373207	19.3	17.5	18.3	-1.74	-1.02	<b>3.34</b>	<b>2.03</b>
hsa-miR-449b-4381011	18.2	17.8	16.9	-0.43	-1.28	<b>1.35</b>	<b>2.42</b>
hsa-miR-450a-4395414	16.6	18.7	25.1	2.18	8.50	<b>0.22</b>	<b>0.00</b>
hsa-miR-450b-3p-4395319	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-450b-5p-4395318	16.3	18.7	25.1	2.42	8.74	<b>0.19</b>	<b>0.00</b>
hsa-miR-451-4373360	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-452-4395440	11.4	10.1	11.3	-1.36	-0.17	<b>2.57</b>	<b>1.12</b>
hsa-miR-453-4395429	17.6	18.3	25.1	0.62	7.42	<b>0.65</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-454-4395434	8.1	9.0	10.4	0.88	2.31	<b>0.55</b>	<b>0.20</b>
hsa-miR-455-3p-4395355	11.0	12.1	14.1	1.02	3.04	<b>0.49</b>	<b>0.12</b>
hsa-miR-455-5p-4378098	12.2	13.8	16.3	1.62	4.10	<b>0.32</b>	<b>0.06</b>
hsa-miR-483-5p-4395449	17.1	10.4	10.5	-6.65	-6.55	<b>100.73</b>	<b>93.78</b>
hsa-miR-484-4381032	6.3	6.8	7.4	0.48	1.06	<b>0.72</b>	<b>0.48</b>
hsa-miR-485-3p-4378095	8.8	10.3	11.4	1.55	2.60	<b>0.34</b>	<b>0.16</b>
hsa-miR-485-5p-4373212	12.1	10.9	12.2	-1.25	0.08	<b>2.38</b>	<b>0.94</b>
hsa-miR-486-3p-4395204	21.0	20.4	25.1	-0.56	4.08	<b>1.48</b>	<b>0.06</b>
hsa-miR-486-5p-4378096	16.3	16.7	17.3	0.43	1.00	<b>0.74</b>	<b>0.50</b>
hsa-miR-487a-4378097	17.1	19.6	20.6	2.52	3.46	<b>0.17</b>	<b>0.09</b>
hsa-miR-487b-4378102	10.9	11.1	12.5	0.25	1.65	<b>0.84</b>	<b>0.32</b>
hsa-miR-488-4395468	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-489-4395469	26.0	17.4	14.7	-8.60	-11.31	<b>387.31</b>	<b>2531.31</b>
hsa-miR-490-3p-4373215	19.2	26.8	25.1	7.55	5.81	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>
hsa-miR-491-3p-4395471	26.0	20.6	25.1	-5.35	-0.92	<b>40.88</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-491-5p-4381053	13.4	12.0	12.7	-1.42	-0.75	<b>2.67</b>	<b>1.68</b>
hsa-miR-492-4373217	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-493-4395475	11.1	11.5	13.4	0.32	2.25	<b>0.80</b>	<b>0.21</b>
hsa-miR-494-4395476	9.2	9.8	11.4	0.64	2.16	<b>0.64</b>	<b>0.22</b>
hsa-miR-495-4381078	8.3	9.5	11.5	1.14	3.22	<b>0.45</b>	<b>0.11</b>
hsa-miR-496-4386771	18.3	18.4	25.1	0.11	6.75	<b>0.93</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-499-3p-4395538	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-499-5p-4381047	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-500-4395539	14.5	14.4	15.3	-0.03	0.86	<b>1.02</b>	<b>0.55</b>
hsa-miR-501-3p-4395546	15.8	19.7	25.1	3.90	9.25	<b>0.07</b>	<b>0.00</b>
hsa-miR-501-5p-4373226	14.3	14.1	15.1	-0.27	0.82	<b>1.20</b>	<b>0.57</b>
hsa-miR-502-3p-4395194	16.4	17.2	16.6	0.79	0.18	<b>0.58</b>	<b>0.88</b>
hsa-miR-502-5p-4373227	15.4	18.7	17.3	3.33	1.95	<b>0.10</b>	<b>0.26</b>
hsa-miR-503-4373228	16.7	21.0	25.1	4.29	8.36	<b>0.05</b>	<b>0.00</b>
hsa-miR-504-4395195	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-505-4395200	14.2	16.5	25.1	2.24	10.84	<b>0.21</b>	<b>0.00</b>
hsa-miR-506-4373231	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-507-4373232	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-508-3p-4373233	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-508-5p-4395203	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-509-3-5p-4395266	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-509-5p-4395346	26.0	21.8	25.1	-4.14	-0.92	<b>17.61</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-510-4395352	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-511-4373236	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-512-3p-4381034	18.5	26.8	25.1	8.27	6.53	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-512-5p-4373238	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-513-5p-4395201	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-515-3p-4395480	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-515-5p-4373242	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-516a-5p-4395527	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-516b-4395172	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-517a-4395513	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-517b-4373244	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-517c-4373264	22.5	26.8	22.3	4.28	-0.25	<b>0.05</b>	<b>1.19</b>
hsa-miR-518a-3p-4395508	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-518a-5p-4395507	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-518b-4373246	26.0	26.8	18.3	0.83	-7.63	<b>0.56</b>	<b>198.40</b>
hsa-miR-518c-4395512	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-518d-3p-4373248	19.0	26.8	25.1	7.83	6.08	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>
hsa-miR-518d-5p-4395500	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-518e-4395506	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-518f-4395499	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-519a-4395526	26.0	26.8	19.5	0.83	-6.44	<b>0.56</b>	<b>86.85</b>
hsa-miR-519c-3p-4373251	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-519d-4395514	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-519e-4395481	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-520a-3p-4373268	19.6	26.8	25.1	7.24	5.50	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>
hsa-miR-520a-5p-4378085	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-520b-4373252	26.0	21.7	25.1	-4.26	-0.92	<b>19.10</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-520d-5p-4395504	17.5	17.4	16.0	-0.07	-1.43	<b>1.05</b>	<b>2.69</b>
hsa-miR-520e-4373255	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-520f-4373256	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-520g-4373257	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>
hsa-miR-521-4373259	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	<b>0.56</b>	<b>1.89</b>

microRNA	dCt SA8/25			ddCt SA8/25		2 <sup>-Δ</sup> -(ddCt) SA8/25	
	nativ	d14 XXL	d28 XXL	d0vs d14	d0 vs d28	d0 vs d14	d0 vs d28
hsa-miR-522-4395524	26.0	26.8	21.1	0.83	-4.90	0.56	29.83
hsa-miR-523-4395497	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-524-5p-4395174	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-525-3p-4395496	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-525-5p-4378088	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-526b-4395493	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-532-3p-4395466	10.9	10.8	11.1	-0.13	0.18	1.09	0.88
hsa-miR-532-5p-4380928	10.1	10.4	12.0	0.29	1.89	0.82	0.27
hsa-miR-539-4378103	8.1	7.4	9.4	-0.72	1.27	1.65	0.42
hsa-miR-541-4395312	16.1	15.6	20.5	-0.45	4.41	1.37	0.05
hsa-miR-542-3p-4378101	17.5	19.7	25.1	2.23	7.59	0.21	0.01
hsa-miR-542-5p-4395351	20.6	19.1	25.1	-1.44	4.47	2.71	0.05
hsa-miR-544-4395376	19.7	26.8	25.1	7.13	5.39	0.01	0.02
hsa-miR-545-4395378	17.8	18.7	25.1	0.90	7.26	0.54	0.01
hsa-miR-548a-3p-4380948	26.0	26.8	18.5	0.83	-7.44	0.56	174.19
hsa-miR-548a-5p-4395523	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-548b-3p-4380951	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-548b-5p-4395519	22.0	26.8	25.1	4.76	3.01	0.04	0.12
hsa-miR-548c-3p-4380993	19.4	19.8	25.1	0.38	5.68	0.77	0.02
hsa-miR-548c-5p-4395540	21.9	26.8	25.1	4.92	3.18	0.03	0.11
hsa-miR-548d-3p-4381008	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-548d-5p-4395348	17.9	26.8	25.1	8.88	7.14	0.00	0.01
hsa-miR-551b-4380945	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-556-3p-4395456	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-556-5p-4395455	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-561-4380938	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-570-4395458	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-574-3p-4395460	5.5	4.1	4.7	-1.40	-0.76	2.63	1.70
hsa-miR-576-3p-4395462	15.5	16.2	17.4	0.77	1.90	0.59	0.27
hsa-miR-576-5p-4395461	18.4	19.1	25.1	0.76	6.67	0.59	0.01
hsa-miR-579-4395509	16.6	17.3	21.4	0.64	4.84	0.64	0.04
hsa-miR-582-3p-4395510	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-582-5p-4395175	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-589-4395520	19.1	18.4	25.1	-0.71	5.98	1.64	0.02
hsa-miR-590-5p-4395176	11.5	12.7	13.6	1.12	2.05	0.46	0.24
hsa-miR-597-4380960	17.4	17.2	17.8	-0.15	0.38	1.11	0.77
hsa-miR-598-4395179	14.1	14.2	14.8	0.10	0.74	0.94	0.60
hsa-miR-615-3p-4386777	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-615-5p-4395464	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-616-4395525	21.6	17.8	25.1	-3.79	3.48	13.79	0.09
hsa-miR-618-4380996	20.6	26.8	25.1	6.20	4.46	0.01	0.05
hsa-miR-624-4395541	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-625-4395542	15.4	15.6	16.6	0.23	1.24	0.86	0.42
hsa-miR-627-4380967	20.1	19.1	25.1	-0.96	5.00	1.94	0.03
hsa-miR-628-5p-4395544	14.8	12.6	13.6	-2.25	-1.22	4.74	2.32
hsa-miR-629-4395547	16.8	16.0	16.9	-0.75	0.13	1.69	0.91
hsa-miR-636-4395199	17.3	17.8	16.4	0.52	-0.93	0.70	1.91
hsa-miR-642-4380995	17.5	17.4	16.7	-0.13	-0.81	1.10	1.76
hsa-miR-651-4381007	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-652-4395463	13.8	14.7	17.0	0.87	3.18	0.55	0.11
hsa-miR-653-4395403	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-654-3p-4395350	15.5	15.5	17.6	-0.02	2.07	1.02	0.24
hsa-miR-654-5p-4381014	12.1	11.8	14.0	-0.26	1.92	1.20	0.26
hsa-miR-655-4381015	12.8	13.9	15.1	1.08	2.30	0.47	0.20
hsa-miR-660-4380925	12.3	12.9	14.5	0.54	2.16	0.69	0.22
hsa-miR-671-3p-4395433	11.6	11.5	12.2	-0.08	0.58	1.06	0.67
hsa-miR-672-4395438	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-674-4395193	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-708-4395452	10.7	11.0	12.8	0.32	2.06	0.80	0.24
hsa-miR-744-4395435	10.5	10.0	11.0	-0.45	0.51	1.37	0.70
hsa-miR-758-4395180	12.1	12.8	14.1	0.69	2.00	0.62	0.25
hsa-miR-871-4395465	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-872-4395375	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-873-4395467	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-874-4395379	26.0	16.4	17.7	-9.53	-8.32	740.84	320.25
hsa-miR-875-3p-4395315	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-876-3p-4395336	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-876-5p-4395316	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-885-3p-4395483	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-885-5p-4395407	16.0	16.8	15.2	0.87	-0.76	0.55	1.69
hsa-miR-886-3p-4395305	9.4	12.3	11.9	2.89	2.50	0.13	0.18
hsa-miR-886-5p-4395304	8.0	9.7	10.6	1.75	2.69	0.30	0.16
hsa-miR-887-4395485	26.0	19.5	25.1	-6.51	-0.92	90.92	1.89
hsa-miR-888-4395323	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-889-4395313	12.8	13.8	14.7	0.96	1.89	0.51	0.27
hsa-miR-890-4395320	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-891a-4395302	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-891b-4395321	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-892a-4395306	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-92a-4395169	6.0	7.6	8.1	1.64	2.09	0.32	0.23

microRNA	dCt SA8/25			ddCt SA8/25		2 <sup>-</sup> -(ddCt) SA8/25	
	nativ	d14 XXL	d28 XXL	d0vs d14	d0 vs d28	d0 vs d14	d0 vs d28
hsa-miR-93-4373302	7.3	8.4	9.9	1.07	2.58	0.47	0.17
hsa-miR-9-4373285	16.3	17.8	18.5	1.50	2.18	0.35	0.22
hsa-miR-95-4373011	18.7	19.2	25.1	0.51	6.35	0.70	0.01
hsa-miR-96-4373372	26.0	26.8	25.1	0.83	-0.92	0.56	1.89
hsa-miR-98-4373009	11.6	11.7	12.6	0.08	0.99	0.95	0.50
hsa-miR-99a-4373008	3.7	3.8	5.2	0.07	1.46	0.96	0.36
hsa-miR-99b-4373007	6.9	7.0	7.6	0.07	0.68	0.95	0.62

## 8.2 Potentieller regulatorischer Einfluss von microRNAs auf verschiedene KEGG-Pathways

In den folgenden Abbildungen sind die Verteilungen potentieller regulatorischer microRNA-Einflüsse der 18 in XXL-USSC herunterregulierten microRNAs in den vier von fünf KEGG-Pathways, mit den meisten vorhergesagten Interaktionen gezeigt. Die grünen Boxen stehen für die einzelnen Proteine im Pathway, während die roten Ovale vorhergesagte microRNA/Zielgen-Interaktionen symbolisieren. Die roten Zahlen benennen die Anzahl der potentiell regulierenden individuellen microRNAs aus der Gruppe der 18 herunterregulierten microRNAs. Die Abbildungen der Pathways wurde aus der KEGG-Pathway-Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) entnommen und mit den microRNA-Daten ergänzt. In Tabelle 6.2 sind diese potentiellen Wechselwirkungen zusammengefasst. Gelbe Pfeile in den Abbildungen weisen auf die Verknüpfungen der einzelnen Pathways zur Neurodifferenzierung hin.

Abbildung 8.1: Long-term Potentiation Pathway.

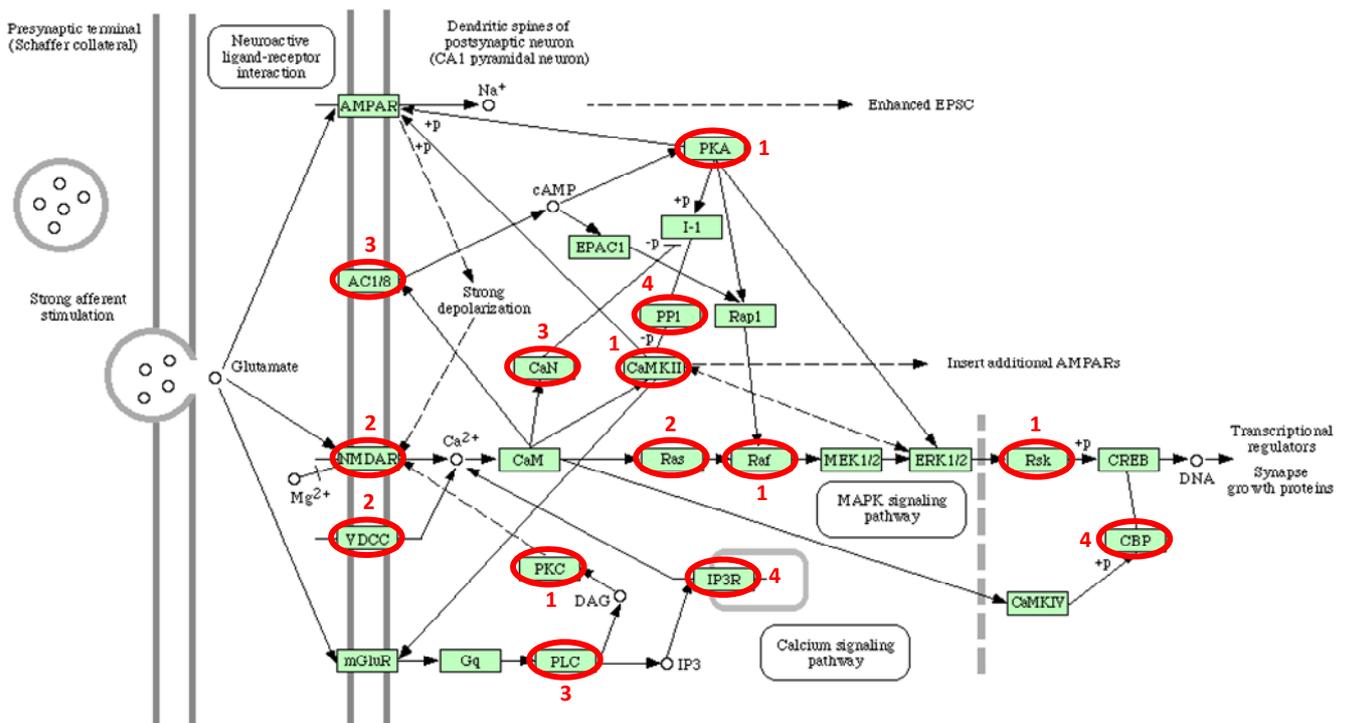


Abbildung 8.2: MAPK Signaling Pathway.

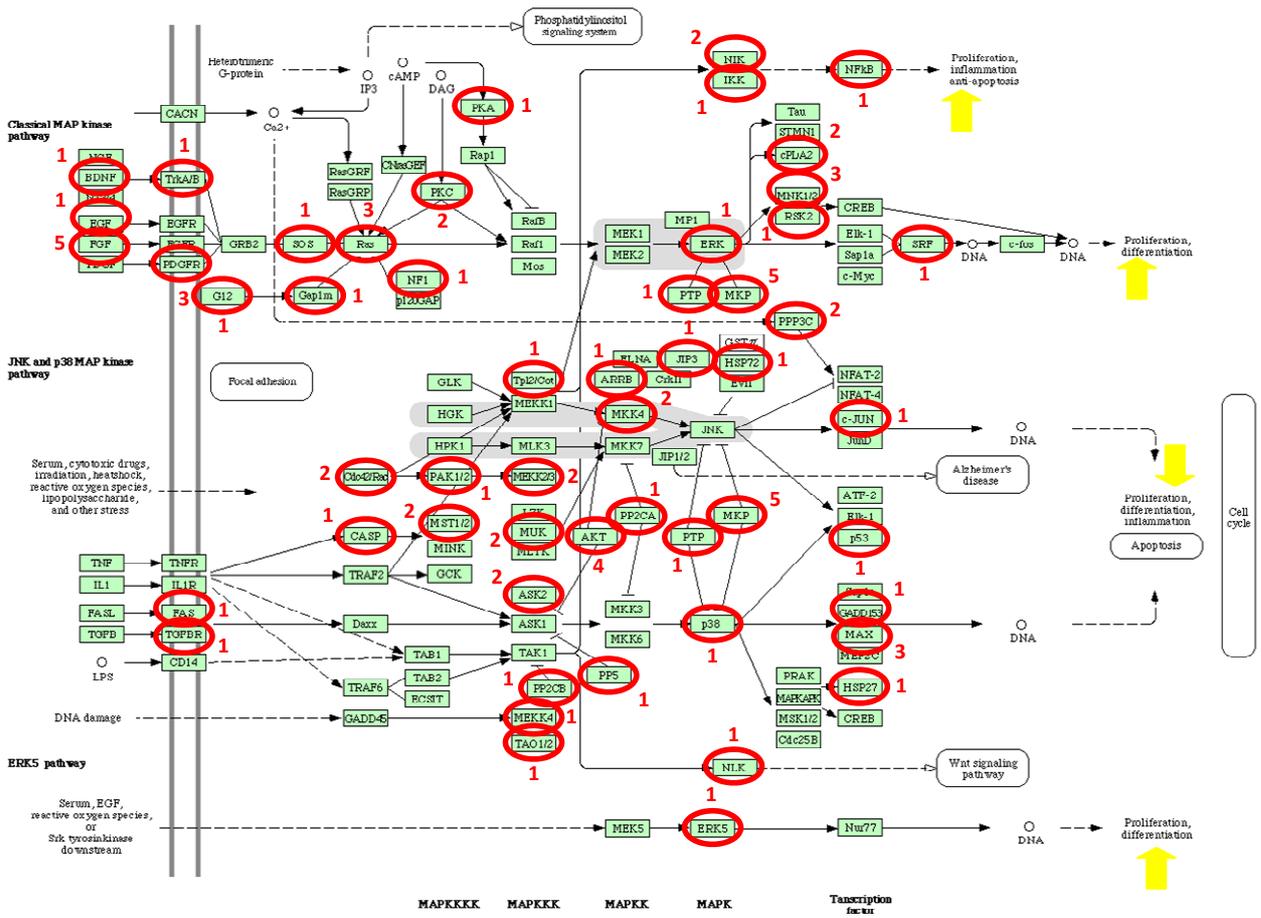


Abbildung 8.3: TGF-beta Signaling Pathway.

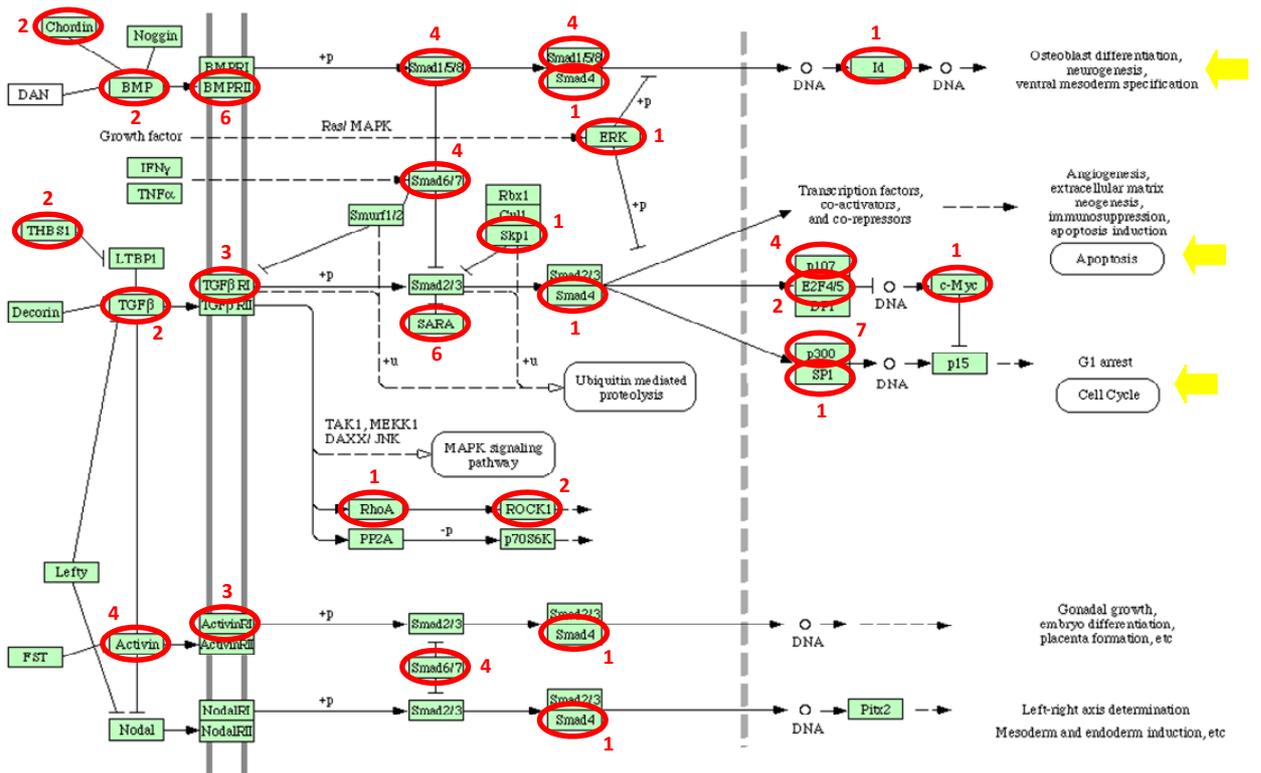
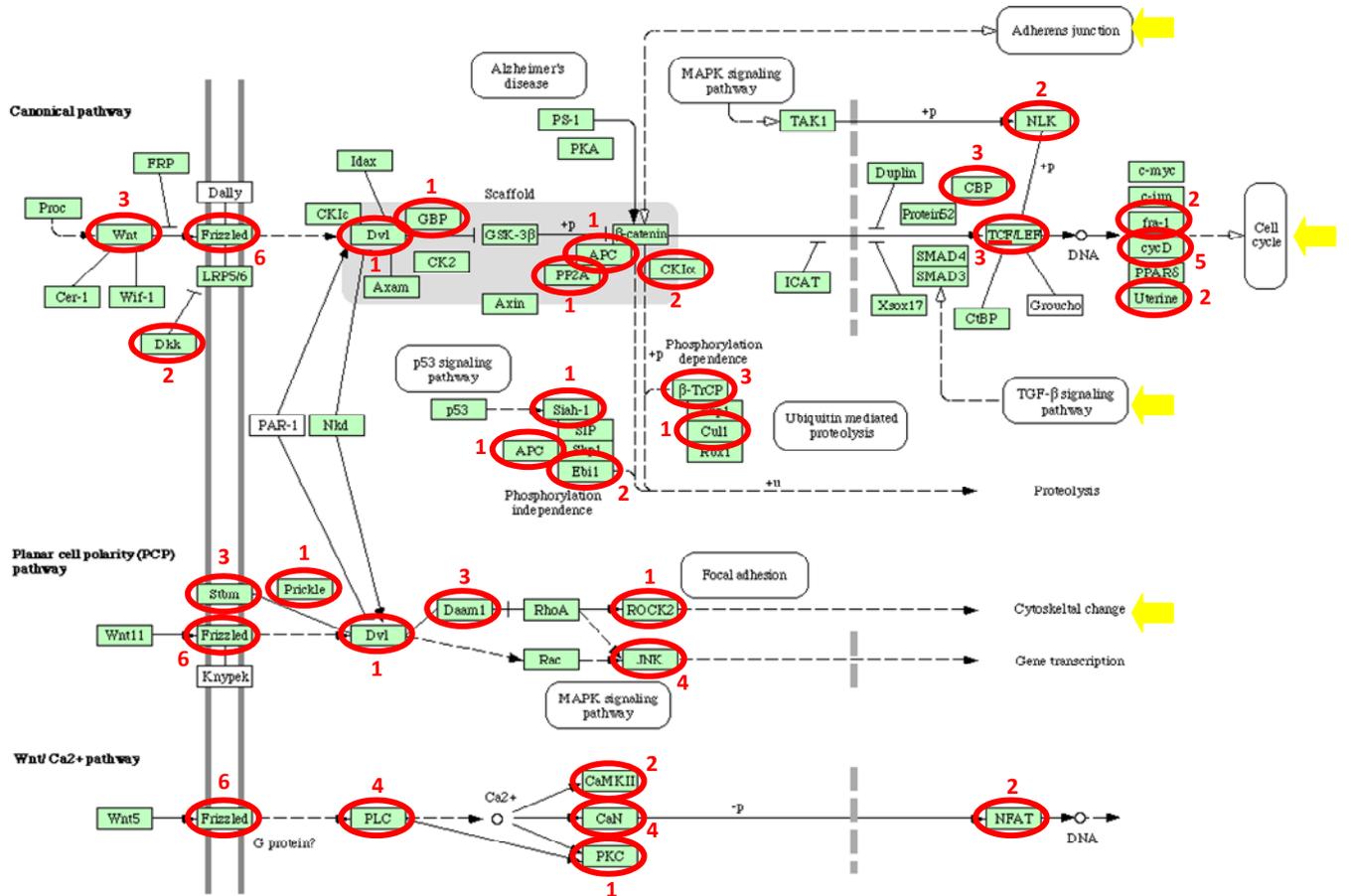


Abbildung 8.4: WNT Signaling Pathway.



## 9 Literaturverzeichnis

1. Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, et al. (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200: 123-135.
2. Greschat S, Schira J, Kury P, Rosenbaum C, de Souza Silva MA, et al. (2008) Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype. *Stem Cells Dev* 17: 221-232.
3. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
4. Tuschl T (2001) RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2: 239-245.
5. Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864.
6. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858-862.
7. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39: D152-157.
8. Griffiths-Jones S (2010) miRBase: microRNA sequences and annotation. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 12: Unit 12 19 11-10.
9. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36: D154-158.
10. Griffiths-Jones S (2006) miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 342: 129-138.
11. Griffiths-Jones S (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32: D109-111.
12. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, et al. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-279.
13. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
14. Cullen BR (2004) Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 16: 861-865.
15. Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC (2007) miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447: 1126-1129.
16. Hinas A, Reimegard J, Wagner EG, Nellen W, Ambros VR, et al. (2007) The small RNA repertoire of *Dictyostelium discoideum* and its regulation by components of the RNAi pathway. *Nucleic Acids Res* 35: 6714-6726.
17. Lu S, Sun YH, Amerson H, Chiang VL (2007) MicroRNAs in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and their association with fusiform rust gall development. *Plant J* 51: 1077-1098.
18. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16: 1616-1626.
19. Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14: 787-799.
20. Zhang L, Chia JM, Kumari S, Stein JC, Liu Z, et al. (2009) A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS Genet* 5: e1000716.
21. Smibert P, Lai EC (2010) A view from *Drosophila*: multiple biological functions for individual microRNAs. *Semin Cell Dev Biol* 21: 745-753.
22. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, et al. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129: 1401-1414.
23. Grundhoff A, Sullivan CS (2011) Virus-encoded microRNAs. *Virology*.
24. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, et al. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060.
25. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-1966.

26. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858.
27. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, et al. (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16: 720-728.
28. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21: 4663-4670.
29. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902-1910.
30. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, et al. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18: 3016-3027.
31. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432: 231-235.
32. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, et al. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432: 235-240.
33. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14: 2162-2167.
34. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419.
35. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
36. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, et al. (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.
37. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, et al. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834-838.
38. Knight SW, Bass BL (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2269-2271.
39. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, et al. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15: 2654-2659.
40. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98.
41. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, et al. (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117: 69-81.
42. Bushati N, Cohen SM (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 175-205.
43. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123: 631-640.
44. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, et al. (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25: 522-532.
45. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 512-517.
46. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, et al. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208.
47. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11: 228-234.
48. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209-216.
49. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, et al. (2010) ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 17: 17-23.
50. Tomari Y, Du T, Zamore PD (2007) Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* 130: 299-308.

51. Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, et al. (2009) Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1148-1153.
52. Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, et al. (2009) Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 10: 413.
53. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297: 2053-2056.
54. Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, et al. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA unctioin. *Dev Cell* 4: 205-217.
55. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, et al. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437-1441.
56. Hutvagner G, Simard MJ (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 22-32.
57. Winter J, Diederichs S (2011) Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biol* 8.
58. Nottrott S, Simard MJ, Richter JD (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1108-1114.
59. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21: 533-542.
60. Gu S, Jin L, Zhang F, Sarnow P, Kay MA (2009) Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 16: 144-150.
61. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, et al. (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309: 1573-1576.
62. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125: 1111-1124.
63. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, et al. (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447: 823-828.
64. Ding XC, Grosshans H (2009) Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J* 28: 213-222.
65. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, 3rd, Parker R, et al. (2005) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 7: 1261-1266.
66. Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7: 633-636.
67. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-798.
68. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, et al. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37: 495-500.
69. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, et al. (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2: e363.
70. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92-105.
71. Bartel DP, Chen CZ (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* 5: 396-400.
72. Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, et al. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455: 58-63.
73. Trompeter HI, Abbad H, Iwaniuk KM, Hafner M, Renwick N, et al. (2011) MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC. *PLoS One* 6: e16138.
74. Mavrakis KJ, Leslie CS, Wendel HG (2011) Cooperative control of tumor suppressor genes by a network of oncogenic microRNAs. *Cell Cycle* 10: 2845-2849.

75. Grigoryev YA, Kurian SM, Hart T, Nakorchevsky AA, Chen C, et al. (2011) MicroRNA regulation of molecular networks mapped by global microRNA, mRNA, and protein expression in activated T lymphocytes. *J Immunol* 187: 2233-2243.
76. Su H, Trombly MI, Chen J, Wang X (2009) Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev* 23: 304-317.
77. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R (2007) DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 39: 380-385.
78. Shekar PC, Naim A, Sarathi DP, Kumar S (2011) Argonaute-2-null embryonic stem cells are retarded in self-renewal and differentiation. *J Biosci* 36: 649-657.
79. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, et al. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35: 215-217.
80. Andersson T, Rahman S, Sansom SN, Alsio JM, Kaneda M, et al. (2010) Reversible block of mouse neural stem cell differentiation in the absence of dicer and microRNAs. *PLoS One* 5: e13453.
81. Schaefer A, O'Carroll D, Tan CL, Hillman D, Sugimori M, et al. (2007) Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med* 204: 1553-1558.
82. Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, et al. (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308: 833-838.
83. Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS (2003) A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 9: 1274-1281.
84. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, et al. (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5: R13.
85. Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, et al. (2008) A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol* 10: 987-993.
86. Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, et al. (2005) Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci* 21: 1469-1477.
87. Maller Schulman BR, Liang X, Stahlhut C, DelConte C, Stefani G, et al. (2008) The let-7 microRNA target gene, *Mlin41/Trim71* is required for mouse embryonic survival and neural tube closure. *Cell Cycle* 7: 3935-3942.
88. Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ (2008) *Hmga2* promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135: 227-239.
89. Leucht C, Stigloher C, Wizenmann A, Klafke R, Folchert A, et al. (2008) MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nat Neurosci* 11: 641-648.
90. Shibata M, Kurokawa D, Nakao H, Ohmura T, Aizawa S (2008) MicroRNA-9 modulates Cajal-Retzius cell differentiation by suppressing *Foxg1* expression in mouse medial pallium. *J Neurosci* 28: 10415-10421.
91. Zhao C, Sun G, Li S, Shi Y (2009) A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat Struct Mol Biol* 16: 365-371.
92. Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL (2008) The bifunctional microRNA miR-9/miR-9\* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci* 28: 14341-14346.
93. Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK (2007) The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21: 744-749.
94. Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T (2007) The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27: 435-448.

95. Fiore R, Siegel G, Schratt G (2008) MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta* 1779: 471-478.
96. Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci* 12: 399-408.
97. Yu JY, Chung KH, Deo M, Thompson RC, Turner DL (2008) MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp Cell Res* 314: 2618-2633.
98. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, et al. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769-773.
99. Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, et al. (2011) MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476: 228-231.
100. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113: 25-36.
101. Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA (2003) The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 13: 790-795.
102. Subramanian S, Steer CJ (2010) MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *J Cell Physiol* 223: 289-298.
103. Shenouda SK, Alahari SK (2009) MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 28: 369-378.
104. Yekta S, Shih IH, Bartel DP (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304: 594-596.
105. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, et al. (2004) MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279: 52361-52365.
106. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS (2009) MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 137: 647-658.
107. Johnson WH, Loskutoff NM, Plante Y, Betteridge KJ (1995) Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo. *Vet Rec* 137: 15-16.
108. Willadsen SM, Polge C (1981) Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet Rec* 108: 211-213.
109. Tarkowski AK (1959) Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 184: 1286-1287.
110. Mitalipov SM, Yeoman RR, Nusser KD, Wolf DP (2002) Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells. *Biol Reprod* 66: 1367-1373.
111. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
112. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634-7638.
113. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
114. Thomson JA, Marshall VS (1998) Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* 38: 133-165.
115. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, et al. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7844-7848.
116. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996) Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18: 173-179.
117. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372-376.

118. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, et al. (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9: 625-635.
119. Boiani M, Scholer HR (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 872-884.
120. Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, et al. (2007) Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450: 1230-1234.
121. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, et al. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655.
122. Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, et al. (2008) Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133: 1106-1117.
123. Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA (2008) Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 22: 746-755.
124. Zhang J, Tam WL, Tong GQ, Wu Q, Chan HY, et al. (2006) Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol* 8: 1114-1123.
125. Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin SH (2008) An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132: 1049-1061.
126. Loh YH, Zhang W, Chen X, George J, Ng HH (2007) Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev* 21: 2545-2557.
127. Meshorer E, Misteli T (2006) Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 540-546.
128. Jaenisch R, Young R (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132: 567-582.
129. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, et al. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19: 489-501.
130. Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ (2005) Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12135-12140.
131. Barroso-delJesus A, Romero-Lopez C, Lucena-Aguilar G, Melen GJ, Sanchez L, et al. (2008) Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol* 28: 6609-6619.
132. Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, et al. (2008) Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 28: 6426-6438.
133. Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, et al. (2008) Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134: 521-533.
134. Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, et al. (2008) Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 40: 1478-1483.
135. Ivey KN, Srivastava D (2010) MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell* 7: 36-41.
136. Takahashi J (2006) Stem cell therapy for Parkinson's disease. *Ernst Schering Res Found Workshop*: 229-244.
137. Wen Y, Chen B, Ildstad ST (2011) Stem cell-based strategies for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Expert Opin Biol Ther* 11: 41-53.
138. Peljto M, Wichterle H (2011) Programming embryonic stem cells to neuronal subtypes. *Curr Opin Neurobiol* 21: 43-51.

139. Germain N, Banda E, Grabel L (2010) Embryonic stem cell neurogenesis and neural specification. *J Cell Biochem* 111: 535-542.
140. Lee DS, Yu K, Rho JY, Lee E, Han JS, et al. (2006) Cyclopamine treatment of human embryonic stem cells followed by culture in human astrocyte medium promotes differentiation into nestin- and GFAP-expressing astrocytic lineage. *Life Sci* 80: 154-159.
141. Jing D, Parikh A, Tzanakakis ES (2010) Cardiac cell generation from encapsulated embryonic stem cells in static and scalable culture systems. *Cell Transplant* 19: 1397-1412.
142. Pal R (2009) Embryonic stem (ES) cell-derived cardiomyocytes: a good candidate for cell therapy applications. *Cell Biol Int* 33: 325-336.
143. Hou YT, Ijima H, Matsumoto S, Kubo T, Takei T, et al. (2010) Effect of a hepatocyte growth factor/heparin-immobilized collagen system on albumin synthesis and spheroid formation by hepatocytes. *J Biosci Bioeng* 110: 208-216.
144. Karner E, Unger C, Sloan AJ, Ahrlund-Richter L, Sugars RV, et al. (2007) Bone matrix formation in osteogenic cultures derived from human embryonic stem cells in vitro. *Stem Cells Dev* 16: 39-52.
145. Karp JM, Ferreira LS, Khademhosseini A, Kwon AH, Yeh J, et al. (2006) Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro. *Stem Cells* 24: 835-843.
146. Hwang NS, Varghese S, Zhang Z, Elisseeff J (2006) Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cell-derived cells in arginine-glycine-aspartate-modified hydrogels. *Tissue Eng* 12: 2695-2706.
147. Hwang NS, Varghese S, Elisseeff J (2007) Cartilage tissue engineering: Directed differentiation of embryonic stem cells in three-dimensional hydrogel culture. *Methods Mol Biol* 407: 351-373.
148. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, et al. (2010) Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med* 16: 927-933.
149. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, et al. (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 14: 213-221.
150. Erdo F, Buhle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, et al. (2003) Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 780-785.
151. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
152. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.
153. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.
154. Wada N, Wang B, Lin NH, Laslett AL, Gronthos S, et al. (2011) Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol Res*.
155. Park JH, Daheron L, Kantarci S, Lee BS, Teixeira JM (2011) Human endometrial cells express elevated levels of pluripotent factors and are more amenable to reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Endocrinology* 152: 1080-1089.
156. Anchan RM, Quaas P, Gerami-Naini B, Bartake H, Griffin A, et al. (2011) Amniocytes can serve a dual function as a source of iPS cells and feeder layers. *Hum Mol Genet* 20: 962-974.
157. Li Y, Zhao H, Lan F, Lee A, Chen L, et al. (2010) Generation of human-induced pluripotent stem cells from gut mesentery-derived cells by ectopic expression of OCT4/SOX2/NANOG. *Cell Reprogram* 12: 237-247.

158. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317.
159. Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, et al. (2009) Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12759-12764.
160. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, et al. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448: 318-324.
161. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322: 945-949.
162. Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, et al. (2011) Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14234-14239.
163. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322: 949-953.
164. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, et al. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7: 618-630.
165. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-384.
166. Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, et al. (2010) Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 116: 386-395.
167. Thier M, Munst B, Edenhofer F (2010) Exploring refined conditions for reprogramming cells by recombinant Oct4 protein. *Int J Dev Biol* 54: 1713-1721.
168. Page RL, Ambady S, Holmes WF, Vilner L, Kole D, et al. (2009) Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning Stem Cells* 11: 417-426.
169. Feng B, Ng JH, Heng JC, Ng HH (2009) Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4: 301-312.
170. Takenaka C, Nishishita N, Takada N, Jakt LM, Kawamata S (2010) Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. *Exp Hematol* 38: 154-162.
171. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, et al. (2008) Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 6: e253.
172. Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, et al. (2009) A small-molecule inhibitor of *tgf*-Beta signaling replaces *sox2* in reprogramming by inducing *nanog*. *Cell Stem Cell* 5: 491-503.
173. Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Bielech R (2009) Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 27: 459-461.
174. Lin SL, Chang DC, Lin CH, Ying SY, Leu D, et al. (2011) Regulation of somatic cell reprogramming through inducible *mir-302* expression. *Nucleic Acids Res* 39: 1054-1065.
175. Pasi CE, Dereli-Oz A, Negrini S, Friedli M, Fragola G, et al. (2011) Genomic instability in induced stem cells. *Cell Death Differ*.
176. Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, et al. (2011) Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471: 58-62.
177. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, et al. (2011) Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* 8: 106-118.
178. Liu J, Verma PJ, Evans-Galea MV, Delatycki MB, Michalska A, et al. (2010) Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Friedreich Ataxia Patients. *Stem Cell Rev*.

179. Zhang N, An MC, Montoro D, Ellerby LM (2010) Characterization of Human Huntington's Disease Cell Model from Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS Curr* 2: RRN1193.
180. Vitale AM, Wolvetang E, Mackay-Sim A (2011) Induced pluripotent stem cells: A new technology to study human diseases. *Int J Biochem Cell Biol*.
181. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, et al. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321: 1174-1178.
182. Arcese W, Rocha V, Labopin M, Sanz G, Iori AP, et al. (2006) Unrelated cord blood transplants in adults with hematologic malignancies. *Haematologica* 91: 223-230.
183. Lekakis L, Giral S, Couriel D, Shpall EJ, Hosing C, et al. (2006) Phase II study of unrelated cord blood transplantation for adults with high-risk hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 38: 421-426.
184. van Heeckeren WJ, Fanning LR, Meyerson HJ, Fu P, Lazarus HM, et al. (2007) Influence of human leucocyte antigen disparity and graft lymphocytes on allogeneic engraftment and survival after umbilical cord blood transplant in adults. *Br J Haematol* 139: 464-474.
185. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, et al. (2007) Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 369: 1947-1954.
186. Gluckman E, Rocha V, Ionescu I, Bierings M, Harris RE, et al. (2007) Results of unrelated cord blood transplant in fanconi anemia patients: risk factor analysis for engraftment and survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 1073-1082.
187. Rocha V, Gluckman E (2007) Outcomes of transplantation in children with acute leukaemia. *Lancet* 369: 1906-1908.
188. de Lima M, McMannis J, Gee A, Komanduri K, Couriel D, et al. (2008) Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 41: 771-778.
189. Pecora AL, Stiff P, Jennis A, Goldberg S, Rosenbluth R, et al. (2000) Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using ex vivo expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 25: 797-799.
190. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, et al. (2005) Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 105: 1343-1347.
191. Chan SL, Choi M, Wnendt S, Kraus M, Teng E, et al. (2007) Enhanced in vivo homing of uncultured and selectively amplified cord blood CD34+ cells by cotransplantation with cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Stem Cells* 25: 529-536.
192. Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, Hsieh TB, Lee DC, et al. (2006) Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem Cells* 24: 679-685.
193. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301.
194. Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, et al. (2005) Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 112: 196-104.
195. van den Berk LC, Jansen BJ, Siebers-Vermeulen KG, Netea MG, Latuhihin T, et al. (2009) Toll-like receptor triggering in cord blood mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 13: 3415-3426.
196. Winter M, Wang XN, Daubener W, Eyking A, Rae M, et al. (2009) Suppression of cellular immunity by cord blood-derived unrestricted somatic stem cells is cytokine-dependent. *J Cell Mol Med* 13: 2465-2475.

197. Jansen BJ, Gilissen C, Roelofs H, Schaap-Oziemlak A, Veltman JA, et al. (2010) Functional differences between mesenchymal stem cell populations are reflected by their transcriptome. *Stem Cells Dev* 19: 481-490.
198. Wernet P, Trapp T, Zweigerdt R, Mann J, Trompeter HI (2010) Lentiviral labeling reveals three germ layer differentiation potential of a single unrestricted somatic stem cell from human cord blood. *Exp Hematol*.
199. Kluth SM, Buchheiser A, Houben AP, Geyh S, Krenz T, et al. (2010) DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood. *Stem Cells Dev* 19: 1471-1483.
200. Aktas M, Buchheiser A, Houben A, Reimann V, Radke T, et al. (2010) Good manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood. *Cytotherapy* 12: 338-348.
201. Santourlidis S, Wernet P, Ghanjati F, Graffmann N, Springer J, et al. (2011) Unrestricted somatic stem cells (USSC) from human umbilical cord blood display uncommitted epigenetic signatures of the major stem cell pluripotency genes. *Stem Cell Res* 6: 60-69.
202. Zaehres H, Kogler G, Arauzo-Bravo MJ, Bleidissel M, Santourlidis S, et al. (2010) Induction of pluripotency in human cord blood unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 38: 809-818, 818 e801-802.
203. Floridon C, Jensen CH, Thorsen P, Nielsen O, Sunde L, et al. (2000) Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation* 66: 49-59.
204. Samulewicz SJ, Seitz A, Clark L, Heber-Katz E (2002) Expression of preadipocyte factor-1(Pref-1), a delta-like protein, in healing mouse ears. *Wound Repair Regen* 10: 215-221.
205. Yevtodiyenko A, Schmidt JV (2006) Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta. *Dev Dyn* 235: 1115-1123.
206. Li L, Forman SJ, Bhatia R (2005) Expression of DLK1 in hematopoietic cells results in inhibition of differentiation and proliferation. *Oncogene* 24: 4472-4476.
207. Krumlauf R (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78: 191-201.
208. Kessel M, Gruss P (1991) Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* 67: 89-104.
209. Ackema KB, Charite J (2008) Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem Cells Dev* 17: 979-991.
210. Schira J, Gasis M, Estrada V, Hendricks M, Schmitz C, et al. (2011) Significant clinical, neuropathological and behavioural recovery from acute spinal cord trauma by transplantation of a well-defined somatic stem cell from human umbilical cord blood. *Brain*.
211. Sun W, Buzanska L, Domanska-Janik K, Salvi RJ, Stachowiak MK (2005) Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 23: 931-945.
212. Sanchez-Ramos JR (2002) Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 69: 880-893.
213. Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, Ritchie L, Hamilton A (2007) Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res* 35: e60.
214. Pall GS, Hamilton AJ (2008) Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc* 3: 1077-1084.
215. Valoczi A, Hornyik C, Varga N, Burgyan J, Kauppinen S, et al. (2004) Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 32: e175.

216. Varallyay E, Burgyan J, Havelda Z (2007) Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods* 43: 140-145.
217. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
218. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
219. Huang da W, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, et al. (2007) DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res* 35: W169-175.
220. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20.
221. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, et al. (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126: 1203-1217.
222. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33: e179.
223. Yu YT, Maroney PA, Darzynkiwicz E, Nilsen TW (1995) U6 snRNA function in nuclear pre-mRNA splicing: a phosphorothioate interference analysis of the U6 phosphate backbone. *RNA* 1: 46-54.
224. Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85: 1077-1088.
225. Siegel G, Obernosterer G, Fiore R, Oehmen M, Bicker S, et al. (2009) A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the dephosphorylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol* 11: 705-716.
226. Le MT, Xie H, Zhou B, Chia PH, Rizk P, et al. (2009) MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets. *Mol Cell Biol* 29: 5290-5305.
227. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25-29.
228. Kosik KS (2006) The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 7: 911-920.
229. Sun H, Li QW, Lv XY, Ai JZ, Yang QT, et al. (2010) MicroRNA-17 post-transcriptionally regulates polycystic kidney disease-2 gene and promotes cell proliferation. *Mol Biol Rep* 37: 2951-2958.
230. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, et al. (2008) Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132: 875-886.
231. Iwaniuk KM, Schira J, Weinhold S, Jung M, Adjaye J, et al. (2011) Network-Like Impact of MicroRNAs on Neuronal Lineage Differentiation of Unrestricted Somatic Stem Cells from Human Cord Blood. *Stem Cells Dev.* 20(8):1383-94.
232. Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, et al. (2011) Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29: 443-448.
233. Martinez NJ, Gregory RI (2010) MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. *Cell Stem Cell* 7: 31-35.
234. Wu Y, Liu S, Xin H, Jiang J, Younglai E, et al. (2011) Up-regulation of microRNA-145 promotes differentiation by repressing OCT4 in human endometrial adenocarcinoma cells. *Cancer* 117: 3989-3998.
235. Yin R, Zhang S, Wu Y, Fan X, Jiang F, et al. (2011) microRNA-145 suppresses lung adenocarcinoma-initiating cell proliferation by targeting OCT4. *Oncol Rep* 25: 1747-1754.
236. Zwaka TP (2008) Ronin and caspases in embryonic stem cells: a new perspective on regulation of the pluripotent state. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 163-169.

237. Zwaka TP, Thomson JA (2005) A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* 132: 227-233.
238. Wong KY, So CC, Loong F, Chung LP, Lam WW, et al. (2011) Epigenetic inactivation of the miR-124-1 in haematological malignancies. *PLoS One* 6: e19027.
239. Wilting SM, van Boerdonk RA, Henken FE, Meijer CJ, Diosdado B, et al. (2010) Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. *Mol Cancer* 9: 167.
240. Caygill EE, Johnston LA (2008) Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the let-7 and miR-125 heterochronic microRNAs. *Curr Biol* 18: 943-950.
241. Zhao C, Sun G, Li S, Lang MF, Yang S, et al. (2010) MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1876-1881.
242. Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, et al. (2010) Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 65: 373-384.
243. Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, et al. (2008) Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J* 27: 2616-2627.
244. Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, et al. (2005) A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16426-16431.
245. Wayman GA, Davare M, Ando H, Fortin D, Varlamova O, et al. (2008) An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9093-9098.
246. Impey S, Davare M, Lasiek A, Fortin D, Ando H, et al. (2010) An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Mol Cell Neurosci* 43: 146-156.
247. Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, et al. (2007) microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* 54: 813-829.
248. Papagiannakopoulos T, Friedmann-Morvinski D, Neveu P, Dugas JC, Gill RM, et al. (2011) Pro-neural miR-128 is a glioma tumor suppressor that targets mitogenic kinases. *Oncogene*.
249. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, et al. (2004) Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 5: R68.
250. Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, et al. (2010) Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* 65: 597-611.
251. Song T, Zhang X, Wang C, Wu Y, Cai W, et al. (2011) MiR-138 Suppresses Expression of Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in Clear Cell Renal Cell Carcinoma 786-O Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 12: 1307-1311.
252. Liu X, Wang C, Chen Z, Jin Y, Wang Y, et al. (2011) MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem J*.
253. Jiang L, Dai Y, Liu X, Wang C, Wang A, et al. (2011) Identification and experimental validation of G protein alpha inhibiting activity polypeptide 2 (GNAI2) as a microRNA-138 target in tongue squamous cell carcinoma. *Hum Genet* 129: 189-197.
254. Beveridge NJ, Tooney PA, Carroll AP, Tran N, Cairns MJ (2009) Down-regulation of miR-17 family expression in response to retinoic acid induced neuronal differentiation. *Cell Signal* 21: 1837-1845.
255. Megraw M, Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG (2007) miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res* 35: D149-155.
256. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, et al. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12: 735-739.

- 
257. Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, Hill EV, Bounacer A, et al. (2007) MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* 282: 19575-19588.
258. Guan KL, Rao Y (2003) Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4: 941-956.
259. Barallobre MJ, Pascual M, Del Rio JA, Soriano E (2005) The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res Brain Res Rev* 49: 22-47.
260. Dickson BJ (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298: 1959-1964.
261. Chilton JK (2006) Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 292: 13-24.
262. Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19: 1-49.
263. Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84: 87-136.
264. Soderling TR, Derkach VA (2000) Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 23: 75-80.
265. Takeda K, Ichijo H (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7: 1099-1111.
266. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, et al. (2001) MAP kinases. *Chem Rev* 101: 2449-2476.
267. Harper SJ, LoGrasso P (2001) Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal* 13: 299-310.
268. Yang Y (2003) Wnts and wing: Wnt signaling in vertebrate limb development and musculoskeletal morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69: 305-317.
269. Kalderon D (2002) Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol* 12: 523-531.
270. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5: 367-377.
271. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF (2004) The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25: 72-101.
272. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147: 35-51.
273. Patterson GI, Padgett RW (2000) TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet* 16: 27-33.
274. Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S (2002) Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 191: 1-16.
275. Massague J (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-178.
276. Massague J, Chen YG (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14: 627-644.
277. Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.
278. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, et al. (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11: 2323-2334.
279. Pan N, Jahan I, Lee JE, Fritsch B (2009) Defects in the cerebella of conditional Neurod1 null mice correlate with effective Tg(Atoh1-cre) recombination and granule cell requirements for Neurod1 for differentiation. *Cell Tissue Res* 337: 407-428.
280. Chae JH, Stein GH, Lee JE (2004) NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 18: 271-288.
281. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, et al. (1995) Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268: 836-844.
282. Seo S, Lim JW, Yellajoshiyula D, Chang LW, Kroll KL (2007) Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers. *EMBO J* 26: 5093-5108.
283. Zhang ZW, Zhang LQ, Ding L, Wang F, Sun YJ, et al. (2011) MicroRNA-19b downregulates insulin 1 through targeting transcription factor NeuroD1. *FEBS Lett* 585: 2592-2598.
-

- 
284. Liu K, Liu Y, Mo W, Qiu R, Wang X, et al. (2011) MiR-124 regulates early neurogenesis in the optic vesicle and forebrain, targeting NeuroD1. *Nucleic Acids Res* 39: 2869-2879.
285. Su Y, Balice-Gordon RJ, Hess DM, Landsman DS, Minarcik J, et al. (2004) Neurobeachin is essential for neuromuscular synaptic transmission. *J Neurosci* 24: 3627-3636.
286. Medrihan L, Rohlmann A, Fairless R, Andrae J, Doring M, et al. (2009) Neurobeachin, a protein implicated in membrane protein traffic and autism, is required for the formation and functioning of central synapses. *J Physiol* 587: 5095-5106.
287. Castermans D, Wilquet V, Parthoens E, Huysmans C, Steyaert J, et al. (2003) The neurobeachin gene is disrupted by a translocation in a patient with idiopathic autism. *J Med Genet* 40: 352-356.
288. O'Neal J, Gao F, Hassan A, Monahan R, Barrios S, et al. (2009) Neurobeachin (NBEA) is a target of recurrent interstitial deletions at 13q13 in patients with MGUS and multiple myeloma. *Exp Hematol* 37: 234-244.
289. Kolle G, Georgas K, Holmes GP, Little MH, Yamada T (2000) CRIM1, a novel gene encoding a cysteine-rich repeat protein, is developmentally regulated and implicated in vertebrate CNS development and organogenesis. *Mech Dev* 90: 181-193.
290. Pennisi DJ, Wilkinson L, Kolle G, Sohaskey ML, Gillinder K, et al. (2007) Crim1KST264/KST264 mice display a disruption of the Crim1 gene resulting in perinatal lethality with defects in multiple organ systems. *Dev Dyn* 236: 502-511.
291. Wilkinson L, Kolle G, Wen D, Piper M, Scott J, et al. (2003) CRIM1 regulates the rate of processing and delivery of bone morphogenetic proteins to the cell surface. *J Biol Chem* 278: 34181-34188.
292. Zhang JF, Fu WM, He ML, Xie WD, Lv Q, et al. (2011) MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. *RNA Biol* 8.
293. He J, Zhang JF, Yi C, Lv Q, Xie WD, et al. (2010) miRNA-mediated functional changes through co-regulating function related genes. *PLoS One* 5: e13558.
294. Jung CG, Hida H, Nakahira K, Ikenaka K, Kim HJ, et al. (2004) Pleiotrophin mRNA is highly expressed in neural stem (progenitor) cells of mouse ventral mesencephalon and the product promotes production of dopaminergic neurons from embryonic stem cell-derived nestin-positive cells. *FASEB J* 18: 1237-1239.
295. Xu D, Hopf C, Reddy R, Cho RW, Guo L, et al. (2003) Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron* 39: 513-528.
296. Shahbazian MD, Zoghbi HY (2002) Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am J Hum Genet* 71: 1259-1272.
297. Abel T, Zukin RS (2008) Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 8: 57-64.
298. Skene PJ, Illingworth RS, Webb S, Kerr AR, James KD, et al. (2010) Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. *Mol Cell* 37: 457-468.
299. Nan X, Meehan RR, Bird A (1993) Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 21: 4886-4892.
300. Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88: 471-481.
301. Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A (2001) A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27: 322-326.
302. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, et al. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23: 185-188.
303. Alvarez-Saavedra M, Antoun G, Yanagiya A, Oliva-Hernandez R, Cornejo-Palma D, et al. (2011) miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum Mol Genet* 20: 731-751.
-

304. Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ (2010) MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* 13: 1120-1127.
305. He Z, Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90: 739-751.
306. Shi L, Fu WY, Hung KW, Porchetta C, Hall C, et al. (2007) Alpha2-chimaerin interacts with EphA4 and regulates EphA4-dependent growth cone collapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16347-16352.
307. Koch M, Murrell JR, Hunter DD, Olson PF, Jin W, et al. (2000) A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. *J Cell Biol* 151: 221-234.
308. Cui Y, Han Z, Yi H, Song G, Hao C, et al. (2011) MicroRNA-181b and microRNA-9 mediate arsenic-induced angiogenesis via NRP1. *J Cell Physiol*.
309. Ihle JN (2001) The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 13: 211-217.
310. Cheng X, Jin G, Zhang X, Tian M, Zou L (2011) Stage-dependent STAT3 activation is involved in the differentiation of rat hippocampus neural stem cells. *Neurosci Lett* 493: 18-23.
311. Kim YJ, Hwang SH, Cho HH, Shin KK, Bae YC, et al. (2011) MicroRNA 21 regulates the proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and high-fat diet-induced obesity alters microRNA 21. *J Cell Physiol*.
312. Zhang M, Liu Q, Mi S, Liang X, Zhang Z, et al. (2011) Both miR-17-5p and miR-20a alleviate suppressive potential of myeloid-derived suppressor cells by modulating STAT3 expression. *J Immunol* 186: 4716-4724.
313. Subramanyam D, Belloch R (2011) From microRNAs to targets: pathway discovery in cell fate transitions. *Curr Opin Genet Dev* 21: 498-503.
314. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, et al. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-1041.

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ohne die diese Arbeit niemals in der jetzigen Form zustande gekommen wäre.

Ich bedanke mich beim kommissarischen Direktor Dr. Johannes Fischer für die Möglichkeit am ITZ meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Bei Prof. Dr. Hans Werner Müller möchte ich mich für die Übernahme des Referates, sowie die hervorragende Beratung zu neurologischen Fragestellungen und die überaus angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Prof. Dr. Hermann Aberle aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät für die Übernahme des Korreferates.

Den Projektleitern des Teilprojektes A4, der Forschergruppe FOR717, Dr. Hans-Ingo Trompeter und Prof. Dr. Peter Wernet möchte ich für meine Einstellung und für die Möglichkeit dieses spannende und komplexe Thema bearbeiten zu dürfen danken. Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Hans-Ingo Trompeter, der meine Arbeit hauptsächlich betreut, mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und dieser Arbeit den letzten Schliff gegeben hat. In unermüdlichen Diskussionen hat er mir so manches Mal zu mehr Durchblick verholfen, mich immer wieder ermutigt und unterstützt wo es nur möglich war. Ohne seine Hilfe wäre die Durchführung dieser Arbeit so nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. Helmut Hanenberg danke ich für meine zeitweilige Finanzierung in den letzten Monaten meiner Arbeit.

Allen Kollegen und Mitarbeitern des ITZ möchte ich für Ihre Unterstützung, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Danke an Sandra Weinhold für die geduldige Einführung in die Geheimnisse des TaqMan Assays. Einen herzlichen Dank auch an die „Mittagstruppe“ bestehend aus Corinna, Rüdiger, Jürgen, Petra, Frank und Verena für die vielen netten Pausen, Gespräche und Kaffeerunden. Corinna und Raphaela möchte ich außerdem für die immer sehr netten „Subway-Meetings“ danken, die moralische Unterstützung in schweren Zeiten und den Austausch zu „tierischen“ Themen. Ich möchte mich auch bei meinen „Schützlingen“ Hassane, Janine, Eugenie, Steffi und Nicole für die angenehme Zusammenarbeit, die vielen Gespräche und Plaudereien bedanken. Es hat mir Spaß gemacht Euch zu begleiten. Rui möchte ich für die informativen und erheiternden Gespräche quer durch alle Themengebiete danken.

Einen ganz lieben Dank auch an die Mitarbeiter des Neurochemischen Labors. Allen voran möchte ich Marion und Jessica für die Bereitstellung, Kultivierung und Differenzierung der USSC, aber auch für Eure Geduld und die vielen wertvollen Gespräche danken.

Allen meinen lieben Freunden, und ganz besonders meinen beiden wichtigsten Vertrauten Andrea und Eva, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank für Euer Verständnis, Eure Unterstützung in Wort und Tat, die vielen beruhigenden und aufmunternden Gespräche und hilfreichen Ratschläge danken. Was wäre ich nur ohne Euch!? Auch der alten „Patho-Truppe“, vor allem Sarah und Anna, möchte ich für die schönen Zeiten und die Ablenkung vom Alltag danken.

Mein allerherzlichster Dank gebührt an dieser Stelle meinen lieben Eltern Zbigniew und Elisabeth. Ihr habt nicht nur mein Studium und die Dissertation ermöglicht, sondern mich durch alle Höhen und Tiefen hindurch mit bedingungsloser Hingabe und Liebe begleitet. Ich konnte mich immer auf Euren Rat und Eure Unterstützung verlassen. Ihr habt mich in schweren Zeiten aufgefangen, Euch in Guten mit mir gefreut und stets unerschütterlich an mich geglaubt, so dass ich letztlich meine Ziele erreichen konnte! Ich möchte auch meiner lieben Schwester Barbara danken die sich geduldig meine Sorgen und Nöte angehört hat und mit ihrem sonnigen Gemüt stets ein tröstendes Wort für mich fand. Ich bin sehr froh Dich zu haben! Meiner Oma Florentine möchte ich für die vielen „Mittagessen“ zu später Stunde und das ein oder andere Taschengeld danken.

Zu guter Letzt möchte ich meinen vierbeinigen Begleitern Atlanta, Picasso, Prinzessin, Trevo und Amaretto für die vielen glücklichen und unbeschwerten Momente an der frischen Luft danken, die mir einen wunderbaren Ausgleich zur Arbeit verschafft, aber auch so manche ungläubige Denkfalte auf die Stirn gezaubert haben.

## **11 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Inaugural-Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 06.10.2011

(Katharina Maria Iwaniuk)