

**Charakterisierung des miR-let-7-abhängigen
onkogenen Netzwerks von IGF2BP1-LIN28B-HMGA2
in Ovarialkarzinomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Bianca Busch

geb. am 18.09.1986 in Halle (Saale)

Gutachter: 1. Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier
2. Prof. Dr. Guido Posern
3. Prof. Dr. Gunter Meister

Verteidigt am 18.05.2016

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis (i)

1 Einleitung (1)

- 1.1 Posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression durch miRNAs (1)
 - 1.1.1 Charakteristika und Identifizierung von miRNA-mRNA Interaktionen (4)
 - 1.1.2 Die Bedeutung von miRNAs in der Tumorgenese (7)
- 1.2 Die Familie der IGF2BPs (11)
 - 1.2.1 Die Bedeutung von IGF2BP1 in der Embryogenese (13)
 - 1.2.2 Die Bedeutung von IGF2BP1 in der Tumorgenese (14)
- 1.3 Die Kontrolle der IGF2BP1-Expression (16)
- 1.4 Das Ovarialkarzinom (18)
- 1.5 Zielstellung der Arbeit (19)

2 Material und Methoden (20)

- 2.1 Material (20)
 - 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien (20)
 - 2.1.2 Bakterien (20)
 - 2.1.3 Zelllinien (20)
 - 2.1.4 Antikörper (21)
 - 2.1.5 Plasmide (21)
 - 2.1.6 Oligodesoxynukleotide (21)
 - 2.1.7 SiRNAs und synthetische miRNAs (21)
 - 2.1.8 *Northern Blot* Sonden (21)
 - 2.1.9 Systeme (22)
 - 2.1.10 Standardbuffer (22)
 - 2.1.11 Geräte (22)
- 2.2 Methoden (23)
 - 2.2.1 Zellbiologische Techniken (23)
 - 2.2.1.1 Zellkultur (23)
 - 2.2.1.2 Zelltransfektionen (23)
 - 2.2.1.3 Lentivirale Transduktion (23)
 - 2.2.2 Molekularbiologische Methoden (24)
 - 2.2.2.1 Klonierung (24)
 - 2.2.2.2 DNA Isolierung (26)
 - 2.2.2.3 RNA Isolierung (26)

- 2.2.2.4 Reverse Transkription (RT) (27)
- 2.2.2.5 Quantitative *real time* PCR (RT-qPCR) (28)
- 2.2.2.6 *Next generation sequencing* Analysen (30)
- 2.2.2.7 SDS-Page und *Western Blot* Analysen (31)
- 2.2.2.8 MiTRAP Verfahren (32)
- 2.2.2.9 *Northern Blot* Analysen (34)
- 2.2.2.10 Luziferasereporter-Assays (35)
- 2.2.3 Zellphänotypische Analysen (36)
 - 2.2.3.1 2D-Proliferationsanalysen/ Durchflusszytometrie (36)
 - 2.2.3.2 3D-Sphäroidwachstumsanalyse (37)
 - 2.2.3.3 *Colony formation assay* (37)
 - 2.2.2.4 Bemessung der Anoikis-Resistenz (38)
 - 2.2.2.5 Bestimmung der Zellvitalität (38)
 - 2.2.2.6 Immunfluoreszenzfärbungen (38)
 - 2.2.2.7 2D- und 3D-Migrationsanalysen (39)
- 2.2.4 Nomenklatur (40)
- 2.2.5 Datenbanken (40)
- 2.2.6 Statistik (41)

3 Ergebnisse (42)

- 3.1 Die posttranskriptionelle Kontrolle der IGF2BP1-Expression (42)
 - 3.1.1 Das Expressionsmuster von IGF2BP1 in humanen Tumorzelllinien (43)
 - 3.1.2 Die Expression der IGF2BP1 3'-UTR Isoformen in humanen Tumorzelllinien (46)
 - 3.1.3 Die Expression von miR-let-7 in humanen Tumorzelllinien und der murinen Embryogenese (52)
 - 3.1.4 Die Expression von IGF2BP1 in DICER-depletierten Zellsystemen (54)
- 3.2. Identifizierung neuer IGF2BP1 regulierender miRNAs (59)
 - 3.2.1 MiTRAP-Verfahren mit dem langen IGF2BP1 3'-UTR (59)
 - 3.2.1.1 Identifizierung neuer IGF2BP1 3'-UTR assoziierenden miRNAs in ES-2 Zellextrakt (62)
 - 3.2.1.2 Validierung der IGF2BP1 3'-UTR assoziierten miR-17-5p, miR-181-5p, miR-196-5p und miR-24-3p in verschiedenen Tumorzellextrakten (65)
 - 3.2.2 Validierung der miTRAP-identifizierten miRNA-Kandidaten in ES-2 Zellen (69)
- 3.3 Charakterisierung des miR-let-7-*Decoys* in Ovarialkarzinomzellen (74)
 - 3.3.1 Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf die IGF2BP-, HMGA2- und LIN28B-Expression (75)
 - 3.3.2 Verifizierung der siRNA-vermittelten Depletionen von IGF2BP1, HMGA2 und LIN28B (80)

3.3.2 Einfluss der miR-let-7-abhängigen Regulation von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 auf den Tumorzellphänotypen (82)

3.3.2.1 Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf das Tumorzellwachstum (83)

3.3.2.2 Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf das Adhäsions-unabhängige Wachstum und die Anoikis-Resistenz (85)

3.3.2.3 Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf die Tumorzellmigration (88)

4. Diskussion (91)

4.1 Die Rolle von IGF2BP1 als miRNA-Zieltranskript (91)

4.2 Die Bedeutung des miR-let-7-abhängigen onkogenen IGF2BP1-LIN28B-HMGA2-Netzwerks in Ovarialkarzinomzellen (95)

5 Zusammenfassung (106)

6 Referenzen (107)

7 Anhang (120)

Abkürzungen (126)

Erklärung (130)

Danksagung (131)

Curriculum Vitae (132)

Publikationsliste (133)

1 Einleitung

Die Vielfalt an verschiedenen Zelltypen in einem multizellulären Organismus beruht auf einer komplexen Genregulation. Obwohl jede Zelle die gleiche genetische Information enthält, wird die Genexpression zelltypspezifisch und auf verschiedenen Ebenen reguliert. Dies umfasst die Kontrolle der DNA-Transkription und die posttranskriptionelle Regulation auf RNA-Ebene. Nach der Transkription und dem Splicing wird die reife mRNA lokalisiert, translatiert und degradiert. Diese Prozesse werden beispielsweise durch RNA-bindende Proteine (RBPs) und/oder microRNAs (miRNA, miR) vermittelt. Diese posttranskriptionellen Genregulatoren kontrollieren die Expression der Ziel-mRNAs durch spezifische *cis*-regulatorische Elemente innerhalb des Transkripts. In humanen Zellen sind derzeit 2455 miRNAs und über 800 RNA-Bindeproteine bekannt, deren Anzahl mit den bisher 1400 identifizierten Transkriptionsfaktoren vergleichbar ist (Jens and Rajewsky, 2015). Neben der transkriptionellen Kontrolle der Gene trägt auch die posttranskriptionelle Genregulation zur Entwicklung, Differenzierung und der Homöostase der verschiedenen Geweben und Organen bei. Daher ist es nicht überraschend, dass neben beispielsweise genetischen Alterationen eine Fehlregulation von miRNAs oder RNA-bindenden Proteinen häufig mit der Entstehung von Erkrankungen wie der Tumorgenese assoziiert ist. Darüber hinaus liefern diese posttranskriptionellen Regulatoren neue putative Ziele für die Prävention, die Diagnostik und die Therapie von Krebserkrankungen.

1.1 Posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression durch miRNAs

MiRNAs sind evolutionär hochkonservierte, nichtkodierende RNA-Moleküle mit einer Länge von ~22 Nukletiden (nt). Diese kleinen RNAs formieren Ribonukleoproteinkomplexe, sogenannte *miRNA-induced silencing complex* (miRISC), um die Genexpression ihrer Zieltranskripte auf posttranskriptioneller Ebene zu kontrollieren. Die miRNA-Gene werden von der RNA-Polymerase II (Pol II) in ein langes primäres Transkript (pri-miRNA), in dessen *stem loop* Struktur die Sequenz der reifen miRNA eingeschlossen ist, transkribiert. Häufig werden benachbarte miRNA-Loci, sogenannte *miRNA-Cluster*, in Form einer polycistronischen Transkriptionseinheit prozessiert. Die *stem loop* Struktur der pri-miRNA wird durch die kernständige Ribonuklease III Drosha (DROSHA) des Mikroprozessor-Komplexes herausgeschnitten, wodurch eine 60 bis 70 nt lange Haarnadel-förmige Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) generiert wird. Nach dem Transport der pre-miRNA ins Zytoplasma über Exportin V (XPO5) wird diese durch die Ribonuklease III DICER (DCR1) prozessiert. Dabei wird der *loop*-Bereich dieses Vorläufer-Transkripts entfernt und ein ~22 nt langes RNA-Duplex entsteht. Dieses doppelsträngige miRNA-Molekül wird von einem der vier humanen Argonaute-Proteine (AGO1-4) gebunden, wobei dieser Komplex als pre-RISC

bezeichnet wird. Anschließend werden die beiden Stränge des miRNA-Duplexes getrennt. Hierbei verbleibt der Strang mit dem thermodynamisch weniger stabilen 5'-Ende auf dem AGO-Protein, wodurch der reife miRISC gebildet wird. Im Gegensatz zum sogenannten *guide strand* wird der andere Strang, welcher als *passanger strand* bezeichnet wird, entfernt und abgebaut (detaillierte Beschreibung der miRNA-Biogenese siehe (Ameres and Zamore, 2013; Ha and Kim, 2014; Kawamata and Tomari, 2010)).

Neben der kanonischen miRNA-Biogenese sind einige alternative Pfade bekannt. So wird die Drosha-abhängige Prozessierung umgangen, indem pre-miRNAs aus endogenen *short hairpin (shRNAs)*, *small nucleolar RNAs (snoRNAs)*, Transfer-RNAs (tRNA) oder aus kurzen Introns (*mirtrons*) generiert werden (detaillierte Beschreibung der nicht kanonischen miRNA-Biogenese siehe (Castellano and Stebbing, 2013; Ha and Kim, 2014)). Bisher ist miR-451 die einzige bekannte DCR1-unabhängig prozessierte miRNA. Deren verkürzte pre-miRNA wird von DCR1 nicht als Substrat erkannt und wird deshalb direkt auf das AGO2-Protein geladen, von welchem es geschnitten wird. In Säugtieren besitzt ausschließlich AGO2 eine Endonukleaseaktivität (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010; Yang et al., 2010). Das dadurch generierte Intermediat wird abschließend durch die Poly(A)-spezifische Ribonuklease PARN zur reifen miRNA verkürzt (Yoda et al., 2013).

In Tieren inhibieren miRNAs die Genexpression von Protein-kodierenden Genen, indem sie, basierend auf partiell komplementärer Basenpaarung, den miRISC zur Ziel-mRNA führen. Das AGO-Protein rekrutiert weitere Faktoren, um eine Destabilisierung und/oder eine Translationsrepression des Zieltranskripts zu induzieren (Abb. 1). Der wichtigste Interaktionspartner des AGO-Proteins ist GW182, welcher in Vertebraten drei paraloge *trinucleotide repeat-containing 6 (TNRC6)* Proteine aufweist. Für die Degradation der mRNA interagiert GW182 mit dem zytoplasmatischen Poly(A)-Bindepotein (PABPC) sowie mit den Deadenylierungskomplexen PAN2-PAN3 und CCR4-NOT. Durch diese Interaktionen dissoziiert PABPC vom Poly(A)-Schwanz der Ziel-mRNA, welche anschließend deadenyliert wird. Das *decapping protein 2 (DCP2)*, das zusätzliche Kofaktoren für seine vollständige Aktivität benötigt, entfernt die 5'Cap-Struktur der mRNA. Diese wird letztlich durch die 5'-zu-3' Exoribonuklease XRN1 abgebaut (detaillierte Beschreibung der miRNA-vermittelten Kontrolle der Genexpression siehe (Jonas and Izaurralde, 2015)).

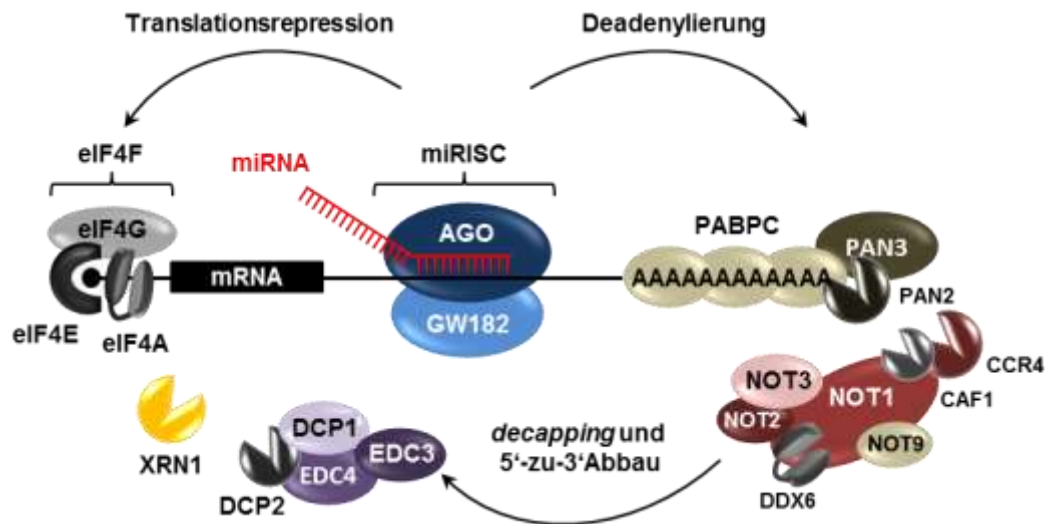


Abb.1: Überblick der miRNA-vermittelten Kontrolle der Genexpression in tierischen Zellen. MiRNAs formieren über die Bindung an ein AGO-Protein Ribonukleoproteinkomplexe sogenannte *miRNA-induced-silencing complexes* (miRISCs). In tierischen Zellen erkennen miRNAs ihre Bindestellen im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) der Ziel-mRNA über partiell komplementäre Basenpaarung. Das AGO-Protein rekrutiert GW182, welches wiederum mit dem zytoplasmatischen Poly(A)-Bindepotein (PABPC) und den Deadenylierungskomplexen PAN2-PAN3 und CCR4-NOT interagiert. Diese Komplexe deadenylieren die mRNA nach der Dissoziation des PABPC vom Poly(A)-Schwanz. Der DCP2-Komplex entfernt die 5'Cap-Struktur der deadenylierten mRNA, welche abschließend 5'-zu-3' durch die Exoribonuclease XRN1 abgebaut wird. Neben dieser mRNA-Destabilisierung reprimieren miRNAs auch die Translation der Ziel-mRNA, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist. Der derzeitige Konsens ist, dass miRNAs die Translationsinitiation inhibieren, indem sie die Aktivität und/oder Assemblierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E (eIF4F) beeinträchtigen. Der eIF4F-Komplex besteht aus dem *cap-binding protein* eIF4E, dem Adaptorprotein eIF4G und der RNA-Helikase eIF4A. Modifiziert nach (Jonas and Izaurralde, 2015).

Neben einer mRNA-Destabilisierung veranlassen miRNAs auch eine Repression der Translation. Allerdings belegen genomweite Analysen von miRNA-Effekten auf die mRNA- und Proteinabundanz kombiniert mit *ribosome profiling* Experimenten, um die Translationseffizienz zu bestimmen, dass die miRNA-vermittelte Inhibition der Genexpression hauptsächlich auf einer mRNA-Degradation beruht. Der Anteil der „puren“ Translationsrepression von endogenen miRNA-Zieltranskripten in Säugetierzellen beläuft sich auf nur 10 - 25 % (Eichhorn et al., 2014; Guo et al., 2010; Hendrickson et al., 2009). Entgegen der bisherigen Annahme, wonach die Translationsrepression dem mRNA-Abbau vorausgeht, befürworten neuste Studien zwei unabhängige Mechanismen (Eichhorn et al., 2014). Demnach erfolgt die Repression der Translation schnell und weist nur einen schwachen Effekt auf, währenddessen der Prozess der mRNA-Destabilisierung langsam bis zur endgültigen Degradation der mRNA verläuft (Eichhorn et al., 2014). Die Frage, wie miRNAs die Translation ihrer Zieltranskripte inhibieren, wird seit langem diskutiert. Dabei wurden zwei verschiedene Modelle postuliert. Zum einen sollen miRNAs die Translation der Ziel-mRNA während der Initiation oder zum anderen im Verlauf der Elongation reprimieren (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Letzteres wurde durch eine kotranslationelle Degradation der naszierenden Polypeptidkette oder eine vorzeitige Dissoziation der Ribosomen begründet (*ribosome drop off*) (Nottrott et al., 2006; Petersen et al.,

2006). Allerdings argumentieren *ribosome profiling* Analysen und die Tatsache, dass miRNAs eine Cap-unabhängige Translation durch eine IRES sowie Reporter-mRNAs mit einer artifiziiellen Apppp-Cap-Struktur nicht reprimieren, gegen eine Repression nach der Translationsinitiation (Guo et al., 2010; Humphreys et al., 2005; Mathonnet et al., 2007; Pillai et al., 2005). Es besteht die übereinstimmende Auffassung, dass miRNAs die Cap-abhängige Translation ihrer Zieltranskripte während der Initiation reprimieren, wobei der exakte molekulare Mechanismus bisher nicht geklärt ist. Es wird vermutet, dass der CCR4-NOT Komplex nicht nur die mRNA-Degradation vermittelt, sondern auch in die Translationsrepression von miRNA-Zieltranskripten involviert ist (Jonas and Izaurralde, 2015). Dieser Komplex interagiert mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor 4A (eIF4A), einer RNA-Helikase, und behindert das Ablesen des 43S Preinitiationskomplexes nach dem Startcodon und inhibiert folglich die Translationsinitiation. Zudem beeinflussen miRNAs neben eIF4A auch die übrigen Komponenten des eIF4E-Komplexes einschließlich des *cap binding* Proteins eIF4E und des Adaptorproteins eIF4G. Weiterhin scheint eine andere RNA-Helikase (DDX6) in die miRNA-vermittelte Repression involviert zu sein (detaillierte Beschreibung der miRNA-vermittelten Translationsrepression siehe (Jonas and Izaurralde, 2015)).

1.1.1 Charakteristika und Identifizierung von miRNA-mRNA Interaktionen

In tierischen Zellen erkennen miRNAs ihre Zieltranskripte über eine partiell komplementäre Bindesequenz, welche meist im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) der mRNA lokalisiert ist. Das wichtigste Kriterium dieser miRNA-Bindungsstelle ist der vollständig komplementäre Bereich zwischen nt 2 bis 7 bzw. 8 der miRNA, welche als *seed*-Region bezeichnet wird (Abb. 2). Die Bindungseffizienz dieser Region kann durch eine Interaktion des 3'-Bereiches (nt 13 - 16 der miRNA) ergänzt werden. In der Mitte wird das miRNA-mRNA Duplex durch eine Ausstülpung (*bulge*) unterbrochen (Bartel, 2009). Der Grad der evolutionären Konservierung der *seed*-Region ist ein wichtiger Indikator für die Funktionalität der miRNA-Bindestelle (Lewis et al., 2005). MiRNAs mit identischen 5'-Sequenzen formieren sogenannte miRNA *seed*-Familien, welche meist die Expression gleicher Zieltranskripte regulieren (Hausser and Zavolan, 2014). In Säugetieren sind 196 dieser miRNA-Familien hoch konserviert (Ha and Kim, 2014). Neben kanonischen miRNA-mRNA Interaktionen wurden auch alternative Bindesequenzen beschrieben. Diese besitzen keine kontinuierliche *seed*-Basenpaarung, weisen jedoch eine erhöhte Komplementarität im Zentrum oder im 3'-Bereich der miRNA auf. Allerdings wurden seither nur wenige dieser nicht kanonischen miRNA-Bindesequenzen experimentell validiert (Helwak et al., 2013; Reinhart et al., 2000; Shin et al., 2010). Eine fast vollständig komplementäre Bindestelle wurde bisher in tierischen Zellen nur für miR-196 im HOXB 3'-UTR beschrieben, wodurch eine direkte AGO2-vermittelte endonukleolytische Spaltung induziert wird (Yekta et al., 2004).

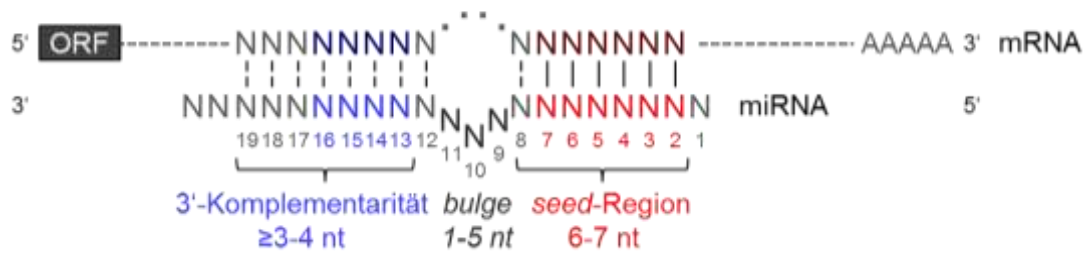


Abb.2: Schematische Darstellung einer kanonischen miRNA-mRNA Interaktion. Kanonische miRNA-Bindestellen sind durch eine vollständig komplementäre Basenpaarung im 5'-Bereich der miRNA (*seed*-Region), eine Ausstülpung (*bulge*) in der Mitte des Duplexes und häufig durch eine supplementäre 3'-Komplementarität gekennzeichnet. Modifiziert nach (Bartel, 2009).

Ergänzend tragen weitere Merkmale zur Effizienz der miRNA-mRNA Interaktionen bei. Dazu zählen die Position im 3'-UTR respektive die Entfernung des Stop-Codons oder des Poly(A)-Schwanzes, die strukturelle Zugänglichkeit oder die Präsenz von AU-reichen Sequenzen in unmittelbarer Nähe der miRNA-Bindestelle (Bartel, 2009; Grimson et al., 2007). Letztere dienen als Bindungsmotive für RNA-bindende Proteine. Insgesamt wurden kooperative aber vor allem kompetitive Interaktionen zwischen RNA-Bindeproteinen und miRNAs beschrieben (Ciafre and Galardi, 2013). Häufig besitzt der 3'-UTR einer mRNA multiple Bindestellen für eine oder verschiedene miRNAs, wobei sich diese miRNA-vermittelten Effekte unabhängig voneinander addieren (Grimson et al., 2007; Nielsen et al., 2007). Befinden sich die miRNA-Bindesequenzen jedoch in unmittelbarer Nähe (mind. 8 nt, max. 40 nt), agieren diese miRNAs kooperativ, wodurch die Repression über den additiven Beitrag der einzelnen Bindestellen hinaus geht (Grimson et al., 2007; Saetrom et al., 2007). Vor allem Gene, welche einen langen 3'-UTR kodieren, wird aufgrund einer höheren Anzahl an putativen Bindestellen eine verstärkte Expressionsinhibition durch miRNAs zugesprochen im Vergleich zu Transkripten mit kurzen 3'-UTRs (Cheng et al., 2009). Darüber hinaus interagieren miRNAs gelegentlich mit dem 5'-UTR oder der kodierenden Sequenz (CDS), wobei ein synergistischer Effekt für miRNA-Bindestellen in der CDS und dem 3'-UTR postuliert wurde (Fang and Rajewsky, 2011; Hafner et al., 2010a).

Zur *in silico* Vorhersage von miRNA-mRNA Interaktionen wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von Algorithmen wie beispielsweise miRANDA (www.microrna.org), Targetscan (www.targetscan.org) oder *RNAhybrid* (www.bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid) entwickelt (Dweep et al., 2013). Solche Datenbanken prognostizieren basierend auf verschiedenen Kriterien miRNA-Bindesequenzen im 3'-UTR einer Ziel-mRNA. Dazu zählen die *seed*-Basenpaarung, die evolutionäre Konservierung, die thermodynamische Stabilität des miRNA-mRNA Duplexes sowie die Sekundärstruktur oder die Präsenz von multiplen miRNA-Bindestellen (Dweep et al., 2013; Martinez-Sanchez and Murphy, 2013). Dennoch weisen diese bioinformatischen Programme nur eine Präzision von ~50 % auf (Rajewsky, 2006). Schlecht konservierte und nicht kanonische Bindungssequenzen werden mit einer schlechten Effizienz

respektive gar nicht prognostiziert. Um die Rate an falschpositiven Kandidaten zu verringern, integrieren neueste Datenbanken wie die *multimiR R-package database* bis zu 8 Algorithmen in ihre Analysen (Ru et al., 2014). Aufgrund dieser Limitierungen ist eine experimentelle Überprüfung der *in silico* Vorhersagen sowie eine Validierung von biologisch relevanten miRNA-mRNA-Interaktionen unerlässlich. Anfängliche *high-throughput* Verfahren analysierten den Einfluss einer individuellen miRNA auf die gesamte bzw. polysomale mRNA-Expression oder die Proteinabundanz infolge einer ektopischen miRNA-Expression (Hendrickson et al., 2009; Lim et al., 2005; Selbach et al., 2008). Jedoch erlauben diese experimentellen Ansätze keine Unterscheidung von primären und sekundären miRNA-Zieltranskripten und die biologische Relevanz dieser Interaktion ist aufgrund der übermäßig hohen miRNA-Expression fraglich. Um eine direkte Assoziation einer miRNA an eine spezifische mRNA zu identifizieren, wurden verschiedene *pull-down* Strategien entwickelt (Thomson et al., 2011). Dazu zählen Immunpräzipitationen von überexprimierten RISC-Komponenten oder Affinitätsreinigungen von markierten synthetischen miRNAs, welche zuvor in die Zellen eingebracht wurden (Chi et al., 2009; Easow et al., 2007; Hafner et al., 2010a; Helwak et al., 2013; Orom and Lund, 2007). Um die Effizienz und die Spezifität dieser Verfahren zu erhöhen, wurden die miRISC-mRNA-Komplexe durch ultraviolette (UV) Strahlung (*UV crosslinking*) stabilisiert (Chi et al., 2009; Hafner et al., 2010a; Helwak et al., 2013). Zur Identifikation von regulatorischen miRNAs einer ausgewählten mRNA wurden Reporter-Assays mit *gain-of-function* Analysen kombiniert und Affinitätsreinigungen von exogen oder endogen exprimierten Ziel-RNAs etabliert (Braun et al., 2014; Gaken et al., 2012; Hassan et al., 2013; Vo et al., 2010; Wu et al., 2010). Darunter befindet sich auch das *trapping of RNA in vitro affinity purification* (miTRAP) Verfahren, welches auf einem erweiterten *MS2-tethering* Protokoll basiert (Braun et al., 2014). Die Affinitätsreinigung mit dem *in vitro* transkribierten MYC 3'-UTR identifizierte in Kombination mit *next generation sequencing* Analysen neben fast allen publizierten MYC-regulierenden miRNAs 18 neue Kandidaten einschließlich nicht *in silico* ermittelbarer miRNAs. Die experimentelle Bewertung von 10 miRNA-Kandidaten bestätigte die 3'-UTR-abhängige Regulation der MYC-Expression sowie die nicht kanonischen miRNA-Bindungsstellen im MYC 3'-UTR (Braun et al., 2014). Prinzipiell wird das regulatorische Potenzial einer identifizierten miRNA-mRNA Interaktion durch die Überexpressionen oder/und Inhibition der miRNA bewertet. Letzteres erfolgt meist durch die transiente Einbringung von chemisch modifizierten komplementären Oligonukleotiden, welche die endogenen miRNAs binden und deren Aktivität blockieren. Für eine längerfristige Maskierung der miRNA eignen sich Vektor-basierende RNA-Konstrukte wie beispielsweise sogenannte *Tough Decoys* (Ebert et al., 2007; Haraguchi et al., 2009; Stenvang et al., 2012).

1.1.2 Die Bedeutung von miRNAs in der Tumorgenese

Durch ihre zentrale Rolle in der posttranskriptionellen Kontrolle der Genexpression beeinflussen miRNAs eine Vielzahl von biologischen Prozessen und sind dadurch in viele klinische Erkrankungen einschließlich der Tumorgenese involviert (Sassen et al., 2008). Eine Fehlregulation der miRNA-Expression wurde in vielzähligen Tumorerkrankungen beschrieben, wodurch diese als diagnostischer und prognostischer Marker genutzt werden kann (Iorio and Croce, 2012). Dabei sind miRNAs, durch die von Hanahan und Weinberg definierten Fähigkeiten, welche Tumorzellen im Verlauf der mehrstufigen Tumorgenese erwerben, involviert (Hanahan and Weinberg, 2011). Diese beinhalten: (1) das Erlangen einer Resistenz gegen den programmierten Zelltod (der Apoptose), (2) die Aufrechterhaltung von wachstumsstimulierenden Signalwegen (Proliferation) und (3) gleichzeitig wachstumshemmenden Signalwegen auszuweichen, (4) das Erlangen von replikativer Immortalität, (5) die Induktion von Angiogenese sowie (6) die Aktivierung von Invasion und Metastasierung respektive das Absterben in zellfremden Geweben zu verhindern (Anoikis) (Hanahan and Weinberg, 2011). Die ektopischen miRNA-Expressionen in Tumoren beruhen neben epigenetischen Veränderungen auf genetischen Deletionen, Amplifikationen und Mutationen sowie auf einer aberranten transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation (Jansson and Lund, 2012). Weiterhin tragen Defekte während der miRNA-Biogenese zur Fehlregulation von miRNAs in Tumoren bei (Jansson and Lund, 2012). Des Weiteren wurden diverse Mechanismen postuliert, bei welchen eine miRNA-vermittelte Regulation durch chromosomale Translokation oder *alternative cleavage and polyadenylation* umgangen wird (Jansson and Lund, 2012; Mayr and Bartel, 2009; Mayr et al., 2007). MiRNAs agieren in Tumorzellen als Onkogen (Onko-miRNA) oder als Tumorsuppressor (tumorsuppressive miRNA) (Zhang et al., 2007). Im Tumor überexprimierte miRNAs, wie das miR-17-92-Cluster, fungieren als Onko-miRNAs. Sie begünstigen die Tumorentstehung durch eine negative Expressionskontrolle von Tumorsuppressoren und/oder Genen, welche die zuvor erläuterten Tumorzellfähigkeiten inhibieren. Im Gegensatz dazu wirken tumorsuppressive miRNAs der Tumorgenese entgegen, indem sie die Expression von onkogenen Faktoren reprimieren. Allerdings sind diese miRNAs in Tumoren meist herabreguliert (Iorio and Croce, 2012; Zhang et al., 2007). Eine der wichtigsten tumorsuppressiven miRNA-Familien ist miR-let-7, welche im folgenden Kapitel im Detail vorgestellt wird.

1.1.2.1 Die miRNA-Familie let-7

Die miRNA-Familie *lethal-7* (miR-let-7) wurde im Jahr 2000 erstmals in der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C-elegans*) beschrieben (Reinhart et al., 2000). Sie ist über eine Vielzahl von Spezien hochkonserviert, wobei verschiedene Organismen eine unterschiedliche Anzahl an miR-let-7-Familienmitgliedern aufweisen. Im Menschen sind 10 reife miRNA-Sequenzen (miR-let-7a, -7b, -7c, -7d, -7f, -7g, -7i, miR-98 und miR-202) zu finden (siehe Abb. 27). Diese werden aus 13 pre-miRNAs prozessiert, welche auf neun Chromosomen (3, 9-12, 19, 21, 22 und X) lokalisiert sind. Dabei wird miR-let-7a von drei und miR-let-7f von zwei Genorten transkribiert (Roush and Slack, 2008). In Säugetieren steigt die Expression von miR-let-7 im Verlauf der Embryogenese sowie der Gehirnentwicklung deutlich an und bleibt in adulten Geweben erhalten (Schulman et al., 2005; Thomson et al., 2004; Wulczyn et al., 2007). In embryonalen Stammzellen ist miR-let-7 nicht nachweisbar (Thomson et al., 2006; Wulczyn et al., 2007). Im Vergleich zu normalentwickelten Geweben ist die Expression von verschiedenen miR-let-7-Vertretern in vielzähligen Tumorerkrankungen reduziert (Boyerinas et al., 2010; Wang et al., 2015b). Diese Reduktion von miR-let-7 steht im Einklang mit der Hypothese, wonach die Tumorentstehung einen reversen Prozess der Embryogenese repräsentiert (Park et al., 2007). Im Gegensatz zu den reifen let-7-miRNAs akkumuliert die Expression der primären miR-let-7-Transkripte während der embryonalen Entwicklung und in der Tumorgenese, was auf eine posttranskriptionelle Regulation von miR-let-7 zurückzuführen ist (Thomson et al., 2006; Wulczyn et al., 2007). Die zwei hoch konservierten paralogen RNA-bindenden Proteine *cell lineage abnormal 28* (LIN28) A und B wurden als wesentliche negative Regulatoren der miR-let-7-Prozessierung identifiziert (Mayr and Heinemann, 2013). MiR-let-7 und LIN28A/B weisen in normalen und malignen Geweben ein inverses Expressionsmuster auf, wobei LIN28A vor allem in embryonalen Stammzellen und LIN28B erstmalig im Leberkarzinom nachgewiesen wurde (Darr and Benvenisty, 2009; Guo et al., 2006; Wang et al., 2015b; Yang and Moss, 2003). Auf molekularer Ebene assoziieren die LIN28-Proteine über ihre RNA-Bindedomänen, welche eine N-terminale *cold shock* Domäne (CSD) und zwei C-terminale Cystein-Cystein-Histidin-Cystein (CCHC) Zink-Finger Domänen umfassen, mit den pri- und pre-miR-let-7-Transkripten (Abb. 3A). Dabei interagiert die CSD-Domäne mit dem apikalen Bereich der *loop*-Region dieser Vorläufer-RNAs und die CCHC Zink-Finger Domänen dimerisieren an einem konservierten GGAG-Motiv, welches in untermittelbarer Nähe zur DCR1-Spaltstelle liegt. LIN28A, welches vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert, inhibiert die DCR1-abhängige Prozessierung von pre-miR-let-7 und rekrutiert eine *terminal uridylyl transferase* (TUTase; TUT4/7) (Abb. 3B). Diese TUTase verursacht eine Oligo-Uridylierung am 3'-Ende der pre-miRNAs. Letztere werden von DCR1 nicht prozessiert und somit anschließend 3'-zu-5' von der Exonuklease Dis312 abgebaut. Im Nukleus inhibiert LIN28B die Drosha-abhängige Prozessierung von miR-let-7 über einen TUTase-unabhängigen Mechanismus.

Auf diese Weise inhibieren LIN28A/B nicht nur die Biogenese der miR-let-7-Familie sondern fördern zudem einen Abbau der pre-miRNAs (detaillierte Beschreibung der LIN28-vermittelten Inhibition von miR-let-7 siehe (Mayr and Heinemann, 2013; Thornton and Gregory, 2012; Wang et al., 2015b)).

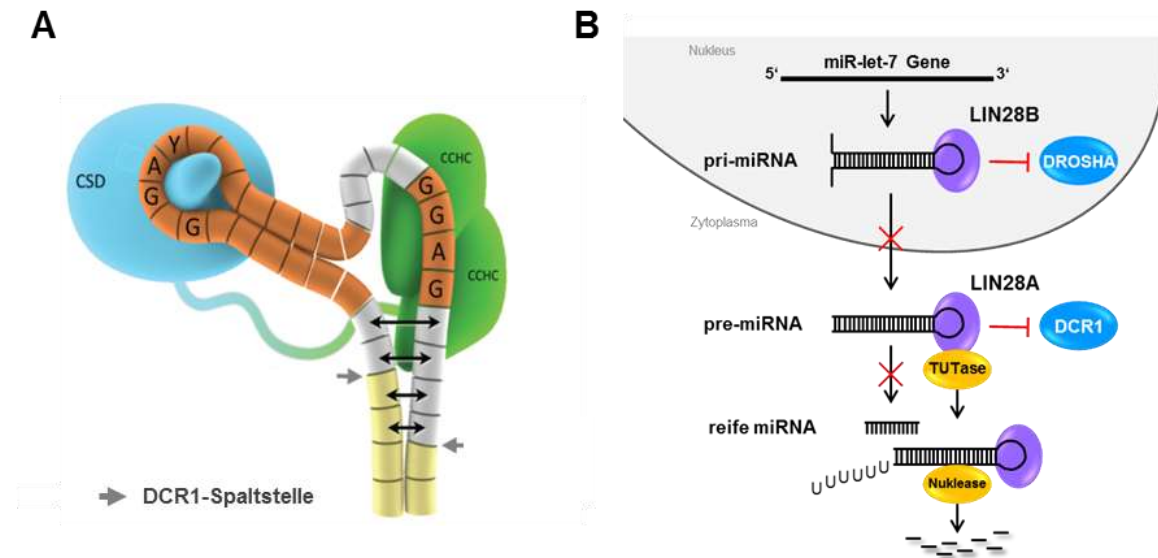


Abb. 3: LIN28A/B inhibieren miR-let-7-Expression auf posttranskriptioneller Ebene. (A) Schematische Darstellung der LIN28-Interaktion mit pre-miR-let-7. LIN28-Proteine besitzen eine N-terminale cold shock Domäne (CSD) und zwei C-terminale Cystein-Cystein-Histidin-Cystein (CCHC) Zink-Finger Domänen. Die CSD inseriert in den terminalen loop der pre-miR-let-7. Die CCHC Zink-Finger Domänen dimerisieren an einem konservierten GGAG-Motiv, wodurch das pre-miRNA-Duplex vermutlich teilweise entwunden und die Prozessierung durch DCR1 inhibiert wird. **(B)** Modell der LIN28-vermittelten Inhibition der miR-let-7-Biogenese. Die miR-let-7-Familie wird durch den kanonischen miRNA-Biogenesepfad prozessiert. In Anwesenheit der LIN28-Proteine wird die DROSHA-abhängige Prozessierung durch das kernständige LIN28B unterbunden. Im Zytoplasma rekrutiert LIN28A eine terminal uridylyl transferase (TUTase) zur pre-let-7, welche dadurch am 3'-Ende uridyliert und durch eine Exonuklease 3'-zu-5' abgebaut wird. LIN28A unterbindet somit die DCR1-vermittelte Prozessierung von pre-miR-let-7. Modifiziert nach (Thornton and Gregory, 2012; Wang et al., 2015b)

Eine systematische Studie über 43 publizierte Forschungsberichte belegt, dass die Reduktion von miR-let-7 in vielen Krebserkrankungen einschließlich Lungen-, Leber- und Ovarialkarzinomen signifikant mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert ist (Nair et al., 2012). Zudem konnten Tumorzelllinien entsprechend ihrer miR-let-7-Abundanz in stark und schwach exprimierende Gruppen eingeteilt werden, wobei letztere einen weniger differenzierten und somit mesenchymal-artigen Phänotypen aufwiesen (Shell et al., 2007). Im metastasierenden Brustkarzinom war die Expression von miR-let-7a, -7b und -7g signifikant stärker reduziert als in Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen. Im Einklang mit diesen Beobachtungen verringert die Überexpression von miR-let-7b die Ausbildung von Lungenmetastasen aus den vom Brustadenokarzinom abstammenden MDA-MB-231-Zellen im Mausmodell, was auf eine wesentliche Funktion von miR-let-7 in der Metastasierung von Tumorzellen hindeutet (Hu et al., 2013). Im Gegensatz dazu ist miR-let-7d im invasiven duktalem Karzinom hoch reguliert (Volinia et al., 2012). Diese Daten legen nahe, dass der Verlust der miR-let-7-Expression nicht als ein

universeller Indikator für die Tumoraggressivität aufgefasst werden kann. Trotz dessen erlaubt die Herabregulation von miR-let-7 eine Unterscheidung von normalen und malignen Geweben und kann daher als ein diagnostischer Marker der Tumorgenese verwendet werden (Kowalewska et al., 2013).

Die miR-let-7-Familie agiert in Tumorzellen hauptsächlich als Tumorsuppressor und inhibiert die Expression von diversen onkogenen Faktoren, wodurch verschiedene Zelleigenschaften wie Proliferation, Zellzyklus, Metabolismus, Apoptose, Migration und Invasivität beeinflusst werden (Boyerinas et al., 2010; Wang et al., 2012). *Gain-of-function* Screening-Analysen von miR-let-7b in Tumorzelllinien identifizierten einige onkogene Faktoren, deren Expression auch im Verlauf der murinen Embryogenese sank (Boyerinas et al., 2008). Dabei waren der architektonische Transkriptionsfaktor HMGA2 und die RNA-bindenden Proteine LIN28B und IGF2BP1 die stärksten miR-let-7-regulierten onkofötalen Transkripte (Boyerinas et al., 2008).

HMGA2 ist ein Mitglied der *High Mobility Group A* (HMGA) Familie. Diese Proteine binden an AT-reiche DNA-Sequenzen und modulieren die Genexpression, indem sie die Chromatinstruktur modulieren (Fusco and Fedele, 2007). HMGA2-defiziente Mäuse weisen ein erhebliches Wachstumsdefizit auf. Hingegen verstärkt die transgene Einbringung von HMGA2-Transkriptvarianten die Ausbildung von benignen Tumoren im Mausmodell, was vermuten lässt, dass HMGA2 einen wachstumsfördernden Einfluss hat und in die Tumorgenese involviert ist (Arlotta et al., 2000; Fedele et al., 2002; Zaidi et al., 2006; Zhou et al., 1995). Damit übereinstimmend wird HMGA2 häufig in malignen Neoplasien, vor allem mesenchymalen Ursprungs, exprimiert. Dabei ist eine hohe HMGA2-Abundanz mit einer schlechten Prognose korreliert (Fusco and Fedele, 2007; Shell et al., 2007). Die gesteigerte HMGA2-Expression steht mutmaßlich im direkten Zusammenhang mit dem Verlust von miR-let-7, welche HMGA2 über sieben konservierte Bindestellen im 3'-UTR reprimiert, und ist darüber hinaus mit einer chromosomalen Translokation assoziiert (Lee and Dutta, 2007; Mayr et al., 2007; Shell et al., 2007). Letzteres führt zum Verlust des 3'-terminalen Genbereichs einschließlich des HMGA2 3'-UTRs (Mayr et al., 2007).

Wie bereits erwähnt sind Lin28A/B weitverbreitete posttranskriptionelle Inhibitoren der miR-let-7-Familie. Die Expression von beiden LIN28-Proteinen wird durch miR-let-7 reprimiert, wodurch ein negativer *feedback*-Mechanismus formiert wird (Guo et al., 2006; Li et al., 2012; Rybak et al., 2008). Lin28A/B sind in einem breiten Spektrum von Tumorarten, deren Ursprungsgewebe aus allen drei Keimblättern entstammt, aberrant exprimiert und mit fortgeschrittener Erkrankung respektive einer schlechten Prognose assoziiert (Viswanathan et al., 2009; Wang et al., 2015b). Die transgene Expression von Lin28B in murinen Tumormodellen induziert Leberkarzinome sowie die Formierung von Neuroblastomen und aggressiven malignen Lymphomen, woran ein hohes onkogenes Potenzial dieses RNA-Bindeproteins zu erkennen ist

(Beachy et al., 2012; Molenaar et al., 2012; Nguyen et al., 2014). Im Einklang mit der zentralen Rolle in der miR-let-7-Biogenese erhöhen Lin28A/B die Expression vielzähliger onkogener Faktoren und beeinflussen dadurch zelluläre Prozesse wie Selbsterneuerung, Proliferation, Zelltod, Metabolismus, Metastasierung und Immunevasion. Darüber hinaus modulieren LIN28A/B als Translationsaktivatoren auch miR-let-7-unabhängig diverse Tumorzelleigenschaften (Wang et al., 2015b).

Im Zusammenhang mit einem LIN28B-überexprimierenden Xenograft-Modell unter Verwendung von primären murinen Hepatozyten wurde die Expression der miR-let-7-Zieltranskripte IGF2BP1 und IGF2BP3 erhöht (Nguyen et al., 2014). Neben diesen beiden IGF2BP-Vertretern wurde auch für das zweite Familienmitglied IGF2BP2 eine miR-let-7-vermittelte Regulation vorgeschlagen (Alajez et al., 2012). Im Rahmen dieser Dissertation galt IGF2BP1 besonderem Interesse. Dessen Funktion, Expression und Bedeutung wird in den folgenden Kapiteln erläutert.

1.2 Die Familie der IGF2BPs

Die drei humanen *Insulin-like growth factor-2 mRNA binding proteins* (IGF2BP1-3) gehören der hochkonservierten VICKZ (Vg1 RBP/Vera, IMP-1,2,3, CRD-BP, KOC, ZBP-1) Familie von RNA-bindenden Proteinen an (Yisraeli, 2005). Die Nomenklatur dieser Proteinfamilie leitet sich von diversen Synonymen ihrer Mitglieder in verschiedenen Organismen und Zelltypen ab. Diese Proteine regulieren die Stabilität, die Translation und die Lokalisierung ihrer RNA-Liganden, wobei IGF2BP1 das am besten charakterisierte Familienmitglied ist (Bell et al., 2013). Charakteristisch für die drei IGF2BPs ist eine kanonische Domänenstruktur. Sie besitzen zwei N-terminale *RNA-recognition motifs* (RRMs) und vier C-terminale *hnRNPk homology* (KH) Domänen (Farina et al., 2003; Weidensdorfer et al., 2009). Mutationsanalysen des GXXG-loops der KH-Domänen in Glycin-Glutamat-Glutamat-Glycin (GEEG) zeigen, dass die RNA-Bindung durch diese vier Domänen vermittelt wird (Wachter et al., 2013). Zudem beeinflussen die KH-Domänen RNA-abhängige Proteinassoziationen und die subzelluläre Lokalisierung (Wachter et al., 2013). Die IGF2BPs sind vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Dort assoziieren sie mit ihren mRNA-Zieltranskripten in Ribonukleoprotein (mRNP) Partikeln (Farina et al., 2003; Wachter et al., 2013). Diese granulären Strukturen wurden in perinukleären Regionen aber auch an der *leading edge* von migrierenden Zellen oder in Neuriten von sich entwickelnden Neuronen beobachtet (Farina et al., 2003; Zhang et al., 2001). Allerdings wurde IGF2BP1 auch im Kern von spermatogenen Zellen nachgewiesen und verfügt über ein nukleäres Exportsignal (Nielsen et al., 2003). Es wird angenommen, dass die IGF2BPs bereits im Kern mit ihren Ziel-mRNAs assoziieren, bevor diese die erste Runde der Translation durchlaufen (Huttelmaier et al., 2005; Oleynikov and Singer, 2003; Pan et al., 2007). Diese Annahme wird durch den Nachweis von Komponenten des

exon junction Komplexes und CBP80 in den IGF2BP1-enthaltenden mRNPs bekräftigt. Die Translationsinitiationsfaktoren eIF4E und eIF4G wurden hingegen nicht nachgewiesen (Jonson et al., 2007; Weidensdorfer et al., 2009). Durch die Rekrutierung der naiven Zieltranskripte in zytoplasmatische mRNPs kontrolliert IGF2BP1 respektive alle IGF2BPs die Degradation und Translation dieser mRNAs, wodurch deren Expression erhöht oder reduziert wird (Bell et al., 2013). Dieses Modell lässt sich ebenso mit dem IGF2BP1-vermittelten Transport von rekrutierten RNA-Liganden vereinbaren (Farina et al., 2003). Eines der am besten analysierten Zieltranskripte von IGF2BP1 ist die β -Aktin (ACTB) mRNA (Dahm and Kiebler, 2005). IGF2BP1 bindet ein konserviertes 54 nt langes Element im ACTB 3'-UTR, den sogenannten *zipcode*, wonach das orthologe IGF2BP-Protein in *gallus gallus* als *zipcode binding protein 1* (ZBP1) benannt wurde (Kislauskis et al., 1994; Ross et al., 1997). ZBP1 inhibiert die ACTB-Proteinsynthese und vermittelt den Transport der reprimierten mRNA in distale Neuriten und in die Wachstumskronen von primären Neuronen (Huttelmaier et al., 2005; Zhang et al., 2001). Die Freisetzung der rekrutierten ACTB-mRNA aus den mRNP-Partikeln wird durch eine Phosphorylierung eines Tyrosins (Y396) von IGF2BP1 durch die Proteinkinase Src induziert, wodurch diese freigesetzt und ihre Translation aktiviert wird (Huttelmaier et al., 2005). Jüngste Studien belegen, dass IGF2BP1 ebenso die lokalisierte Translation der Cofilin1-mRNA in migrierenden Lungenkarzinomzellen vermittelt (Maizels et al., 2015). Eine Inhibition der Translation ist auch für MAPK4 und IGF2 bekannt (Nielsen et al., 1999; Stohr et al., 2012). Hingegen postulieren Studien in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs), dass eine Phosphorylierung von IGF2BP1 durch den mTOR Komplex 2 (mTORC2) die Bindung an den hochstrukturierten 5'-UTR der IGF2-mRNA verstärkt und die Translationsinitiation über eine IRES aktiviert wird (Dai et al., 2011). Des Weiteren steigert IGF2BP1 auch die IRES-abhängige Translation der cIAP1-mRNA und der Hepatitis-C-Virus RNA (Faye et al., 2015; Weinlich et al., 2009). Eine Stabilisierung der RNA-Liganden vermittelt IGF2BP1 zum einen durch die Bindung an einen seltenen Sequenzbereich (*coding region instability determinat* (CRD)) der CDS, wodurch es den Translations-gekoppelten endonukleolytischen Abbau der MYC- und MDR1-mRNA verhindert (Sparanese and Lee, 2007). Daher wurde das murine IGF2BP-Ortholog erstmalig als *CRD binding protein* (CRD-BP) beschrieben (Bernstein et al., 1992; Doyle et al., 1998). Ein solcher CRD-vermittelter Mechanismus wird auch für die PTEN-mRNA vermutet (Stohr et al., 2012). Zum anderen wirkt IGF2BP1 durch die Bindung an den 3'-UTR von β -TRCP (BTRC) oder MITF einer miRNA-vermittelten Repression dieser Transkripte entgegen (Elcheva et al., 2009; Goswami et al., 2010). Neueste Studien belegen, dass IGF2BP3 die miR-let-7-abhängige Degradation von HMGA2 vermindert (Jonson et al., 2014). Interessanterweise, wurden im murinen fötalen *Telecephalon* HMGA2 und im Kolonkarzinom KRAS, ein weiteres miR-let-7-Ziel, als IGF2BP1-stabilisierte Transkripte identifiziert (Mongroo et al., 2011; Nishino et al., 2013). Ob IGF2BP1 die miR-let-7-

vermittelte Inhibition der HMGA2- und KRAS-Expression beeinträchtigt, ist bisher jedoch nicht geklärt. Des Weiteren stabilisiert IGF2BP1 die CD44-, CTNNB1-, LEF1- und GLI1-mRNA, wobei der genaue Regulationsmechanismus dieser Transkripte nicht bekannt ist (Gu et al., 2008; Noubissi et al., 2009; Vikesaa et al., 2006; Zirkel et al., 2013). Darüber hinaus wurde auch ein destabilisierender Einfluss von IGF2BP1 auf die lange nicht kodierende RNA (lncRNA) HULC im Leberkarzinom beschrieben. Die Autoren dieser Studie postulieren, dass IGF2BP1 den CCR4-NOT-Komplex rekrutiert, wodurch eine Degradation der HULC-RNA initiiert wird (Hammerle et al., 2013). Trotz dieser Vielzahl an publizierten IGF2BP1-Zieltranskripten ist kein konserviertes Bindungsmotiv bekannt. PAR-CLIP Analysen, in welchen über 8000 weitere Ziel-mRNAs für die gesamte IGF2BP-Familie vorgeschlagen wurden, identifizierten die putative Konsensussequenz CAUH (H = A, U oder C) für alle drei IGF2BPs (Hafner et al., 2010b).

1.2.1 Die Bedeutung von IGF2BP1 in der Embryogenese

Die gesamte IGF2BP-Familie wird durch ein hohes Expressionsniveau während der embryonalen Entwicklung von der Zygote zu den Embryonalstadien charakterisiert (Hammer et al., 2005; Nielsen et al., 1999). Während der murinen Embryogenese erreicht die Expression der drei IGF2BPs um Embryonaltag (E) 12,5 ihr Maximum und fällt bis zur Geburt stetig ab (Hansen et al., 2004; Mori et al., 2001; Mueller-Pillasch et al., 1999; Nielsen et al., 1999). Die Expression von IGF2BP1 im Mausfötus wurde durch einen *gene-trap* der β -Galaktosidase (β -geo) in das zweite Intron des IGF2BP1-Gens lokalisiert (Hansen et al., 2004). Dabei wurde IGF2BP1 ab E 10,5 vorwiegend im Vorder- und Hinterhirn, der Schnauze, den Gliedmaßen, dem Branchialbogen und dem Schwanz beobachtet. Die IGF2BP1-Expression im Vorder- und Hinterhirn sowie im neuralen Trakt stieg bis E 12,5 an. Ab E 17,5 war IGF2BP1 abgesehen vom Darm, der Niere und der Leber nicht mehr nachweisbar (Hansen et al., 2004). Entgegen der hohen Expression während der Embryogenese werden IGF2BP1 sowie IGF2BP3 in adulten Geweben nicht oder in nur geringfügigen Mengen z.B. im Testis exprimiert (Hammer et al., 2005). Damit übereinstimmend zeigten semi-quantitative RT-PCR Analysen, dass eine schwache IGF2BP1-Abundanz in der Lunge, der Milz und im Kopf einer 16 Wochen alten männlichen Maus im Vergleich zu einem 64 Wochen älteren Tier vollständig erlosch (Bell et al., 2013). Im Gegensatz dazu ist IGF2BP2 das einzige Familienmitglied, welches im adulten Organismus exprimiert wird (Bell et al., 2013; Hammer et al., 2005). Genomweite Assoziationsstudien zeigten, dass ein *single nucleotide polymorphism* (SNP) im zweiten Intron des IGF2BP2-Gens mit einem erhöhten Risiko für Typ2-Diabetes korreliert und legten eine zentrale Funktion von IGF2BP2 im Metabolismus nahe (Christiansen et al., 2009).

Die Physiologische Rolle der IGF2BPs in der embryonalen Entwicklung wurde bisher nur für IGF2BP1 anhand der *gene-trap* Maus analysiert (Hansen et al., 2004). Da das IGF2BP1- β -geo-

Fusionsprotein nur eine der zwei RRM- und keine KH-Domäne besitzt, verliert das Protein seine biologische Aktivität. Diese Mäuse weisen eine stark erhöhte perinatale Mortalität, eine verminderte Viabilität, eine unvollständige Darmentwicklung und einen Zwergenwuchs auf. Die um 40 % verminderte Körpergröße sowie die verkleinerten Organe wurden vermutlich eher durch Hypoplasie als durch Apoptose bedingt. Die Analyse von bekannten Zieltranskripten und der globalen mRNA-Mengen zeigten, dass der fötale Verlust (E 12,5) von IGF2BP1 die IGF2-Translation verringert, jedoch keinen Einfluss auf die weitere Genexpression hatte. Hingegen führte der IGF2BP1-Mangel im postnatalen Darm zu einer verringerten Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM) Proteinen wie z.B. verschiedenen Kollagenen (Hansen et al., 2004). Im Zusammenhang mit der generellen Wachstumsretardierung der *gene-trap* Maus belegen jüngste Studien, dass der *knockout* von IGF2BP1 die Proliferation von embryonalen Stammzellen aus dem dorsalen *Telecephalon* dieser Maus verringert und dadurch die Gehirngröße reduziert. In undifferenzierten Stammzellen weist IGF2BP1 eine hohe Expression auf und fördert das Selbsterneuerungspotenzial über eine Stabilisierung der HMGA2-mRNA (Nishino et al., 2013).

Während der Embryogenese in *Xenopus* verstärkt das IGF2BP3-Ortholog Vg1RBP/Vera die direkte Migration von Zellen der Neuralleiste. Diese Beobachtung legt einen Einfluss der IGF2BPs in der Regulation der Zellbewegung nahe.

1.2.2 Die Bedeutung von IGF2BP1 in der Tumorgenese

Eine Vielzahl von Studien belegen eine Reexpression von IGF2BP1 und IGF2BP3 in verschiedenen Tumorerkrankungen (Bell et al., 2013; Lederer et al., 2014). Aufgrund dieser *de novo* Synthese und der hohen Expression während der Embryogenese wird das Expressionsmuster dieser beiden IGF2BP-Vetreter als onkofötal charakterisiert. Hingegen gibt es bisher nur wenige Hinweise auf eine onkogene Funktion von IGF2BP2, wobei dieses im Liposarkom sowie im Leber- und Endometriumkarzinom detektiert wurde (Cleynen et al., 2007; Lu et al., 2001; Zhang et al., 2011). Basierend auf RT-qPCR und Mikroarray-Analysen, sowie immunhistochemischen Färbungen wurde IGF2BP1 in verschiedenen malignen Tumorarten wie beispielsweise dem Ovarial-, Brust-, Leber-, oder Darmkarzinom aber auch im Melanom, im Neuroblastom sowie in verschiedenen Arten des Lymphoms nachgewiesen (Bell et al., 2015; Boyerinas et al., 2012; Dimitriadis et al., 2007; Elcheva et al., 2008; Gutschner et al., 2014; Ioannidis et al., 2003; Kobel et al., 2007; Natkunam et al., 2007; Vainer et al., 2008). Die Inzidenz von IGF2BP1 steigt im Ovar und Kolon mit zunehmendem Tumorstadium und damit einhergehend mit abnehmendem Differenzierungsgrad dieser Gewebe an (Dimitriadis et al., 2007; Kobel et al., 2007). In diesen Krebserkrankungen und im Neuroblastom ist eine hohe IGF2BP1-Expression mit einer kürzeren Rezidivfreien- und Gesamtüberlebensrate korreliert, wodurch IGF2BP1 als signifikanter prognostischer Marker genutzt werden kann (Bell et al.,

2015). Zudem ist die *de novo* Synthese von IGF2BP1 im kolorektalen Karzinom mit einer verstärkten Ausbildung von Metastasen assoziiert (Dimitriadis et al., 2007; Vainer et al., 2008).

Neben diesen deskriptiven klinischen Studien wurde die Rolle von IGF2BP1 als ein pro-onkogener Faktor vor allem anhand von funktionellen *in vitro* Studien mit Tumorzelllinien aber auch in einigen wenigen Tiermodellen untersucht. Durch die posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression von vielfältigen Zieltranskripten beeinflusst IGF2BP1 diverse zelluläre Eigenschaften wie Proliferation, Wachstum, Apoptose und Motilität von Tumorzellen. So erhöht IGF2BP1 die Proliferation von verschiedenen Krebszelllinien über die Stabilisierung von MYC, KRAS, MDR1, MITF und GLI (Boyerinas et al., 2012; Goswami et al., 2010; Kobel et al., 2007; Mongroo et al., 2011; Noubissi et al., 2009). In *knockdown*-Analysen reduziert IGF2BP1 das Adhäsions-unabhängige Wachstum von Kolonkarzinomzellen, wohingegen die retrovirale Überexpression des kurzen IGF2BP1-Transkriptes in epithelialen Brust- und Lungenzellen diese Fähigkeit und damit einhergehend das onkogene Potenzial steigert (Mayr and Bartel, 2009; Mongroo et al., 2011). Einen negativen Einfluss auf die Apoptose von Tumorzellen vermittelt IGF2BP1 über die Expressionskontrolle von cIAP1 und BTRC (Elcheva et al., 2009; Faye et al., 2015). In murinen Xenograft-Modellen mit humanen Leber- und Kolonkarzinomzellen fördert IGF2BP1 das Tumorwachstum (Gutschner et al., 2014; Hamilton et al., 2013). Die Xenograft-Maus mit IGF2BP1-überexprimierenden Kolonkarzinomzellen weist zudem eine verstärkte Dissemination von Tumorzellen ins Blut auf, wohingegen der *knockdown* von IGF2BP1 die Anzahl von zirkulierenden Tumorzellen reduziert (Hamilton et al., 2013). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass IGF2BP1 ein potenzieller Initiator der Metastasierung ist. Hinweise über eine mögliche Funktion von IGF2BP1 in der Tumorinitiation wurde anhand eines transgenen Mausmodells beschrieben (Tessier et al., 2004). Hierbei wurde IGF2BP1 unter der Kontrolle eines *whey acidic protein* Promotors (WAP) im epithelialen Brustgewebe exprimiert. Die Inzidenz von Brusttumoren lag bei einer hohen IGF2BP1-Menge innerhalb von 60 Wochen bei 95 % und bei schwächeren Expressionen immer noch bei 60 %. Zudem waren diese Tumore multifokal und metastasierend (Tessier et al., 2004). Zahlreiche Forschungsberichte belegen eine zentrale Funktion von IGF2BP1 in der Regulierung der Motilität von Tumorzellen, wodurch das Migrations- und Invasionspotenzial erhöht und die Ausbildung von Metastasen begünstigt werden kann (Lapidus et al., 2007; Oberman et al., 2007; Stohr et al., 2012; Vainer et al., 2008; Vikesaa et al., 2006; Zirkel et al., 2013). Im kolorektalen Karzinom ist IGF2BP1 maßgeblich an der Formierung von Lamellipodien in migrierenden Tumorzellen beteiligt (Vainer et al., 2008). Studien in Ovarialkarzinom- (ES-2) und Osteosarkom-abstammenden (U2OS) Tumorzellen belegen, dass IGF2BP1 die gerichtete Migration von Tumorzellen erhöht, indem es die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts moduliert (Stohr et al., 2012). Die IGF2BP1-vermittelte Translationsrepression von MAPK4 verringert die Phosphorylierung von HSP27 durch MK5. HSP27

kontrolliert das Gleichgewicht zwischen zellulärem G/F-Aktin, wodurch IGF2BP1 die strukturelle und dynamische Integrität der Mikrofilamente verbessert und die Migrationsgeschwindigkeit sowie die Zell-Matrixadhäsion erhöht. Des Weiteren stabilisiert IGF2BP1 die mRNA der Phosphatase PTEN, wodurch das PIP3/PIP2-Verhältnis reduziert und kleine Rho-GTPase aktiviert wird. Dies moduliert die Zellpolarität und damit die Richtung der Zellbewegung. Diese Beobachtungen belegen, dass IGF2BP1 ein wesentlich Modulator der Zellmigration ist (Stohr and Huttelmaier, 2012). Im Einklang damit erhöhte IGF2BP1 in metastatischen Brustkarzinomzellen der Ratte die Motilität und reduzierte allerdings die Chemotaxis (Lapidus et al., 2007). Hingegen verringert der *knockdown* von IGF2BP1 und IGF2BP3 über die Stabilitätskontrolle der CD44-mRNA die Formierung von Invadopodien, was einen positiven Einfluss der IGF2BPs auf die Invasivität von Tumorzellen unterstützt (Vikesaa et al., 2006). Diese Aktin-reichen Zellfortsätze beinhalten verschiedene Proteine wie die Matrixmetalloproteasen (MMP), welche die umliegende ECM remodelieren und das invasive Potenzial erhöhen.

Zusammengenommen ist IGF2BP1 ein zentraler Modulator der posttranskriptionellen Genregulation, wodurch dieses onkofötale RNA-Bindeprotein verschiedene Zelleigenschaften wie Proliferation, Apoptose, Migration und Ivasivität beeinflusst. Diese Prozesse sind vor allem während der Embryogenese von Bedeutung und werden in der Tumorgenese häufig fehlreguliert.

1.3 Die Kontrolle der IGF2BP1-Expression

Die Expression von IGF2BP1 wird auf transkriptioneller Ebene sowie durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen kontrolliert. Verschiedene Studien verdeutlichen, dass die IGF2BP1-Transkription über den Wnt-Signalweg aktiviert wird (Gu et al., 2008; Nishino et al., 2013; Noubissi et al., 2006). In HEK293T-Zellen erhöht CTNNB1 in einem Komplex mit TCF4 die IGF2BP1-Expression, wodurch BTRC und MYC stabilisiert werden. Das BTRC-Protein ist als ein Bestandteil des Skp1-Cullin1-Fbox Komplexes, einer E3 Ubiquitin-Ligase, an der Degradation von CTNNB1 beteiligt und formiert dadurch eine negative *feedback*-Regulation (Noubissi et al., 2006). Kontroverse Studien in Brustkrebszelllinien belegen eine CTNNB1-vermittelte Aktivierung der IGF2BP1-Expression über einen positiven *feedback*-Mechanismus (Gu et al., 2008). Neben CTNNB1 wurde MYC als ein transkriptioneller Aktivator von IGF2BP1 beschrieben (Noubissi et al., 2010). Dieser Transkriptionsfaktor könnte die IGF2BP1-Expression allerdings auch indirekt über die Inhibition der miR-let-7-Familie steigern (Chang et al., 2008; Chang et al., 2009; Wang et al., 2011). Wie bereits erwähnt, wird IGF2BP1 durch miR-let-7 reprimiert, wobei fünf miR-let-7-Bindungsstellen im humanen ~6,7 kb langen IGF2BP1 3'-UTR identifiziert wurden (Abb. 4) (Boyerinas et al., 2008). In Tumorzellen, die vom Lungenkarzinom abstammen beeinflusst die miR-let-7-vermittelte Inhibition der IGF2BP1-Expression vermutlich die Proliferation, den

Zellzyklus und die Motilität (Boyerinas et al., 2008). Studien in *Drosophila* und im Mausmodell belegen, dass die miR-let-7/IGF2BP1-Achse auch in diesen Organismen konserviert ist (Gurtan et al., 2013; Nishino et al., 2013; Toledano et al., 2012). In embryonalen (E 13,5) *Telencephalon*-Zellen einer miR-let-7i-induzierten transgenen Maus war die IGF2BP1-Proteinmenge gesenkt, was vermuten lässt, dass miR-let-7 die IGF2BP1-Expression auch *in vivo* inhibiert (Nishino et al., 2013). Der *knockout* von DCR1 in einer adulten mesenchymalen murinen Stammzelllinie führte zur Derepression von miR-let-7-Zieltranskripten einschließlich IGF2BP1-3 und HMGA2, wobei auch die Expression von anderen miRNAs reduziert wurde (Gurtan et al., 2013). Neben miR-494 wurden in neusten Studien im Leber- und Lungenkarzinom miR-625 und miR-196b, miR-873 im Glioblastom und miR-372 im Nierenkarzinom als IGF2BP1-regulierende miRNAs identifiziert (Huang et al., 2015; Ohdaira et al., 2012; Rebucci et al., 2015; Wang et al., 2015a; Zhou et al., 2015). Diese miRNAs tragen durch die Expressionskontrolle von IGF2BP1 zur Tumorgenese bei, wobei ein Einfluss auf die Proliferation, das Wachstum, die Apoptose oder das Migrations- und Invasionspotenzial beschrieben wurde.

IGF2BP1 mRNA:

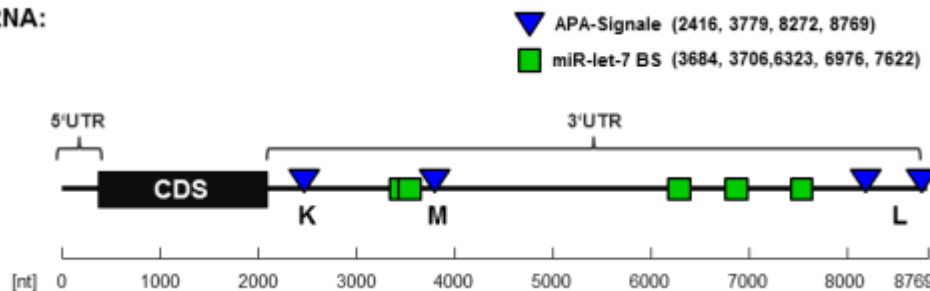


Abb.4: Schematische Darstellung des IGF2BP1-mRNA. IGF2BP1-Transkript mit den hochkonservierten miR-let-7-Bindestellen (BS, grün) und den alternativen Polyadenylierungssignalen (APA-Signale, blau) im 3'-UTR. Einhergehend mit diesen APA-Signalen werden vier alternative mRNA Isoformen prozessiert: eine kurze (K), eine mittlere (M) und zwei lange (L) Varianten. Modifiziert nach (Mayr and Bartel, 2009).

Ein alternativer Mechanismus, wodurch die miR-let-7-vermittelte Repression von IGF2BP1 in Tumorzellen umgangen und die Expression dieses Proto-Onkogen vermutlich heraufreguliert wird, wurde von Mayr und Bartel postuliert (Mayr and Bartel, 2009). Im Einklang mit verschiedenen alternativen Polyadenylierungssignalen im ~6,7 kb langen 3'-UTR werden durch *alternative cleavage and polyadenylation* (APA) vier IGF2BP1 mRNA-Isoformen prozessiert (Abb. 4). Im Gegensatz zu den beiden langen Varianten weisen die kurze und mittlere IGF2BP1-mRNA einen stark verkürzten 3'-UTR auf und besitzen keine respektive nur zwei der fünf validierten miR-let-7-Bindestellen. Der genaue Mechanismus dieser APA-Regulation ist jedoch unklar. Anhand von *Northern Blot* Analysen postulieren die Autoren, dass die kurze IGF2BP1-mRNA stärker in Tumorzelllinien als in nicht transformierten Zellen exprimiert wird und mit der Tumorzelltransformation assoziiert ist (Mayr and Bartel, 2009). Des Weiteren wird anhand von Luziferasereporter-Analysen angenommen, dass die kürzeste IGF2BP1 mRNA durch den Verlust

der 3'-UTR abhängigen Regulation vor allem der miR-let-7-vermittelten Repression erheblich mehr Protein produziert als die längste Variante. Dies soll zur Heraufregulation von IGF2BP1 in Tumorzellen führen (Mayr and Bartel, 2009).

Zusammengenommen wird die IGF2BP1-Expression neben einer Transkriptionskontrolle auch durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Allerdings stehen sich die miRNA-vermittelte Repression und die APA-Regulation des IGF2BP1-Transkriptes offensichtlich gegenüber. Welcher dieser posttranskriptionellen Regulationsmechanismen die IGF2BP1-Abundanz in Tumorzellen maßgeblich kontrolliert, ist nicht geklärt.

1.4 Das Ovarialkarzinom

Eine Fehlregulation des soeben vorgestellten onkofötalen IGF2BP1-Proteins sowie der miRNA-Familie let-7 wurde auch in gynäkologischen Krebserkrankungen wie dem Ovarialkarzinom beobachtet (Boyerinas et al., 2010; Boyerinas et al., 2012; Kobel et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass diese posttranskriptionellen Regulatoren in die Entstehung von ovarialen Tumoren involviert sein könnten. Der Eierstockkrebs ist die Tumorerkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane. Er weist die höchste Mortalitätsrate auf und stellt die fünfthäufigste Krebs-assoziierte Todesursache bei Frauen dar. Die geschätzte jährliche Inzidenz dieser Erkrankung liegt weltweit bei über 200000 neu erkrankten Frauen und ca. 125000 Todesfällen (Sankaranarayanan and Ferlay, 2006). Das epitheliale Ovarialkarzinom stellt mit 90 % den häufigsten ovarialen Tumor dar und wird histologisch in seröse, endometriodale, muzine und Klarzellkarzinome eingeteilt. Darüber hinaus werden diese Ovarialkarzinome mit zunehmender Tumorprogression nach der *Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique* (FIGO) in vier Stadien oder nach neusten histopathologischen und genetischen Kriterien in zwei umfassende Tumorkategorien eingeordnet (Koshiyama et al., 2014; Prat, 2015). Die Typ I-Tumore umfassen geringgradig seröse, endometriodale, muzine sowie einige Klarzellkarzinome. Diese Tumore sind im Allgemeinen indolent, genetisch stabil, entwickeln sich langsam und sind vorwiegend auf das Ovar begrenzt. Im Gegensatz dazu umfassen Typ II-Tumore hochgradig seröse, undifferenzierte und diverse Klarzellkarzinom sowie Karzinosarkome. Diese aggressiven Tumore entwickelt sich rasant, sind genetisch sehr instabil und werden durch Mutationen des Tumorsuppressor-Gens TP53 gekennzeichnet (Jones and Drapkin, 2013; Kurman and Shih le, 2011). Trotz verschiedener diagnostischer und therapeutischer Ansätze liegt die 5-jährige Überlebensrate derzeit bei nur 45 %, da aggressive Typ II-Tumore spät detektiert werden und es häufig zur Rekurrenz der Erkrankung kommt (Kurman and Shih le, 2011; Siegel et al., 2011). Daher sind die Aufklärung der molekularen Pathologie des Ovarialkarzinoms sowie die Identifizierung von Tumormarkern respektive putativen therapeutischen Zielgenen von hohem Interesse.

1.5 Zielstellung der Arbeit

IGF2BP1 gehört der *IGF2 mRNA binding protein* (IGF2BP) Proteinfamilie, welche drei Mitglieder umfasst, an. Dieses RNA-Bindeprotein kontrolliert die Expression der Zieltranskripte auf post-transkriptioneller Ebene, wodurch es verschiedene Zelleigenschaften wie Motilität und Wachstum moduliert (Bell et al., 2013). IGF2BP1 wird hauptsächlich während der Embryogenese exprimiert und ist daher in adulten Geweben kaum zu finden. Hingegen wird IGF2BP1 in vielen Tumorerkrankungen *de novo* synthetisiert (Bell et al., 2013; Yisraeli, 2005). Wie dieses onkofötale Protein in Tumorzellen haraufreguliert wird, ist bisher nur wenig charakterisiert. Jedoch verdeutlichten einige Studien, dass die IGF2BP1-Transkription über den Wnt-Signalweg aktiviert werden kann (Gu et al., 2008; Nishino et al., 2013; Noubissi et al., 2006). Darüber hinaus wird die IGF2BP1-Expression auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Es wurde postuliert, dass der ~6,7 kb lange 3'-UTR des IGF2BP1-Transkripts in Tumorzellen durch *alternative cleavage and polyadenylation* (APA) verkürzt wird, wodurch die 3'-UTR abhängige Regulation, insbesondere die miR-let-7-vermittelte Inhibition, verloren geht (Mayr and Bartel, 2009). Im Gegensatz dazu wurde IGF2BP1 neben HMGA2 und LIN28B in Tumorzelllinien anhand von *loss-of-function* Analysen als stärkstes miR-let-7-reguliertes onkofötale Zieltranskript identifiziert. Welcher dieser posttranskriptionellen Regulationsmechanismen die IGF2BP1-Expression in Tumorzellen entscheidend beeinflusst, ist nicht geklärt. Daher war das erste Ziel dieser Arbeit, die Charakterisierung ob der 3'-UTR von IGF2BP1 in Tumorzellen tatsächlich verkürzt wird und ob die miR-let-7-vermittelte Regulation das Expressionsmuster des onkofötalen IGF2BP1-Proteins wesentlich beeinflusst

Die tumorsuppressive miRNA-Familie let7 wirkt der Tumorprogression entgegen, indem sie die Expression von diversen onkogenen Faktoren reprimiert und somit die Ausbildung eines malignen Tumorzellphänotypen unterdrückt. Es ist daher zu charakterisieren, ob IGF2BP1 neben HMGA2 und LIN28B den zentralen Modulator in der miR-let-7-vermittelten Tumorsuppression darstellt. Da miR-let-7 in vielen Tumorerkrankungen, wie auch dem Ovarialkarzinom herunterreguliert ist, sollte die miR-let-7-vermittelte Inhibition von IGF2BP1-LIN28B-HMGA2 in miR-let-7-depletierten Ovarialkarzinomzellen charakterisiert werden. Der Einfluss dieser onkogenen Faktoren auf die Zelleigenschaften der Tumorzellen sollte dabei separat getestet und zugeordnet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma Aldrich und Roth bezogen. Die Bezugsquellen für Enzyme, 2xPCR Mastermix und DNA Marker waren die Firma Promega und NEB (New England Biolabs). Transfektionsreagenzien, qPCR-Mastermixe sowie Protein-Größenstandards wurden von Life Technologies bezogen. Zellkulturschalen wurden von TPP und sämtliche Zellkulturlösungen (DMEM, HANKS, Trypsin, FBS und OptiMem) wurden von PAA erworben.

2.1.2 Bakterien

Erregerstamm	Genotyp
DH5alpha	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>

LB (*Luria Bertani*) bestand aus 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl und zur Herstellung von LB-Agar wurde 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Für die Selektion rekombinanter Klone wurde das LB-Medium in Abhängigkeit des Vektors mit 30 μ g Kanamycin/mL oder 150 μ g Ampicillin/mL supplementiert.

2.1.3 Zelllinien

Tab.1: Zusammenfassung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Nummer	Ursprungsgewebe	Publikation
Humane Zelllinien			
HEK293A	ACC-305	Embryonale Niere	(Graham et al., 1977)
HEK293T	ACC-635	Embryonale Niere	(Graham et al., 1977)
BxPC-3	CRL-1687	Pankreaskarzinom	(Tan et al., 1986)
PANC-1	CRL-1469	Epithelioides Pankreaskarzinom	(Lieber et al., 1975)
ES-2	CRL-1978	Ovariales Klarzellkarzinom	(Lau et al., 1991)
Hela	CCL-2	Cervixkarzinom	(Scherer et al., 1953)
HT-144	HTB-63	Malignes Melanom	
HCT-116	CCL-247	Kolorektales Karzinom	(Brattain et al., 1981)
MCF-7	HTB22	Mammakarzinom	(Soule et al., 1973)
U2OS	HTB-96	Osteosarkom	(Heldin et al., 1986)
C-643		Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	(Mark et al., 1987)

Murine Zelllinien		
MEFs WT	Embryonale Fibroblasten	(Glasmacher et al., 2010)
MEFs KO	Embryonale Fibroblasten	(Glasmacher et al., 2010)

WT: Wildtyp; KO: DCR1-*knockout*

2.1.4 Antikörper

Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie deren Bezugsquellen sind in Tab.7 im Anhang zusammengefasst.

2.1.5 Plasmide

Zero Blunt® blunt (Invitrogen)

pcDNA3.1 (zeo) (Invitrogen)

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega)

pLVX-shRNA2 (Clontech)

pLVX-GFP (Clontech)

psPAX2 (Clontech)

pMD2G (Clontech)

Die folgenden Plasmide wurden von Addgene geordert:

pIS1-IMP-1 long 3'UTR (ID21640)

pIS1-IMP-1 long-mut-let-7 (ID21642)

pIS2-HMGA2 3'UTR WT (ID14785)

pIS2-HMGA2 3'UTR M7 (ID14788)

2.1.6 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide für Klonierungen und RT-qPCR wurden von Microsynth AG bezogen. Die Sequenzen sind in Tab. 8 und 9 im Anhang zusammengefasst. *TaqMan® MicroRNA Assays* für RT-qPCR Analysen wurden von Applied Biosystems erworben und sind in Tab. 10 im Anhang aufgelistet.

2.1.7 SiRNAs und synthetische miRNAs

SiRNAs sowie synthetische miRNAs wurden von MWG hergestellt und deren Sequenzen sind in Tab. 11 im Anhang dargestellt.

2.1.8 Northern Blot Sonden

Dye-782-markierte DNA-Sonden zur Detektion von miR-let-7a-5p sowie der ribosomalen 5S-RNA wurden von MWG hergestellt. Die zur Generation der *Northern Blot* Sonden von IGF2BP1

respektive GAPDH verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von Microsynth AG bezogen. Alle Sequenzen wurden in Tab. 12 im Anhang zusammengefasst.

2.1.9 Systeme

DC Protein Assay (Biorad)

Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega)

Wizard SV Gel and Clean-Up System (Promega)

AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (50) (Qiagen)

QIAGEN Plasmid Midi Kit (100) (Qiagen)

Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Life Technologies)

Phusion® High-Fidelity PCR Kit (New England Biolabs)

RiboMAX™ Large Scale RNA Produktion System-T7 (Promega)

MEGAClear Transcription Clean-UP Kit (Thermo Fisher)

2.1.10 Standardbuffer

Phosphate buffered saline (0,01 M) (PBS)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

PBS-Tween (PBS-T)

0,01 M PBS

1% Tween-20

TRIS/ Acetate/ EDTA (TAE)

40 mM TRIS

20 mM Eisessig

1 mM EDTA

2.1.11 Geräte

SP5X Mikroskope (Leica)

TE-2000E Mikroskope (Nikon)

Infinite 200 PRO NanoQuant Spektrometer (TECAN)

GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega)

XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophoresesystem (Life Technologies)

HT7900 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Odyssey Infrared Imaging Systems (LI-COR Biosciences)

Stratalinker 2400 (Stratagene)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Techniken

2.2.1.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden in *Dublecco's modified Eagle's medium* (DMEM) versetzt mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX, Life Technologies) bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid kultiviert.

2.2.1.2 Zelltransfektionen

Zur Transfektion von siRNAs oder synthetischen miRNAs wurde RNAiMAX entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Für diese RNA-Interferenz (RNAi) Studien bzw. miRNA-Überexpressionen wurden 6×10^5 ES-2 Zellen pro Kavität einer 6-*well*-Platte eingesät und in Suspension mit 30 pmol siRNA respektive siRNA-*pool* (Zielgen- und Kontroll-siRNA) oder 100 pmol synthetische miRNA (miRNA und Kontroll-miRNA) mit 7 μ L RNAiMAX transfiziert und für 72 h kultiviert. Die Sequenzen der verwendeten siRNAs und synthetischen miRNAs sind in Tab. 11 im Anhang aufgelistet. Für die RNAi-*recovery*-Experimente der Zellphänotypischen Studien (siehe 3.2.2) wurden die stabilen miR-let-7-*Decoy*- bzw. Kontroll-*Decoy*-exprimierenden ES-2 Zellpopulationen analog transfiziert.

Für Luziferasereporter-Analysen wurden die entsprechenden Plasmide mit Lipfectamine2000 nach Herstellerangaben transfiziert (siehe 2.2.2.10).

2.2.1.3 Lentivirale Transduktion

Die Inhibierungen von miRNAs und die Überexpression von LIN28B in ES-2 Zellen erfolgten mittels lentiviraler Transduktion. Hierfür wurden einerseits *Tough Decoy* (*Decoy*, TuD), miRNA-Inhibitoren, in den pLVX-shRNA2 Vektor und andererseits die CDS von LIN28B in den pLVX-GFP-Vektor kloniert (siehe Tab. 13 im Anhang). Als Kontrollen dienten ein TuD-cel-miR-239b-5p-exprimierender sowie ein GFP-exprimierendes Virus. Die Produktion der lentiviralen Partikel erfolgte durch Transfektion von HEK293T-Zellen. Hierfür wurden 3×10^6 Zellen auf eine 10 cm Kulturschale ausgesät und nach 12 h mit 15 μ g pLVX-Plasmid, 10 μ g psPAX2 und 5 μ g pMD2G transfiziert. Die letzten beiden Plasmide waren für die Verpackung des Virus notwendig. Die DNA wurde mittels einer Calcium-Phosphat-Präzipitation in die Zellen eingebracht. Dabei wurde die DNA in 500 μ L bi-dest. Wasser verdünnt, mit 500 μ L 2xHBS aufgefüllt und Tropfenweise mit 50 μ L CaCl_2 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT wurde dieses Transfektionsgemisch auf die HEK293T-Zellen getropft. 12 h nach der Transfektion wurde das

Medium gewechselt. Der mit Viruspartikeln-angereicherte Überstand wurde nach 24 h und 48 h gesammelt und mittels des Lenti-X™ (Clontech) nach Herstellerangaben aufkonzentriert. Mit Hilfe einer Titrationsreihe wurde der Virustiter der aufkonzentrierten Lösung bestimmt. Dafür wurde 1×10^5 HEK293T-Zellen pro Kavität einer 12-*well*-Kulturplatte eingesät und in Suspension mit verschiedenen Volumina einer 1:10 verdünnten Lösung der aufkonzentrierten Viruspartikel transduziert. Nach 24 h wurde die Anzahl der fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt und daraus der Virustiter berechnet (Anzahl der transduzierten Zellen x ZsGreen-positive Zellen [%] x Verdünnungsfaktor).

Für die Transduktion der ES-2 Zellen wurde 1×10^5 Zellen pro Kavität einer 12-*well*-Kulturplatte ausgesät. Für die miRNA-Inhibierungsstudien wurden die Zellen in Suspension mit den miRNA-*Decoy*- respektive Kontroll-*Decoy*-exprimierenden Viruspartikel mit einer *Multiplicity of infection* (MOI) von 100 transduziert. Für die Überexpressionsanalysen von LIN28B wurden die Zellen mit einer MOI von 20 der GFP-LIN28B- respektive GFP-exprimierenden Viruspartikel transduziert. Nach 48 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf eine 10 cm Kulturschale überführt. Die Reinheit der transduzierten Zellen wurde anhand der *ZsGreen*- bzw. GFP-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie überprüft. In weiterführenden Analysen wurden nur Populationen mit mindestens 99 % *ZsGreen*- bzw. GFP-positiven Zellen verwendet. Die Funktionalität der miRNA-*Decoys* wurde vergleichend zur Kontrollpopulation mittels Luziferasereporter-Analysen (siehe 2.2.2.10) unter Verwendung von *antisense* miRNA-Reportern bemessen. Der Einfluss der LIN28B-Überexpression auf die miR-let-7-Expression wurde analog mit Luziferasereporter-Analysen und *Northern Blottings* (siehe 2.2.2.9) analysiert. Anschließend wurden mit diesen stabilen Zellpopulationen umfangreiche Expressionsanalysen und zellphänotypische Studien durchgeführt.

2x HEPES-buffered saline (HBS)

280 mM NaCl
10 mM KCl
1,5 mM Na_2HPO_4
12 mM Glukose
50 mM HEPES
pH 7,05

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Klonierung

Für die *Tough Decoy*-basierende Inhibierung von miRNAs, die LIN28B-Überexpression und für Luziferasereporter- und miTRAP-Analysen wurden verschiedene Konstrukte kloniert. Die generierten Plasmide sind in Tab. 13 im Anhang einschließlich des Ausgangsvektors, der Klonierungsstrategie und der Restriktionsschnittstellen zusammengefasst. Alle PCR-

amplifizierten Produkte wurden mittels DNA-Sequenzierungen durch MWG Biotech verifiziert.

MiRNA-*Decoys* sind Vektor-kodierte ~60 nt lange Haarnadel-förmige RNA-Strukturen, deren interne Schleife besitzt zwei perfekte miRNA-Bindestellen (Abb. 5) (Haraguchi et al., 2009). Diese miRNA-Bindestellen werden von 3 nt langen Linkersequenzen flankiert und von einem 18 bp (Basenpaar) langen *stem* respektive 26 bp langen *stem loop* Struktur stabilisiert. In Fällen, in denen *Decoys* von einem RNA-Polymerase III Promotor transkribiert werden, wird eine 3'-Überhang für den Transport ins Zytoplasma über Exportin V generiert. Im Zytoplasma fungieren *Decoys* als miRNA-Zieltranskripte, welche von miRNAs gebunden werden und folglich die Regulation von endogenen Ziel-mRNAs vermindern (Bak et al., 2013a). Für die Klonierung der *Decoy*-exprimierenden Vektoren wurden die *sense* und *antisense* Oligodesoxynukleotide in 2xPCR Mastermix hybridisiert und amplifiziert. Nach einer Gelelektion wurde dieses PCR-Fragment mit EcoRI/BamHI für 4 h verdaut, erneut gereinigt und in den pLVX-shRNA2 inseriert (Abb. 5). Alle verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tab. 8 im Anhang zu finden.

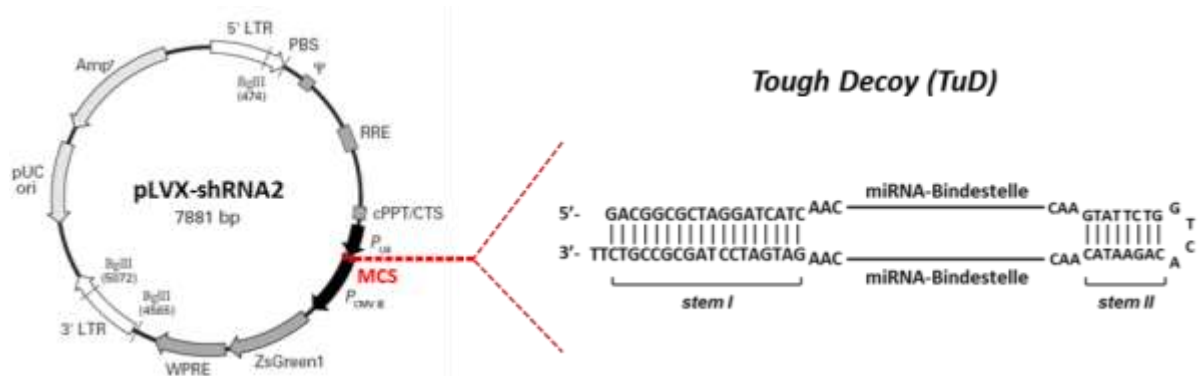


Abb.5: Klonierung des *Tough Decoy* miRNA-Inhibitor in den pLVX-shRNA2-Vektor. Plasmidkarte des pLVX-shRNA2 Vektors (links). In die *multiple cloning site* (MCS) dieses Plasmids wurde über BamHI/EcoRI ein *Tough Decoy* miRNA-Inhibitor (TuD; rechts) kloniert. Schematische Darstellung der TuD-Struktur (rechts) wurde modifiziert nach (Haraguchi et al., 2009).

Zur Überexpression des RNA-Bindeproteins LIN28B wurde die CDS aus HEK293A-cDNA mittels *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* amplifiziert, in Zero Blunt® inseriert und dann über MfeI in EcoRI und XhoI in Sall in pLVX-GFP subkloniert.

Für die Luziferasereporter-Analysen wurden 3'-UTR- und miRNA-*antisense* Reporter kloniert. Letztere enthielten eine vollständig komplementäre Bindesequenz der entsprechenden miRNA. Für deren Klonierung wurden die entsprechenden *sense* und *antisense* Oligodesoxynukleotide (siehe Tab. 8 im Anhang) für je 5 min bei 95 °C und 65 °C hybridisiert und über EcoRI/XhoI in den pmiR-GLO-MCS kloniert. Dieser wurde durch eine Subklonierung einer *multiple cloning site* (MCS) in den pmiR-GLO-Vektor (Promega) im Vorfeld von Juliane Braun generiert. Positive Klone wurden zunächst durch eine inserierte PspOMI-Schnittschnelle identifiziert und anschließend sequenziert.

Die Wildtyp (WT) und miR-let-7-inaktivierte (let-7 BS MUT; kurz MUT) IGF2BP1 3'-UTRs

wurden unter Verwendung des *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* von den Addgene-Konstrukten ID21640 und ID21642 amplifiziert. Nach der Klonierung in den Zero Blunt® Vektor wurden die PCR-Fragmente in den pmiR-GLO-MCS über NheI/BamHI subkloniert. Die WT und MUT HMGA2 3'-UTRs wurden von ID14785 bzw. ID14788 in pmiR-GLO-MCS über XbaI in NheI/NotI subkloniert. Die LIN28B 3'-UTR Konstrukte (WT und MUT) wurden von Dr. Marcell Lederer kloniert. Dabei wurde der WT LIN28B 3'-UTR aus HEK293A-cDNA mittels *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* amplifiziert, in Zero Blunt® inseriert und über NheI/XhoI in Sall in pmiR-GLO-MCS subkloniert. Der MUT LIN28B 3'-UTR wurde durch Fusions-PCRs mit Oligodesoxynukleotiden, welche die Mutationen enthielten, und dem *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* generiert. In allen verwendeten MUT 3'-UTRs beruht die Inaktivierung von miR-let-7 auf zwei Punktmutationen in der *seed*-Region jeder validierten (IGF2BP1, HMGA2) respektive *in silico* prognostizierten (LIN28B) miR-let-7-Bindestelle (Boyerinas et al., 2008; Mayr et al., 2007).

Zur Klonierung der miTRAP-Konstrukte wurden zwei MS2-Aptamere durch das *annealen* der MS2 *sense* und *antisense* Oligodesoxynukleotide generiert und über XhoI/PspOMI in den pcDNA3.1 Vektor kloniert. Die WT und MUT IGF2BP1 3'-UTRs wurden von ID21640 und ID21642 PCR-amplifiziert, in Zero Blunt® inseriert und abschließend in pcDNA3.1-MS2 über XbaI in NheI/XhoI subkloniert. Die Sequenzen der verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tab. 8 im Anhang zusammengefasst.

2.2.2.2 DNA Isolierung

Die Präparation von Plasmiden im kleinen und mittleren Maßstab erfolgte mittels des *AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (50)* bzw. des *Plasmid Midi Kit (100)* der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben.

2.2.2.3 RNA Isolierung

Die Gesamt-RNA aus Zellen wurde mittels TRIZOL und einer darauffolgenden Phenol-Chloroform Extraktion isoliert. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 mL TRIZOL pro 6-well von der Kulturschale lysiert. Nach der Überführung in ein Reaktionsgefäß wurden die Zelltrümmer durch eine Zentrifugation für 5 min bei 13000 x g und 4 °C pelletiert. Die RNA im Überstand wurde durch Zugabe von 200 µL Chloroform unter Vortexen extrahiert. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µL Isopropanol für 20 min bei RT gefällt. Die RNA wurde für 20 min bei 13000 x g und 4 °C pelletiert. Das RNA-Pellet wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem angemessenen Volumen an Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die Qualität und Konzentration der RNA wurde mittels des

Infinite 200 PRO NanoQuant Spektrometers (TECAN) bestimmt. Die isolierte RNA diente der cDNA-Synthese (siehe 2.2.2.4) oder wurde für *Northern Blot* Analysen (siehe 2.2.2.9) respektive *next generation sequencing* Analysen (siehe 2.2.2.6) verwendet.

TRIZOL

0,8 M Guanidiniumthiocyanat
 0,4 M Ammoniumthiocyanat
 0,1 M Natriumacetat pH 5,0
 5 % (w/v) Glycerol
 45 % Roti-Aqua-Phenol für RNA-Isolierung
 Nuklease-freies Wasser

2.2.2.4 Reverse Transkription (RT)

Für die quantitative *real time* Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) (siehe 2.2.2.5) wurde die entsprechende RNA zuvor in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die Analyse der mRNA wurden 2 µg Total-RNA standardmäßig mit 1 µL *random*-Hexameren (R6; 150 ng/µL) für 5 min bei 65 °C denaturiert und 5 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Mastermix, welcher die M-MLV Reverse Transkriptase (Promega) enthielt, dazugegeben. Die Hybridisierung der R6-*Primer* erfolgte für je 5 min bei 20 °C, 25 °C und 30 °C. Die RNA wurde dann 1 h bei 42 °C revers transkribiert. Die Reaktion wurde durch die Inaktivierung des Enzyms bei 72 °C für 15 min beendet.

Zur Untersuchung von IGF2BP1 3'-UTR assoziierten miRNAs in den miTRAP-Studien (siehe 2.2.2.8) wurden miRNAs der miTRAP-Eluat sowie der Input-RNA mit miRNA spezifischen RT-*Primern* der *TagMan MicroRNA Assays* (siehe Tab. 10; Applied Biosystems) unter Verwendung des *TaqMan Revers Transcription Kits* (Applied Biosystems) revers transkribiert. Hierfür wurden 4 µL des miTRAP-Eluates respektive 1 µL der Input-RNA, welche mit 3 µL Nuklease-freiem Wasser ergänzt wurde, mit 3 µL Mastermix und 8 µL RT-*Primer*-Mix versetzt. Letztere bestand aus je 2 µL 5xRT-*Primer* von vier ausgewählten miRNAs. Nachdem der Reaktionsansatz 5 min auf Eis inkubiert wurde, erfolgte die reverse Transkription für je 30 min bei 16 °C und 42 °C. Abschließend wurde die reverse Transkriptase bei 80 °C für 5 min inaktiviert.

Mastermix mRNA

4 µL 5xRT-Puffer
 1 µL dNTPs (10 mM)
 0,25 µL RNasin (25 U/µL)
 0,5 µL M-MLV RT (200 U/µL)

Mastermix miRNA

1,5 µL 10xRT-Puffer
 0,15 µL dNTPs (100mM)
 0,16 µL Nuklease-freies Wasser
 0,19 µL RNase Inhibitor (20 U/µL)
 1 µL MultiScribe RT (50 U/µL)

2.2.2.5 Quantitative *real time* PCR (RT-qPCR)

Die RT-qPCR wurde zur Bestimmung von von mRNA- und miRNA-Abundanzen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene RT-qPCR-Methoden, die *SYBR Green-I* und die *TaqMan*-Technologie, genutzt. Beide Varianten beruhen auf einer PCR kombiniert mit Fluoreszenzmessungen, wobei die Fluoreszenz während der PCR in Echtzeit detektiert wird. Die dabei emittierte Fluoreszenz ist der Menge an PCR-Produkt proportional und erlaubt somit Rückschlüsse auf die Abundanz des spezifischen Transkriptes.

Die *SYBR Green-I* Technologie wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich zur Bestimmung von mRNA-Expressionen verwendet. Der *SYBR Green-I* Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA, wobei das Fluoreszenzsignal zu der neu synthetisierten dsDNA proportional ist. Diese Methode benötigte zusätzlich Gen-spezifische Oligonukleotidepaare. Abschließend wurden zur Qualitätskontrolle des PCR-Amplikons Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Die Oligonukleotidepaare für die *SYBR Green-I* Technologie wurde mittels der *Primer-blast software* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) generiert. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, überspannten alle verwendeten *Primer* mit einer Amplikongröße von ca. 200 nt eine Exon-Exon-Grenze. Hinsichtlich der beiden Oligonukleotidepaare des IGF2BP1 3'-UTRs war dies jedoch nicht möglich. Für alle verwendeten *Primer* wurden im Vorfeld Wasser sowie noRT-Kontrollen durchgeführt und die Primereffizienzen überprüft, wobei nur Oligonukleotidepaare mit einer Effizienz von 90 - 100 % verwendet wurden.

Die *TaqMan*-Systeme enthalten neben zwei PCR-Primern eine Transkript-spezifische *TaqMan*-Sonde. Diese besitzt einen 5'-Fluoreszenzfarbstoff und einen 3'-Quencher, welcher aufgrund der räumlichen Nähe die Fluoreszenzemission unterdrückt. Nachdem die *TaqMan*-Sonde spezifisch mit der Ziel-RNA hybridisiert, wird diese während der Elongation durch die Exonuklease-Aktivität der PCR-Polymerase abgebaut. Dadurch wird die Fluoreszenzfarbstoff frei und die zunehmende Fluoreszenzintensität wird detektiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *TaqMan*-Technologie zur Bestimmung von miRNA-Abundanzen in den miTRAP-Experimenten verwendet (siehe 2.2.2.8).

Für die Messungen wurden der *SYBR® Select Master Mix* (Life Technologies) mit den entsprechenden *Primern* (siehe Tab. 9 im Anhang) bzw. der *TaqMan universal PCR Master Mix No AmpErase UNG* (Applied Biosystems) mit dem jeweiligen *TaqMan MicroRNA Assay* (siehe Tab. 10 im Anhang) versetzt. Diese Mastermixe wurden vorgelegt und die 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnte cDNA dazugegeben.

SYBR Green-I Mastermix

5 µL SYBR Select Mastermix
 0,02 µL je *sense Primer* (100 µM)
 0,02 µL je *antisense Primer* (100 µM)

TaqMan Mastermix

5 µL *TaqMan universal PCR Master Mix No AmpErase UNG*
 0,5 µL *TagMan Sonde*

Alle RT-qPCR Messungen wurden standardmäßig im Triplikate unter Verwendung des *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) im *384-well*-Format durchgeführt. Dabei wurden folgende PCR-Programme verwendet.

SYBR Green-I RT-qPCR-Programm:

UDP-Aktivierung	2 min bei 50 °C
Polymeraseaktivierung	2 min bei 95 °C
40 Zyklen:	
Denaturierung	15 s bei 95 °C
Hybridisierung	15 s bei 58 °C
Elongation	30 s bei 72 °C
Finale Elongation	60 s bei 60 °C
Schmelzkurve:	55 °C bis 95 °C

TaqMan Mastermix RT-qPCR-Programm:

Polymeraseaktivierung	10 min bei 95 °C
40 Zyklen:	
Denaturierung	15 s bei 95 °C
Hybridisierung/Elongation	60s bei 60 °C

Die Auswertung dieser Analysen erfolgten mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode respektive ΔC_t -Methode unter Verwendung der C_t -Werte (*threshold cycle*) (Livak and Schmittgen, 2001). Für die Berechnung der mRNA-Abundanz wurden die $\Delta\Delta C_t$ Methode verwendet. Hierfür wurden die ΔC_t -Werte des Zieltranskripts zweier Populationen (z.B. *knockdown* und Kontrolle) direkt unter Normalisierung auf ein internes Kontrolltranskript miteinander verglichen, wobei eine Primereffizienz von 100 % angenommen wurde. Standardmäßig dienten Vinculin (VCL) oder α 4-Tubulin (TUBA4A) respektive Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrollgene.

Die folgende Formel wurde für die $\Delta\Delta C_t$ -Berechnung verwendet:

$$\text{rel. mRNA-Menge} = 2^{-((ZZ - ZK) - (KZ - KK))}$$

ZZ – C_t des Zieltranskripts der Zielpopulation

ZK – C_t des Zieltranskripts der Kontrollpopulation

KZ – C_t des Kontrolltranskripts der Zielpopulation

KK - C_t des Kontrolltranskripts der Kontrollpopulation

Die miRNA-Anreicherungen in den miTRAP-Experimenten wurden mittels der ΔC_t -Methode bestimmt. Hierbei wurde die ΔC_t -Werte der miRNA des miTRAP-Eluates und des Inputs unter

Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde die Expression des langen IGF2BP1 3'-UTRs normalisiert zur gesamten IGF2BP1-mRNA Menge unter Verwendung der ΔC_t -Methode berechnet.

Die folgende Formel wurde für die ΔC_t -Berechnung verwendet:

$$\text{miRNA-Anreicherung} = 2^{-(MM - MI)}$$

MM – C_t der miRNA im miTRAP-Eluat respektive C_t der langen IGF2BP1-Isoform
MI – C_t der miRNA im Input respektive C_t gesamte IGF2BP1-Menge

2.2.2.6 Next generation sequencing Analysen

Die im Rahmen dieser Studien durchgeführten *next generation sequencing* (NGS) Analysen von miRNAs und Total RNA (*mRNA Sequencing*) wurden durch die *Core Unit* DNA-Technologien des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) der Universität Leipzig angefertigt. Die Durchführungen dieser Analysen sind in den folgenden Abschnitten zusammengefasst. Die statistische Auswertung der NGS-Daten erfolgte von Danny Misiak (AG Hüttelmaier, Universität Halle-Wittenberg).

Zur Identifizierung von IGF2BP1 3'-UTR assoziierenden miRNAs (siehe 2.2.2.8) bzw. von herunterregulierten miRNAs infolge des DCR1-*knockouts* oder *knockdowns* (siehe 3.1.4) wurden *small RNA Sequencing* Analysen durchgeführt. Dafür wurden aus den miTRAP-Eluaten (7 μ L) sowie der Input RNA (1 μ L) respektive aus der TRIZOL-gereinigten Total-RNA (500 ng) der DCR1-Analysen mittels des *TruSeqTM Small RNA Sample Prep Kit v2* (Illumina) entsprechend den Herstellerangaben spezifisch markierte Sequenzierbibliotheken generiert. Dabei wurden kleine RNAs (*small RNAs*) einschließlich miRNAs 5' und 3' spezifisch mit RNA-Adaptoren versehen. Der 3'-RNA-Adapter ligierte spezifisch mit dem 3'-Hydroxalende dieser kleinen RNAs, welches durch die Prozessierung von DCR1 oder anderen RNA-Prozessierungsenzymen entstand. Diese Adapterkonstrukte wurden revers transkribiert, amplifiziert, mit einem Barcode markiert und über eine Agarosegelelektrophorese auf eine Länge von 140 - 165 bp begrenzt. Dadurch umfasste die generierte Sequenzierbibliothek ausschließlich kleine RNAs mit einer Länge von 22 - 30 nt. Für die *Cluster*-Generierung wurde ein Gemisch aus maximal 10 Bibliotheken auf eine Spur des „Sequenzierchips“ (*Flow Cell*) unter Verwendung des *cBot* (Illumina) geladen. Die Sequenzierung von 50 bp erfolgte mittels des *HighScan-SQ sequencer* (Illumina) nach Herstellerangaben. Die sequenzierten miRNA-Fragmente der DCR1-*knockout* bzw. -*knockdown* Proben wurden mittels des *bowtie2 aligner* gegen die murinen (*knockout*) bzw. humanen (*knockdown*) miRNA-Sequenzen der Datenbank *miRBase v20 alignet*. Die sequenzierten miRNA-Fragmente der miTRAP-Proben wurden mittels des *Bowtie aligner* gegen die humanen miRNA-

Sequenzen von *miRBase v19 alignet*. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *edgeR software package*. Dabei wurden die NGS-Daten mittels der *weighted trimmed mean of M-values (TMM)* Methode normalisiert (Robinson and Oshlack, 2010). Diese Methode ermöglicht den Vergleich von Sequenzierbibliotheken mit abweichenden Größen oder Sequenziertiefen, wobei diese Verfahren bis zu einer Abweichung von 30 % verifiziert wurde (Robinson and Oshlack, 2010). Dabei werden die originalen Bibliotheksgrößen mit einem Skalierungsfaktor multipliziert, wodurch eine „effektive“ Bibliotheksgröße generiert wird. Auf Basis der TMM-normalisierten miRNA-Fragmente werden „pseudo“ *counts per million (CPM)* kalkuliert, welche für die Testung der differentiellen Expression respektive selektive Kopräzipitation von miRNAs in einem Poisson-Exakt-Test verwendet wurden. Differenziell herunter regulierte respektive spezifische kopräzipitierte miRNAs wiesen ein Signifikanzniveau (der *false discovery rate (FDR)*) von <0,05 auf.

Für die *mRNA Sequencing* Analysen der *mir-let-7-Decoy-* respektive Kontroll-*Decoy-* exprimierenden Zellen (siehe 3.3.1) wurden aus der TRIZOL-gereinigter Total-RNA (500 ng) dieser Zellen wie folgt Sequenzierbibliotheken generiert. Zunächst wurde die ribosomale RNA mittels des *RiboZero Gold kit* (Epicentre) nach Herstellerangaben abgereichert. Die RNA wurde durch Zugabe von 5x Fragmentierungsbuffer (200 mM Tris-Acetat, pH 8,2, 500 mM Kaliumacetat, 150 mM Magnesiumacetat) bei 94 °C für 3 min im Thermocycler fragmentiert und anschließend mittels Ethanol, Ammoniumacetat und *GlycoBlue* (Life Technologies) präzipitiert. Die fragmentierte RNA wurde mittels *R6-Primern* und Superscript III Transkriptase (Life Technologies) revers transkribiert. Die Zweitstrangsynthese erfolgte mittels des *TargetAmp Kit* (Epicentre) nach Herstellerangaben. Die letzten Schritte der Präparation der Sequenzierbibliotheken einschließlich die Adapterligation und Amplifikation erfolgten nach dem *Cold Spring Harbour* Protokoll von Meyer und Kircher (Meyer and Kircher, 2010). Die markierten Bibliotheken wurden mittels des *Library Quantification Kit* (KAPA Biosystems) nach Herstellerangaben gereinigt. Ein Gemisch aus maximal 10 Bibliotheken wurde für die *Cluster-*Generierung mittels des *cBot* (Illumina) verwendet. Die Sequenzierung von 2x100 bp erfolgte mittels des *HighScan-SQ sequencer* (Illumina) nach Herstellerangaben. Nachdem die sequenzierten Fragmente mittels TopHat2 annotiert, gegen das humane Genom (H19) *alignet* wurden, erfolgte auf den TMM-normalisierten *reads* die Berechnung der differentiell herauf regulierten mRNAs mit einer FDR<0,05 unter Verwendung des *edgeR software package*.

2.2.2.7 SDS-Page und Western Blot Analysen

Die Abundanz zellulärer Proteine wurde mittels *Western Blot* Analysen bestimmt. Nachdem das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurden diese mit Trypsin von der Zellkulturplatte gelöst. Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und

durch eine Zentrifugation bei 5000 x g für 2 min pelletiert. Die Proteinextraktion erfolgte mit RIPA Puffer versetzt mit Protease-Inhibitor-Cocktail (1:200, Sigma Aldrich). Dabei wurde das Zellpellet in einem angepassten Volumen des RIPA Puffers resuspendiert und für 15 min auf Eis lysiert. Zelltrümmer wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000 x g und 4 °C entfernt. Die Proteinkonzentration wurde mittels des *DC Protein Assay* (Biorad) in Gegenwart einer BSA-Standardreihe ermittelt. In Abhängigkeit der Proteinabundanz wurden 10 bis 30 µg des Totalproteinextrakts durch Zugabe des *4xNuPAGE® LDS Sample Buffer* (Life Technologies) für die Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) vorbereitet. Die SDS-Page erfolgte mit einem *NuPAGE® Novex 4 - 12 % Bis-Tris Gel* (Life Technologies) und *NuPAGE® MOPS SDS* (Life Technologies) Laufpuffer. Für den Transfer der Proteine auf eine *Hybond-ECL Nitrocellulosemembran* (GE Healthcare) wurde das *XCell SureLock™ Mini-Cell* Elektrophoresesystem (Life Technologies) verwendet. Letzteres erfolgte nach dem *wet-*Verfahren mit *NuPAGE Transfer* Puffer versetzt mit 10 % Methanol. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit Ponceau-S Lösung gefärbt. Danach wurden unspezifische Antikörper-Bindungen durch eine Inkubition mit 10 % (w/v) Magermilch/ PBS-T für 1 h blockiert. Die Membran wurde mit primären Antikörpern (siehe Tab. 7) in 5 % (w/v) Magermilch/ PBS-T bei 4 °C für 1 h unter ständiger Agitation inkubiert. Nachdem die Membran mit PBS-T gewaschen wurde, wurde diese für 1 h mit IRDye-markierten sekundären Antikörpern (siehe Tab. 2) in 5 % (w/v) Magermilch/ PBS-T Lösung bei RT inkubiert. Die Detektion der Fluorophor-gekoppelten Sekundäntikörper erfolgt unter Verwendung des *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences) bei 680 nm oder 800 nm. Die Quantifikation der Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe der *Image Studio Lite* Software (LI-COR Biosciences). Die quantifizierten Proteinmengen wurden relativ zur Kontrollpopulation und zu den internen Ladekontrollen VCL respektive Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

RIPA Puffer

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 % NP-40
1 % DOC

NuPAGE Puffer

50 mM TRIS (pH 8,5)
40 mM Glycin
0,04 % SDS

Ponceau-S Lösung

0,1 % (w/v) Ponceau S
5 % Essigsäure

2.2.2.8 MiTRAP Verfahren

Zur Identifizierung von IGF2BP1 3'-UTR-assoziierenden miRNAs wurde das *miRNA trapping by RNA in vitro affinity purification* (miTRAP) Verfahren verwendet (Braun et al., 2014). Dabei wurde der Wildtyp IGF2BP1 3'-UTR, welcher mit einem MS2-Apatamer am 3'-Ende fusioniert war, als Köder-RNA verwendet. Diese Köder-RNA besaß keine 5'-Cap-Struktur und keinen Poly(A)-Schwanz. Als Spezifitätskontrolle diente eine miR-let-7-inaktivierte 3'-UTR von IGF2BP1.

Zusätzlich wurde eine mit der MCS des Vektors fusionierte MS2-RNA als Hintergrundkontrolle verwendet. Die Klonierung dieser Konstrukte erfolgte wie in 2.2.2.1 beschrieben. Die *in vitro* Transkription der Köder-RNAs wurde mittels des *RiboMAX Large Scale RNA Production System T7* (Promega) auf linearisierten Plasmiden durchgeführt. Dafür wurden 20 µg Plasmid in einem 100 µL Ansatz mit 10 µL BclI über Nacht verdaut und anschließend mittels des *Wizard SV Gel and Clean-Up System* (Promega) gereinigt. Die *in vitro* transkribierten RNAs wurden mittels des *MEGAclean Transcription Clean-Up Kits* (Ambion) gereinigt.

Für die Affinitätsreinigung wurden 30 µL Amylose Resin Matrix (NEB) viermal mit *binding buffer* (BB) gewaschen und mit 100 pmol rekombinant hergestelltem MBP-MS2BP in 1 mL BB für 1 h inkubiert. Nach einem 30-minütigen Blocken mit BSA (25 µg/mL) in 1 mL BB wurde die Matrix einmal mit BB gewaschen. Dann wurden die *in vitro* transkribierten RNAs (40 pmol der WT-, MUT- bzw. 2,5 pmol der MS2-RNA) durch eine einstündige Inkubation in 1 mL BB versetzt mit 11 µg/mL Heparin (Sigma Aldrich) an die MS2BP-MBP-gekoppelte Matrix immobilisiert. Während dessen wurden pro Bedingung 5×10^6 Zellen, welche 48 h zuvor auf 15 cm Kulturschalen ausgesät wurden, in 500 µL BB versetzt mit Protease-Inhibitor-Cocktail (1:200) auf Eis lysiert und anschließend durch eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 13000 x g geklärt. Nachdem die RNA-gekoppelte Matrix dreimal mit Heparin-versetztem BB gewaschen wurde, wurde diese mit 500 µL Zellextrakt ergänzt mit 500 µL BB, 11 µg/mL Heparin, 1 mM Dithiothreitol und 400 U/mL RNasin (Promega) für 30 min inkubiert. Abschließend wurde die Matrix viermal mit Heparin-versetztem BB gewaschen. Alle Schritte wurden unter RT und einer ständigen Agitation auf einem Drehrad durchgeführt.

Für RNA-Anwendungen wurden die Protein-miRNA-Assoziationen respektive die Köder-RNAs durch eine zweimalige Inkubation mit 150 µL BB versetzt mit 15 mM Maltose eluiert. Die RNA wurde durch eine Phenol-Chloroform Extraktion isoliert. Hierfür wurden die 280 µL Maltose-Eluat mit 80 µL Wasser, 80 µL Ammoniumacetatlösung (5 M; Sigma Aldrich) und 400 µL Phenol-Chloroform (5:1, pH 4.5; Sigma Aldrich) versetzt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation (13000 x g, 4 °C) wurden 370 µL der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 mL Ethanol und 2 µg Glycogen (Roche) überführt. Die gefällte RNA wurde pelletiert und das RNA-Pellet in 9 µL Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die Input-RNA wurde aus 200 µL Zelllysat nach einer Proteinase K Behandlung (20 mg/mL; Life Technologies) analog Phenol-Chloroform extrahiert. Die Input-RNA wurde in 32 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die Integrität der Köder-RNAs wurde in Gegenwart einer Standardkurve auf einem siebenprozentigen TBE-Harnstoff-Polyacrylamidgel überprüft (siehe 2.2.2.9). Hierfür wurde ein Drittel des miTRAP-Eluates mit 2x Ladepuffer versetzt, für 10 min bei 65 °C denaturiert und elektrophoretisch mit 0,5x TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Als Größenstandards dienten der *ssRNA Ladder* (NEB) und der *Low Range ssRNA Ladder* (NEB). Die RNAs wurde mittels des fluoreszierenden Nukleinsäure-

interkalierenden Farbstoff *Syto60* (Life Technologies) angefärbt. Die Detektion erfolgte mittels des *Odyssey Infrared Imaging Systems* bei 680 nm. Die Quantifikation der Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe der *Image Studio Lite Software*.

Die Identifizierung von assoziierten miRNAs erfolgte durch RT-qPCR (siehe 2.2.2.5) respektive *next generation sequencing* (siehe 2.2.2.6).

Für die Proteinanalyse wurde die Matrix mit 25 µL SDS *1xNuPAGE® LDS Sample Buffer* (Life Technologies) versetzt mit 10 % β-Mercatoethanol für 10 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden 20 µL dieses Probenauftragungspuffers abgenommen und in *Western Blot* Analysen untersucht (siehe 2.2.2.7).

BB-Puffer:

20 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
1,5 mM MgCl₂
8,6 % Glycerin
0,05 % NP40

2.2.2.9 Northern Blot Analysen

Die *Northern Blot* Analysen zum Nachweis der IGF2BP1-mRNA Isoformen und der GAPDH-mRNA, welche als Ladungskontrolle diente, wurden nach dem *Cold Spring Harbour* Protokoll von Sambrook et al. durchgeführt (Sambrook and Russell, 2006). Dafür wurde aus der TRIZOL-gereinigten Total-RNA von HEK293A- und MCF-7-Zellen die polyadenylierte RNA mittels des *Oligotex Direct mRNA Kits* (Qiagen) isoliert. 3 µg der poly(A)⁺RNA wurden mit 10 µL Glyoxol-Mix für 1 h bei 55 °C inkubiert und danach 10 min auf Eis gelagert. Nachdem die Proben mit 2 µL Ladepuffer versetzt wurden, wurde die RNA auf einem einprozentigen TAE-Agarosegel (*GTG SeaKem* Agarose; Lonza) für 4 h bei 4 °C mit 1x BPTe-Laufpuffer aufgetrennt. Als Marker diente der *DynaMarker Prestain Marker for RNA High* (Biodynamics). Anschließend wurde die RNA durch Kapillarkräfte unter Verwendung des *Whatman™ Turboblotter™ Transfer System* (GE Healthcare) mit 20x SSC über Nacht auf eine Nylonmembran (GE Healthcare) transferiert. Die Membran wurde dann 5 min mit 2x SSC gewaschen und 25 min mit 20 mM Tris HCL (pH 8,0) inkubiert, um die Glyoxal-Reaktion zu stoppen. Nachdem *UV crosslinking* (1000J; Stratagene) wurde die Membran mit *ULTRAhyb*-Hybridisierungsbuffer (Life Technologies) für 1 h in einem Glasröhrchen unter ständiger Rotation inkubiert. Die ³²P-markierten DNA-Sonden von IGF2BP1 und GAPDH wurden mittels des *Amersham™ Megaprime DNA Labeling kit* (GE Healthcare) generiert. Die dafür verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tab. 12 im Anhang aufgelistet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C unter ständiger Rotation. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Christiane Rammelt (AG Wahle, Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen wurde der *Northern Blot* auf einem

Storm 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics) detektiert und die Bandenintensität mittels der *ImagingQuant 5.2 Software* quantifiziert.

Zur Detektion von miR-let-7a-5p und der als Ladungskontrolle dienenden 5S rRNA während der *Northern Blot* Analyse wurden 4 µg TRIZOL-gereinigter Total-RNA mittels einem 15% denaturierenden TBE-Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und danach auf eine Nylon-Membran (Roche) transferiert. Für die Gelelektrophorese und den RNA-Transfer wurde das *XCell SureLock™ Mini-Cell* Elektrophoresesystem verwendet. Als Größenstandard diente *DynaMarker Prestain Marker for Small RNA Plus* (Biodynamics). Nach dem *UV-crosslinking* wurde die Membran mit *PerfectHyb Plus* Hybridisierungspuffer (Sigma-Aldrich) inkubiert. Die Dye-782-markierten DNA-Sonden (siehe Tab. 12 im Anhang) wurde im Hybridisierungsbuffer auf 100 ng/µL verdünnt und bei 30 °C für 2 h hybridisiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Detektion des *Northern Blots* mittels des *Odyssey Infrared Imaging Systems* bei 800 nm. Die Bandenintensitäten wurden mit Hilfe der *Image Studio Lite Software* quantifiziert.

Glyoxal-Mix

6 mL DMSO
2 mL deionisiertes Glyoxal
0,6 mL 80 % Glycerol in H₂O
0,2 mL Ethidiumbromid (10 mg/mL in H₂O)
1,2 mL 10x BPTE

10x BPTE

100 mM PIPES
300 mM Bis-Tris
10 mM EDTA
pH 6,5

2x Ladebuffer

95 % deionisiertes Formamid
0,025 (w/v) Bromphenolblau
0,025 (w/v) Xylencyanol
5 mM EDTA (pH 8,0)
0,025 (w/v) SDS

5x TBE

0,45 M Tris
0,45 M Borsäure
10 mM EDTA

20x SSC

3 M NaCl
300 mM Natriumcitrat
pH 7,0

Waschpuffer 1

100 mL 20X SSC
10 mL 10 % SDS
890 mL steriles Wasser

Waschpuffer 2

5 mL 20X SSC
10 mL 10 % SDS
985 mL steriles Wasser

2.2.2.10 Luziferasereporter-Assays

MiRNAs inhibieren die Genexpression ihrer Zieltranskripte über spezifische *cis*-regulatorische Elemente, sogenannte miRNA-Bindestellen, im 3'-UTR der mRNA. Um miRNA-Effekte quantitativ zu bewerten, wurden Luziferasereporter-Analysen unter Verwendung des pmirGLO *Dual-Luciferase miRNA Target Expression* Vektors (Promega) durchgeführt. Dieser Vektor kodierte zum einen für eine *Firefly* Luziferase (FFL), welche als primäres Reportergen diente, und zum anderen für eine *Renilla* Luziferase (RL), die zur internen Normalsierung eingesetzt wird. Für

diese Analysen wurden einerseits Luziferasereporter verwendet, welche 3' des FFL-Repotergens den Wildtyp (WT) respektive den miR-let-7-inaktivierten 3'-UTR (MUT) von IGF2BP1, HMGA2 oder LIN28B enthielten. Andererseits wurden miRNA-*antisense* Luziferasereporter benutzt. Diese kodierten eine perfekte miRNA-Bindestelle von miR-let-7-a, -7d, -7i-5p, miR-17-5p, miR-196a-5p oder miR-24-3p. Das MCS-kodierende Leerplasmid diente als Kontroll-Luziferasevektor. Die Klonierungen dieser Konstrukte erfolgten wie in 2.2.2.1 beschrieben und sind in Tab. 13 im Anhang zusammengefasst.

Für die Luziferasereporter-Assays wurden 1×10^5 ES-2 Zellen respektive stabil *Decoy*-exprimierenden (TuD-miR-let-7 und miR-Kontrolle) oder LIN28B/GFP-überexprimierende ES-2 Zellen sowie MEFs (DCR1-/- und WT) pro Kavität einer 24-*well*-Kulturplatte in Suspension mit 100 ng miRGLO-Plasmid mittels 1 μ L Lipofectamine2000 nach Herstellerangaben transfiziert. Für die RNAi-Analysen respektive miRNA-Überexpressionsstudien wurden die ES-2 Zellen ausgezählt und 1×10^5 Zellen pro 24-*well* analog in Suspension mit 100 ng Reporterplasmid und 10 pmol siRNA (siDCR1 und Kontrolle-siRNA) respektive 30 pmol synthetische miRNA (miRNA und Kontroll-miRNA) mit 1 μ L Lipofectamine2000 kotransfiziert. Die Luziferaseaktivitäten wurden 48 h nach der Transfektion mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Auswertung wurde die FFL-Aktivität zur RL-Aktivität normalisiert, wodurch sich ein Luziferaseverhältnis (FFL/RL) ergab. Dieses Verhältnis wurde zur jeweiligen Kontrollpopulation normalisiert und ist als relative Luziferaseaktivität gekennzeichnet.

2.2.3 Zellphänotypische Analysen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden diverse zellphänotypische Analysen mit ES-2 Zellen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden einerseits stabil miR-let-7-*Decoy*- und miR-Kontroll-*Decoy*-exprimierende Zellen verwendet. Andererseits wurden weitere Zellpopulationen generiert, indem die miR-let-7-*Decoy*-Zellen mit siRNA-Pools gerichtet gegen IGF2BP1, LIN28B oder HMGA2 und einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Die nicht transfizierten sowie mit siRNAs transfizierten miR-let-7-*Decoy*- und miR-Kontroll-*Decoy*-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion in die jeweiligen Kavitäten eingesät (siehe 2.2.3.1 bis 2.2.3.7). In den folgenden Kapiteln werden alle Zellpopulationen, wenn nicht anders erwähnt, unter der Bezeichnung ES-2 Zellen zusammengefasst.

2.2.3.1 2D-Proliferationsanalysen/ Durchflusszytometrie

Zur Bemessung der Zellproliferation im 2 dimensionalen (2D) Zellkultursystem wurden 5×10^4 ES-2 Zellen pro Kavität einer 24-*well*-Kulturplatte ausgesät. Nach 72 h wurde einerseits die

Zellvitalität mit dem *CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assays* (siehe 2.2.3.5) entsprechend den Herstellerangaben analysiert. Andererseits wurde die Zellzahl mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für diese Analysen wurden das Zellkulturmedium abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Trypsinierung separiert. Letzteres wurde durch Zugabe des abgenommenen Zellkulturmediums gestoppt und die Zellen darin resuspendiert. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 4000 x g wurden die Zellen in 1 mL EDTA-versetztem PBS resuspendiert. Danach wurde die Lebendzellzahl mittels des Durchflusszytometers MACSQuant[®] (Miltenyi Biotec) ermittelt. Die Anzahl an toten Zellen wurde durch eine Propidiumiodid-Färbung gleichzeitig bestimmt.

2.2.3.2 3D-Sphäroidwachstumsanalyse

Für die Analyse des Sphäroidwachstums im 3D-Zellkultursystem wurde der *Cultrex[®] 3-D Spheroid Growth Assay* (Trevigen) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden 3×10^3 ES-2 Zellen pro 96-well einer poly-Hydroxyethylmethacrylat (poly-HEMA) beschichteten Rundbodenplatte (Corning) (*ultra low attachment*) in 100 μ L FBS/ GlutaMAX-haltigem DMEM, welches mit dem *spheroid formation buffer* supplementiert wurde, eingesät. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 300 x g im entsprechenden Puffer, wurde die Formierung von Zellsphäroiden forciert. Nach einer Inkubation von 72 h wurde das Wachstum der Tumorzellsphäroide mittels Durchlichtmikroskopie unter Verwendung eines TE-2000-E-Mikroskops (Nikon) mit einer 4-fachen Vergrößerung innerhalb einer *Live-Kammer* dokumentiert. Die Fläche der dokumentierten Tumorzellsphäroide wurde automatisch mittels des NIS-Elements Software *measurement tool* (Nikon) ermittelt. Ergänzend dazu wurde die Zellvitalität mittels des *CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assays* nach Herstellerangaben bestimmt (siehe 2.2.3.5).

2.2.3.3 Colony formation assay

Um das Adhäsions-unabhängige Wachstum der stabilen miR-let-7-*Decoy*- und miR-Kontroll-*Decoy*-exprimierenden ES-2 Zellen zu untersuchen, wurden *colony formation assays* durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine 3,3 % und 5,0 % Agarosesuspension aus *SeaPlaque[™]* Agarose (Lonza) und PBS hergestellt. Zur Vorbereitung der Kavitäten wurde die 5,0 % Agaroselösung unter Wärmeeinwirkung mit FBS/GlutaMAX-haltigem DMEM auf 0,5 % verdünnt. Um das Absetzen der Zellen auf dem Gefäßboden zu vermeiden, wurden die Kavitäten einer 12-well-Zellkulturplatte mit je 1 mL der 0,5 % Agarosesuspension beschichtet und die Agarose über Nacht bei 4 °C verfestigt. Danach wurden 1×10^3 ES-2 Zellen in 900 μ L Zellkulturmedium mit 100 μ L der erwärmten 3,3 % Agaroselösung vermischt. Diese Agarose-Zell-Suspension wurde auf die beschichtete Kavität einer 12-well-Zellkulturplatte gegeben. Zur Verfestigung wurde diese für

5 min bei 4 °C inkubiert und jede Kavität danach mit 0,5 mL FBS/ GlutaMAX-haltigem DMEM überschichtet. Nach einer 14-tägigen Kultivierung bei 37 °C wurde die Zellvitalität mittels Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) überprüft. Dafür wurde jedes 12-well mit je 100 µL einer 5 mg/mL MTT-Lösung (in PBS) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Dokumentation der gesamten Zellkulturplatte erfolgte mittels des Scanjet G4010 Fotoscanners (HP). Die Anzahl und die Fläche der MTT-gefärbten Zellkolonien wurden mittels der *SoftAgarPipeline* Software ermittelt. Dabei wurden nur Zellkolonien mit einer Mindestgröße von $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ berücksichtigt.

2.2.3.4 Bemessung der Anoikis-Resistenz

Um die Anoikis-Resistenz respektive das Selbsterneuerungspotenzial zu bemessen, wurden 1×10^3 ES-2 Zellen pro 96-well einer *ultra low attachment* Zellkulturplatte mit flachen Boden (Corning) in 100 µL GlutaMAX-haltigem DMEM ohne FBS eingesät und 5 Tage kultiviert. Danach wurden die Zellaggregate mittels Durchlichtmikroskopie unter Verwendung eines TE-2000-E-Mikroskops (Nikon) mit einer 4-fachen Vergrößerung dokumentiert. Zusätzlich wurde die Zellvitalität mittels des *CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assays* nach Herstellerangaben bestimmt (siehe 2.2.3.5).

2.2.3.5 Bestimmung der Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der *CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurde die Zellvitalität anhand des intrazellulären ATP-Spiegels von lebenden Zellen bemessen. Diese Methode beruht auf der Umsetzung von Luciferin in Gegenwart von ATP, Mg^{2+} und molekularem Sauerstoff zu Oxyluciferin und AMP, Pyrophosphat, CO_2 und Licht. Diese Oxygenierung wird von der Luziferase katalysiert. Das emittierte Licht, das mittels des *GloMAX[®] Luminometers* (Promega) detektiert wurde, ist der verfügbaren ATP-Menge der metabolisch aktiven Zellen direkt proportional.

2.2.3.6 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Untersuchung der Zellmorphologie, der Organisation des filamentären (F)-Aktin-Zytoskeletts sowie der Lokalisierung von β -Catenin (CTNNB1) wurden Immunfärbungen durchgeführt und diese mikroskopisch dokumentiert. Dafür wurden die ES-2 Zellen adhärent wachsend auf angeätzten Deckgläschen für 48 h kultiviert. Dann wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und 20 min mit einer vierprozentigen Paraformaldehyd (PFA) Lösung fixiert. Die fixierten Zellen wurden durch eine Inkubation mit 0,5 % Triton X-100 in PBS für 5 min permeabilisiert. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch eine 1 % BSA/PBS Lösung für 1 h blockiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit

dem primären CTNNB1-Antikörper verdünnt in einer 1 % BSA/PBS-Lösung für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die einstündige Inkubation mit dem AlexaFluor-gekoppelten sekundären Antikörper (Alexa-488) in 1 % BSA/PBS. Durch gleichzeitige Inkubation mit TRITC-gekoppelten Phalloidin (Sigma Aldrich, 1:500 Verdünnung) wurde das F-Aktin-Zytoskelett visualisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die DNA mittels DAPI (1:5000 in H₂O) für 5 min angefärbt. Die Zellen wurden zweimal mit dest. Wasser gewaschen, mit 80 % Ethanol dehydratisiert und mittels *mounting medium* (IBIDI) auf Objektträgern fixiert. Die gesamte Immunfärbung wurde bei RT durchgeführt. Die Bilderfassung wurde mittels des SP5X konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Leica) unter Verwendung eines 63x PlanApo-Objektivs durchgeführt. Die sequentielle Bildaufnahme erfolgte nach Anregung durch den Weißlichtlaser (Anregungswellenlänge: 555 nm (Phalloidin-TRITC); 488 nm (Maus Alexa-488)) sowie einer Diode (Anregungswellenlänge: 405 nm (DAPI)) und die Detektion über Hybrid-Detektoren unter Standardeinstellungen.

2.2.3.7 2D- und 3D-Zellmigrationsanalysen

Das Migrationsverhalten der ES-2 Zellen wurde im 2D- und 3D-Zellkultursystem auf Einzelzellniveau mikroskopisch verfolgt und analysiert. Für die 2D-Migrationsanalysen wurden 1×10^3 Zellen in 300 μL Zellkulturmedium pro 8-well eines Kollagen I-beschichteten Kammerobjektträgers (IBIDI) ausgesät. Zur Beschichtung des Objektträgers wurde dieser zuvor mit einer 1 mg/mL Kollagen I-Lösung (Merck Millipore) bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Für die 3D-Migrationsanalysen wurden die Zellen in 50 μL eines 3D-Kollagengels mit einer Endkonzentration von 4 mg/mL eingebettet. Dafür wurden 40 μL einer 5 mg/mL Kollagen I-Lösung mit 10 μL Kulturmedium versetzt und mit 0,5 μL einer 1 M NaOH-Lösung neutralisiert. 1×10^4 Zellen wurden in einem Volumen von 5 μL Zellkulturmedium in die Matrix eingesät. Dieses 3D-Gel wurde in eine Kavität des 8-well-Kammerobjektträgers (IBIDI) gegeben und für 1 h bei 37 °C geliert. Dann wurden die in die Matrix eingebetteten Zellen mit 100 μL Zellkulturmedium überschichtet. Nachdem sich die Zellen in der 2D- und 3D-Kavität über Nacht bei 37 °C ausgebreitet hatten, wurde das Migrationsverhalten über 10 h mittels Zeitraffer-Analysen auf Basis der *ZsGreen*-Fluoreszenz verfolgt. Dafür wurde das SP5X konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (Leica) unter Verwendung der Ludin-Cube Klimakammer und des 20x Trockenobjektivs benutzt. Nach Anregung mit einem Weißlichtlaser (Anregungswellenlänge des *ZsGreen*: 496 nm) wurden z-Stapel (2D $\sim 10 \mu\text{m}$; 3D $\sim 50 \mu\text{m}$) mit Hilfe der Hybrid-Detektoren für 5 bzw. 10 min (2D) und 10 h (3D) unter Verwendung des *“Mark and Find” Multipositionings* aufgenommen. Die automatische Auswertung des Bildmaterials bezüglich der Migrationsgeschwindigkeit erfolgte mittels *„CellMigrationAnalyzer-tool“* (<http://www2.informatik.uni-halle.de/agprbio/mitobo/>) des *MiToBo package* von

ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) basierend auf Maximalprojektionen. Hierbei wurden die Zellen durch ein lokal angewendetes Schwellwertverfahren im Bild segmentiert und der Mittelpunkt dieser Zellen über die Zeit verfolgt. Die mittlere Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{min}$] wurde aus der durchschnittliche Strecke einer Zelle pro Minute berechnet, wobei pro Bedingung in einer Dreifachbestimmung zwischen 50 - 100 Zellen analysiert wurden. Dabei wurden nur Zellen in die Analyse einbezogen, welche mindestens 2 h verfolgt wurden. Zur Darstellung von repräsentativen Trajektorien wurden die Bewegungspfade der Zellen über einen Zeitraum von 3 h auf den Koordinatenursprung zentralisiert.

2.2.4 Nomenklatur

Im Rahmen dieser Dissertation wurden alle Proteine, RNAs sowie Gene zunächst mit ihrer geläufigsten Bezeichnung vorgestellt, wobei das Gensymbol in Klammern zu finden war. Letzteres wurde fortführend in der gesamten Arbeit verwendet.

Die Nomenklatur der miRNA beruhte auf der 3P- und 5P-Form. Dies stammt davon, ob die miRNA aus dem 5'-Arm (miRNA-5p) oder dem 3'-Arm (miRNA-3p) der pre-miRNA prozessiert wurde (Kawamata and Tomari, 2010). Die 5p-Form wird wie am Beispiel von miR-let-7a-5p gezeigt, häufig verkürzt als miR-let-7 bezeichnet.

2.2.5 Datenbanken

Ein Großteil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen erfolgten mittels der *R2: Genomic Analysis and Visualization Platform* (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) basierend auf Mikroarray-Analysen. Hierbei wurde zum einen der *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) Datensatz, welcher 917 Tumorzelllinien verschiedensten Ursprungs umfasste, verwendet (Barretina et al., 2012). Zum anderen wurden Datensätze primärer Tumorproben analysiert. Dazu zählten: Ovariale Tumore (Pamula Pilat – 101 Proben) (EXPO – 256 Proben) (Bowtell – 285 Proben), Brusttumore (EXPO – 351 Proben), Osteosarkome (27- Kobayashi-Datensatz), Schilddrüsentumore (EXPO – 34 Proben) (Kobayashi et al., 2010; Lisowska et al., 2014).

Zur Vorhersage von putativen IGF2BP1 3'-UTR-assoziierenden miRNAs wurden durch Zusammenarbeit mit Marcus Glaß (AG Hüttelmaier, Universität Halle-Wittenberg) *in silico* Analysen mittels des *multimiR R package* (version 1.0.1) hinsichtlich des langen humanen 3'-UTR von IGF2BP1 durchgeführt (Ru et al., 2014). Darüber hinaus wurden mittels *RNAhybrid* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de>) und miRANDA (<http://www.microrna.org>) putative miRNA-Bindestellen ermittelt.

2.2.6 Statistik

Alle dargestellten Experimente wurden, falls nicht anders erwähnt, dreimal durchgeführt. Die Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde standardmäßig durch Student's T-Test berechnet und ist als p-Wert gekennzeichnet. Diese p-Werte sind in den Diagrammen als Asterix wie folgt dargestellt: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,005$.

Für Korrelationsanalysen wurden mit Hilfe von SigmaPot11.0 der Korrelationskoeffizient (R) nach *Pearson* sowie der p-Wert (p) für das Signifikanzniveau bestimmt. Diese Parameter sind in den entsprechenden Abbildungen angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Die posttranskriptionelle Kontrolle der IGF2BP1-Expression

Das *Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1* (IGF2BP1) reguliert die Expression verschiedener z.T. onkogener Faktoren wie IGF2, MYC, ACTB, MAPK4, CTNNB1, CD44, BTRC und GLI1 auf posttranskriptioneller Ebene (Gu et al., 2008; Huttelmaier et al., 2005; Nielsen et al., 1999; Noubissi et al., 2006; Noubissi et al., 2009; Stohr et al., 2012; Vikesaa et al., 2006; Weidensdorfer et al., 2009). Dadurch beeinflusst dieses RNA-Bindeprotein verschiedene Zelleigenschaften wie Wachstum und Motilität, welche besonders im Verlauf der Embryonalentwicklung von Bedeutung sind und oftmals während der Tumorentstehung fehlreguliert werden (Yisraeli, 2005). Die Embryo- und Tumorgenese sind daher auch die beiden wichtigsten Phasen, in denen IGF2BP1 hauptsächlich exprimiert wird (Bell et al., 2013). In normal entwickelten adulten Geweben ist IGF2BP1 hingegen nicht oder nur in Spuren zu finden (Bell et al., 2013). Daher stellt dieses onkofötale Protein einen interessanten Kandidaten für eine gezielte Tumorthherapie dar, den es genauer zu charakterisieren gilt.

Während sich die Forschungsarbeiten zu IGF2BP1 überwiegend auf dessen Zieltranskripte und die daraus resultierenden zellphänotypischen Funktionen fokussieren, ist über die Regulation der IGF2BP1-Expression bisher wenig bekannt. Allerdings kann das IGF2BP1-Gen durch die Transkriptionsfaktoren MYC und CTNNB1/TCF4 aktiviert werden (Noubissi et al., 2006; Noubissi et al., 2010), wobei für Letzteres die Kofaktoren nicht beschrieben sind. Darüber hinaus kann der ~6,7 kb lange 3'-UTR von IGF2BP1, welcher fünf miR-let-7-Bindungsstellen besitzt, durch *alternative cleavage and polyadenylation* (APA) verkürzt werden. Durch die „Verkürzung“ des 3'-UTRs soll die miR-let-7-vermittelte Repression von IGF2BP1 in Tumorzellen umgangen und die IGF2BP1-Expression wesentlich heraufreguliert werden (Mayr and Bartel, 2009). Dahingegen wurde IGF2BP1 in Tumorzelllinien als stark reguliertes miR-let-7-Ziel identifiziert (Boyerinas et al., 2008). Welcher dieser, vor allem posttranskriptionellen Regulationsmechanismen, jedoch in Tumorzellen vorherrscht und damit tatsächlich das onkofötale Expressionsmuster des IGF2BP1-Proteins maßgeblich beeinflusst, ist bislang nur unzureichend charakterisiert. Diese Frage wurde daher in der vorliegenden Dissertation adressiert.

3.1.1 Das Expressionsmuster von IGF2BP1 in humanen Tumorzelllinien

Zur umfassenden Charakterisierung des Expressionsmuster von IGF2BP1 in diversen Tumorzellen wurden Datenbanken-Analysen der IGF2BP1-mRNA durchgeführt (Abb. 6 und 8). Hierfür wurde die R2-Datenbank (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi?&species=hs>) basierend auf *Mikroarray*-Analysen der *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE; <http://www.broadinstitute.org/software/cprg/?q=node/11>), in welcher 917 humane Tumorzelllinien erfasst sind, verwendet. Darüber hinaus wurden detaillierte Expressionsstudien anhand von neun humanen Tumorzelllinien unterschiedlichsten Ursprungs durchgeführt (Tab. 2). Dabei dienten die embryonalen Nierenzellen HEK293A als nicht-tumorigene Referenz-Zelllinie. Für diese Expressionsanalysen wurde der IGF2BP1-Proteingehalt der Zellen mittels semi-quantitativen *Western Blot* sowie die Expression der mRNA-Isoformen mittels *Northern Blot* und quantitativer RT-qPCR analysiert.

Die Analyse des CCLE-Datensatzes zeigte, dass die IGF2BP1-mRNA in der Mehrheit der 917 analysierten Tumorzelllinien detektiertbar war (Abb. 6A). Dabei wies IGF2BP1 im Gegensatz zu anderen RNA-Bindeproteinen wie beispielsweise HuR (*Hu-antigen R*, ELAVL1), welches in den getesteten Tumorzellen ubiquitär exprimiert wurde, ein differentielles Expressionsmuster auf. Eine Klassifizierung der Tumorzelllinien nach dem Ursprungsgewebe zeigte, dass die IGF2BP1-mRNA in Zelllinien verschiedener Tumorentitäten nachweisebar war. Dabei wurde IGF2BP1 in Abhängigkeit von der Tumorzelllinie differentiell exprimiert (Abb. 6B).

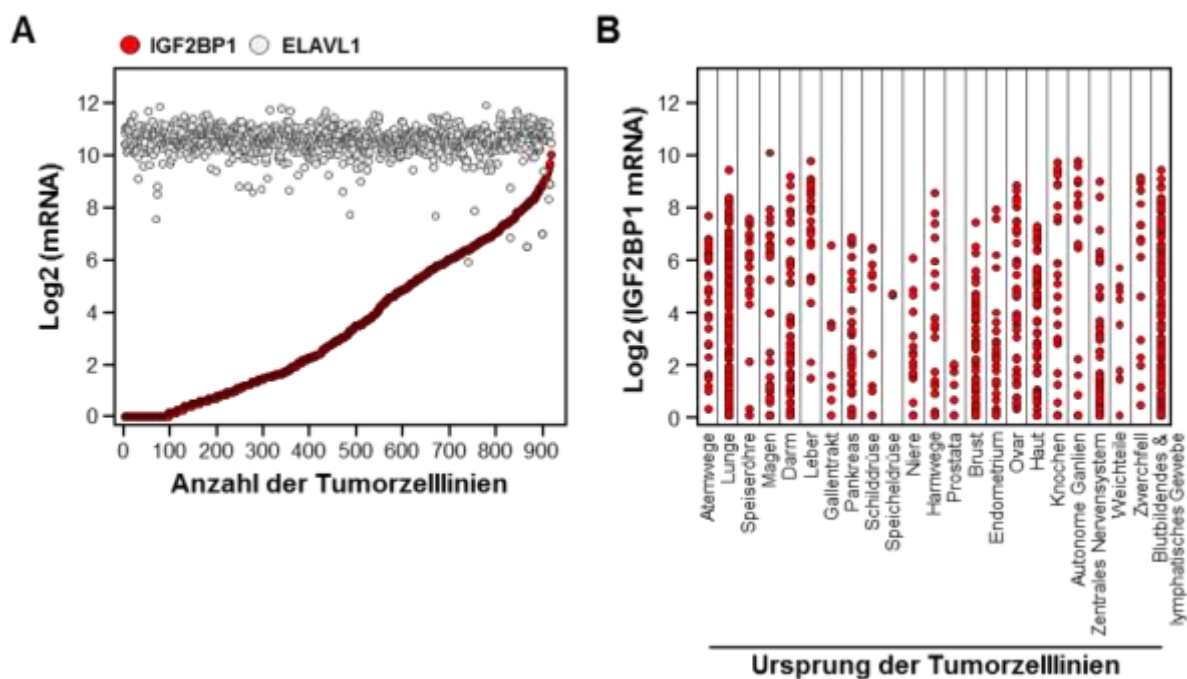


Abb. 6: Datenbank-Analyse zur Expression der IGF2BP1-mRNA in humanen Tumorzelllinien. **(A)** Expressionsanalyse zur IGF2BP1- (Sonde:227377_at) und ELAVL1-mRNA (Sonde:201726_at) mittels der R2-Datenbank basierend auf *Mikroarray*-Studien (*Affymetrix* U133p2) der *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), welche 917 humane Tumorzelllinien umfasst. **(B)** Diagramm präsentiert die IGF2BP1 mRNA-Expression in CCLE-Tumorzelllinien klassifiziert nach dem Ursprung dieser Tumorzellen.

Diese Beobachtungen korrelieren mit bereits publizierten Studien, in welchen mit Hilfe von RT-qPCR Analysen oder immunhistochemischen Färbungen eine Re-Expression von IGF2BP1 in verschiedenen malignen Krebserkrankungen wie beispielsweise der Leber, des Darms, des Pankreas oder der weiblichen Ovarien beschrieben wurde (Boyerinas et al., 2012; Dimitriadis et al., 2007; Gutschner et al., 2014; Ioannidis et al., 2003; Kobel et al., 2007).

Tumorzelllinie	Primärgewebe	Tumortyp
ES-2	Ovar	Klarzellkarzinom
C-643	Schilddrüse	Anaplastisches Karzinom
Hela	Zervix	Adenokarzinom
HT-144	Haut	Malignes Melanom ¹
U2OS	Knochen	Osteosarkom
PANC-1	Pankreas	Epithelioides Karzinom
BxPC-3	Pankreas	Adenokarzinom
MCF-7	Brust	Adenokarzinom ¹
HCT-116	Kolon	Kolorektales Karzinom

¹ aus einer Metastase isoliert

Tab. 2: Übersicht der verwendeten humanen Tumorzelllinien. Für Expressionsanalysen von IGF2BP1 wurden neun humane Tumorzelllinien unterschiedlichsten Ursprungs ausgewählt.

Die Mehrheit (62 %) der 917 analysierten Tumorzelllinien wurde aus Karzinomen isoliert, welche sich aus epithelialen Geweben entwickeln. Interessanterweise können epitheliale Tumorzellen im Verlauf der Tumorgenese eine reversible Transdifferenzierung, welche als *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) bezeichnet wird, durchlaufen (Kalluri and Weinberg, 2009). Der EMT-Prozess ist vor allem durch den Verlust epithelialer Markerproteine wie E-Cadherin (CDH1) gekennzeichnet, was die epitheliale Zell-Zell-Adhäsion negativ beeinflusst. Durch die Reorganization des Zytoskeletts wird eine Veränderung der Zellform induziert, die Aktivierung mesenchymaler Gene wie Vimentin (VIM) begünstigt und dabei mesenchymale Zelleigenschaften wie die Zellmotilität und Invasivität verstärkt (Kalluri and Weinberg, 2009). Die Aktivierung des EMT-Prozesses während der Tumorgenese trägt wesentlich zur Akquirierung eines malignen Tumorzellphänotypen bei (Thiery, 2002). In den detaillierten Expressionstudien wurde in den neun ausgewählten Tumorzelllinien (Tab. 2) mittels *Western Blot* Analysen die Expressionen von IGF2BP1, des epithelialen Markers CDH1 bzw. des mesenchymalen Markerproteins VIM analysiert. Ergänzend wurde die IGF2BP1 mRNA-Abundanz mittels RT-qPCR untersucht. HEK293A-Zellen dienten als Referenz-Zelllinie, da diese hohe Mengen aller drei IGF2BPs exprimieren (Bell et al., 2013). Übereinstimmend mit publizierten Studien wird IGF2BP1 hauptsächlich in mesenchymal-artigen, VIM-positiven Tumorzelllinien exprimiert, wobei die Mehrheit der VIM-positiven Zellen eine Expression des IGF2BP1-Proteins und der mRNA aufwies (Abb. 7A, B) (Zirkel et al., 2013). In epithelial-artigen Tumorzelllinien, deren Entstehung kein EMT voraus geht und die daher durch eine hohe CDH1-Expression gekennzeichnet sind, war IGF2BP1 nicht bzw. in äußerst geringen Mengen zu finden.

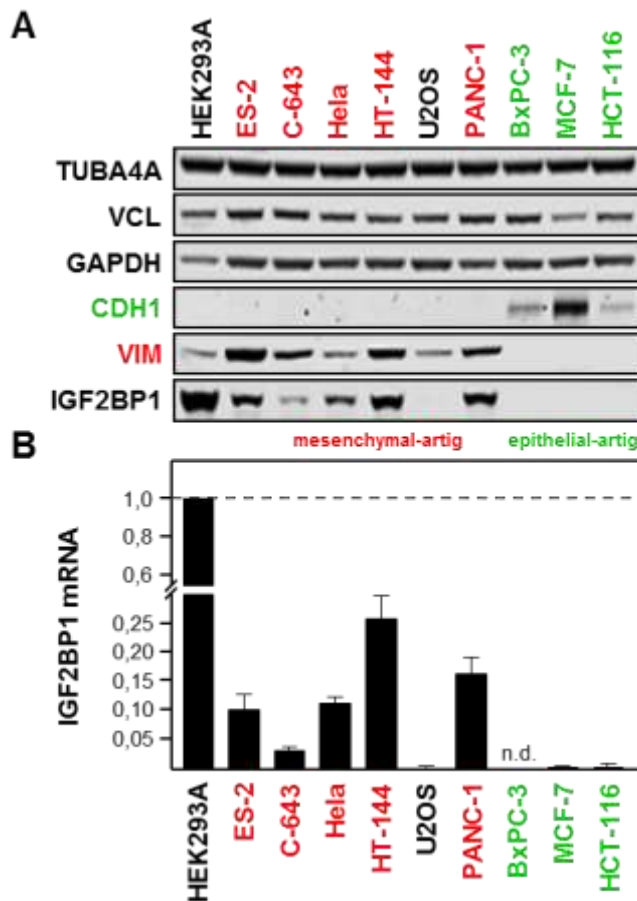


Abb. 7: Expressionsanalyse von humanen Tumorzelllinien. (A) Die Proteinabundanz von IGF2BP1, Vimentin (VIM; mesenchymaler Marker; rot) und E-Cadherin (CDH1; epithelialer Marker; grün) wurde in neun verschiedenen Tumorzelllinien vergleichend zu HEK293A-Zellen mittels semi-quantitativen *Western Blots* analysiert. Als Ladungskontrollen dienten α 4-Tubulin (TUBA4A), Vinculin (VCL) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). (B) Die IGF2BP1-mRNA wurde mittels RT-qPCR analysiert und ist relativ zu VCL und HEK293A-Zellen dargestellt. In BxPC-3 Zellen wurde IGF2BP1 nicht detektiert (n.d.). Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten.

Um diese Beobachtungen in einer umfangreicheren Studie zu überprüfen, wurden die Karzinomzelllinien des CCLE-Datensatz bezüglich der VIM-, CDH1- und IGF2BP1-mRNA Expression analysiert. Erwartungsgemäß wurde eine signifikante Antikorrelation zwischen dem ausschließlich epithelialem Marker CDH1 und dem mesenchymalen Marker VIM festgestellt (Abb. 8A). Zudem war die Expression der IGF2BP1-mRNA signifikant positiv mit der VIM mRNA-Abundanz korreliert, wohingegen eine negative Korrelation mit CDH1 beobachtet wurde (Abb. 8B, C). Für die VCL-mRNA wurde erwartungsgemäß keine signifikante Abhängigkeit von der IGF2BP1-Expression festgestellt (Abb. 8D).

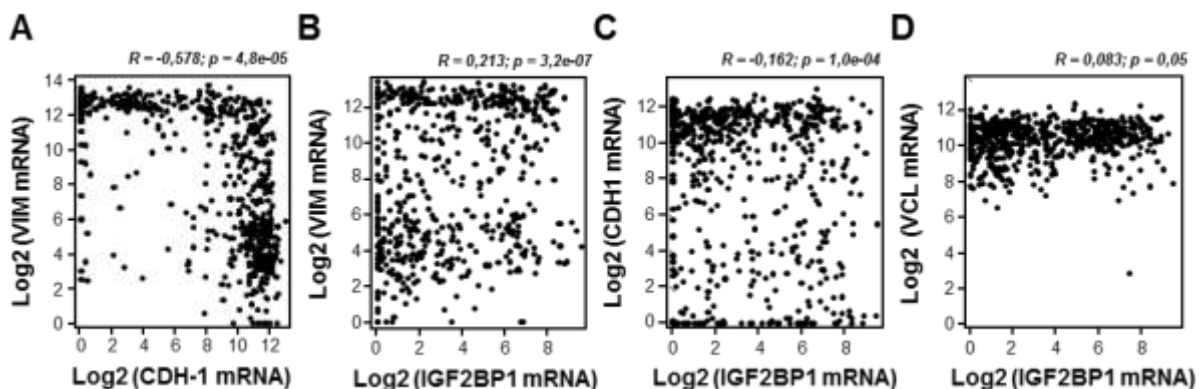


Abb. 8: Korrelationsanalysen zur IGF2BP1, VIM, CDH1 und VCL mRNA-Expression in Karzinomzelllinien. R2-Datenbankanalyse zur IGF2BP1- (227377_at), VIM- (201426_s_at), CDH1- Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Abb. 8

(201131_s_at) und VCL-mRNA (200931_at) basierend auf den 569 Karzinomzelllinien des CCLE-Microarray-Datensatzes. *Pearson*-Korrelationen zwischen (A) VIM und CDH1 respektive zwischen IGF2BP1 und (B) VIM, (C) CDH1, (D) VCL. Korrelationskoeffizienten (R) und p-Werte (p).

Zusammengenommen belegen diese umfangreichen Expressionsstudien, dass das onkofötale RNA-Bindeprotein IGF2BP1 in einer Vielzahl von Tumorzelllinien unterschiedlichsten Ursprungs exprimiert wurde. Dabei war IGF2BP1 in Karzinomzelllinien ausschließlich mit dem mesenchymalen Marker VIM koexprimiert. Dies verdeutlicht, dass IGF2BP1 vorwiegend in mesenchymal-artigen Tumorzellen exprimiert wird. Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob dieses differentielle Expressionsmuster von IGF2BP1 maßgeblich durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen beeinflusst wird. Mayr und Bartel postulierten im APA-Modell eine Verkürzung des IGF2BP1 3'-UTRs in Tumorzellen, wodurch die miR-let-7-vermittelte Repression von IGF2BP1 verloren geht (Mayr and Bartel, 2009). Dies könnte möglicherweise die Heraufregulation von IGF2BP1 in den mesenchymal-artigen Tumorzelllinien begünstigen. Diese Vermutung wird im folgenden Kapitel daher näher analysiert.

3.1.2 Die Expression der IGF2BP1 3'-UTR Isoformen in humanen Tumorzelllinien

Einhergehend mit diversen alternativen Polyadenylierungssignalen im ~6,7 kb langen IGF2BP1 3'-UTR sind vier IGF2BP1 mRNA-Isoformen bekannt. Diese wurden in publizierten Forschungsberichten anhand von *Northern Blot* Analysen in einigen Tumorzelllinien, in HEK293T-Zellen und in embryonalem Mausgewebe nachgewiesen (Mayr and Bartel, 2009; Nielsen et al., 1999). Aufgrund des verkürzten 3'-UTRs besitzt die kurze IGF2BP1-mRNA (K: 2416 nt) keine und die mittlere mRNA-Variante nur zwei (M: 3379 nt) miR-let-7-Bindungsstellen. Hingegen enthalten die langen 3'-UTR Isoformen (L: 8272 nt oder 8769 nt) alle fünf validierten Bindesequenzen der miR-let-7-Familie (Abb. 9A). Studien von Mayr und Bartel postulierten, dass die kürzeste IGF2BP1 mRNA-Isoform in Tumorzellen stärker gebildet wird als das längste Transkript, wodurch die IGF2BP1-Expression erheblich heraufreguliert wird. Diese Expressionserhöhung von IGF2BP1 soll auf dem Verlust der 3'-UTR abhängigen Regulation insbesondere der miRNA-Familie let-7 beruhen (Mayr and Bartel, 2009).

Um die Expression der IGF2BP1 3'-UTR Isoformen in den zuvor charakterisierten Zelllinien zu analysieren, wurden zunächst *Northern Blot* Analysen mit HEK293A- und MCF-7-Zellen, welche von einem metastasierenden Brustkarzinom abstammten, durchgeführt (Abb. 9B) (Soule et al., 1973). In Übereinstimmung mit den publizierten Studien von Mayr und Bartel wurden vier IGF2BP1-Transkripte in HEK293A-Zellen nachgewiesen, wobei sich die beiden längsten Varianten aufgrund ähnlicher Größen hier nicht unterscheiden ließen. Erstaunlicherweise waren die längsten Transkripte mit ca. 65 % der totalen IGF2BP1 mRNA-Expression wesentlich abundanter als die kurze (~15 %) oder mittlere Variante (~20 %). Im Gegensatz dazu konnte in MCF-7-Zellen,

aufgrund der geringfügigen IGF2BP1-Expression (siehe Abb. 7), keine der vier mRNA-Isoformen detektiert werden.

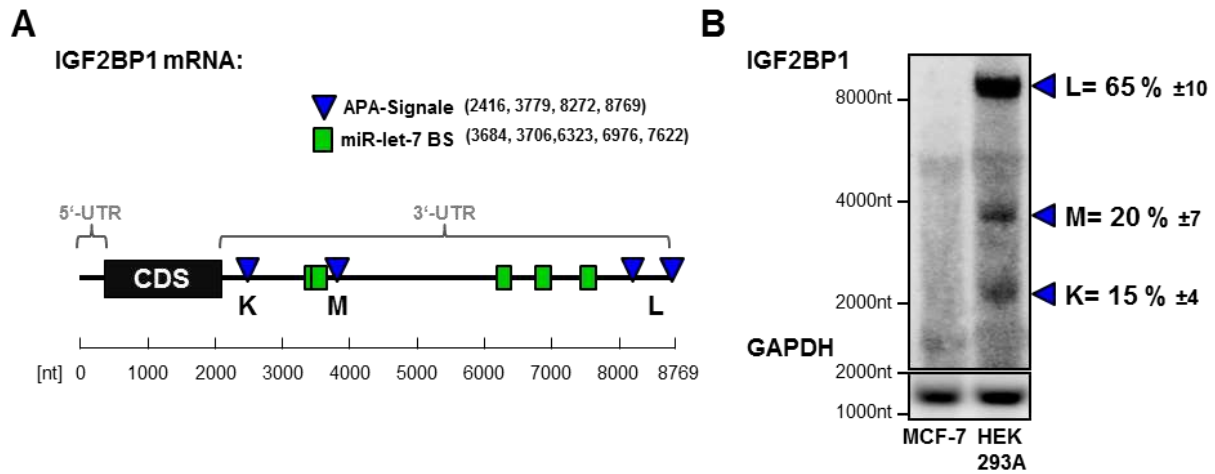


Abb. 9: Die Expression der IGF2BP1 mRNA-Isoformen. (A) Schematische Darstellung der IGF2BP1-mRNA. Durch *alternative cleavage and polyadenylation* (APA) werden eine kurze (K: 2416 nt), eine mittlere (M: 3379 nt) und zwei lange (L: 8272 oder 8769 nt) IGF2BP1 3'-UTR Isoformen prozessiert. APA-Signale (blau) und miR-let-7-Bindungsstellen (BS, grün) sind farbig gekennzeichnet. (B) Northern Blot Analysen mit poly(A)⁺RNA aus HEK293A- und MCF-7-Zellen. GAPDH diente als Ladungskontrolle. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten.

Um dennoch die Expression der IGF2BP1-Transkripte in MCF-7-Zellen, als auch in den übrigen Tumorzelllinien zu analysieren, wurde RT-qPCR als sensitivere Methode gewählt. Hierfür wurde die Total-RNA mittels *random*-Hexameren revers transkribiert. Durch Isoform-spezifische Oligodesoxynukleotide wurde die relative Abundanz der beiden längsten IGF2BP1-Isoformen (lang) relativ zur gesamten IGF2BP1-mRNA Menge (total) bestimmt (Abb. 10A). Interessanterweise wurden die längsten IGF2BP1-Isoformen nicht nur in HEK293A-Zellen, sondern auch in allen analysierten Tumorzelllinien weitestgehend unabhängig von der IGF2BP1-Proteinexpression mit einer hohen relativen Abundanz von durchschnittlich 50 % exprimiert (Abb. 10B). Eine Ausnahme stellten BxPC3-Zellen dar, in denen kein IGF2BP1-Transkript nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtungen stehen nicht im Einklang mit postulierten APA-Model und legen nahe, dass die differentielle IGF2BP1-Expression dieser Tumorzelllinien im Wesentlichen nicht mit einer „Verkürzung“ des langen 3'-UTRs assoziiert ist.

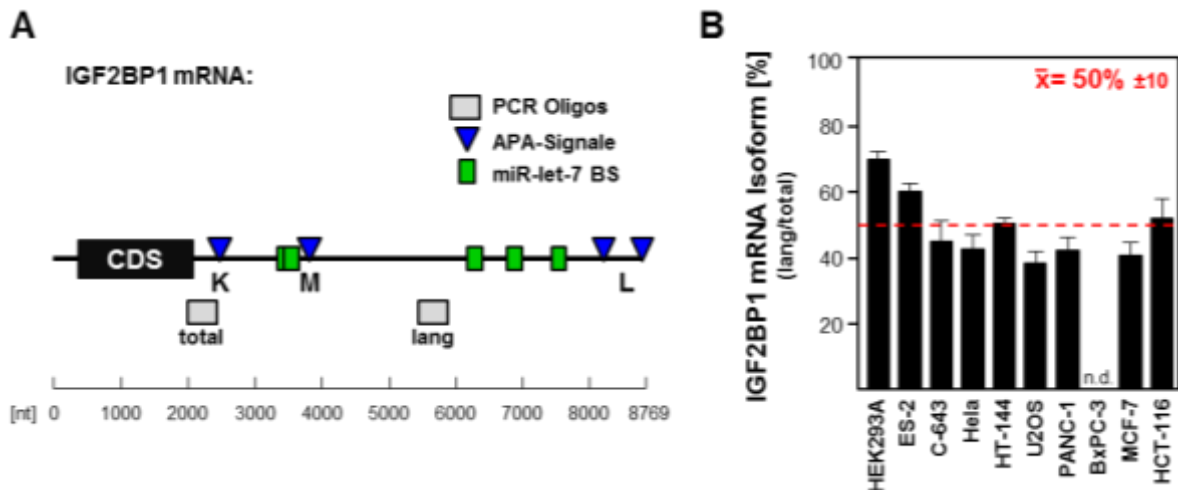


Abb. 10: Die Expression der langen IGF2BP1 3'-UTR Isoform in humanen Tumorzelllinien und HEK293A-Zellen. **(A)** Schematische Darstellung der IGF2BP1-mRNA wie in Abb. 9. Die qPCR-Oligodesoxynukleotide zum Isoform-spezifischen Nachweis der längsten IGF2BP1-mRNAs (lang) sowie aller IGF2BP1-Transkripte (total) sind grau gekennzeichnet. **(B)** Total-RNA der Zelllinien wurde mittels *random*-Hexameren revers transkribiert und mittels RT-qPCR analysiert. Aus der relativen Expression der langen Isoformen aller Zelllinien wurde der Mittelwert (\bar{x} , rote gestrichelte Linie) berechnet. In BxPC3-Zellen wurden die IGF2BP1-mRNAs nicht detektiert (n.d.). Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten.

Um dieses Ergebnis in einer umfangreicheren Studie zu prüfen, wurde der CCLE-Datensatz analysiert. Für die Detektion der IGF2BP1-kodierenden Transkripte stehen in diesen *Affymetrix Mikroarrays* (u133plus2.0) zwei Sonden zur Verfügung. Die erste (223689_s_at) detektiert einen Bereich, der das Ende der kodierenden Sequenz und den vorderen Abschnitt des 3'-UTRs umfasst (Abb. 11A). Dieser Bereich ist in allen IGF2BP1 mRNA-Isoformen vorhanden. Die zweite Sonde (227377_s_at) detektiert den distalen Abschnitt des 3'-UTRs, welcher nur in den längsten Transkripten zu finden ist. *Mikroarray*-Analysen basieren in der Regel auf mRNA, welche mittels *Oligo-dT-Primern* revers transkribiert wurde. Demzufolge könnte die cDNA-Synthese von sehr langen Transkripten, wie der IGF2BP1-mRNA, möglicherweise nicht bis zum 5'-Ende erfolgen, sondern bereits vorher abbrechen. Daher wurde vermutet, dass die erste Sonde vorwiegend die kurze und mittlere IGF2BP1-mRNA detektiert. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Expression von sechs nicht alternativ prozessierten mRNAs wie beispielsweise VCL analysiert, wobei jedes Transkript von zwei Sonden detektiert wurde. Hierfür wurde die gemittelte Signalintensität der Sonden, welche der mRNA-Expression entspricht, in Abhängigkeit von ihren Abständen zum Poly(A)-Signal aufgetragen (Abb. 11B). Dabei zeigte sich, dass die mRNA-Expression mit zunehmender Distanz der Sonde zum Poly(A)-Signal signifikant und stark abnahm. Dies legt nahe, dass die erste IGF2BP1-Sonde hauptsächlich die Expression der kurzen und mittleren Isoform reflektiert. Die Betrachtung des CCLE-Datensatzes basierend auf diesen beiden Sonden zeigte, dass die längsten IGF2BP1-Isoformen (lang) durchschnittlich in allen 917 analysierten Tumorzelllinien eine signifikant höhere Expression (ca. 1,6-fach) als die kürzeren mRNAs (kurz) aufwiesen (Abb. 11C). Darüber hinaus wurde anhand der Verhältnisse von langen

zu kurzen Isoformen beobachtet, dass die Mehrheit der Tumorzellen (66 %) eine höhere Abundanz der langen IGF2BP1-mRNAs als der Kürzeren aufwiesen (Abb. 11D). Die übrigen Tumorzelllinien zeigten ein umgekehrtes Verhältnis (30 %) oder gleiche Anteile (4 %) der langen und kurzen IGF2BP1-mRNAs auf. Im Hinblick auf die zuvor analysierten Tumorzelllinien wurde, für die im CCLE-Datensatz erfassten Tumorzellen, eine weitestgehende Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der RT-qPCR und der *Mikroarray*-Analysen festgestellt. So wiesen die ES-2 Zellen eine relative Expression der langen IGF2BP1-mRNAs von ~58 % auf, was mit ungefähr gleichen Abundanzen für die kurzen und langen mRNAs in der *Mikroarray*-Analyse übereinstimmt. Übereinstimmende Ergebnisse wurden zudem für die Tumorzelllinien HT-144 und PANC-1 festgestellt. Dahingegen wurde für MCF-7 Zellen im *Mikroarray* ein verstärkter Trend zu den langen IGF2BP1-mRNAs festgestellt. Allerdings bestätigte die quantitative PCR eine relative Abundanz von ~45 %.

Zusammengenommen verdeutlichen diese Expressionsstudien, dass die langen IGF2BP1-Isoformen, welche den ~6,7 kb lange 3'-UTR kodieren, in fast allen analysierten Tumorzelllinien mit einer hohen Abundanz exprimiert wurden.

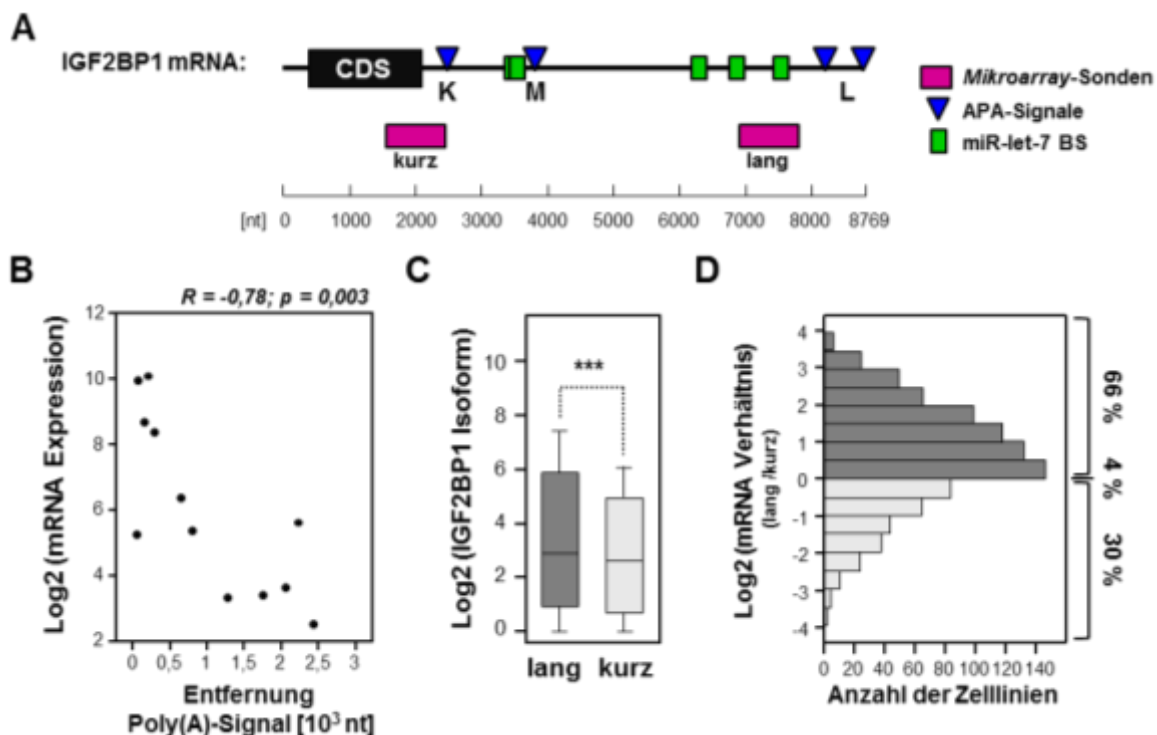


Abb. 11: Die Expression der IGF2BP1 mRNA-Isoformen in den CCLE-Tumorzelllinien. (A) Schematische Darstellung der IGF2BP1-mRNA (siehe Abb. 9) mit den Positionen der verwendeten IGF2BP1-Sonden des *Affymetrix Mikroarrays* (u133plus2.0). (B-D) Expressionsanalysen mittels der R2-Datenbank basierend auf dem CCLE-*Mikroarray*-Datensatz. (B) Expression von nicht alternativ prozessierten mRNAs, welche durch zwei Sonden ermittelt wurde. Die gemittelte Signalintensität der Sonde ist in Abhängigkeit zum Abstand vom distalen Poly(A)-Signal als *Pearson*-Korrelation abgebildet. Korrelationskoeffizient (R) und p-Wert (p). (C) Gemittelte Signalintensität der langen (lang; 227377_s_at) und kürzeren (kurz; 223689_s_at) IGF2BP1-mRNAs in den 917 Tumorzelllinien der CCLE. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: ***p < 0,005. (D) Verteilung der Verhältnisse der Signalintensität von langen zu kürzeren Isoformen der analysierte CCLE-Tumorzelllinien. Ein Verhältnis von Null repräsentiert gleiche Isoform-Anteile.

Aus den vorangegangenen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob die langen IGF2BP1-Isoformen auch in primären Tumorgeweben vorhanden sind. Daher wurde mittels der R2-Datenbank die Expression der langen und kurzen IGF2BP1-mRNAs in *Mikroarray*-Analysen von primären Tumorproben der Brust, des Knochens, der Schilddrüse und des Ovars analysiert (Abb. 12). Analog zu den Beobachtungen in Tumorzelllinien wiesen die Sonden der langen IGF2BP1-Transkripte in allen analysierten Datensätzen durchschnittlich eine deutlich höhere Signalintensität als die der kurzen Varianten auf (2 - 3-fach). Darüber hinaus waren die langen IGF2BP1-Isoformen im Ovarialkarzinom sogar in Tumorproben aggressiver metastasierender Stadien exprimiert (FIGO-IIIc; FIGO-IV) (Abb. 12B). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass alle IGF2BP1-mRNAs nicht nur in Tumorzelllinien sondern auch in primären Tumoren zu finden sind. Dieses Ergebnis wurde von Markus Glaß anhand einer Analyse von RNA-Sequenzierdaten, wobei die Sequenzierdichte des IGF2BP1 3'-UTR betrachtet wurde, unabhängig bestätigt (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde eine gleichmäßige Verteilung von mRNA-*reads* für den gesamten 3'-UTR im primären Ovarialkarzinom und in Peritonealmetastasen festgestellt. Dies lässt vermuten, dass alle IGF2BP1-Transkripte exprimiert wurden. Hingegen wurde im nicht transformierten ovariellen Epithel kein IGF2BP1 nachgewiesen, wie in Studien von Köbel et al. gezeigt (Kobel et al., 2007).

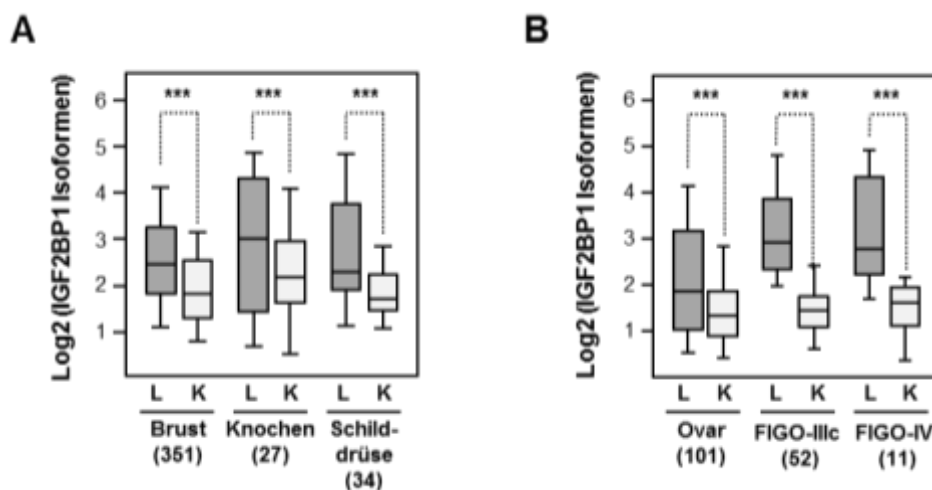


Abb. 12: Die Expression der IGF2BP1 mRNA-Isoformen in primären Tumorgeweben. R2-Mikroarray-Analysen zur Expression der langen (L) und kurzen (K) IGF2BP1 mRNA-Isoformen in primären Tumorproben der (A) Brust (EXPO-Datensatz), Knochen (Osteosarkom, Kobayashi-Datensatz), Schilddrüse (EXPO-Datensatz) oder (B) Ovar (Pamula-Pilat Datensatz). Letztere enthielt Tumorproben mit aggressiveren Tumorstadien (FIGO-IIIc, IV). Anzahl der analysierten Tumorproben ist in Klammern dargestellt. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: *** $p < 0,005$.

Es blieb zu untersuchen, ob die langen Isoformen zur Proteinsynthese von IGF2BP1 beitragen. Daher wurden die langen IGF2BP1-kodierenden Transkripte sowie alle IGF2BP1-mRNAs mittels siRNAs depletiert (Abb. 13A). Hierfür wurden siRNAs, welche einerseits gegen den langen 3'-UTR (si3UTR) und andererseits gegen die kodierende Sequenz (siCDS) gerichtet waren, verwendet. Für diese und folgende Analysen wurde die Ovarialkarzinom-abstammende Zelllinie ES-2 ausgewählt, da diese eine mittlere IGF2BP1-Expression aufwies und die langen IGF2BP1-

Isoformen ungefähr 60 % der gesamten mRNA-Expression repräsentierten. Zudem belegen einige publizierte Studien eine Re-Expression von IGF2BP1 in ovarialen Karzinomen, welche mit einem fortgeschrittenen klinischen Stadium und einer schlechten Prognose assoziiert war (Boyerinas et al., 2012; Gu et al., 2004; Kobel et al., 2007). Im Vergleich zur Transfektion einer Kontroll-siRNA (siC) führt der *knockdown* der langen IGF2BP1-Isoformen zu einer starken Reduktion (ca. 50 %) der IGF2BP1-Proteinmenge (Abb. 13B). Erwartungsgemäß wurde die IGF2BP1-Expression durch die siCDS fast vollständig depletiert. Die *knockdown*-Effizienzen wurden mittels RT-qPCR überprüft (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die langen IGF2BP1-kodierenden Transkripte wesentlich zur Proteinsynthese beitragen.

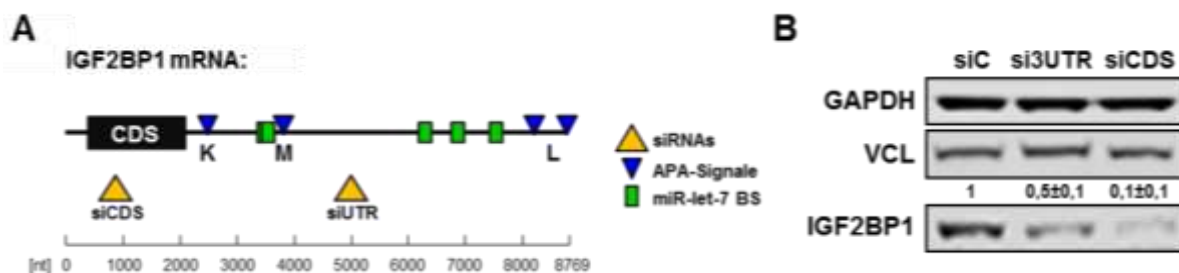


Abb. 13: Anteil der langen IGF2BP1 Isoformen an der Proteinexpression. (A) Schematische Darstellung der IGF2BP1-mRNA wie in Abb. 9 mit den verwendeten siRNAs. **(B)** ES-2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (siC) und siRNAs gerichtet gegen den langen IGF2BP1 3'-UTR (si3UTR) oder gegen die kodierende Sequenz (siCDS) von IGF2BP1 transfiziert. Proteinexpression wurde mittels semi-quantitativen *Western Blot* analysiert. GAPDH und VCL dienten als Ladungs- bzw. Normalisierungskontrollen. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst belegen die dargestellten Analysen, dass alle IGF2BP1 mRNA-Isoformen in HEK293A-Zellen, in einer Vielzahl von Tumorzelllinien und primären Tumoren gebildet wurden. Dabei wiesen die längsten IGF2BP1-kodierenden mRNAs eine hohe Abundanz auf. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass eine Heraufregulation der IGF2BP1-Expression in Tumorzellen primär nicht auf einer verstärkten Expression der kurzen mRNAs zurückzuführen ist. Demzufolge tragen APA-unabhängige Mechanismen zur Reexpression von IGF2BP1 in Tumorzellen bei. Eine Möglichkeit könnte eine verminderte miR-let-7-vermittelte Inhibition der IGF2BP1-Expression darstellen.

3.1.3 Die Expression von miR-let-7 in humanen Tumorzelllinien und der murinen Embryogenese

Um den Einfluss der miR-let-7-vermittelten Repression von IGF2BP1 in den zuvor charakterisierten Tumorzelllinien und den HEK293A-Zellen zu analysieren, wurde ergänzend zu den Expressionsanalysen von IGF2BP1 die Abundanz der miR-let-7a mittels *Northern Blottings* untersucht. Zusätzlich wurden Mausgewebe (Hirn) der Embryonaltage (E) 12 bis 18 analysiert, wobei die Gewebeproben von Britta Mühleck (AG Hüttelmaier, Universität Halle-Wittenberg) präpariert und aufgereinigt wurden. Übereinstimmend mit publizierten Daten nahm während der murinen Embryogenese die Expression von miR-let-7a stark zu (Abb. 14A) (Schulman et al., 2005). Im Gegensatz dazu sank die Proteinmenge von IGF2BP1 bis dieses im adulten Organismus, in welchem die miR-let-7a ihr Maximum (~22-fach) erreichte, nicht mehr detektierbar war (Hansen et al., 2004). Die Expression der langen IGF2BP1 mRNA-Isoformen in murinen Embryos wurde bereits in publizierten *Northern Blot* Analysen von Nielsen et al. bestätigt (Nielsen et al., 1999). Hierbei waren die langen Transkripte von E 10,5 bis E 17,5 mit einem Expressionmaximum an E 12,5 detektierbar und stellten zudem die abundantesten mRNAs des murinen IGF2BP1-Paralogs dar. Im Zusammenspiel mit diesen publizierten Daten, belegen die durchgeführten Expressionsanalysen eine signifikant Antikorrelation der IGF2BP1- und miR-let-7-Expression im Verlauf der murinen Embryogenese (Abb. 14B). Dies legt eine miR-let-7-vermittelte Inhibition der IGF2BP1-Expression nahe.

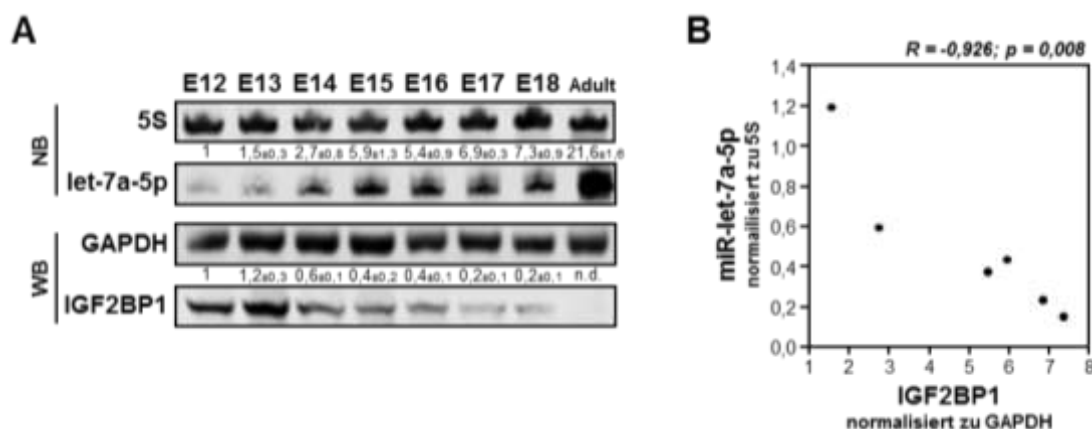


Abb. 14: Expression von IGF2BP1 und miR-let-7 in der murinen Embryogenese. Expressionsanalysen von IGF2BP1 und miR-let-7a in murinen Geweben (Hirn) der Embryonaltage (E) 12 bis 18 sowie eines adulten Tieres (Adult) mittels **(A, unten)** semi-quantitativen *Western Blottings* (WB) und **(A, oben)** *Northern Blottings* (NB). GAPDH und 5S-RNA dienten als Ladungs- und Normalisierungskontrollen. Expression wurde relativ zu E 12 normalisiert. Im adulten Gewebe wurde IGF2BP1 nicht detektiert (n.d.). **(B)** *Pearson*-Korrelation der relativen IGF2BP1- und miR-let-7a-5p-Expression. Korrelationskoeffizient (R) und p-Wert (p). Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten.

Die Expressionsanalyse der Zelllinien zeigte, dass HEK293A-Zellen entgegen einer hohen IGF2BP1-Proteinmenge eine geringe miR-let-7a-Abundanz aufwiesen (Abb. 15A). Auf Basis der variierenden miR-let-7a-Mengen der analysierten mesenchymal-artigen Tumorzelllinien und der

HEK293A-Zellen wurde eine signifikante negative Korrelation zur IGF2BP1-Proteinexpression festgestellt (Abb. 15B). Im Vergleich dazu wiesen die drei analysierten epithelial-artigen Tumorzelllinien nur leicht erhöhte miR-let-7a-Mengen auf. Für die U2OS-Zellen wurde eine mittlere miR-let-7a-Abundanz festgestellt (Abb. 15B). Dies legt nahe, dass die geringfügige IGF2BP1-Expression dieser Tumorzelllinien vermutlich nicht maßgeblich durch miR-let-7 inhibiert wird. Im Gegensatz dazu unterstützt das gegenläufige Expressionsmuster in den analysierten mesenchymal-artigen Tumorzelllinien und HEK293A-Zellen die miR-let-7-vermittelte Inhibition von IGF2BP1. Um diese Annahme in einer umfangreicheren Studie zu prüfen, wurde der CCLE-Datensatz verwendet. Da keine Expressionsdaten der miR-let-7-Familie verfügbar waren, wurde die Abundanz der IGF2BP1-mRNA in Abhängigkeit des LIN28B-Transkriptes analysiert. LIN28B inhibiert die miR-let-7-Expression auf posttranskriptioneller Ebene, indem dieses RNA-Bindeprotein die miR-let-7-Prozessierung blockiert und die Degradation dieser miRNAs fördert (Mayr and Heinemann, 2013). Einhergehend mit der zentralen Rolle von LIN28B in der miR-let-7-Biogenese ist die Expression der langen IGF2BP1-Transkripte signifikant positiv mit der Abundanz der LIN28B-mRNA in den 917 CCLE-Tumorzelllinien assoziiert (Abb. 15C). Dies verdeutlicht eine Koexpression dieser beiden RNA-Bindeproteine und legt indirekt eine miR-let-7-vermittelte Regulation des IGF2BP1-Transkriptes nahe.

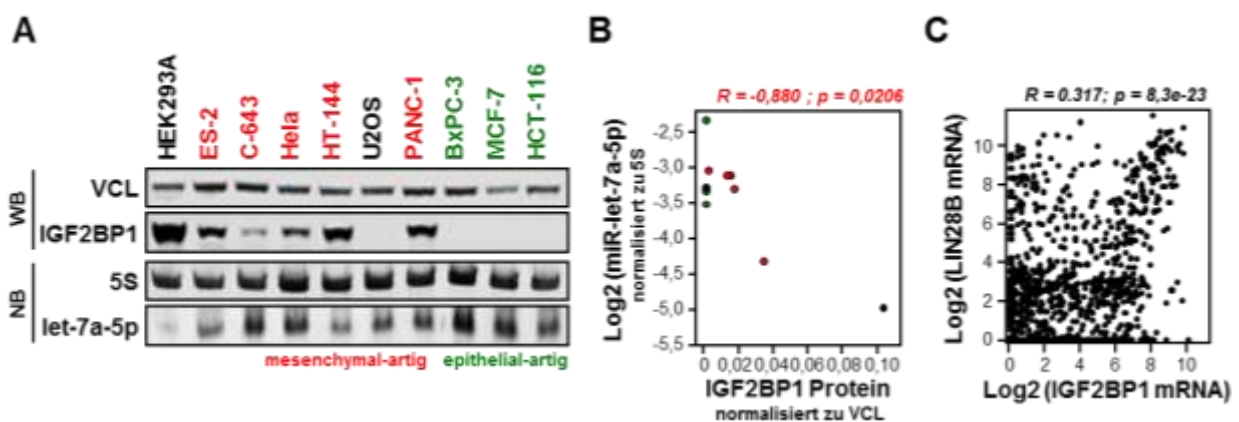


Abb. 15: Expression von IGF2BP1 und miR-let-7 in humanen Tumorzelllinien. (A) Western Blot Analysen (WB) wie in Abb. 7A. Expression der miR-let-7a-5p wurde mittels Northern Blottings analysiert (NB). VCL und 5S-RNA dienten als Ladungs- und Normalisierungskontrollen. (B) Pearson-Korrelation der IGF2BP1- und miR-let-7a-5p-Expression von mesenchymal-artigen Tumorzelllinien und HEK293A-Zellen. (C) Pearson-Korrelation der LIN28B-mRNA (229349_at) und der langen IGF2BP1-Transkripte (227377_at) basierend auf R2-Mikroarray-Analysen des CCLE-Datensatzes. Korrelationskoeffizienten (R) und p-Werte (p).

Zusammengenommen belegen diese Ergebnisse ein gegenläufiges Expressionsmuster von IGF2BP1 und miR-let-7 in Tumorzellen als auch während der embryonalen Mausentwicklung, was eine miR-let-7-vermittelte Repression der IGF2BP1-Expression nahe legte. Dies warf allerdings die Frage auf, ob die IGF2BP1-Expression neben der miR-let-7-Familie möglicherweise auch durch weitere miRNAs reguliert wird.

3.1.4 Die Expression von IGF2BP1 in DICER-depletierten Zellsystemen

Um zu untersuchen, ob IGF2BP1 ein Ziel für weitere miRNAs ist, wurde dessen Expression in Zellsystemen mit einem *knockout* oder *knockdown* der Ribonuklease DICER (DCR1) analysiert. Dieses hoch konservierte Enzym katalysiert im Zytoplasma die Freisetzung des ~22 nt langes miRNA-Duplexes aus der pre-miRNA und stellt somit eine zentrale Komponente der miRNA-Biogenese dar (Ha and Kim, 2014). Im Einklang mit dem onkofötalen Expressionsmuster von IGF2BP1 wurden einerseits DCR1-defiziente (-/-) murine embryonale Fibroblasten (MEFs), in denen mit Hilfe des Cre/loxP Systems das DCR1-Gen entfernt wurde, verwendet (Glasmacher et al., 2010). Andererseits wurde in ES-2 Zellen durch RNA-Interferenz (RNAi) ein transients DCR1-*knockdown* etabliert.

Der vollständige Verlust von DCR1 resultierte in einem starken Anstieg (ca.8 - 9-fach) der IGF2BP1 Protein- und mRNA-Expression (Abb. 16A), was in Übereinstimmung mit einer publizierten Studie in murinen adulten Fibroblasten steht (Gurtan et al., 2013). Zudem war miR-let-7a in den DCR1-/- Zellen im Vergleich zum Wildtyp (WT) mittels *Northern Blot* Analysen nicht mehr nachweisbar. Der siRNA-vermittelte *knockdown* von DCR1 (siDCR1) mit einer Effizienz von ca. 80 % führte zu einer Verdopplung der IGF2BP1-Expression verglichen mit der Kontrolltransfektion (siC) (Abb. 16B). Dabei wurde die Abundanz von miR-let-7a um ungefähr 50 % gesenkt. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der miR-let-7-Familie (siehe Abb. 27) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die *Northern Blot* Sonde ebenso weitere Familienmitglieder detektiert. Diese Beobachtungen zeigen, dass der Verlust von DCR1 die Abundanz von IGF2BP1 wesentlich beeinflusst, was durch die Reduktion der miR-let-7-Familie begründet werden könnte. Um eine 3'-UTR abhängige Regulation der IGF2BP1-Expression in diesen Zellsystemen zu überprüfen, wurden Luziferase-Reporteranalysen mit dem langen humanen Wildtyp IGF2BP1 3'-UTR (WT) durchgeführt. Als Spezifitätskontrolle wurde ein miR-let-7-inaktivierter 3'-UTR-Luziferasereporter (MUT) verwendet. Die Inaktivierung der miR-let-7-Familie beruht auf je zwei Punktmutationen in der *seed*-Region der fünf bekannten miR-let-7-Bindestellen im IGF2BP1 3'-UTR (Boyerinas et al., 2008; Mayr and Bartel, 2009) (Abb. 16C). Die Luziferaseaktivität des WT- (ca. 1,5- bzw. 2-fach) als auch des MUT-Reporters (ca. 1,2- bzw. 1,4-fach) wurde durch den DCR1-*knockdown* respektive -*knockout* signifikant erhöht (Abb. 15D). Jedoch war die gesteigerte Luziferaseaktivität des WT-Reporters im *knockout*-Zellsystem geringer als der Anstieg der endogenen IGF2BP1-Expression. Mögliche Gründe hierfür könnten zum einen Sekundäreffekt wie beispielsweise eine Aktivierung des IGF2BP1-Gens durch die miR-let-7-reprimierten Transkriptionsfaktoren MYC oder HMGA2 (*High-mobility group AT-hook 2*) sein (Kim et al., 2009; Lee and Dutta, 2007; Noubissi et al., 2010). Letzterer wurde bisher allerdings nur als eine Transkriptionsaktivator von IGF2BP2 beschrieben (Cleyne et al., 2007). Zum anderen könnten eine veränderte Sekundärstruktur des artifiziellen 3'-UTR-Reporters oder

das Fehlen von anderen *cis*-agierenden Bereichen der endogenen IGF2BP1-mRNA diese Diskrepanz begründen. Publizierte Studien zeigen, dass sowohl der 5'-UTR als auch die kodierende Sequenz (CDS) gelegentlich funktionelle miRNA-Bindestellen enthalten (Fang and Rajewsky, 2011; Hafner et al., 2010a). Darüber hinaus wies der überexprimierte Luziferasereporter im Vergleich zur endogenen mRNA wahrscheinlich eine höhere Abundanz auf, wodurch die miRNA-vermittelte Regulation des artifiziellen 3'-UTRs nicht direkt mit der des endogenen Transkripts verglichen werden könnte. Im Gegensatz zu den 3'-UTR-Reportern blieb das als Hintergrundkontrolle dienende Leerplasmid (MCS), welches eine MCS (*multiple cloning site*) kodierte, von den DCR1-Depletionen unbeeinflusst. Die erhöhten Luziferaseaktivitäten des WT-Reportes im DCR1-*knockdown* respektive *-knockout* Zellsystem wurden durch die Inaktivierung der miR-let-7-Bindestellen um ca. 40 % bzw. 60 % vermindert, was durch die Reduktion der miR-let-7-Familie zu begründen ist. Die verbliebenen signifikant erhöhten Luziferaseaktivitäten (20 % bzw. 40 %) deuten stark darauf hin, dass der IGF2BP1 3'-UTR ein Ziel weiterer miRNAs ist.

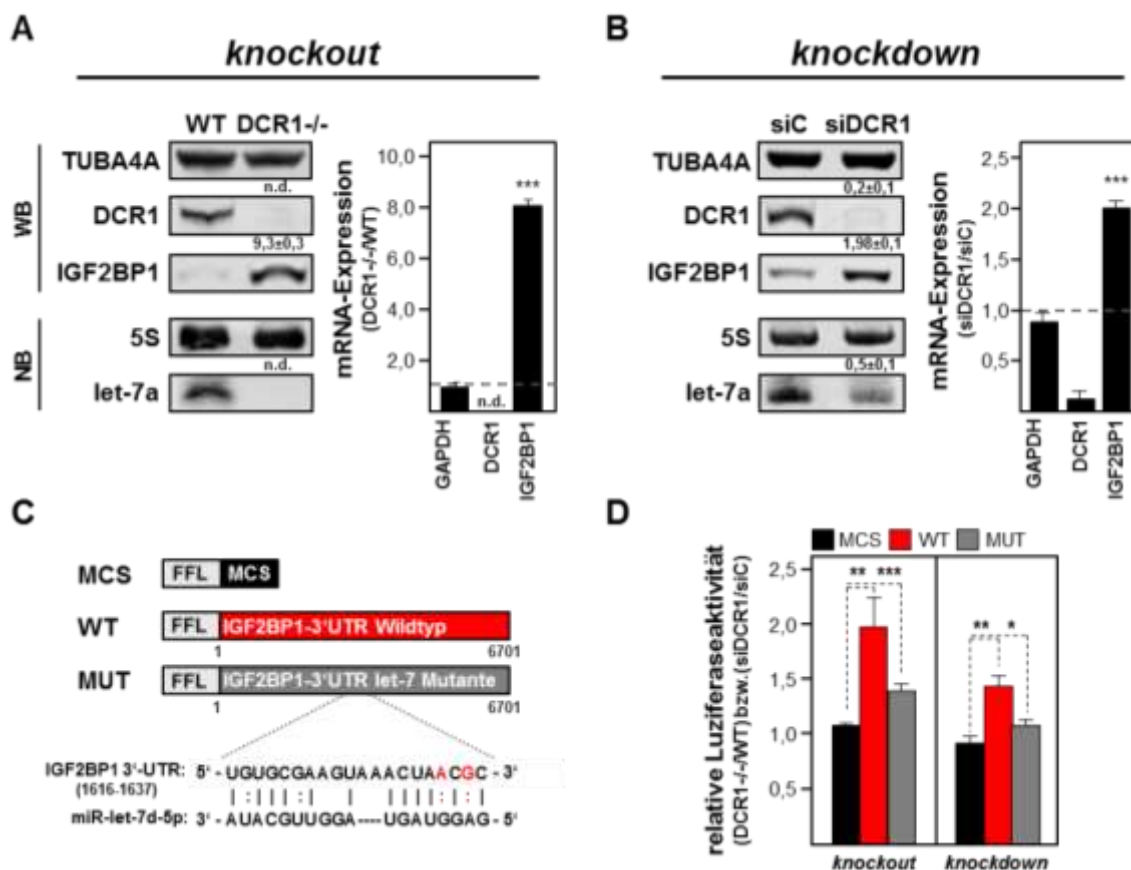


Abb. 16: Einfluss der DCR1-Depletion auf die IGF2BP1-Expression. Expressionsanalysen von IGF2BP1 in DICER (DCR1) *knockout*- und *knockdown*-Zellsystemen. Hierfür wurden Wildtyp (WT) murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) vergleichend zu MEFs mit eliminiertem DCR1-Gen (DCR1-/-) analysiert. Zudem wurden ES-2 Zellen mit DCR1-gerichteter siRNA (siDCR1) und Kontroll-siRNA (siC) für 72 h transfiziert. **(A,B)** Expression der Zellen wurden mittels semi-quantitativen *Western Blottings* (WB), *Northern Blottings* (NB) und RT-qPCR analysiert. TUBA4A bzw. 5S-RNA dienten als Ladungs- und Normalisierungskontrollen. Expressionen sind relativ zu Kontrollzellen dargestellt. DCR1 und miR-let-7a wurden in DCR1-/- Zellen nicht detektiert (n.d.). **(C)** Schematische Darstellung der verwendeten Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Abb. 16

Firefly (FFL) Luziferasereporter: Langer, nicht mutierter IGF2BP1 3'-UTR (WT, rot); 3'-UTR mit je 2 Punktmutationen in der *seed*-Region der fünf miR-let-7-Bindungsstellen (MUT, grau); *multiple cloning site* (MCS) kodierendes Leerplasmid (MCS) diente als Hintergrundkontrolle. (D) Luziferasereporter wurden transient in die Zellen eingebracht und Luziferaseaktivitäten nach 48 h bestimmt. Neben einer *Firefly*-Luziferase (FFL) kodierten die Plasmide zur internen Normalisierung eine *Renilla*-Luziferase (RL). Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: *p<0,05; **p< 0,01; ***p< 0,005.

Es sollte nun untersucht werden, inwieweit miRNAs durch den DCR1-*knockdown* respektive -*knockout* in ihrer Expression verändert wurden. Daher wurden *next generation sequencing* (NGS) Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten durch die *Core Unit* DNA-Technologien des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) der Universität Leipzig. Dafür wurden aus der Total-RNAs der *knockout*- und *knockdown*-Zellpopulationen in einer Dreifachbestimmung mittels des Illumina *TruSeq™ Small RNA Sample Prep Kit v2* DNA-Sequenzierbibliotheken generiert. Hierbei wurden kleine RNAs (*small RNAs*) einschließlich miRNAs 5' und 3' spezifisch mit RNA-Adaptoren ligiert. Diese Adapterkonstrukte wurden anschließend revers transkribiert, amplifiziert und mit einem Barcode markiert. Nach einer Größenselektion enthalten die generierten Bibliotheken 145 - 160 bp lange Adapter-ligierte DNA-Fragmente, welche ausschließlich die Sequenzen von kleinen RNAs mit einer Länge von 22 bis 30 nt beinhalten. Dadurch wird die darauffolgende Sequenzierung auf kleine RNAs begrenzt (*small RNA sequencing*). Ein Gemisch aus max. 10 Sequenzierbibliotheken wurde für die *Cluster*-Generierung auf eine Spur des Sequenzierchips geladen und anschließend wurden 50 bp sequenziert. Die sequenzierten Fragmente wurden mittels des *bowtie2 aligner* gegen die humanen bzw. murinen miRNA-Sequenzen der Datenbank *miRBase v20 alignet*. Die statistische Auswertung der Sequenzierdaten erfolgte mittels *edgeR software package* und beinhaltete eine Normalisierung nach der *weighted trimmed mean of M-values method* (TMM). Diese Methode ermöglicht die Normalisierung von Sequenzierbibliotheken mit abweichenden Größen oder Sequenzertiefen. Die Veränderung der miRNA-Expressionen infolge des DCR1-*knockdowns* respektive -*knockouts* wurden relativ zur jeweiligen Kontrollpopulation in einem Poisson-Extakt-Test bestimmt. Differenziell herunter regulierte miRNAs wiesen ein Signifikantsniveau (der *false discovery rate* (FDR)) von <0,05 auf.

Im Einklang mit der zentralen Funktion von DCR1 in der miRNA-Biogenese wiesen die nicht normalisierten Bibliotheken des *knockout*-Zellsystems stark abweichende Größen auf (Tab. 3.). In der WT-Probe wurden 3×10^5 miRNA-Fragmente sequenziert. Hingegen ergab die DCR1-/- Probe nur $0,7 \times 10^5$ Fragmente. Im Vergleich zu der DCR1-/- Bibliothek war die WT-Bibliothek 5-mal so groß, was eine starke Reduktion der miRNA-Expression infolge des DCR1-Verlustes nahe legt. Hingegen wurden für die siDCR-Probe 7×10^5 miRNA-Fragmente und für die Kontroll-Probe 9×10^5 Fragmente sequenziert, die zeigten, dass sich diese Bibliotheken in ihrer Größe nicht maßgeblich unterschieden. Dieses Ergebnis deutet stark darauf hin, dass der DCR1-*knockdown* nicht effizient

genug war, um die Expression von miRNAs zu beeinflussen.

Sequenzierbibliothek	WT	DCR1-/-	siC	siDCR1
Anzahl der sequenzierten miRNA-Fragmente	351251	73226	718572	898288
Verhältnisse	~5		~1,3	

Tab. 3: Anzahl der sequenzierten miRNA-Fragmente in den Bibliotheken der DCR1 *knockout*- und *knockdown*-Zellsysteme. Die Total-RNA von Wildtyp (WT) und DCR1-eliminierten MEFs (DCR1-/-) sowie von siDCR1 bzw. siC transfizierten ES-2 Zellen wurden mittels *small RNA Sequencing* analysiert. Die sequenzierten Fragmente wurden gegen die murinen bzw. humanen miRNA-Sequenzen der Datenbank miRBase v20 *alignet*.

Die statische Auswertung der normalisierten Sequenzierdaten zeigte, dass durch den DCR1-*knockout* 52 % der in WT-Probe detektierbaren miRNAs herunterreguliert wurden oder teilweise nicht mehr detektierbar waren (Abb. 17A). Dabei war die gesamte miRNA-let-7-Familie erheblich, um durchschnittlich 56-fach, reduziert. Die starke Reduktion der miRNA-Expressionen steht in guter Übereinstimmung mit der stark verringerten Bibliotheksgröße der DCR1-/- Probe. Die übrigen miRNAs blieben in ihrer Expression unverändert (30 %) oder wurde leicht angehoben (17 %). Der Grund hierfür liegt vorwiegend in einer Überrepräsentation dieser miRNAs in der normalisierten DCR1-/- Sequenzierbibliothek. Darüberhinaus könnten diese miRNAs auch unabhängig von DCR1 prozessiert werden (Cheloufi et al., 2010). Des Weiteren könnte es sich um falsch annotierte Sequenzen ribosomaler (rRNA) und Transfer-RNAs oder um unspezifische Abbauprodukt von mRNAs oder nicht-codierenden Transkripten handeln (Castellano and Stebbing, 2013). Im Gegensatz zum DCR1-*knockout* senkt der *knockdown* nur ca. 4 % der, in der Kontrollpopulation detektierbaren, miRNAs (Abb. 17B). Darunter befanden sich vier von zehn humanen miR-let-7-Familienmitgliedern, wobei diese durchschnittlich 4-fach in ihrer Expression reduziert wurden. Der Großteil der miRNAs (96 %) wurde jedoch nicht signifikant verändert. Diese Beobachtung könnte zum einen dadurch begründet werden, dass die *knockdown*-Effizienz von 80 % nicht ausreicht, um die Prozessierung von miRNAs signifikant zu beeinflussen. Zum anderen weisen miRNAs im Zellsystem eine z.T. überaus hohe Stabilität auf. So wurden in einer publizierte Studie, in welcher die DCR1-Transkription in MEFs längerfristig induzierbar geblockt wurde, dennoch miRNA-Halbwertzeiten von bis zu 220 h beschrieben (Gantier et al., 2011).

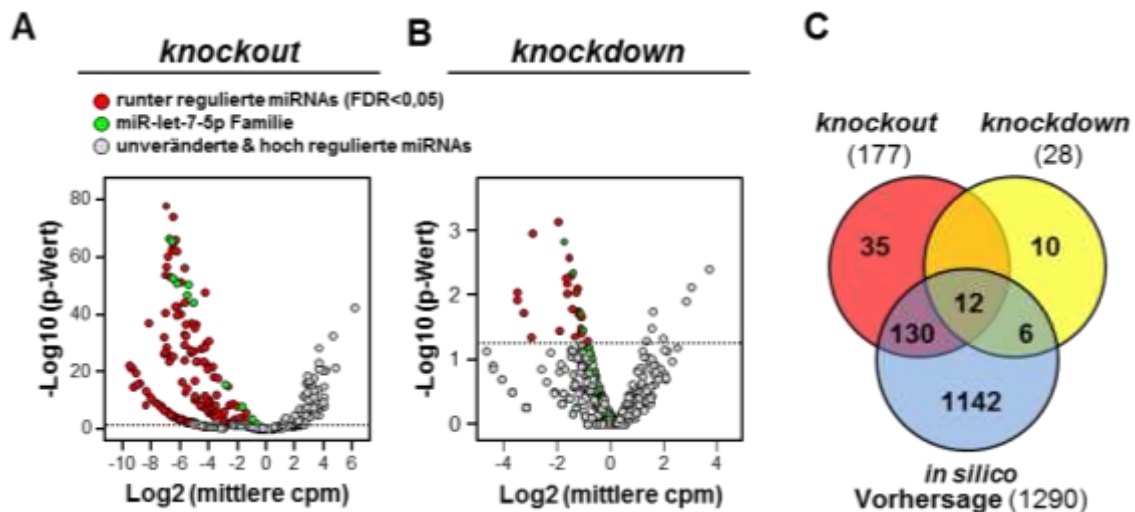


Abb. 17: Einfluss der DCR1-Depletionen auf miRNA-Expressionen. (A,B) Total-RNA von MEFs mit DCR1-*knockout* und ES-2 mit DCR1-*knockdown* (wie in Abb. 16) wurden mittels *small RNA Sequencing* analysiert. Spezifisch veränderte miRNAs wurden relativ zu Wildtyp MEFs (WT) bzw. siC-Population mittels Poisson-Exakt-Test mit einem FDR > 0,05 bestimmt. Der Signifikanzwert der sequenzierten miRNAs ist im Vergleich zur Abundanz (cpm; *counts per million*) für das (A) *knockout*- und (B) *knockdown*-Zellsystem dargestellt. (C) Vergleich der spezifisch herunter regulierten miRNAs des *knockout*- (rot) und *knockdown*- (gelb) Zellsystem mit *in silico* Analysen (blau) für den langen humanen IGF2BP1 3'-UTR mittels der *multimiR R-package database*.

Die vorangegangenen Analysen verdeutlichen, dass der *knockout* und, wenngleich auch deutlich schlechter, der *knockdown* von DCR1 die Expression von miRNAs reduziert. Um zu überprüfen, welche dieser herunter regulierten miRNAs mögliche Interaktionspartner des langen IGF2BP1 3'-UTR darstellen, wurden *in silico* Vorhersagen durchgeführt. Hierfür wurde die *multimiR R-package database*, welche basierend auf Sequenzanalysen über acht verschiedene Datenbanken 1290 putative miRNAs für den langen IGF2BP1 3'-UTR prognostiziert, verwendet. Für einen großen Anteil (65 - 70 %) der herunter regulierten miRNAs des *knockdown*- respektive *knockout*- Zellsystems wurden mindestens eine Bindesequenz im langen 3'-UTR ermittelt, wodurch diese miRNAs als putative Interaktionspartner vorgeschlagen wurden (Abb. 17C). Dieses Ergebnis deutet, im Zusammenspiel mit den vorrausgegangenen Luziferasereporter-Analysen, darauf hin, dass der IGF2BP1 3'-UTR neben der miR-let-7-Familie von weiteren miRNAs gebunden und die IGF2BP1-Expression mutmaßlich reguliert werden könnte.

3.2. Identifizierung neuer IGF2BP1 regulierender miRNAs

Die langen IGF2BP1 mRNA-Isoformen, welche den ~6,7 kb langen 3'-UTR enthalten, sind in Tumorzelllinien die am stärksten gebildeten, IGF2BP1 kodierenden Transkripte. Darüber hinaus führt ein Verlust von DCR1 zu einem Anstieg der IGF2BP1-Expression, der nicht vollständig durch die Mutation der miR-let-7-Bindungsstellen im IGF2BP1 3'-UTR kompensiert wird. Dies verdeutlicht, dass die IGF2BP1-Expression wesentlich durch miRNAs reguliert wird und legt zudem nahe, dass IGF2BP1 neben der miR-let-7-Familie auch Ziel weiterer miRNAs ist. Diese Annahme wird durch eine *in silico* Analyse mittels der *multimiR R-package* unterstützt, welche 1290 putative miRNAs für den langen IGF2BP1 3'-UTR vorschlägt. Um nun miRNAs zu identifizieren, welche tatsächlich an den IGF2BP1 3'-UTR binden können, wurde das *miRNA trapping by RNA in vitro affinity purification* (miTRAP) Studien durchgeführt. Der Vorteil dieser Affinitätsreinigung gegenüber anderen Verfahren liegt in der hohen Spezifität, einer einfachen und verhältnismäßig kostengünstigen Durchführung sowie der Identifizierung von nicht *in silico* ermittelbaren miRNAs (Braun et al., 2014). Zur Validierung wurde das regulatorische Potenzial von vier ausgewählten miRNA-Kandidaten vergleichend zur bekannten miR-let-7 mittels *gain-* und *loss-of-function* Analysen überprüft.

3.2.1 MiTRAP-Verfahren mit dem langen IGF2BP1 3'-UTR

Das miTRAP-Verfahren ist eine Affinitätsreinigung bei der eine *in vitro* transkribierte Ziel-RNA oder ein RNA-Fragment wie beispielsweise ein 3'-UTR als Köder verwendet wird (Abb. 18A). Zur Aufreinigung wird diese Köder-RNA am 3'-Ende mit zwei MS2-Aptameren fusioniert. Mit deren Hilfe kann die Ziel-RNA über ein rekombinant hergestelltes Fusionsprotein (MS2BP-MBP), das aus einem MS2-Bindeprotein (MS2BP) und einem Maltosebindeprotein (MBP) besteht, an einer Amylose-Affinitätsmatrix immobilisiert werden. Die Inkubation mit einem beliebigen Zelllysat ermöglicht die spezifische Bindung von RISC-inkorporierten miRNAs und/oder RNA-bindenden Proteinen an die immobilisierte Köder-RNA. Die miRNA-RNA Interaktionen können durch quantitative PCR oder *NGS* und die Proteinassoziationen mittels semi-quantitativen *Western Blot* Analysen untersucht werden.

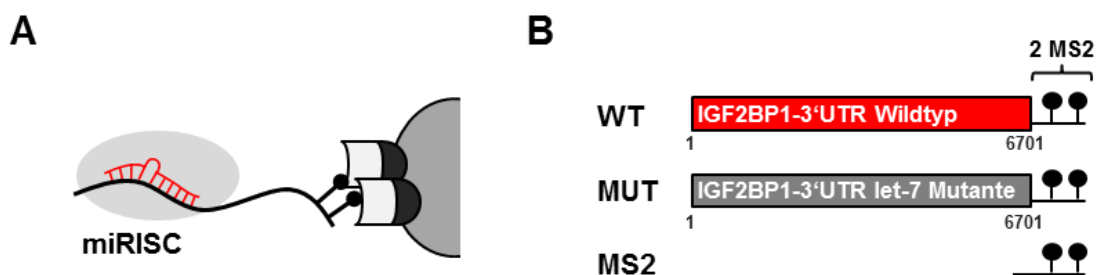


Abb. 18: MiTRAP-Verfahren und verwendete Köder-RNAs. (A) Schema des miTRAP-Verfahrens: Die Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Abb. 18

MS2-Aptamere der *in vitro* transkribierten Köder-RNAs wurden über eine MS2BP-MBP-Fusion (MS2BP, MS2-Bindeprotein (grau); MBP, Maltose-Bindeprotein (schwarz)) an einer Amylose-Affinitätsmatrix (dunkelgrau) immobilisiert. Durch Inkubation mit Zellextrakt können miRNAs und/oder RNA bindende Protein spezifisch assoziieren und respektive mittels qPCR, NGS und *Western Blot* Analysen identifiziert werden. **(B)** Schematische Darstellung der verwendeten Köder-RNAs: Langer, nicht mutierter IGF2BP1 3'-UTR (WT, rot); 3'-UTR mit je 2 Punktmutationen in allen fünf miR-let-7-Bindungsstellen (MUT, grau); 108 nt lange, aus der MCS des Vektors bestehende RNA (MS2), welche als Hintergrundkontrolle diente. Alle Köder-RNAs besaßen weder eine 5'-Cap-Struktur noch einen Poly(A)-Schwanz und waren mit 2 MS2-Aptameren fusioniert.

Für diese miTRAP-Studien wurde der ~6,7 kb lange IGF2BP1 3'-UTR, welcher am 3'-Ende mit 2 MS2-Aptameren fusioniert wurde, als Köder-RNA verwendet (Abb. 18B). Zur Überprüfung der Spezifität dieser Methode, bei Verwendung einer solchen ungewöhnlich langen RNA, wurde die bekannte IGF2BP1-regulierende miR-let-7 genutzt. Für diese miRNA-Familie wurden fünf Bindungsstellen im IGF2BP1 3'-UTR definiert und anhand von Mutationsanalysen validiert (Boyerinas et al., 2008). Somit wurde der Wildtyp 3'-UTR (WT) vergleichend zu dem miR-let-7-inaktivierten Transkript (MUT) analysiert. Als zusätzliche Hintergrundkontrolle diente eine, mit der MCS des Vektors fusionierte MS2-RNA (MS2). Das Zellextrakt wurde aus den vom Ovarialkarzinom-abstammenden ES-2 Zellen generiert.

Zunächst wurde die Beschaffenheit der immobilisierten Köder-RNAs verifiziert, indem die miTRAP-Eluat mittels Harnstoffgel-Elektrophorese aufgetrennt und die Ribonukleinsäuren durch Syto60 angefärbt wurden (Abb. 19A). Dabei wurde eine effiziente, gleichmäßige Immobilisierung der MS2- und der 3'-UTR-RNAs sowohl vor als auch nach der Inkubation mit einem ES-2-Zellextrakt festgestellt. Eine partielle Degradation dieser *in vitro* transkribierten, ungecappten und nicht polyadenylierten Köder-RNAs kann unter den Versuchsbedingungen nicht vermieden werden (Braun et al., 2014). Jedoch ist zu erwähnen, dass über ~50 % der ~6,7 kb langen Transkripte intakt blieben. Um nun zu überprüfen, ob auch mit diesen langen Köder-RNAs spezifisch RISC-inkorporierte miRNAs angereichert werden können, wurde die Assoziation mit Argonaut-Proteinen (AGO1 und AGO2) mittels semi-quantitativen *Western Blot* Analysen untersucht (Abb. 19B). Hier wurde eine spezifische Kopräzipitation von AGO1 und AGO2 mit dem WT 3'-UTR wie auch mit dem MUT 3'-UTR beobachtet, wobei die Argonaut-Mengen für das mutierte Transkript um 40 % respektive 60 % vermindert sind. Diese Beobachtung könnten sich mit einer reduzierten Assoziation der miR-let-7-Familie begründen lassen, wenn diese den Hauptanteil der IGF2BP1 regulierenden miRNAs darstellt. Als weitere Spezifitätskontrollen wurden miTRAPs mit der MS2-Köder-RNA sowie einer Hintergrundkontrolle mit MS2BP-MBP alleine durchgeführt. Für beide Proben wurden keine AGO-Kopräzipitationen festgestellt. Die Detektion des MBP bestätigt eine gleichmäßige Beladung. Zusätzlich wurde die selektive Assoziation der miR-let-7-Familie mittels *TaqMan*-basierter RT-qPCR überprüft (Abb. 19C). Dabei wurde eine signifikante Anreicherung der miR-let-7a-, -7d- und -7f-5p mit dem WT 3'-UTR beobachtet. Im Gegensatz dazu war die Kopräzipitation

mit der MUT-RNA und der MS2-Kontrolle vernachlässigbar gering, wodurch eine selektive Anreicherung der miR-let-7-Familie mit dem WT 3'-UTR bestätigt wurde. Als weitere Spezifitäts- und Hintergrundkontrollen dienten die miR-125-3p, miR-16-5p und miR-222-5p, welche mit keiner der Köder-RNAs spezifisch angereichert wurden.

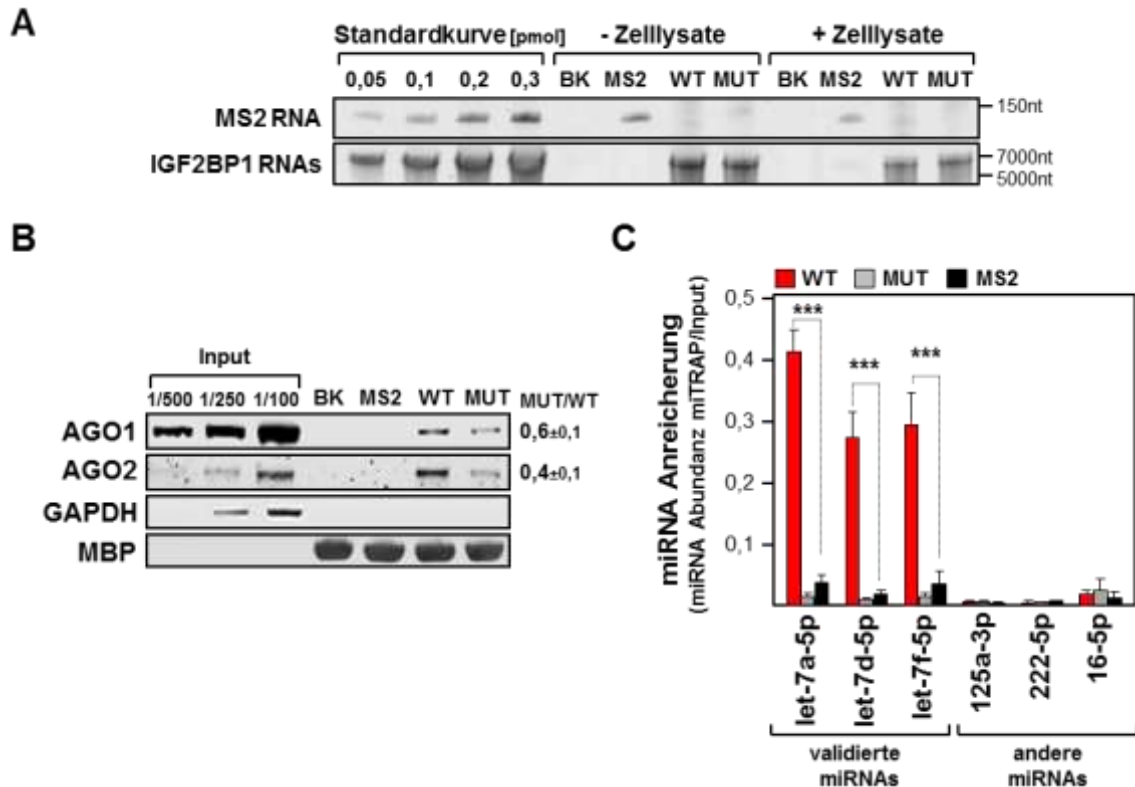


Abb. 19: Selektive Anreicherung von miR-let-7 mit dem IGF2BP1 3'-UTR. MiTRAP-Experimente unter Verwendung von ES2-Zellextrakt. Die Eluate des miTRAPs wurden zu gleichen Teilen analysiert: **(A)** Ein denaturierenden Harnstoffgel diente zum Nachweis der Beschaffenheit der Köder-RNAs durch Syto60-Färbung. **(B)** Mittels semi-quantitativen *Western Blottings* wurde die spezifische Assoziation von RISC-Komponenten (AGO1 und AGO2) kontrolliert. GAPDH diente als Negativ- und MBP als Beladungskontrolle. Die AGO-Assoziationen mit der MUT-RNA sind relativ zur WT-Probe dargestellt (rechts) **(C)** Die spezifische Assoziation von miR-let-7 wurde mittels *TaqMan*-basierter RT-qPCR relativ zum Input analysiert. Die übrigen miRNAs dienten als Spezifitäts- und Hintergrundkontrollen. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: ***p< 0,005

Zusammengenommen belegen diese Analysen, dass AGO-Proteine spezifisch an den IGF2BP1 3'-UTR assoziieren und lassen den Schluss zu, dass die miTRAP-Methode sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen erlaubt. Zudem verdeutlichen diese Experimente, dass der lange IGF2BP1 3'-UTR ein Ziel funktioneller miRISC-Komplexe ist. Die Kopräzipitation der miR-let-7-Familie wurde durch Mutation der miR-let-7-Bindestellen signifikant reduziert, was eine selektive Anreicherung einer bekannten IGF2BP1 regulierenden miRNA an den ungewöhnlich langen, *in vitro* transkribierten 3'-UTR belegt. Mit den vorausgegangenen Luziferase-Experimenten zeigen diese Ergebnisse, dass die miR-let-7-Familie ein wichtiger post-transkriptioneller Regulator von IGF2BP1 ist und dass es jedoch weitere miRNAs gibt die an den IGF2BP1 3'-UTR assoziieren.

3.2.1.1 Identifizierung neuer IGF2BP1 3'-UTR assoziierenden miRNAs in ES-2 Zellextrakt

Um neue IGF2BP1 3'-UTR assoziierende miRNAs zu ermitteln, wurden *next generation sequencing* Analysen, wie in 3.1.4 beschrieben, von je drei unabhängigen miTRAP-Experimenten mit der WT-, MUT- und MS2-RNA durchgeführt. Hierfür wurden aus den miTRAP-Eluaten und der Total-RNA des Zellextraktes (Input) spezifisch markierte Sequenzierbibliotheken generiert. Die sequenzierten Fragmente wurden mittels des *Bowtie1 aligner* gegen die humanen miRNA-Sequenzen der Datenbank *miRBase v19 alignet*. Auf Basis der TMM-normalisierten miRNA-*reads* wurden mittels eines Poisson-Exakt-Test selektiv mit dem IGF2BP1 3'-UTR angereicherte miRNAs relativ zur MS2-Kontrolle mit einem Signilifianzniveau (FDR) von < 0,05 bestimmt.

Wie zu erwarten war, unterschieden sich die Größen der nicht normalisierten Bibliotheken stark von einander. Für die WT-RNA wurden durchschnittlich 3×10^6 miRNA-Fragmente sequenziert, für MUT nur etwa $1,3 \times 10^6$ Fragmente während die MS2-Negativkontrolle nur ca. $0,6 \times 10^6$ Fragmente ergab (Tab. 4) Die Inaktivierung der miR-let-7-Bindungsstellen ergab somit einen Verlust von 60 % der Gesamt-*reads*, was in sehr guter Übereinstimmung mit der 40 %-respektive 60 %-igen Reduktion der Assoziation von AGO-Proteinen des miRISC-Komplexes steht. Im Vergleich zur MS2-Kontrolle waren die beiden IGF2BP1 3'-UTR Bibliotheken 5-mal (WT) bzw. 2-mal (MUT) größer, was für eine spezifische Assoziation von miRNAs spricht und damit bestätigt, dass der IGF2BP1 3'-UTR ein Ziel für miRNAs ist.

Sequenzierbibliothek	Input	MS2	WT	MUT
Anzahl der sequenzierten miRNA-Fragmente	13879360	616628	2963039	1.270149
Verhältnisse			~5	~2,5

Tab. 4: Anzahl der sequenzierten miRNA-Fragmente in den miTRAP-Bibliotheken. Die Eluate von drei unabhängigen miTRAP-Experimenten aus ES-2 Zellextrakt mit WT, MUT und MS2 RNA sowie der Input-Fraktion wurden mittels *small RNA Sequencing* analysiert. Die sequenzierten Fragmente wurden gegen die humanen miRNA-Sequenzen der Datenbank *miRBase v19 alignet*.

Die Auswertung der TMM-normalisierten Sequenzierdaten ergab, dass alle exprimierten miR-let-7-Familienmitglieder spezifisch und stark (durchschnittlich 30-fach) mit der WT-RNA angereichert wurden (Abb. 20A). Diese Anreicherung ging für acht der neun Mitglieder durch die Inaktivierung der miR-let-7-Bindungsstellen vollständig verloren, während für ein Vertreter (let-7g) zwar eine signifikante jedoch nur deutlich reduzierte Assoziation (~167-fach für WT; ~16-fach fürMUT) zu verzeichnen war (Abb. 20B). Der Grund hierfür könnte eine weitere *in silico* ermittelbare Bindestelle im IGF2BP1 3'-UTR (miRANDA-Vorhersage, Position 3'-UTR: 431) sein. Zusammengefasst stehen diese Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den vorangegangenen qPCR-Analysen, mit welchen ähnliche Verhältnismäßigkeiten ermittelt wurden.

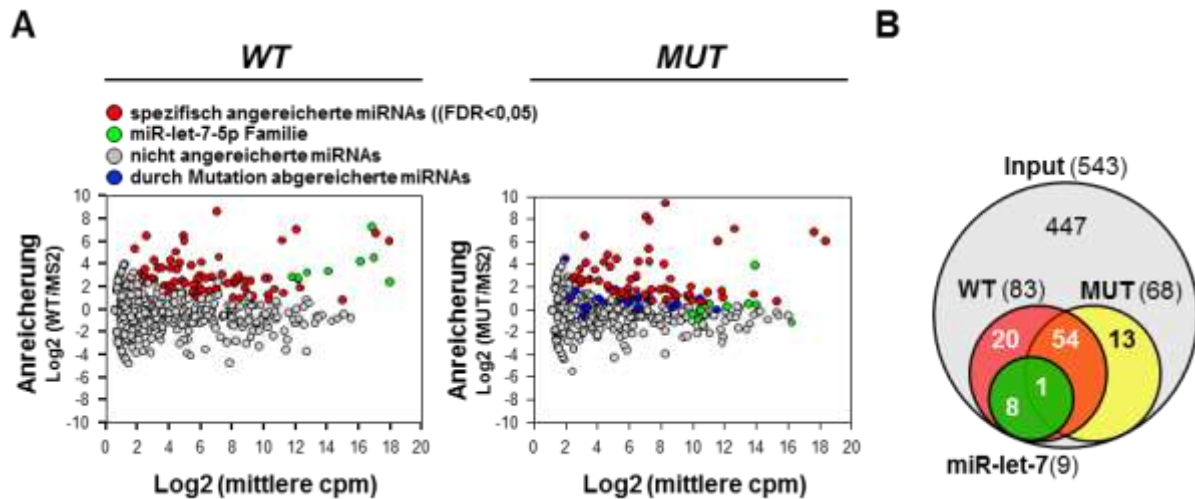


Abb. 20: Identifizierung neuer IGF2BP1 3'-UTR assoziierende miRNAs aus ES-2 Zellextrakt. Die Eluate von drei unabhängigen miTRAP-Experimenten mit WT-, MUT- und MS2-RNA sowie der Input wurden mittels *small RNA Sequencing* analysiert. Spezifisch angereicherte miRNAs wurden relativ zur MS2-Kontrolle mittels Poisson-Exakt-Test mit einem Signifikanzniveau (FDR) von < 0,05 ermittelt. **(A)** Die Anreicherung der sequenzierten miRNAs ist im Vergleich zur Abundanz (cpm; *counts per million*) für WT (links) und MUT (mitte) dargestellt. **(B)** Zusammenfassung der spezifisch angereicherten miRNAs für WT (rot) und MUT 3'-UTR (gelb). Die mit beiden Transkripten kopräzipitierten miRNAs sind orange dargestellt und die miR-let-7- Familie ist in grün gekennzeichnet.

Insgesamt wurden von 543 im Input detektierbaren miRNAs 83 (15 %) mit dem WT und 68 (13 %) mit dem MUT 3'-UTR spezifisch angereichert (Abb. 20A). Die Mehrheit (55) dieser miRNAs assoziiert mit beiden Transkripten gleichermaßen, was nahelegt, dass die Bindung durch die inaktivierten miR-let-7-Bindestellen nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 20B). Neben diesen 55 mit beiden 3'-UTRs kopräzipitierten miRNAs wurden spezifisch mit dem WT 20 weitere miRNA-Kandidaten angereichert (Abb. 20B). Ein Grund für den Verlust dieser miRNAs mit der MUT-RNA könnte sein, dass die *in silico* ermittelbaren Bindestellen dieser miRNAs teilweise oder völlig mit den mutierten miR-let-7-Bindestellen überlappen. Eine solche Überlappung der miRNA-Bindestellen wurde beispielsweise für die miR-24-3p und die miR-196a/b-5p festgestellt. Ebenso wurden 13 miRNAs spezifisch mit dem MUT-Transkript kopräzipitiert. Mutationsbedingte Veränderungen der Sekundärstruktur des Transkripts oder eine bessere Zugänglichkeit der Bindestellen durch den Verlust der miR-let-7-Assoziation könnten mögliche Gründe hierfür sein. Da der mutierte 3'-UTR als natürliches IGF2BP1-Transkript nicht vorkommt, wurden diese miRNA-Kandidaten nicht weiter betrachtet.

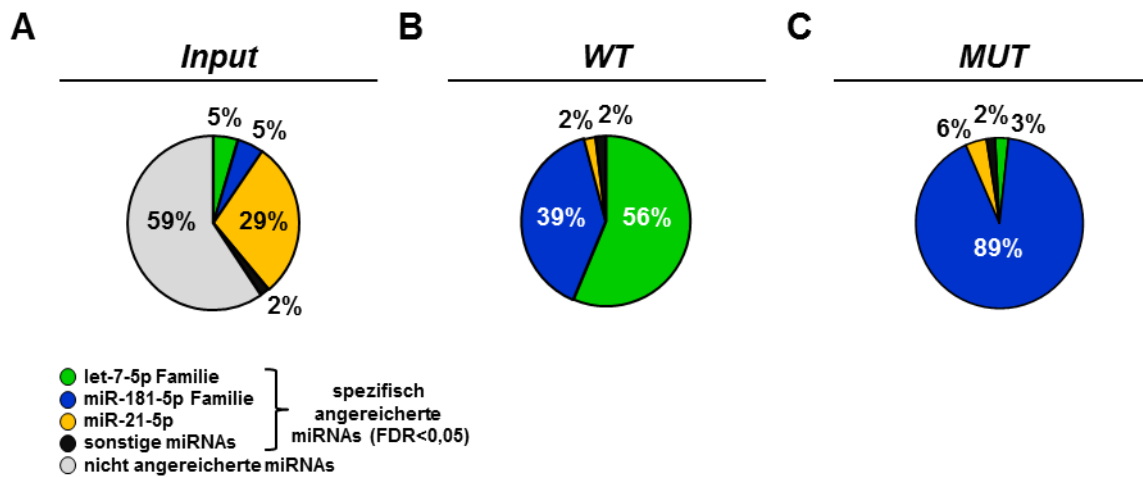


Abb.21: Anteile der präzipitierten miRNAs an den Input- und miTRAP-Bibliotheken. Basierend auf den TMM-normalisierten Bibliotheken der gekennzeichneten Bedingungen wurden die prozentualen Anteile der angegebenen miRNAs/Familien bezogen auf die Gesamtbibliothek (A) bzw. die spezifisch präzipitierten (FDR < 0,05) miRNAs (B, C) berechnet. MiRNAs, die weniger als 2 % in den Bibliotheken darstellen, wurden als sonstige zusammengefasst.

Die quantitative Betrachtung der Sequenzierdaten zeigte, dass knapp zwei Drittel der mit dem WT 3'-UTR kogereinigten miRNAs durch die miR-let-7-Familie repräsentiert wurde (Abb. 21B). Die Gründe für diese sehr starke Anreicherung sind nicht in einer Überrepräsentation dieser Familie in den Sequenzierungsbibliotheken zu suchen, da die miR-let-7-Mitglieder lediglich 5 % der Input-*reads* ausmachen (Abb. 21A). Zudem sinkt der Anteil der miR-let-7-Fragmente in der MUT-Bibliothek auf 3 % (Abb. 21C), was die Selektivität und Spezifität der Methode selbst mit sehr langen Transkripten unterstreicht. Die zweitstärkste Anreicherung (39 % der *reads*) mit dem WT 3'-UTR war für die miR-181-Familie, die vier Mitglieder (a, b, c, d) umfasst, zu verzeichnen (Abb. 21B). Das Vorkommen in der Input-Bibliothek ist vergleichbar mit dem der miR-let-7-Familie. Durch den Verlust der miR-let-7 in der MUT-Bibliothek und der damit verbundenen Verlust von 53 % der Gesamt-Fragmente, nimmt die miR-181-Familie nun 89 % aller miRNA-Sequenzen der MUT-Bibliothek ein (Abb. 21C), wobei die absolute Sequenzanzahl der beiden TMM-normalisierten Bibliotheken vergleichbar ist (WT $\sim 2,1 \times 10^6$, MUT $\sim 1,6 \times 10^6$ Sequenzen). Interessanterweise wurde diese miRNA-Familie durch *in silico* Analysen nicht identifiziert, da keine der acht analysierten Datenbanken der *multimiR R-package* Vorhersage im langen IGF2BP1 3'-UTR eine kanonische Bindungssequenz prognostizierte. Dieser Befund unterstützt, dass experimentelle Ansätze notwendig sind, um natürlich vorkommende Assoziationen qualitativ und vor allem quantitativ zu erfassen. Die miR-21-5p ist die am drittstärksten angereicherte miRNA, wobei diese miRNA einen Hauptanteil der Input-Bibliothek stellt (29 %) jedoch nur eine schwache Anreicherung (2 % WT; 6 % MUT; Abb. 21) aufweist. Für die miR-21-5p wurden *in silico* zwei Bindungsstellen (miRANDA-Vorhersage, Position 3'-UTR: 1301, 5993) postuliert, was darauf hindeutet, dass eine Regulation der IGF2BP1-Expression wahrscheinlich ist. Von unspezifischer Bindung aufgrund der hohen Abundanz in der Input-Bibliothek wurde nicht ausgegangen, da

andere stark vorhandene miRNAs wie beispielsweise das miR-221-/222-3p-Cluster (11 %) oder miR-10a-5p (8 %) nicht spezifisch angereichert wurden. Alle weiteren spezifisch angereicherten miRNAs machen ca. 2 % der WT- und MUT-Bibliotheken aus und waren auch in der Input-Bibliothek nur geringfügig vorhanden. Dies könnte zum einen an der schwachen Expression in ES-2 Zellen liegen, wie es z.B. für miR-24-3p und miR-196a/b-5p mittels RT-qPCR validiert wurde (Daten nicht gezeigt), oder daran, dass diese miRNAs keine optimalen Substrate für die Adapterligation während der Bibliotheksgenerierung darstellen. Dennoch beinhaltet diese Gruppe interessante miRNA-Kandidaten wie die tumorsuppressive miRNA 24-3p, welche als Regulator der durch IGF2BP1 stabilisierten MYC-mRNA beschrieben wurde, und drei Vertreter der miR-17-5p-Familie (miR-17-5p, miR-15a-5p, miR-20a-5p) (Lal et al., 2009; Mogilyansky and Rigoutsos, 2013; Weidensdorfer et al., 2009). Letztere waren von besonderem Interesse, da diese miRNAs dem onkogenen miR-17/92-Cluster angehören (Lal et al., 2009; Mogilyansky and Rigoutsos, 2013). Des Weiteren waren unter dieser miRNA-Kandidaten auch miR-196b-5p und miR-625 zu finden, welche in jüngsten Studien als IGF2BP1-regulierende miRNAs im Leberzellkarzinom bestätigt wurden (Rebucci et al., 2015; Zhou et al., 2015). Andere bekannte regulatorische miRNAs wie miR-494, miR-372 oder miR-873 wurden in ES-2 Zellen nicht exprimiert bzw. konnten im Zellextrakt nicht detektiert werden.

Zusammengenommen wurde die miR-let-7-Familie in dieser miTRAP-Studien als stärkster Interaktionspartner des IGF2BP1 3'-UTRs bestätigt. Darüber hinaus wurden neue *in silico* prognostizierbare und nicht prognostizierbare miRNAs mit dieser sehr langen Köder-RNA spezifisch und unabhängig von ihrer Abundanz in der Input-Bibliothek identifiziert, was in Übereinstimmung mit der durch Braun et al. publizierten miTRAP-Studie steht (Braun et al., 2014). Nach miR-let-7 sind die Vertreter der miR-181-5p-Familie mit Abstand die am stärksten angereicherten miRNA-Kandidaten im ES-2 Zellsystem. Die starke Anreicherungen von miR-let-7 und miR-181-5p könnten dahingehend interpretiert werden, dass die IGF2BP1-Expression besonders durch diese beiden miRNA-Familie kontrolliert wird, was in einem späteren Kapitel überprüft wird (siehe 3.2.2). Ob diese miRNAs allerdings auch in anderen Tumorzelllysaten ebenso stark an den IGF2BP1 3'-UTR assoziieren, wird im folgenden Kapitel analysiert.

3.2.1.2 Validierung der IGF2BP1 3'-UTR assoziierten miR-17-5p, miR-181-5p, miR-196-5p und miR-24-3p in verschiedenen Tumorzellextrakten

Um zu überprüfen, inwiefern miR-let-7 und miR-181-5p auch in anderen Tumorzellsystemen die stärksten Interaktionspartner des IGF2BP1 3'-UTRs sind und ob miR-17-5p, miR-196a/b-5p sowie miR-24-3p ebenfalls assoziieren, wurden miTRAP-Experimente mit der WT- und MS2-RNA in C-643-, U2OS- und MCF-7-Zellextrakt durchgeführt. Die vom Schilddrüsenkarzinom abstammenden C-643 Zellen wiesen dabei eine ähnliche starke IGF2BP1-Expression wie die

zuvor verwendeten ES-2 Zellen auf. Hingegen waren in den vom Osteosarkom-abstammenden U2OS-Zellen sowie der stark epithelialen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nur geringfügige IGF2BP1-Mengen zu finden. Letzteres war von besonderem Interesse, da die Herabregulation des IGF2BP1-Proteins die Folge einer starken posttranskriptioneller Regulation durch miRNAs sein könnte. Zur Ermittlung der IGF2BP1 3'-UTR assoziierenden miRNAs wurden die Eluate und der Input von je zwei unabhängige miTRAP-Experimenten wie in 3.2.1.1. durch *small RNA sequencing* analysiert und ausgewertet.

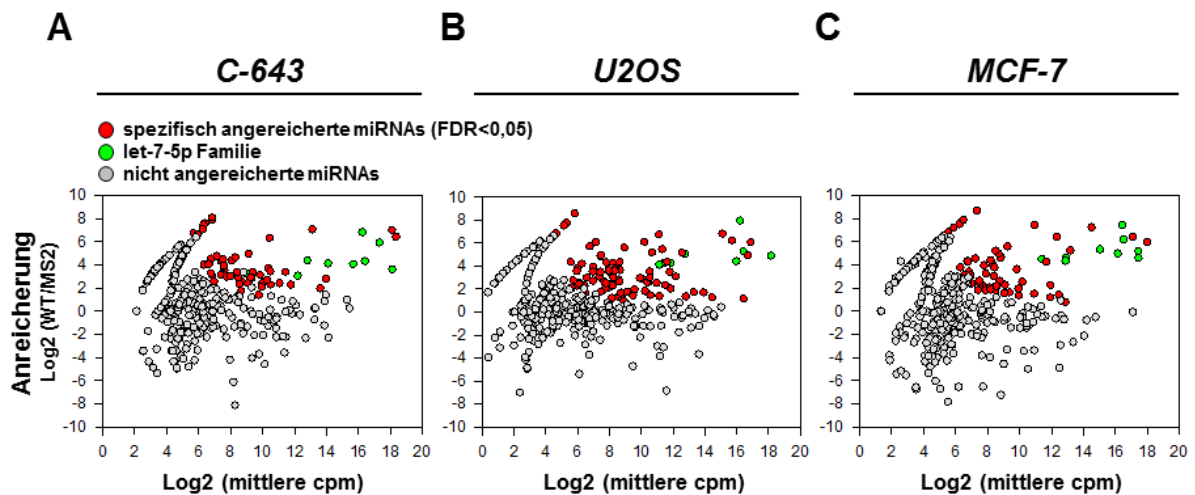


Abb.22: Identifizierung neuer IGF2BP1 3'-UTR assoziierende miRNAs aus verschiedenen Tumorzellextrakten. MiTRAP-Experimente mit der WT- und MS2-RNA unter Verwendung von Zellextrakt generiert aus (A) C-643-, (B) U2OS- oder (C) MCF-7-Zellen. Die Eluate und der Input von zwei unabhängigen miTRAP-Experimenten wurden mittels *small RNA Sequencing* analysiert. Spezifisch angereicherte miRNAs wurde relativ zur MS2-Kontrolle mittels Poisson-Exakt-Test (FDR<0,05) ermittelt. Die Anreicherung der sequenzierten miRNAs ist im Vergleich zur Abundanz dargestellt.

Die Auswertung der Sequenzierdaten zeigte, dass 61 miRNAs aus dem C-643-, 95 aus dem U2OS- und 64 aus dem MCF-7-Zellextrakt spezifisch mit der WT-RNA kopräzipitiert wurden, was durchschnittlich 15 % der im Input detektierbaren miRNAs (*read* ≥ 1) entsprach (Abb. 22). Alle exprimierten miR-let-7-Familienmitglieder wurden den analysierten Zelllysaten stark angereichert. Insgesamt wurden in allen vier untersuchten Tumorzellextrakten 130 IGF2BP1 3'-UTR-assoziierende miRNAs identifiziert, wovon 34 aus jedem Zellsystem spezifisch kopräzipitiert wurden (Tab. 5). Unter diesen „zelltypunabhängigen“ miRNAs waren neben den neun exprimierten miR-let-7-Vertretern auch die gesamte miR-181-Familie, miR-24-3p sowie drei Vertreter der miR-17-Familie (miR-17-5p, miR-15a-5p, miR-20a-5p) zu finden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in allen getesteten Tumorzelllinien eine definierte Gruppe an miRNAs den IGF2BP1 3'-UTR bindet und möglicherweise die IGF2BP1-Expression reguliert. Diese Regulation könnte möglicherweise in Abhängigkeit des Tumorzellsystems durch die Assoziation von weiteren „zelltypabhängigen“ Kandidaten (96 miRNAs) verstärkt werden. Diese zelltypabhängige Kopräzipitation von miRNAs beruht mutmaßlich auf unterschiedlichen Expressionsmustern der analysierten Tumorzelllinien. So wurde beispielsweise miR-196a/b-5p in ES-2, U2OS, C-643 aber

nicht in MCF-7-Zellen exprimiert. Des Weiteren könnten miRNA-Bindestellen zelltypabhängig durch *trans*-agierende Faktoren wie RBPs blockiert werden. Dies könnte beispielsweise für miR-21-5p möglich sein, da diese miRNA zwar in allen getesteten Tumorzelllinien stark exprimiert wurde, jedoch nur in ES-2 und U2OS-Zellextrakt mit dem IGF2BP1 3'-UTR assoziierte.

Anhand von *in silico* Analysen mittels des *multimiR R-package* wurde für alle miRNA-Kandidaten überprüft, ob diese putative Bindestellen im langen IGF2BP1 3'-UTR aufwiesen. Erstaunlicherweise wurden durchschnittlich 65 % der im Input detektierbaren miRNAs aller Tumorzelllinien als putative Interaktionspartner vorgeschlagen (Tab. 5). Von diesen *in silico* prognostizierbaren miRNAs assoziierten tatsächlich nur ca. 10 % mit dem IGF2BP1 3'-UTR, was wiederum ungefähr 77 % der identifizierten miRNA entsprach. Die übrigen 23 % der IGF2BP1 3'-UTR-assoziierten miRNAs waren sogar nicht *in silico* prognostizierbar. Insgesamt wurden für alle untersuchten Tumorzellsysteme ähnliche Verhältnismäßigkeiten festgestellt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Anwendung des miTRAP-Verfahren, da diese Methode eine experimentelle Überprüfung von *in silico* Vorhersagen erlaubt und die Identifikation von nicht prognostizierbaren miRNAs ermöglicht.

miTRAP-Experimente mit dem IGF2BP1 3'-UTR (WT-RNA)						
Tumorzellsystem	ES-2	C-643	U2OS	MCF-7	Zelltyp- unspezifisch	Zelltyp- spezifisch
Input	543	551	462	843	300	950
davon <i>in silico</i> prognostizierbar	65%	70%	60%	63%	65%	68%
spezifisch angereicherte miRNAs	83	61	95	64	34	96
davon <i>in silico</i> prognostizierbar	69	51	81	52	26	82
	(83%)	(84%)	(85%)	(81%)	(77%)	(85%)
davon miR-let-7-Mitglieder	9	9	9	9	9	9
davon nicht prognostizierbar	14	10	14	12	8	14
	(17%)	(16%)	(15%)	(19%)	(23%)	(15%)

Tab. 5: Zusammenfassung der miTRAP-Ergebnisse. Die in Abb. 20 und 22 identifizierten IGF2BP1 3'-UTR (WT) assoziierten miRNAs wurden miteinander verglichen. Anhand von *multimiR R-package* basierenden *in silico* Analysen wurden putative Bindestellen der miRNA-Kandidaten überprüft.

Die quantitative Betrachtung der Sequenzierdaten zeigte, dass die miR-let-7-Vertreter auch in C-643-, U2OS- und MCF-7-Zellextrakt die am stärksten angereicherten miRNAs waren (Abb. 23, unten). Die miR-let-7-Familie repräsentierte die Mehrheit (51 - 58 % der miRNA-reads) der WT-RNA angereicherten miRNAs, was in guter Übereinstimmung mit den vorherigen miTRAP-Experimenten mit ES-2 Zellen steht. Die zweit stärkste Anreicherung wurde ebenso für die miR-181-Familie verzeichnet. In den Input-Bibliotheken der hier untersuchten Tumorzelllinien machten die miR-let-7- und miR-181-Familien lediglich 1 - 7 % der Input-Sequenzen aus (Abb. 23, oben). Dies bestätigt erneut, dass die starke Anreicherung dieser miRNAs nicht auf der Abundanz im Input beruhte. MiR-21-5p war in U2OS-Zelllysate die drittstärkste angereicherte miRNA (Abb. 23B, unten). Wie im ES-2 Input stellt diese miRNA auch hier den Hauptanteil dar (23 %), wies

jedoch nur eine geringe Anreicherung auf (2 %). Die übrigen spezifisch angereicherten miRNAs repräsentierten nur ungefähr 4 - 6 % der WT-Bibliotheken und waren im Input dieser Zellextrakte schwach exprimiert (3 - 10 %).

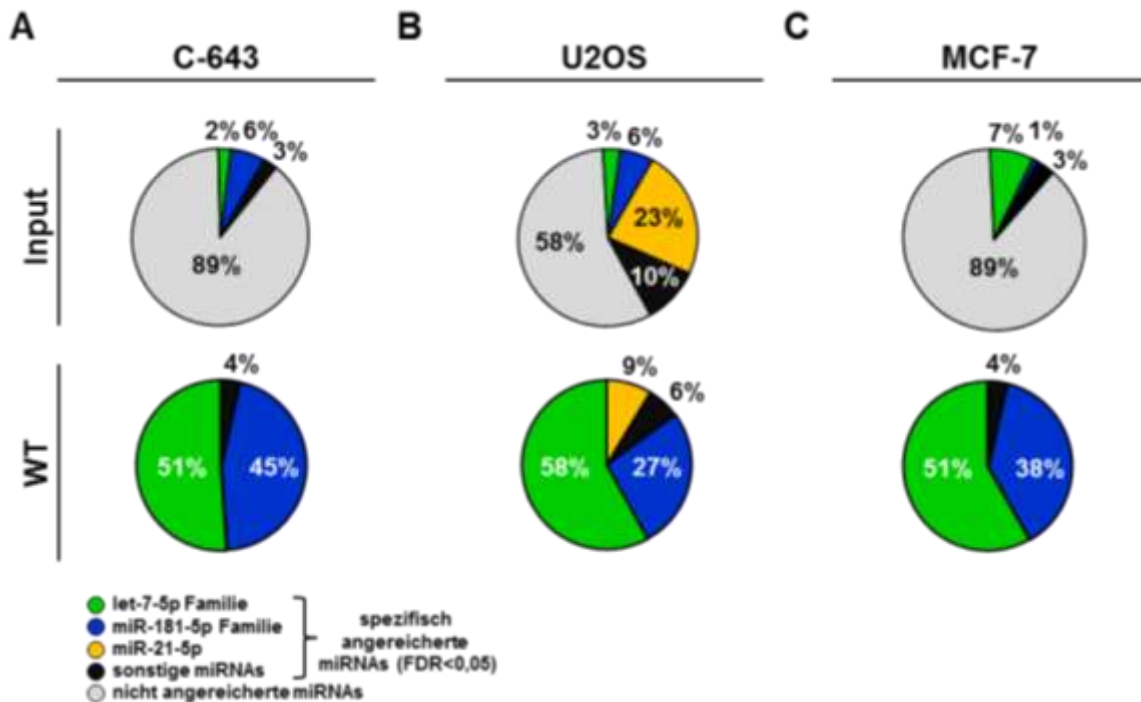


Abb. 23: Anteile der kopräzipitierten miRNAs an den Input- und miTRAP-Bibliotheken. Basierend auf den TMM-normalisierten Bibliotheken der WT- und der Input-Fraktion von miTRAP-Experimente (siehe Abb. 21) aus (A) C-643-, (B) U2OS- oder (C) MCF-7-Zellextrakt wurden die prozentualen Anteile der angegebenen miRNAs/Familien bezogen auf die Gesamtbibliothek (**oben**) bzw. die spezifisch präzipitierten miRNAs (FDR < 0,05) (**unten**) berechnet. MiRNAs, die weniger als 1 % in den Bibliotheken darstellen, wurden als sonstige zusammengefasst.

In guter Übereinstimmung mit den miTRAP-Analysen der ES-2 Zellen verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die miR-let-7- und miR-181-Familie die stärksten Interaktionspartner des IGF2BP1 3'-UTRs in C-643-, U2OS- und MCF-7-Zellextrakt waren. Diese Ergebnisse legen übereinstimmend mit den vorrausgegangenen Expressionsanalysen von miR-let-7a und IGF2BP1 (siehe Abb. 15) zudem nahe, dass die geringfügige IGF2BP1-Expression in U2OS- und MCF-7-Zellen nicht maßgeblich auf eine zelltypspezifische Assoziation von miRNA zurückgeführt werden könnte. Dennoch wurden in allen durchgeführten miTRAP-Experimenten neue IGF2BP1 3'-UTR assoziierende miRNAs identifiziert, welche sowohl „zelltypspezifisch“ als auch „zelltypunspezifisch“ an den IGF2BP1 3'-UTR assoziieren. Darunter befanden sich kürzlich beschriebene IGF2BP1-regulierende miRNAs wie beispielsweise miR-196a/b-5p und weitere interessante Kandidaten wie miR-17-5p oder miR-24-3p. Ob diese miRNAs die IGF2BP1-Expression tatsächlich regulieren und inwieweit miR-let-7- und miR-181-5p die Hauptregulatoren darstellen, wird im folgenden Kapitel analysiert.

3.2.2 Validierung der miTRAP-identifizierten miRNA-Kandidaten in ES-2 Zellen

Um zu überprüfen, ob die ausgewählten miRNA-Kandidaten die IGF2BP1-Expression in ES-2 Zellen tatsächlich regulieren, wurden *loss* und *gain-of-function* Analysen durchgeführt. Im Vorfeld dieser Experimente wurden mittels der miRANDA-Datenbank putative Bindestellen von miR-17-5p und miR-24-3p im langen IGF2BP1 3'-UTR ermittelt. Für miR-24-3p wurden zwei putative Bindungsstellen *in silico* prognostiziert, wobei diese wie die drei publizierten miR-196b-5p-Bindestellen mit denen der miR-let-7-Familie überlappen oder sich in unmittelbare Nähe dazu befinden (Abb. 24A). Wie bereits erwähnt, wurden diese miRNAs in den miTRAP-Experimenten mit der MUT-RNA nicht spezifisch angereichert, was eine Überlappung der miRNA-Bindestellen bereits andeutet. MiR-17-5p weist sechs putative Bindungsstellen auf, wovon eine in der Nähe einer miR-let-7-Bindestelle liegt. Allerdings wurde miR-17-5p mit der WT- und der MUT-RNA ähnlich stark angereichert, was nahe legt, dass sich diese Bindestellen nicht beeinflussen. Für die nicht *in silico* prognostizierbare miR-181-5p Familie wurde mittels des *RNAhybrid*-Algorithmus, basierend auf der geringsten Hybridisierungsenergie der vorgeschlagenen miRNA-mRNA, Interaktionen eine Bindesequenz zu Beginn des IGF2BP1 3'-UTRs ermittelt (Rehmsmeier et al., 2004). Auf Basis dieser Analysen war es von besonderem Interesse zu überprüfen, ob die Inaktivierung der miR-let-7-Bindestellen die Assoziation der übrigen miRNA-Kandidaten auch im zellulären Kontext beeinflusst.

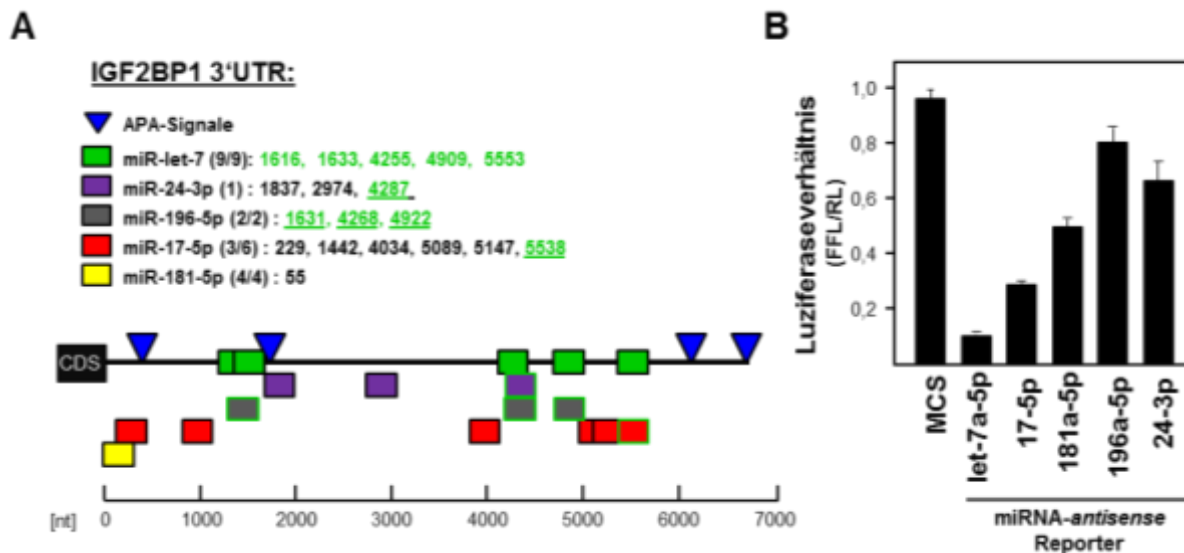


Abb. 24: Vorstellung der ausgewählten miTRAP-identifizierten miRNA-Kandidaten. (A) Schematische Darstellung des IGF2BP1 3'-UTRs mit den validierten Bindestellen von miR-let-7-5p (grün), miR-196-5p (grau) und den *in silico* prognostizierten Bindungsstellen (miRANDA-Vorhersage) von miR-24-3p (lila), miR-17-5p (rot). Eine putative Bindesequenz von miR-181-5p (gelb) wurde mittels *RNAhybrid* ermittelt. Bindestellen, die mit denen von miR-let-7 überlappen sind mit einem grünen Rahmen gekennzeichnet. **(B)** ES-2 Zellen wurden mit erkennbaren miRNA-*antisense* Luziferasereportern und dem MCS-kodierenden Leerplasmid transfiziert. Nach 48 h wurde Luziferaseaktivität bestimmt. Die Verhältnisse von FFL- und RL-Luziferaseaktivität sind dargestellt. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen zwei unabhängigen Experimenten.

Um die Effizienz der Überexpressionen und Inhibitionen von miR-let-7a-5p, miR-17-5p, miR-181b-5p, miR-196a-5p und miR-24-3p zu verifizieren, wurden miRNA-*antisense* Luziferasereporter generiert. Diese kodieren eine perfekte Bindestelle der jeweiligen miRNA. Zur Überprüfung ihrer Funktionalität wurden diese Reporter sowie das Leerplasmid transient in ES-2 Zellen eingebracht, wodurch sich die Abundanz der miRNAs im zellulären Kontext bemessen ließ. Hier wurde festgestellt, dass die FFL-Aktivität des *antisense*-Luziferasereporters von miR-let-7a bei ungefähr 10 % der RL-Aktivität lag (Abb. 24B). Im Vergleich zum Kontrollplasmid wurde dieser *antisense*-Luziferasereporter durch die endogene miR-let-7a auffallend stark reprimiert (um ~90 %). Diese Beobachtung verdeutlicht eine hohe Expression von miR-let-7a in ES-2 Zellen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die *antisense*-Konstrukte durch andere Familienmitglieder ebenso als miRNA-Zielsequenz erkannt wurden. Die Verhältnisse der relativen Luziferaseaktivitäten des miR-17-5p und miR-181b-5p *antisense*-Reporters wurden verglichen mit dem Leerplasmid auf ca. 30 % bzw. 50 % gesenkt, was eine mittlere Expression dieser miRNAs nahe legt. Hingegen wurden die *antisense*-Reporter von miR-196a-5p und miR-24-3p nur schwach reprimiert, woran eine schwache miRNA-Abundanz zu erkennen war. Aufgrund der meist schwachen bis mittleren Expressionen der ausgewählten miRNAs wurden zunächst *gain-of-function* Analysen durchgeführt. Hierfür wurden diese Kandidaten mittels synthetischer miRNAs (syn-miRNA) im Vergleich zu einer Kontroll-miRNA (syn-C) überexprimiert. Im Vergleich zum Leerplasmid wurden die Luziferaseaktivitäten der miRNA *antisense*-Luziferasereporter durch die überexprimierter synthetischen miRNAs signifikant um ca. 40 - 60 % reduziert (Abb. 25A). Dieses Ergebnis verdeutlicht eine effiziente Überexpression der miRNAs mit Ausnahme von miR-let-7a. Aufgrund der zuvor bemessenen hohen Abundanz von miR-let-7a (siehe Abb. 24B) wurde von einer moderaten Überexpression ausgegangen. Die Interaktion der überexprimierten synthetischen miRNAs mit dem IGF2BP1 3'-UTR wurde anhand von Luziferasereporter-Analysen untersucht. Hierbei wurden Luziferasereporter, welche den Wildtyp bzw. den miR-let-7-inaktivierten 3'-UTR kodieren, analysiert (siehe Abb. 16C). Die relative Luziferaseaktivität des WT-Reporters wurde durch die Transfektion der synthetischen miR-let-7a signifikant und stark reduziert (ca. 50 %). Im Einklang mit den miTRAP-Studien ging die miR-let-7-vermittelte Inhibition der Luziferaseaktivität durch die Inaktivierung der miR-let-7-Bindestellen vollständig verloren (Abb. 25B). Die Überexpression der übrigen miRNAs reduzierte die Luziferaseaktivität des WT-Reporters im Vergleich zum Leerplasmid moderat aber dennoch signifikant. Im Hinblick auf miR-24-3p und miR-196b-5p wurde die reduzierte Luziferaseaktivität des WT-Reporters durch die Inaktivierung der miR-let-7-Bindestellen fast vollständig aufgehoben, was nahe legt, dass die putativen Bindestellen dieser beiden miRNAs tatsächlich mit denen der miR-let-7-Familie überlappen. Dies wurde für die miR-17-5p und miR-181-5p erwartungsgemäß nicht festgestellt, da die Luziferaseaktivitäten der MUT- und WT-Reporter

ähnlich stark reprimiert wurden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass alle ausgewählten miRNA-Kandidaten infolge einer Überexpression den IGF2BP1 3'-UTR im zellulären Kontext reprimieren, was in guter Übereinstimmung mit den miRNA-Anreicherungen in den miTRAP-Experimenten steht. Die endogene IGF2BP1-Expression wurde durch die überexprimierte miR-let-7a erheblich gesenkt (Abb. 25C). Die Überexpression von miR-17-5p, miR-196a-5p und miR-24-3p vermindert die Protein- und mRNA-Menge von IGF2BP1 moderat, was mit der Repression des WT-Luziferasereporters gut übereinstimmt. Diese Effekte fallen im Vergleich zur miR-let-7-vermittelten Inhibition der IGF2BP1-Expression deutlich schwächer aus. Dies könnte wie im Fall der miR-196-5p-Familie durch eine geringere Anzahl an Bindestellen begründet werden. Im Gegensatz zur signifikanten Repression des 3'-UTR-Reporters blieb die endogene IGF2BP1-Expression von der Überexpression der miR-181a-5p weitestgehend unbeeinflusst. Die Bindung dieser nicht kanonischen miRNA-Familie an den endogenen 3'-UTR könnte möglicherweise durch die Sekundärstruktur der mRNA oder durch die unmittelbare Nähe der putativen miR-181-5p-Bindestellen zum Stop-Codon der CDS verhindert werden. Des Weiteren könnten möglicherweise *cis*-agierende Faktoren (RBPs), welche spezifisch mit der CDS interagieren, die Interaktion der miR-181-5p mit dem endogenen 3'-UTR beeinträchtigen. Diese Möglichkeiten könnten in weiterführenden Analysen überprüft werden.

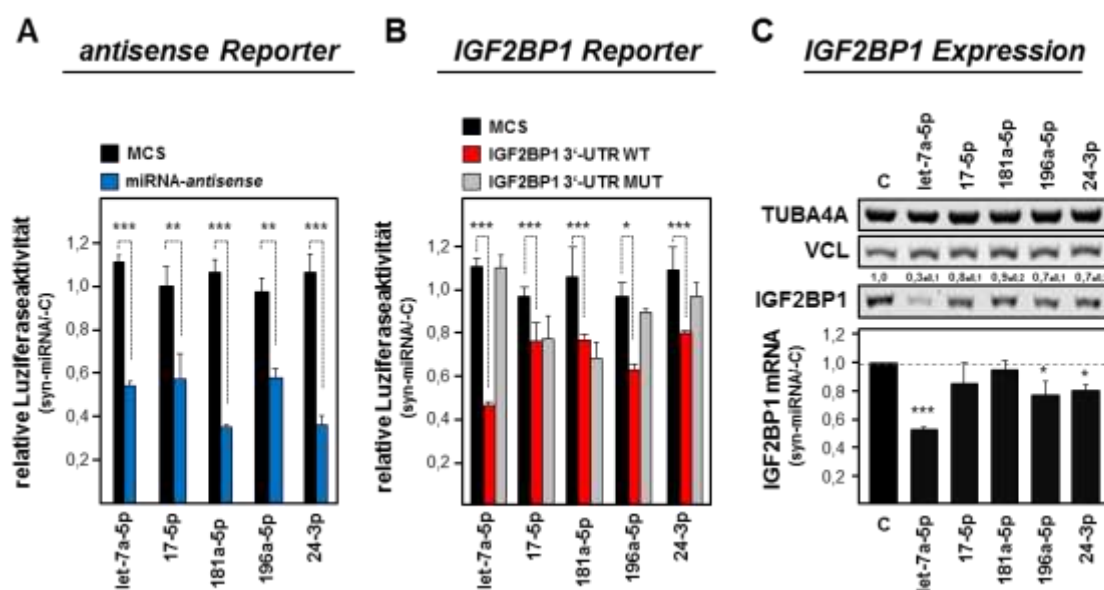


Abb. 25: Einfluss der Überexpression von miTRAP-identifizierten miRNA-Kandidaten auf die IGF2BP1-Expression. (A-C) ES-2 Zellen wurden mit synthetischen miRNAs (syn-miRNA) sowie einer Kontroll-miRNA (syn-C) transfiziert. (B,C) Für Luziferasereporter-Analysen wurden ES-2 Zellen mit Leerplasmid (MCS) und (A) erkennbaren miRNA-*antisense* Luziferasereportern oder (B) Wildtyp IGF2BP1 3'-UTR-(WT) bzw. miR-let-7 inaktivierten 3'-UTR-Luziferasereportern (MUT) kotransfiziert. Nach 48 h wurde Luziferaseaktivität bestimmt und ist relativ zur syn-C dargestellt. (C) IGF2BP1-Expression wurden mittels semi-quantitativen *Western Blottings* (oben) und RT-qPCR (unten) analysiert. VCL und TUBA4A dienen als Normalisierungs- respektive Ladungskontrollen. Expressionen sind relativ zu syn-C quantifiziert. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Für die *loss-of-function* Analysen wurden die ausgewählten miRNAs mittels *Tough Decoys* (*Decoy*, TuDs) inhibiert (Haraguchi et al., 2009). Diese 60 bp langen Haarnadel-förmigen RNAs wurden von einem lentiviralen Vektor kodiert, wodurch eine langfristige Inhibierung einer miRNA in einem beliebigen Zellsystem möglich war. *Decoys* besitzen zwei perfekte miRNA-Bindestellen, welche von *stem*-Strukturen flankiert und stabilisiert werden (Abb. 26A). Diese miRNA-Inhibitoren agieren im Zellsystem als miRNA-Ziele, indem sie von miRNAs gebunden werden und somit die Regulation endogener miRNA-Transkripte verringern (Bak et al., 2013a). Im Vergleich zu anderen miRNA-Inhibitoren, wie anti-miRs oder LNAs, besitzen *Decoys* eine höhere Suppressionskapazität (Bak et al., 2013b). Für diese Analysen wurden ES-2 Zellen stabil mit *Decoys* transduziert, welche gegen die ausgewählten miRNAs (TuD-miRNA) oder gegen eine Kontroll-miRNA (TuD-C) gerichtet waren. Um die miRNA-Inhibierung zu verifizieren, wurden miRNA-*antisense* Luziferasereporter transient in diese *Decoy*-exprimierenden Zellen eingebracht. Dabei wurde festgestellt, dass nur die miR-let-7a- und miR-17-5p-gerichteten *Decoys* die relative Luziferaseaktivität des entsprechenden miRNA-*antisense* Reporters im Vergleich zum Leerplasmid signifikant und stark erhöhten (ca. 2,5-fach) (Abb. 26B). Diese Beobachtung verdeutlicht eine effiziente Inhibierung von miR-let-7a-5p respektive miR-17-5p. Die Analysen der endogenen IGF2BP1-Expression infolge dieser miRNA-Depletionen zeigte, dass miR-let-7a die Protein- und mRNA-Menge von IGF2BP1 signifikant und stark- erhöhte (Abb. 26C). Für die Inhibierung von miR-17-5p wurde hingegen nur eine marginale Erhöhung der IGF2BP1-Expression festgestellt.

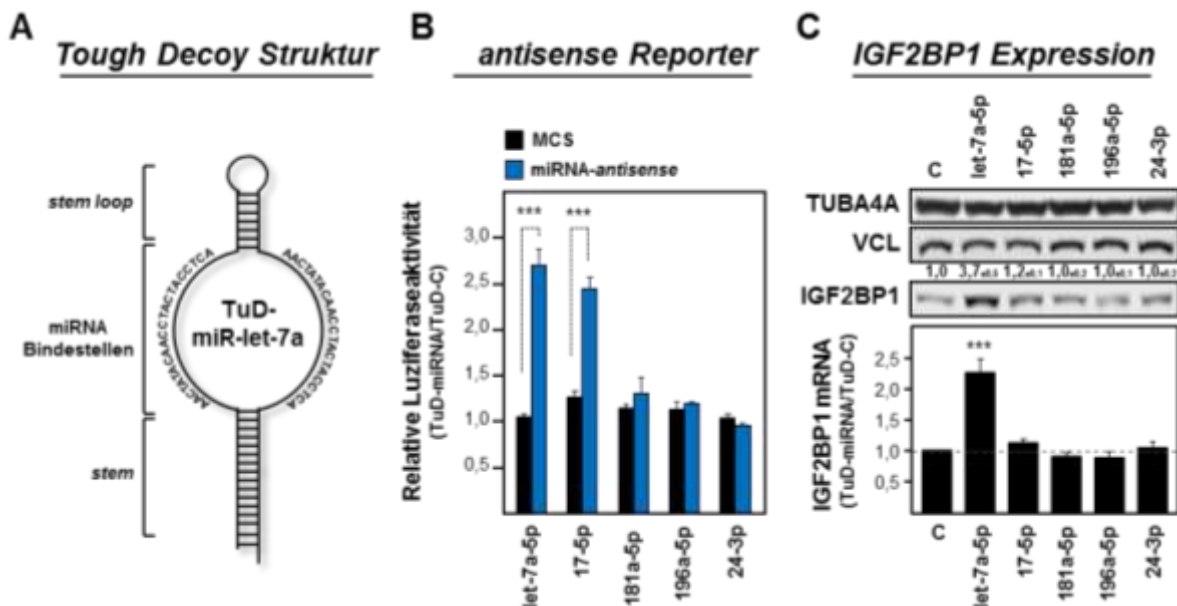


Abb. 26: Einfluss der Inhibierung von miTRAP-identifizierten miRNAs auf die IGF2BP1 Expression. (A) Schematische Darstellung des *Tough Decoy* (TuD) Inhibitors von miR-let-7a. **(B,C)** ES-2 Zellen wurden mit lentiviralen miRNA-*Decoys* (TuD-miRNA) oder Kontroll-*Decoy* (TuD-C) kodierenden Konstrukten stabil transduziert. **(C)** Zellen wurden mit angegebenen miRNA-*antisense* Luziferasereportern (blau) und Leerplasmid (MCS, schwarz) transfiziert. Luziferaseaktivität wurde 48 h nach der Transfektion bestimmt und ist relativ zu TuD-C dargestellt. **(C)** IGF2BP1-Expression wurden mittels semi-Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Abb. 26

quantitativen *Western Blottings* (oben) und RT-qPCR (unten) analysiert. VCL und TUBA4A dienten als Normalisierungs- respektive Ladungskontrolle. Expressionen sind relativ zu TuD-C quantifiziert. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: *** $p < 0,005$.

Für die übrigen miRNA-*Decoy* exprimierenden Zellpopulationen wurden keine miRNA-Inhibierung und demzufolge kein Einfluss auf die IGF2BP1-Expression festgestellt (Abb. 26). Dies könnte dadurch begründet werden, dass eine wechselseitige Affinität der miRNA-Bindungsstellen im *Decoy* die Assoziation der miRNA beeinträchtigte oder sogar verhinderte. Es wäre vorstellbar, dass ein möglicher „*Kollaps*“ der *Decoy*-Struktur durch die Einführung von Mutationen verhindert werden könnte (Haraguchi et al., 2012). Des Weiteren könnte das Suppressionspotenzial erhöht werden, indem die Stabilität des *Decoys* verstärkt wird. Die Einführung eines 4 nt langen *bulge* an der gegenüberliegenden Position, der AGO-Schnittstelle, zwischen nt 10 bis 11 der miRNA wurde zur Stabilisierung von *Decoy*-Strukturen vorgeschlagen (Haraguchi et al., 2009). Weiterhin könnten aneinander gereihte *Decoys* sogenannte *Decoy*-Cluster generiert werden (Hollensen et al., 2013).

Zusammengenommen belegen diese miRNA-Validierungen in ES-2 Zellen, dass die miTRAP-identifizierten miRNAs miR-17-5p, miR-196a-5p und miR-24-3p die IGF2BP1-Expression über eine Interaktion mit dem langen 3'-UTR infolge einer Überexpression inhibieren. Für miR-181a-5p wurde zwar kein Einfluss auf die endogene IGF2BP1-Abundanz aber eine signifikante Repression des langen IGF2BP1 3'-UTR beobachtet, was die spezifische Anreicherung dieser miRNA-Familie in den miTRAP-Studien bestätigte. Im Rahmen dieser *loss-of-function* Analysen wurden miR-17-5p und miR-24-3p als neue IGF2BP1-regulierende miRNAs identifiziert und die bekannte miRNAs 196-5p als auch miR-let-7 bestätigt. In den *gain-of-function* Analysen konnte ebenso eine marginale miR-17-5p-vermittelte Inhibition der IGF2BP1-Expression bestätigt werden. Allerdings wurde miR-let-7 im Rahmen dieser Validierungen als stärkste IGF2BP1-regulierende miRNA in ES-2 Zellen identifiziert, was die starke Anreicherung der miR-let-7-Familie in den vorherigen miTRAP-Studien bestätigt.

3.3 Charakterisierung des miR-let-7-*Decoys* in Ovarialkarzinomzellen

MiR-let-7 agiert in Tumorzellen als ein bedeutender Tumorsuppressor (Boyerinas et al., 2010). Allerdings ist die Expression der miR-let-7-Familienmitglieder in verschiedenen Tumortypen wie auch dem Ovarialkarzinom im Vergleich zum Normalgewebe stark verringert (Boyerinas et al., 2010; Dahiya et al., 2008; Nam et al., 2008; Yang et al., 2008). Die Herabregulation von miR-let-7 in primären Tumoren ist mit einer Heraufregulation verschiedener onkogener Faktoren wie den RNA-Bindeproteinen IGF2BP1 und LIN28B oder dem architektonischen Transkriptionsfaktors HMGA2 assoziiert (Boyerinas et al., 2012; Guo et al., 2006; Shell et al., 2007). Diese Faktoren wurden in *gain-of-function* Analysen als stärkste onkofötale miR-let-7-reprimierte Transkripte identifiziert (Boyerinas et al., 2008). Als wesentlicher Regulator der miR-let-7-Biogenese formiert LIN28B somit einen negativen *feedback*-Mechanismus (Guo et al., 2006; Li et al., 2012; Rybak et al., 2008). Publizierte Studien belegen, dass IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 den Zellphänotypen von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* modulieren (Bell et al., 2013; Fusco and Fedele, 2007; Wang et al., 2015b). Inwieweit eine miR-let-7-vermittelte Regulation der Expression dieser Onkogene ebenso zur Modulation von Tumorzelleigenschaften beiträgt, ist bisher nur für HMGA2 und z.T. für IGF2BP1 bekannt (Boyerinas et al., 2008; Lee and Dutta, 2007; Mayr et al., 2007; Wu et al., 2011). Jedoch beruhen diese Forschungsberichte fast ausschließlich auf miR-let-7-Überexpressionsanalysen sowie phänotypischen Korrelationen mit den einzelnen Onkogenen. Bisher publizierte *loss-of-function* Studien beinhalten nur transiente Analysen mittels LNAs oder anti-miRs, wobei zellphänotypische Studien meist vollständig fehlen. Zudem wurden dabei keine *recovery*-Experimente des jeweiligen miR-let-7-Zieltranskripts durchgeführt, um den Einfluss des regulierten Onkogens auf die Tumorzelleigenschaften zu bemessen. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob und inwieweit sich diese onkogenen Faktoren im selben Tumorzellsystem gegenseitig beeinflussen.

Um die Bedeutung der miR-let-7-vermittelten Inhibition von IGF2BP1, HMGA2 und LIN28B in Folge einer Reduktion von miR-let-7 zu analysieren, wurde diese mittels eines miR-let-7a-gerichteten *Decoys* (miR-let-7-*Decoy*) in ES-2 Zellen langfristig inhibiert. Studien von Haraguchi et al. zeigen, dass diese Inhibitoren die Expression gesamter *seed*-Familien maskieren (Haraguchi et al., 2009). Um zu überprüfen, inwieweit der miR-let-7-*Decoy* tatsächlich weitere Familienmitglieder inhibiert, wurden *antisense*-Luziferasereporter für miR-let-7a, -7d- und -7i-5p generiert. Diese drei Vertreter der miR-let-7-Familie, welche insgesamt zehn reife miRNAs umfasst, unterschieden sich im 3'-Bereich um 1 bis 4 Nukleotide (Abb. 27A; let-7i: 4 nt Unterschied zu let-7a). Aufgrund der hohen Expression der miR-let-7-Familie in ES-2 Zellen lag die durchschnittliche Firefly-Aktivität dieser *antisense*-Reporter bei ca. 10 - 20 % der *Renilla*-Aktivität. Durch die Expression des miR-let-7-*Decoys* wurde die *Firefly*-Aktivität signifikant auf

30 - 40 % erhöht. Daraus ergab sich im Vergleich zum Kontroll-*Decoy* eine Steigerung der relativen Luziferaseaktivität der getesteten *antisense*-Reporter um das ~3-Fache, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen diesen *antisense*-Luziferasereportern festgestellt werden konnte (Abb. 27B). Dahingegen blieb das Leerplasmid unbeeinflusst. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der miR-let-7-*Decoy* die gesamte miR-let-7-Familie inhibierte, wobei keine vollständige Inaktivierung durch diesen *Decoy* in diesem Zellsystem erreicht wurde.

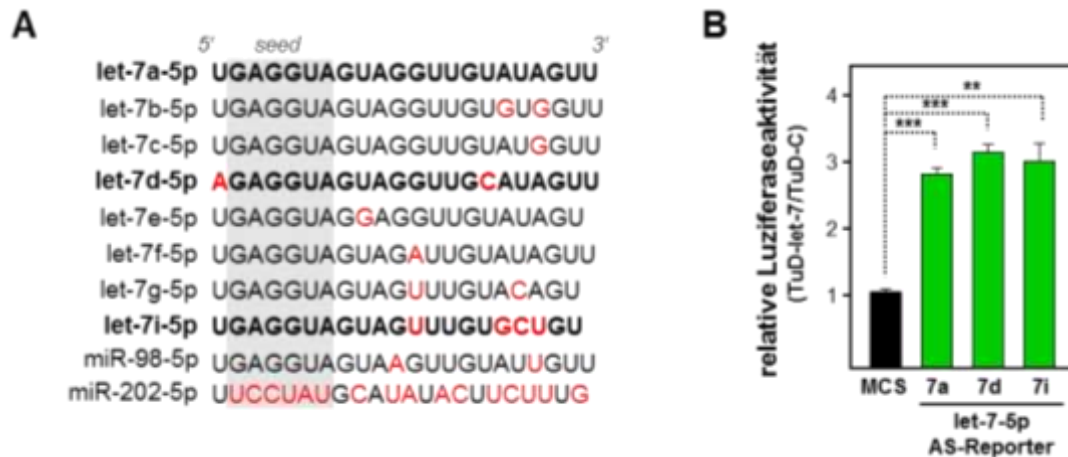


Abb. 27: Inhibierung der miR-let-7-Familie mittels Tough Decoy Inhibitor. (A) Darstellung der miRNA-Sequenzen der humanen miR-let-7-Familie. Unterschiedliche Nukleotide im Vergleich zu miR-let-7a sind rot gekennzeichnet. Modifiziert nach (Kolenda et al., 2014) (B) ES-2 Zellen wurden mit lentiviralen miR-let-7-*Decoy* (TuD-let-7) oder Kontroll-*Decoy* (TuD-C) kodierenden Konstrukten stabil transduziert und danach mit angegebenen miR-let-7 *antisense*-Luziferasereportern (AS, grün) oder dem Leerplasmid (MCS, schwarz) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: **p<0,01; ***p< 0,005.

3.3.1 Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf die IGF2BP-, HMGA2- und LIN28B-Expression

Um den Einfluss der Inhibierung von miR-let-7 auf die IGF2BP-, HMGA2- und LIN28B-Expression zu analysieren, wurden semi-quantitativen *Western Blot* und RT-qPCR Analysen durchgeführt. Die Expression der gesamten IGF2BP-Familie wurde in den miR-let-7-*Decoy* exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation signifikant erhöht, wobei IGF2BP1 das am stärksten regulierte Familienmitglied war (~3,5-fach) (Abb. 28B, C). Auch die Protein- und mRNA-Abundanz von HMGA2 (~4,5-fach) und LIN28B (~3-fach) wurde durch den Verlust von miR-let-7 deutlich angehoben. Insgesamt nahm die Effizienz der miR-let-7-vermittelten Erhöhung der Proteinsynthese mit zunehmender Anzahl an validierten respektive *in silico* prognostizierbaren Bindungsstellen im 3'-UTR der analysierten Transkripte signifikant zu (Abb. 28A, D). Zudem wurden die Protein- und mRNA-Mengen gleichermaßen durch die miR-let-7-Inhibierung erhöht, was nahe legt, dass die miR-let-7-vermittelte Repression dieser Transkripte auf einer Destabilisierung der mRNA beruhte (Abb. 28C). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit publizierten miRNA-Überexpressionsanalysen, welche postulieren, dass miR-let-7

den exonukleolytischen Abbau der HMGA2-mRNA induziert (Lee and Dutta, 2007). Die 3'-UTR abhängige Regulation dieser Faktoren wurde mittels Luziferasereportern validiert, wobei der Wildtyp 3'-UTR (WT) von LIN28B, IGF2BP1 und HMGA2 verwendet wurde. Zur Verifizierung der Spezifität wurden 3'-UTR-Reporter (MUT) generiert, in welchen alle (validierten und *in silico* prognostizierten) miR-let-7-Bindestellen durch je zwei Punktmutationen in der *seed*-Region inaktiviert waren (Mayr and Bartel, 2009; Mayr et al., 2007). Auf eine Analyse der übrigen IGF2BPs wurde aufgrund der deutlich schwächeren miR-let-7-vermittelten Repressionen und aus Zeitgründen verzichtet.

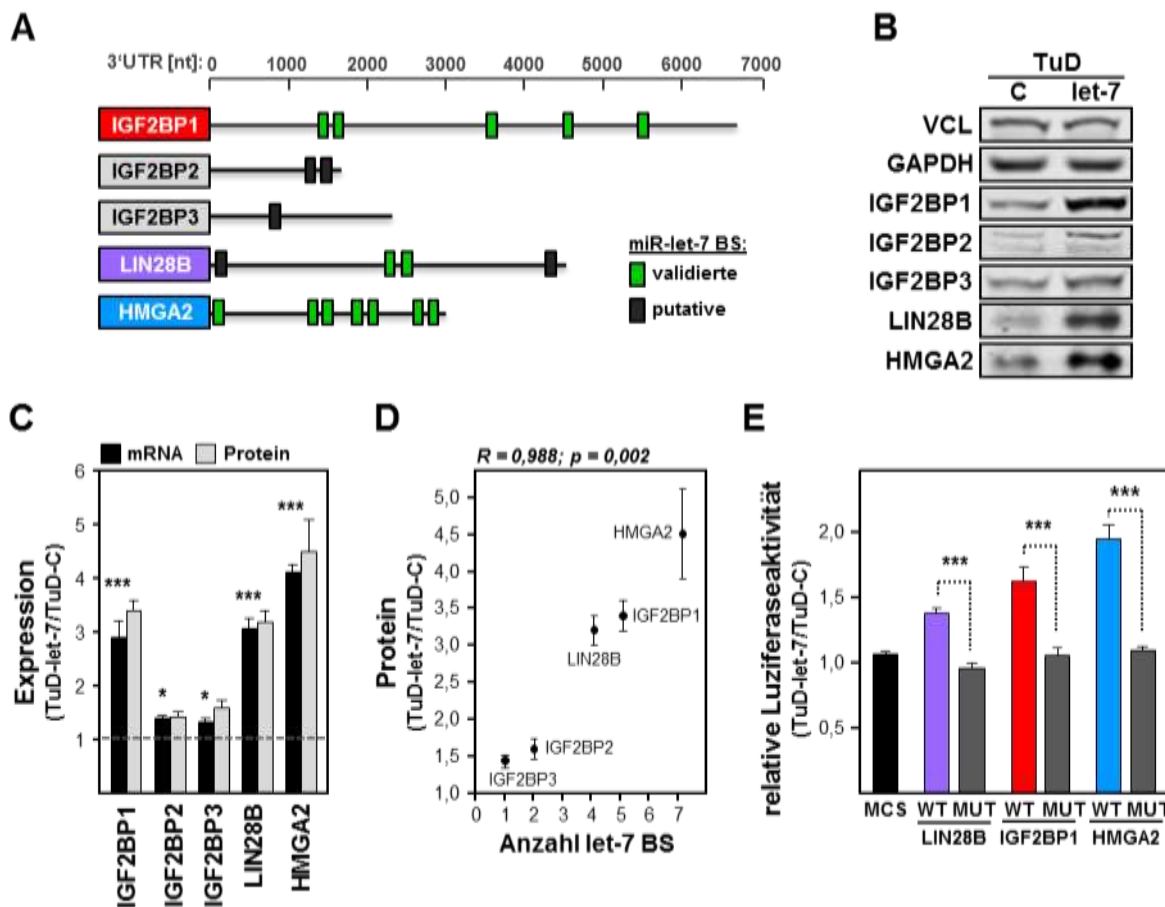


Abb. 28: Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf die IGF2BP-, LIN28B- und HMGA2-Expression. **(A)** Schematische Darstellung der mRNAs von IGF2BP1-3, LIN28B und HMGA2 mit validierten (schwarz) oder *in silico* (grün, miRanda-Vorhersage) ermittelten miR-let-7-Bindestellen (BS). **(B-D)** Die Expression der miR-let-7-*Decoy* (TuD-let-7) und Kontroll-*Decoy* (TuD-C) exprimierenden Zellen wurden mittels **(B)** semi-quantitativen *Western Blottings* und **(C)** RT-qPCR analysiert. Die Protein- und mRNA-Mengen sind normalisiert zu VCL quantifiziert. **(D)** *Pearson*-Korrelation der relativen Proteinexpression mit der Anzahl der miR-let-7-BS. Korrelationskoeffizient (R) und p-Wert (p). **(E)** Für Luziferasereporter-Analysen wurden *Decoy*-Zellen mit Leerplasmid (MCS), Wildtyp 3'-UTR- (WT) und miR-let-7 inaktivierten 3'-UTR-Luziferasereportern (MUT) transfiziert. Nach 48 h wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Die Luziferaseaktivitäten der WT-Reporter nahmen mit steigender Anzahl an miR-let-7-Bindungsstellen signifikant zu (Abb. 28E). Dabei wies der LIN28B 3'-UTR-Luziferasereporter mit vier miR-let-7-Bindestellen eine ~1,4-fache Erhöhung auf. Für den IGF2BP1 3'-UTR, welcher fünf

miR-let-7-Bindesequenzen besitzt, und im Fall von HMGA2 mit sieben Bindestellen wurde die Luziferaseaktivität auf das 1,6- respektive 1,8-Fache erhöht. Diese Erhöhungen der Luziferaseaktivitäten wurden durch die Inaktivierung der Bindestelle vollständig aufgehoben. Allerdings war der Anstieg der Luziferaseaktivitäten der WT-Reporter geringer als die Erhöhung der endogenen Proteinexpressionen. Mögliche Gründe hierfür könnten einerseits eine im Vergleich zum endogenen Transkript höhere Abundanz der überexprimierten Reporter sein. Andererseits tragen Veränderungen der Sekundärstruktur dieser artifiziellen 3'-UTR-Reporter als auch das Fehlen von weiteren *cis*-Elementen aus anderen Regionen der mRNA möglicherweise zu dieser Diskrepanz bei. Zusammengenommen belegen diese Ergebnisse, dass die *Decoy*-vermittelte Inhibierung der miR-let-7-Familie die Expression von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 stark erhöht. Diese Steigerung korrelierte direkt mit der Anzahl der miR-let-7-Bindestellen im 3'-UTR dieser onkogenen Faktoren. In diesem Zusammenhang wurden zwei weitere *in silico* ermittelte miR-let-7-Bindungsstellen im LIN28B 3'-UTR bestätigt. Des Weiteren wurde hier erstmals eine miR-let-7-vermittelte Regulation der beiden übrigen IGF2BPs in einer *loss-of-function* Analyse beschrieben. Die Validierung der putativen Bindestellen im 3'-UTR dieser miR-let-7-Ziele sollte in zukünftigen Studien durchgeführt werden.

Um zu untersuchen, ob IGF2BP1, HMGA2 und LIN28B in den miR-let-7-*Decoy* experimentierenden Zellen die am stärksten hoch regulierten miR-let-7-Ziele sind, wurden *next generation sequencing* Analysen (siehe 2.2.2.6) durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten durch die *Core Unit* DNA-Technologien des IZKF der Universität Leipzig. Hierbei wurde die Total-RNA der miR-let-7- und Kontroll-*Decoy*-Zellen nach der Depletion der ribosomalen RNAs unter Hitze fragmentiert. Diese RNA-Fragmente wurden revers transkribiert, der cDNA-Zweitstrang synthetisiert und mit Adaptern markiert. Maximal 10 Sequenzierbibliotheken wurden für die *Cluster*-Generierung auf eine Spur des Sequenzierchips geladen und anschließend 2x100 bp sequenziert. Die bioinformatische Auswertung der NGS-Daten erfolgt durch Danny Misiak (AG Hüttelmaier, Universität Halle Wittenberg). Hierbei wurden die sequenzierten Fragmente mittels *TopHAT* gegen das humane Genom *alignet* und nach einer TMM-Normalisierung die differentiell exprimierten mRNAs mit einer von $FDR < 0,05$ bestimmt. Dabei zeigte sich, dass HMGA2 und IGF2BP1 die am stärksten signifikant hoch regulierten Transkripten waren (Tab. 6). LIN28B war in den beiden analysierten Experimenten ähnlich stark (~1,9-fach) aber nicht signifikant erhöht, weshalb es hier nicht unter den stärksten heraufregulierten Transkripten zu finden war. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten miR-let-7b-Überexpressionsanalysen, in welchen IGF2BP1, HMGA2 und LIN28B als stärkste onkofötale miR-let-7-Zieltranskripte in Lungen- (A549) und Leberkarzinomzelllinien (HepG2) identifiziert wurden (Boyerinas et al., 2008). Erwartungsgemäß sind unter den übrigen hoch regulierten RNAs weitere putative miR-let-7-Ziele zu finden, welche allerdings in dieser Arbeit nicht näher betrachtet wurden.

Gensymbol	Genname	TuD-C	TuD-let-7	FC	BS
HMGA2	high mobility group AT-hook 2	44,9	144,7	3,2	7
IGF2BP1	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	74,9	198,5	2,7	5
TFAP2A	<i>transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)</i>	13,7	34,1	2,5	1
RRAS	<i>related RAS viral (r-ras) oncogene homolog</i>	10,5	25,7	2,4	-
ARID3B	<i>AT rich interactive domain 3B (BRIGHT-like)</i>	13,2	29,5	2,2	5
FAM222B		12,3	27,2	2,2	-
HDHD1	<i>haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1</i>	17,7	37,9	2,1	1
BCL9	<i>B-cell CLL lymphoma 9</i>	18,8	39,9	2,1	-
TGFB2	<i>transforming growth factor, beta 2</i>	16,7	35,3	2,1	-
WIPF1	<i>WASWASL interacting protein family, member 1</i>	15,7	32,2	2,1	

Tab. 6: Die zehn stärksten hochregulierten mRNAs infolge der miR-let-7-Inhibierung. Total-RNA der stabil transduzierten miR-let-7-*Decoy* und Kontroll-*Decoy* Zellen (siehe Abb. 28) wurde durch *Next Generation Sequencing* analysiert. Die sequenzierten Fragmente wurden gegen das humane Genom *aligned* und nach einer TMM-Normalisierung statistisch ausgewertet. Signifikant hochregulierte mRNAs wurde relativ zum Kontroll-*Decoy* mittels Poisson-Exakt-Test mit einer FDR<0,05 bestimmt. Die TMM-normalisierten mRNA-*reads* sowie das Verhältniss (FC) von TuD-let-7 zu TuD-C der mRNAs sind dargestellt. Putative miR-let-7-Bindestellen (BS) im 3'-UTR dieser Transkripte wurden mittels miRANDA ermittelt. Im Fall von HMGA2 und IGF2BP1 sind diese bereits validiert.

Um das onkogene Potenzial des miR-let-7-inhibierenden Proteins LIN28B in ES-2 Zellen zu analysieren, wurden stabile GFP-LIN28B- und GFP-überexprimierende Zellpopulationen generiert. Der Einfluss der forcierte Überexpression des GFP-fusionierten LIN28B-Proteins auf die Abundanz von miR-let-7 wurde mittels Luziferasereporter-Analysen und *Northern Blottings* verifiziert. Dabei zeigte sich, dass die relative Luziferaseaktivitäten der *antisense*-Reporter von miR-let-7a, -7d und -7i infolge der LIN28B-Überexpression im Vergleich zum GFP-Klon stark um Faktor ~2,5 (let-7i) bis ~4,5 (let-7a) erhöht wurden, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen diesen *antisense*-Reportern festgestellt wurde (Abb. 29A). Die endogene miR-let-7a-Menge der LIN28B-überexprimierenden Zellen wurde im Vergleich zur Kontrollpopulation um ca. 70 % verringert (Abb. 29B, unten). Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Überexpression von LIN28B in ES-2 Zellen die Abundanz der gesamten miR-let-7-Familie inhibiert. Die IGF2BP-, HMGA2- und LIN28B-Expressionen wurden erwartungsgemäß infolge der LIN28B-Überexpression signifikant erhöht (Abb. 29B oben, C). Diese Expressionsanstiege fielen im Vergleich zu den Beobachtungen des miR-let-7-*Decoys* höher aus, was durch eine stärkere LIN28B-vermittelte Inhibierung der miR-let-7-Familie begründet werden konnte. Im Hinblick auf LIN28B und HMGA2 heben möglicherweise Sekundäreffekte den Expressionsanstieg im LIN28B-Klon zusätzlich an. Zudem war die Proteinabundanz dieser beiden Onkogene stärker erhöht als die mRNA-Expression. Dies könnte mutmaßlich dadurch begründet werden, dass LIN28B über eine direkte Bindung die Translation dieser mRNAs fördert, wobei eine Autoregulation des LIN28B-Transkripts bereits beschrieben wurde (Graf et al., 2013; Hafner et al., 2013). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Überexpression von LIN28B über die Inhibierung von miR-let-7 einen starken Einfluss auf die Expression von IGF2BP1, HMGA2 und LIN28B selbst hat. Inwieweit LIN28B möglicherweise

diese Transkripte über einen miR-let-7-unabhängigen Regulationsmechanismus beeinflusst, könnte in zukünftigen Studien betrachtet werden.

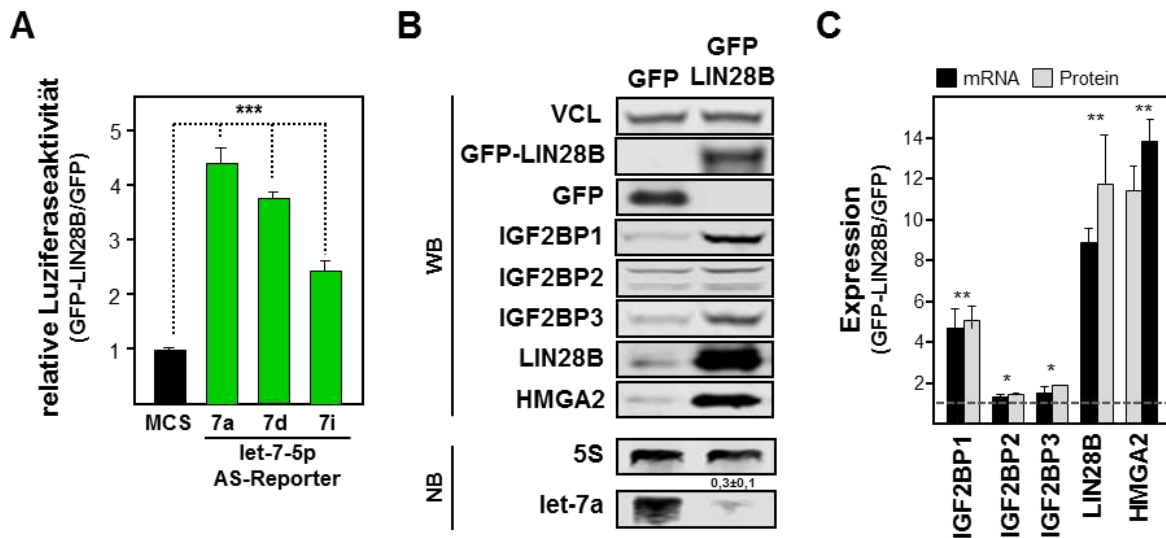


Abb. 29: Inhibition von miR-let-7 durch Überexpression von LIN28B in ES-2 Zellen. (A-C) ES-2 Zellen wurden mit lentiviralen GFP-LIN28B- und GFP-kodierenden Konstrukten stabil transduziert. (A) Zellen wurden mit angegebenen miR-let-7-*antisense* (AS, grün) Luziferasereportern oder dem Leerplasmid (MCS, schwarz) transfiziert. Nach 48 h wurde Luciferaseaktivität bestimmt. (B-C) Die Protein- und -miR-let-7-Expression wurde mittels *Western Blottings* (WB) respektive *Northern Blottings* (NB) sowie die mRNA-Abundanz mittels RT-qPCR analysiert. Die Protein- und mRNA-Mengen wurden normalisiert zu VCL quantifiziert. Die Abundanz der miR-let-7a-5p wurde zur 5S-RNA normalisiert. Expressionen sind relativ zu TuD-C dargestellt. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Die vorangegangenen Studien verdeutlichen eine starke miR-let-7-vermittelte Heraufregulation von IGF2BP1, HMGA2 und LIN28B in ES-2 Zellen infolge der miR-let-7-Reduktion, wobei die Überexpression von LIN28B die Abundanz dieser Faktoren verstärken kann. Um zu überprüfen, ob diese onkogenen Faktoren auch im primären Ovarialkarzinom koexprimiert sind, wurden Expressionskorrelations-Studien zur IGF2BP1-, HMGA2- und LIN28B-mRNA mittels der R2-Datenbank basierend auf zwei *Mikroarray*-Analysen von ovarialen Tumoren durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden von Simon Müller im Rahmen seiner Masterarbeit angefertigt. Dabei wurde eine signifikant positive Korrelation für jedes analysierte Onkogene zu den beiden übrigen Faktoren in beiden Datensätzen festgestellt, wobei eine Abstufung zuerkennen war (Abb. 30). Die Abundanz der langen IGF2BP1-Transkripte war am Stärksten mit LIN28B im Bowtell-Datensatz oder mit HMGA2 im EXPO-Datensatz korreliert (Abb. 30B, C). Das jeweilige andere Transkript war unter den 20 stärksten korrelierten Genen zu finden. IGF2BP1 war das am stärksten positiv korrelierte Gen von LIN28B, wobei HMGA2 deutlich schwächer war. Darüber hinaus waren auch IGF2BP1 und LIN28B positiv mit HMGA2 assoziiert, wenn diese auch nicht unter den am besten korrelierten Genen zu finden waren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass IGF2BP1, HMGA2 und LIN28B auch in primären ovarialen Tumoren koexprimiert wurden. Diese Koexpression könnte möglicherweise auf einer Reduktion der miR-let-7-Familie beruhen und

könnte durch eine gegenseitige Beeinflussung dieser onkogenen Faktoren verstärkt werden.

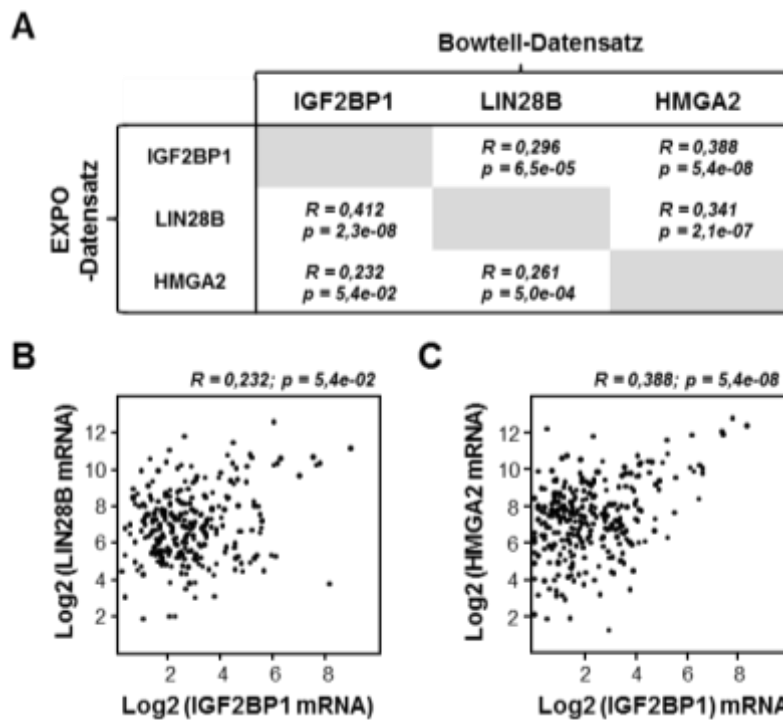


Abb. 30: Korrelationsanalysen zur mRNA-Expression von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 im primären Ovarialkarzinom. R²-Datenbank-Analysen basierend auf zwei *Mikroarray*-Analysen von primären ovariellen Karzinomen (EXPO-Datensatz mit 256 Tumorproben; Bowtell-Datensatz mit 285 Tumorproben) (A) *Pearson*-Korrelationen der mRNA-Expressionen von IGF2BP1 (227377_at), LIN28B (229349_at) und HMGA2 (208025_s_at). Die jeweilige stärkste Korrelation ist (B) IGF2BP1 und LIN28B (EXPO) respektive (C) IGF2BP1 und HMGA2 (Bowtell). Korrelationskoeffizienten (R) und p-Werte.

Zusammengenommen belegen die vorrangigsten Studien, dass die Reduktion von miR-let-7 zu einer starken Heraufregulation der IGF2BP1-, HMGA2- und LIN28B-Expression in ES-2 Zellen führt. Diese onkogenen Faktoren sind ebenso im primären Ovarialkarzinom detektierbar. Inwieweit die Expressionserhöhungen dieser Onkogene infolge der miR-let-7-Inhibierung den Tumorzellphänotypen von ES-2 Zellen modulieren, wird in folgenden Kapiteln im Detail analysiert.

3.3.2. Verifizierung der siRNA-vermittelten Depletionen von IGF2BP1, HMGA2 und LIN28B

Um zu untersuchen, ob die miR-let-7-vermittelten Expressionserhöhungen von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 einen wesentlichen Einfluss auf den Tumorzellphänotypen von ES-2 Zellen haben, wurden diese Faktoren in den miR-let-7-*Decoy*-Zellen spezifisch depletiert. Für diese *recovery*-Analysen wurden siRNA-Pools verwendet, da durch deren Verwendung Nebeneffekte (*off-target-effects*) von einzelnen siRNAs stark verringert werden können (Hannus et al., 2014). Die Effizienzen der siRNA-vermittelten *knockdowns* wurden mittels semi-quantitativen *Western Blottings* und RT-qPCR Analysen überprüft. Die, infolge der miR-let-7-Inhibierung, stark erhöhten IGF2BP1-, HMGA2- und LIN28B-Expressionen wurden durch die jeweilige siRNA-Transfektion auf das ungefähre Ausgangsniveau des Kontroll-*Decoys* reduziert (Abb. 31A, B). Dahingegen blieb die Protein- und mRNA-Abundanz der onkogenen Faktoren in den miR-let-7-*Decoy* Zellen von der Transfektion einer Kontroll-siRNA (siC) unbeeinflusst.

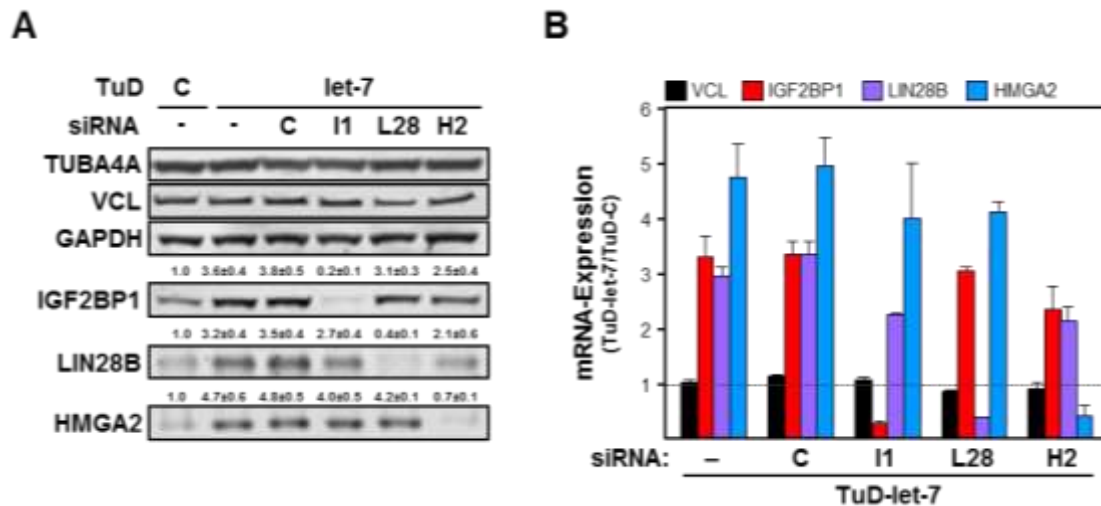


Abb. 31: Validierung der siRNA-vermittelten Depletionen von IGF2BP1, LIN28B, und HMGA2 in den miR-let-7-Decoy Zellen. MiR-let-7-Decoy (TuD-let-7) und Kontroll-Decoy (TuD-C) Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (siC = C; siIGF2BP1 = I1; siLIN28B = L28; siHMGA2 = H2). Nach 72 h wurde die Protein- und mRNA-Expression mittels (A) semi-quantitativen Western Blottings und (B) RT-qPCR analysiert. Die Protein- und mRNA-Mengen wurden zu VCL normalisiert. Die Expressionen sind relativ zum Kontroll-Decoy dargestellt. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten.

Darüber hinaus zeigten diese Expressionsanalysen, dass die Depletion der einzelnen Onkogene die Expression der beiden übrigen Faktoren geringfügig senkte. So verminderte der IGF2BP1 *knockdown* die Protein- und mRNA-Menge von LIN28B und HMGA2 marginal, was darauf hindeuten könnte, dass IGF2BP1 die Stabilität dieser Transkripte moduliert. Neueste Studien postulieren, dass das IGF2BP1-Paralog IGF2BP3 das HMGA2-Transkript stabilisiert, indem es dieses vor der miR-let-7-vermittelten Degradation schützt (Jonson et al., 2014). Ein solcher Regulationsmechanismus wäre auch für IGF2BP1 und die HMGA2- respektive LIN28B-mRNA denkbar. Der geringfügige Einfluss der LIN28B-Depletion auf die IGF2BP1- und HMGA2-Expression könnte auf einen Anstieg von miR-let-7- zurückzuführen sein, wobei bisher nicht geklärt ist, inwieweit der LIN28B-*knockdown* die Abundanz der miR-let-7-Familie in Gegenwart des miR-let-7-Decoys beeinflussen könnte. Die moderate Reduktion von IGF2BP1 und HMGA2 infolge der HMGA2-Depletion könnte möglicherweise auf eine transkriptionelle Beeinflussung dieser Faktoren hindeuten. Inwieweit sich IGF2BP1, HMGA2 und LIN28B in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen, sollte in witerführenden Studien überprüft werden.

Zusammengenommen wurde jedes der drei analysierten Onkogene durch die siRNA-vermittelten *knockdowns* in den miR-let-7-Decoy-Zellen effizient depletiert, wobei die beiden übrigen Faktoren nicht wesentlich beeinflusst wurden. Demzufolge kann anhand dieser *knockdown*-Populationen der Einfluss von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 auf den Tumorzellphänotypen der miR-let-7-depletierten ES-2 Zellen separat getestet werden, was in den folgenden Kapiteln vorgestellt wird.

3.3.2 Einfluss der miR-let-7-abhängigen Regulation von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 auf den Tumorzellphänotypen

Die bedeutende tumorsuppressive miRNA-Familie miR-let-7 ist durch die Expressionskontrolle von vielzähligen onkogenen Faktoren in die Modulation von verschiedenen Tumorzelleigenschaften wie beispielsweise dem Wachstum, der Apoptose, dem Metabolismus sowie der Migration und der Invasivität involviert (Boyerinas et al., 2010). Einige Studien postulierten, dass der Phänotyp von Tumorzellen auch durch eine miR-let-7-vermittelte Inhibition von HMGA2 und IGF2BP1 beeinflusst wird (Boyerinas et al., 2008; Lee and Dutta, 2007). So wurden in Lungenkarzinom-abstammenden A549-Zellen nach miR-let-7b-Überexpression oder IGF2BP1-*knockdown* ein vergleichbarer Effekt auf die Proliferation und die Motilität dieser Tumorzellen festgestellt, wobei letzteres ausschließlich auf *boyden chamber assays* beruhte (Boyerinas et al., 2008). Um zu prüfen, ob der beobachtete Wachstumseffekt durch IGF2BP1 und nicht HMGA2 vermittelt wurde, überexprimierten Boyerinas et al. miR-let-7b in den IGF2BP1-depletierten Zellen. Trotz einer Reduktion der HMGA2-Expression wurde die Proliferation nicht weiter vermindert. Angesichts dieser Beobachtungen wurde ein HMGA2-vermittelter Wachstumseffekt infolge einer miR-let-7-Überexpression ausgeschlossen und IGF2BP1 zugesprochen (Boyerinas et al., 2008). Ein *recovery* von IGF2BP1 in den miR-let-7b-überexprimierten Zellen wurde allerdings nicht durchgeführt. Darüber hinaus wurde der beobachtete Einfluss auf die Tumorzellbewegung nicht weiter analysiert. Da IGF2BP1 als ein zentraler Modulator der Tumorzellmigration identifiziert wurde, könnte die miR-let-7-vermittelte Inhibition möglicherweise zur Modulation dieser Tumorzelleigenschaft beitragen (Stohr and Huttelmaier, 2012). Im Gegensatz zu Boyerinas et al. bestätigten andere *loss-of-function* Studien, dass eine miR-let-7-vermittelte Inhibition der HMGA2-Expression die Tumorzellproliferation von Lungenkarzinomzellen moduliert (Lee and Dutta, 2007). Neben einem starken wachstumsfördernden Effekt ist HMGA2 auch mit mesenchymalen Charakteristika assoziiert, wodurch es das Migrations- und -Invasivitätspotenzial von Tumorzellen erhöhen kann (Shell et al., 2007; Wu et al., 2011). Ob auch dieser Tumorzelleigenschaft durch eine miR-let-7-abhängige Regulation von HMGA2 vermittelt werden kann, wurde bisher noch nicht charakterisiert. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob eine Heraufregulation von IGF2BP1 und HMGA2 infolge eines miR-let-7-Verlustes ausreicht, um den Phänotyp von Tumorzellen entscheiden zu beeinflussen. In primären Ovarialkarzinomen war eine Reduktion von miR-let-7 mit einer hohen Expression dieser beiden Faktoren assoziiert (Boyerinas et al., 2012; Shell et al., 2007). Die Bedeutung der miR-let-7-Inhibitors LIN28B, welcher vor allem in die Modulation von Stammzelleigenschaften, dem Zellmetabolismus und der Tumorprogression involviert ist, wurde bisher vorwiegend im Tiermodell analysiert (Beachy et al., 2012; Molenaar et al., 2012; Nguyen et al., 2014). Trotz der bekannten negativen *feedback*-Regulation von LIN28B, wurde der Einfluss

der miR-let-7-vermittelten Repression der LIN28B-Expression in Tumorzellen bisher nicht charakterisiert (Guo et al., 2006; Li et al., 2012; Rybak et al., 2008).

Die Kombination der stabil transduzierten miR-let-7-*Decoy* Zellen und der siRNA-basierenden Depletion von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 ermöglicht es den Einfluss jedes Onkogens auf den Tumorzellphänotyp dieser Ovarialkarzinomzellen infolge der miR-let-7-Inhibierung separat zu testen.

3.3.2.1 Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf das Tumorzellwachstum

Zunächst sollte untersucht werden, inwiefern die Inhibierung der miR-let-7-Familie das Tumorzellwachstum beeinflusst und ob dieser Einfluss durch die Heraufregulation der IGF2BP1-, HMGA2- und LIN28B-Expression vermittelt wird. Hierfür wurde das Wachstum der miR-let-7-*Decoy* Zellen, in welchen die analysierten Onkogene mittels siRNAs depletiert wurden (siehe Abb. 31), im Vergleich zum Kontroll-*Decoy* im zweidimensionalen (2D) Zellkultursystem anhand von zwei unabhängigen Methoden analysiert. Einerseits wurde die Zellvitalität basierend auf einer ATP-Messung ermittelt. Allerdings wurde miR-let-7 auch als ein Modulator des Zellstoffwechsels beschrieben (Frost and Olson, 2011; Zhu et al., 2011). Daher wurde andererseits die Zellzahl mittels Durchflusszytometrie bestimmt, wobei die toten Zellen durch eine Propidiumiodid-Färbung von den Lebenden unterschieden werden konnten. Die Inhibierung von miR-let-7 führte zu einem signifikanten Anstieg der Zellvitalität (~1,3-fach) und der Lebendzellzahl (~1,5-fach), woran ein deutlicher Einfluss auf das Tumorzellwachstum zu erkennen war (Abb. 32A, B). Die erhöhte Vitalität der miR-let-7-*Decoy* Zellen wurde durch den IGF2BP1-, LIN28B- und signifikant durch den HMGA2-*knockdown* vermindert (Abb. 32A). Sie blieb hingegen von der Transfektion der Kontroll-siRNA unbeeinflusst. Die gesteigerte Anzahl an miR-let-7-*Decoy* Zellen wurde durch die Depletion von IGF2BP1 und HMGA2 signifikant auf das Niveau des Kontroll-*Decoy*s reduziert (Abb. 32B). Der Verlust von LIN28B vermindert das erhöhte Zellwachstum hingegen nicht. Die Anzahl an toten Zellen (~12 %) blieb für alle analysierten Populationen allerdings unbeeinflusst, weshalb von einem Wachstumseffekt und keinem Einfluss auf die Apoptoseraten ausgegangen wurde (Abb. 32C). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Verlust der miR-let-7-Familie einen signifikanten Einfluss auf das Tumorzellwachstum im 2D-Zellkultursystem hat, was sowohl anhand der Zellzahl als auch der Zellvitalität bemessen werden konnte. Dieser wachstumsfördernde Effekt wird im Wesentlichen durch die miR-let-7-vermittelte Expressionserhöhung von IGF2BP1 und HMGA2 moduliert, da die Depletion dieser Faktoren das gesteigerte Wachstum auf das Niveau der Kontroll-*Decoy* Zellen senkte.

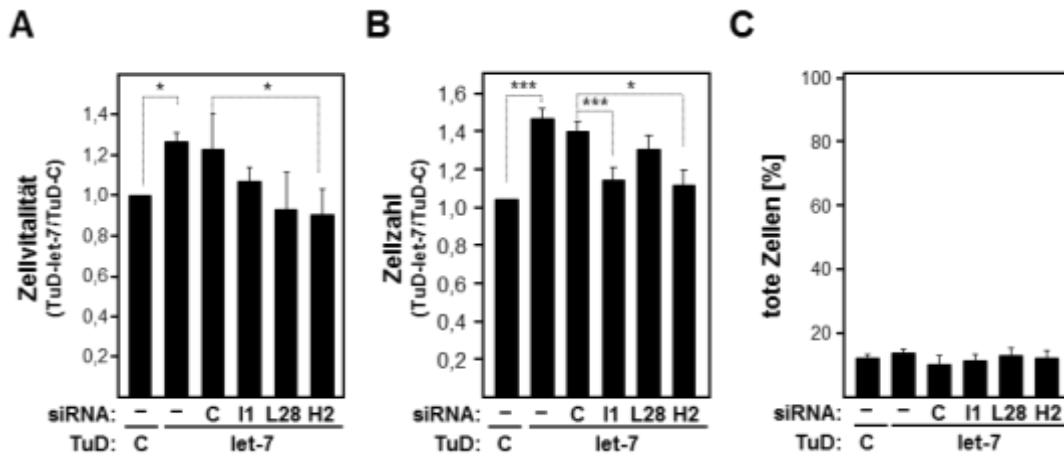


Abb. 32: Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf das Tumorzellwachstum im 2D-Zellkultursystem. (A-C) MiR-let-7-*Decoy*- und Kontroll-*Decoy*-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (siehe Abb. 31). Nach 72 h wurde (A) die Zellvitalität basierend auf einer ATP-Messung und (B) die Lebendzellzahl sowie der Anteil der toten (Propidiumiodid (PI) positive) Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Die vorangegangenen Analysen belegen, dass IGF2BP1 und HMGA2 infolge der miR-let-7-Inhibierung das Tumorzellwachstum im 2D-Zellkultursystem modulieren. Um diesen proliferativen Effekt unter physiologischeren Bedingungen zu verifizieren, wurden 3D-Wachstumsanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die zuvor verwendeten *Decoy*-Zellpopulationen in poly-HEMA-beschichtete Rundbodenplatten eingesät. Die Formierung der Tumorzellsphäroide wurde durch den Cultrex® *spheroid formation buffer* forciert und das Wachstum nach 72 h analysiert. Standardmäßig wird das Wachstum dieser Tumorzellaggregate anhand der Fläche der dokumentierten Sphäroide und der Zellvitalität mittels Calcein-Acetoxy-methylesters (Calcein-AM) bemessen. Da sich die Emissions- und Extinktionsspektren des Calcein-AM (495/515 nm) und des Vektor-kodierten *ZsGreen*-Proteins (496/506 nm) der *Decoys* überlagerten, wurde die Zellvitalität der Tumorzellsphäroide basierend auf einer ATP-Messung bestimmt. Im Vergleich zum Kontroll-*Decoy* wurde die Fläche (~1,3-fach) und die Vitalität (~1,4-fach) der miR-let-7-*Decoy* exprimierenden Tumorzellsphäroide signifikant erhöht (Abb. 33). Diese Beobachtung zeigte, dass die miR-let-7-Inhibierung das Wachstum von Tumorzellsphäroiden beeinflusst. Die erhöhte Zellvitalität und die vergrößerte Fläche der miR-let-7-*Decoy* Zellsphäroide wurde durch die *knockdowns* von IGF2BP1 und HMGA2 signifikant und stark reduziert (Abb. 33B, C). Der Verlust von LIN28B verringert das 3D-Sphäroidwachstum der miR-let-7-*Decoy* Zellen hingegen mäßig und nicht signifikant. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf das 3D-Tumorzellsphäroidwachstum im Wesentlichen durch die gesteigerte Expression von IGF2BP1 und HMGA2 vermittelt wurde.

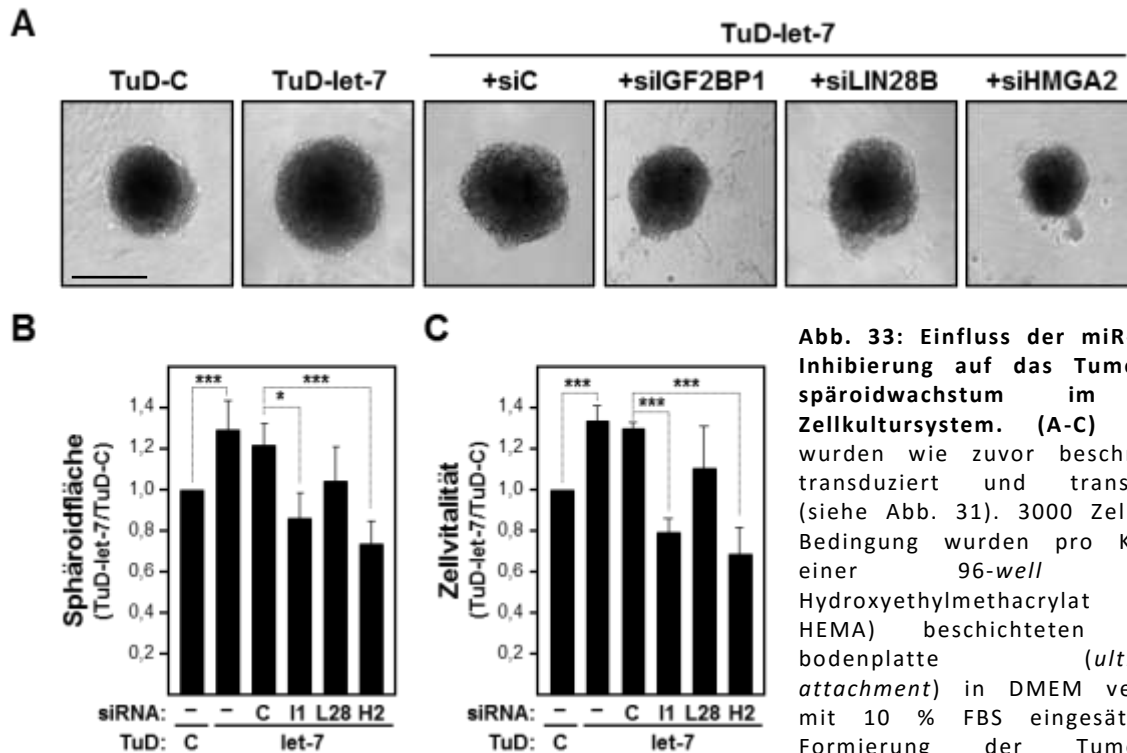


Abb. 33: Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf das Tumorzell-sphäroidwachstum im 3D-Zellkultursystem. (A-C) Zellen wurden wie zuvor beschrieben transduziert und transfiziert (siehe Abb. 31). 3000 Zellen je Bedingung wurden pro Kavität einer 96-well poly-Hydroxyethylmethacrylat (poly-HEMA) beschichteten Rundbodenplatte (*ultra-low attachment*) in DMEM versetzt mit 10 % FBS eingesät. Die Formierung der Tumorzell-sphäroide wurde durch Cultrex®

spheroid formation buffer forciert. (A) Nach 72 h wurden die Tumorzellaggregate mittels Durchlichtmikroskopie dokumentiert. (B) die Fläche der dokumentierten Tumorzellsphäroide wurde automatisch bestimmt und (C) die Zellvitalität basierend auf ATP-Messung ermittelt. Standardabweichungen ergeben sich aus sechs unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 500 μm .

Zusammengenommen belegen diese Studien, dass der Verlust von miR-let-7 das Wachstum von ES-2 Zellen im 2D- und 3D-Zellkultursystem deutlich erhöht. Dieser Wachstumseffekt beruht im Wesentlichen auf dem starken Anstieg der IGF2BP1- und/oder HMGA2-Expressionen, da die Depletion dieser Faktoren das Proliferationsverhalten der miR-let-7-*Decoy*-Zellen auf das Ausgangsniveau der Kontrollzellen senkt. Inwieweit weitere Tumorzelleigenschaften wie das Adhäsions-unabhängige Wachstum und die Ausprägung einer Anoikis-Resistenz infolge einer miR-let-7-Reduktion beeinflusst werden, war nicht bekannt und wird im folgenden Kapitel untersucht.

3.3.2.2 Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf das Adhäsions-unabhängige Wachstum und die Anoikis-Resistenz

Aggressive Tumorzellen können ohne jegliche Adhäsion an die umliegende Extrazelluläre Matrix (ECM) sowie ohne Kontakt zu benachbarten Zellen überleben und wachsen. Diese Fähigkeit wird als Adhäsions-unabhängiges Wachstum bezeichnet und korreliert stark mit der Tumorigenität *in vivo* (Cifone and Fidler, 1980). Publizierte Studien postulieren, dass die Heraufregulation von IGF2BP1 oder HMGA2 in Tumorzellen bedingt durch die APA-Regulation

des IGF2BP1-Transkripts respektive der Translokation des HMGA2-Gens mit der Tumorzelltransformation assoziiert ist (Mayr and Bartel, 2009; Mayr et al., 2007). Letzteres wurde anhand eines verstärkten Adhäsions-unabhängigen Wachstums im *colony formation assay* nach Überexpression von HMGA2- und IGF2BP1-Konstrukten mit verkürzten 3'-UTRs oder inaktivierten miR-let-7-Bindestellen bemessen (Mayr and Bartel, 2009; Mayr et al., 2007). Der Bezug zur miR-let-7-vermittelten Regulation der endogenen Proteinexpression dieser Onkogene fehlte. Demzufolge sollte zunächst untersucht werden, ob die miR-let-7-Inhibierung das Adhäsion-unabhängige Wachstum von ES-2 Zellen beeinflusst, indem *colony formation assays* durchgeführt wurden. Beachtlicherweise bildeten die miR-let-7-*Decoy* Zellen deutlich und signifikant mehr Kolonien (~50 %) als die Kontrollpopulation (Abb. 34A, B). Dabei wiesen die miR-let-7-*Decoy* Zellkolonien eine größere Fläche auf, was nahe legt, dass die miR-let-7-Inhibierung ebenfalls das Wachstum von Tumorzellkolonien verstärkt (Abb. 34C). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Verlust der miR-let-7-Familie einen wesentlichen Einfluss auf das Koloniebildungsvermögen und auf das Adhäsions-unabhängige Wachstum von ES-2 Zellen hat. Allerdings konnte hier anhand von siRNA-basierenden *recovery*-Experimenten nicht geklärt werden, ob die analysierten Onkogene diesen wachstumsfördernden-Effekt modulieren. Dies könnte mittels langfristigen shRNA-vermittelten Depletionen in zukünftigen Analysen überprüft werden.

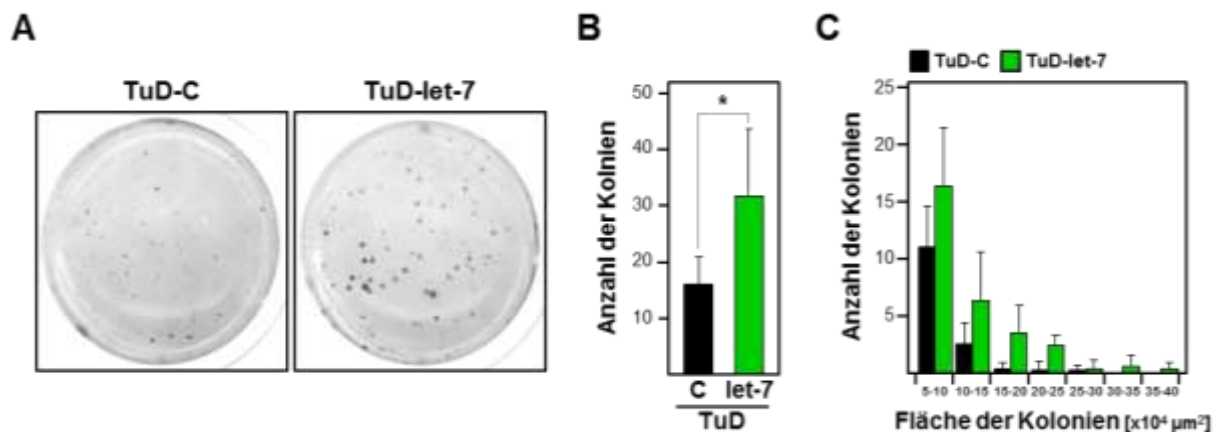
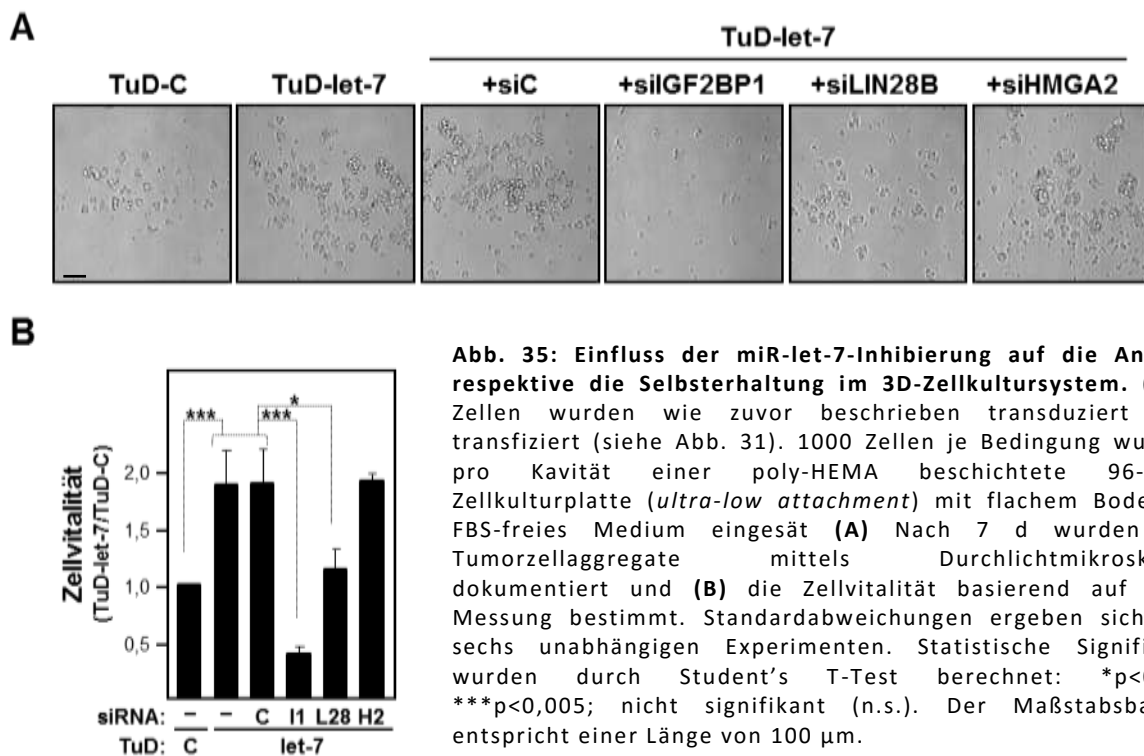


Abb. 34: Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf das Adhäsions-unabhängige Wachstum. (A-C) 3000 miR-let-7-*Decoy* oder Kontroll-*Decoy* Zellen wurden pro Kavität einer 12-*well*-Platte in eine 0,3 %-ige Agarsuspension eingesät. (A) Nach 14 d wurde mittels Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) die Vitalität der Zellkolonien überprüft und die angefärbten Zellen dokumentiert. (B) Die Anzahl und (C) die Fläche der Zellkolonien mit einer Mindestgröße von $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ wurden mittels *SoftAgarPipeline* Software bestimmt. Standardabweichungen ergeben sich aus sechs unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: * $p < 0,05$.

Die vorangegangenen Ergebnisse warfen die Frage auf, ob das gesteigerte Adhäsions-unabhängige Wachstum der miR-let-7-*Decoy* Zellen mit einer Anoikis-Resistenz assoziiert ist. Wenn eine nicht tumorogene Zelle ihre Anheftung zur ECM verliert, erliegt diese einem programmierten Zelltod, der sogenannten Anoikis (Paoli et al., 2013). Im Verlauf der Tumorprogression können Tumorzellen eine Fehlregulation oder sogar eine Resistenz gegen

Anoikis entwickeln, um Adhäsions-unabhängig zu wachsen (Paoli et al., 2013). Um zu überprüfen, ob die Inhibierung von miR-let-7 diese Form der Apoptose beeinflusst, wurden die *knockdown Decoy*-Zellpopulationen (siehe Abb. 31) in poly-HEMA-beschichtete (*ultra low attachment*) Zellkulturplatten mit einem flachen Boden eingesät. Unter diesen Bedingungen formierten die ES-2 Zellen kleine Tumorzellaggregate. Als zusätzlicher Selektionsdruck wurden die Zellen in FBS-freiem Medium kultiviert (Abb. 35). Nach 7 Tagen wurde die Vitalität dieser Zellpopulationen anhand einer ATP-Messung ermittelt. Für die miR-let-7-*Decoy* Zellen wurde im Vergleich zum Kontroll-*Decoy* eine stark erhöhte Zellvitalität (~2-fach) festgestellt, was darauf hindeutet, dass die miR-let-7-Inhibierung eine Anoikis beeinträchtigt (Abb. 35B). Die gesteigerte Zellvitalität der miR-let-7-*Decoy* Zellen wurde erheblich durch die Depletion von IGF2BP1 und schwächer aber dennoch signifikant durch den LIN28B-*knockdown* reduziert (Abb. 35B). Der HMGA2-Verlust hatte, wie die Kontrolltransfektion, keinen Einfluss auf die Zellvitalität der miR-let-7-depletierten Zellen.



Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Reduktion der miR-let-7-Familie die Ausbildung einer Anoikis-Resistenz begünstigt, wodurch das Adhäsions-abhängige Wachstum und die Selbsterhaltung dieser Tumorzellen unterstützt wird. Dies wird durch die miR-let-7-vermittelte Expressionserhöhung von IGF2BP1 und LIN28B vermittelt. Letzteres könnte jedoch auch mit der reduzierten IGF2BP1-Expression des LIN28B-*knockdowns* im Zusammenhang stehen (siehe Abb. 31). Eine Fehlregulation der Anoikis ist eine wichtige Voraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen (Kim et al., 2012c). Die Kapazität einer Tumorzelle den primären Tumor zu

verlassen, ins angrenzende Gewebe sowie den Körperkreislauf einzuwandern und letztlich Metastasen zu bilden, wird ebenso durch eine Veränderung der Zellmigration bestimmt (Bravo-Cordero et al., 2012). Inwieweit die miR-let-7-Inhibierung die Motilität von ES-2 Zellen affektiert, wird im folgenden Kapitel analysiert.

3.3.2.3 Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf die Tumorzellmigration

Um zu untersuchen ob die Inhibierung von miR-let-7 die Zellbewegung über die Heraufregulation von IGF2BP1, HMGA2 oder LIN28B beeinflusst, wurde das Migrationsverhalten der miR-let-7-*Decoy* respektive der *knockdown*-Populationen im Vergleich zum Kontroll-*Decoy* analysiert. Auffallend war, dass die miR-let-7-*Decoy* Zellen eine verstärkte Ausbildung von Filopodien-ähnlichen Zellfortsätzen aufwiesen, welche anhand einer Phalloidin-Färbung des F-Aktin-Zytoskeletts beobachtet wurde (Abb. 36A). Da die Zellbewegung neben einer Formierung von Lamellipodien auch durch Filopodien initiiert wird, könnte diese Beobachtung ein Indiz für eine verstärkte Motilität sein (Mattila and Lappalainen, 2008). Diese Filopodien-ähnlichen Zellfortsätze waren in den IGF2BP1- und LIN28B-depletierten Zellpopulationen nicht mehr zu erkennen. Der IGF2BP1-*knockdown* führte zu einer Veränderung des kortikalen Aktin-Zytoskeletts und zu einer Lokalisierung von β -Catenin (CTNNB1) an die Zellperipherie (Abb. 36A, B). Letzteres war ein Hinweis auf eine verstärkte Ausbildung von vermeintlichen Zell-Zell-Kontakten. Damit übereinstimmend wiesen die IGF2BP1-depletierten ES-2 Zellen verglichen mit den spindelförmigen Kontrollzellen eine flache epithelial-ähnliche Zellform auf. Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten (Stohr et al., 2012; Zirkel et al., 2013). Diese Beobachtungen wurden in abgeschwächter Form für die LIN28B- aber nicht für die HMGA2-depletierten miR-let-7-*Decoy* Zellen festgestellt.

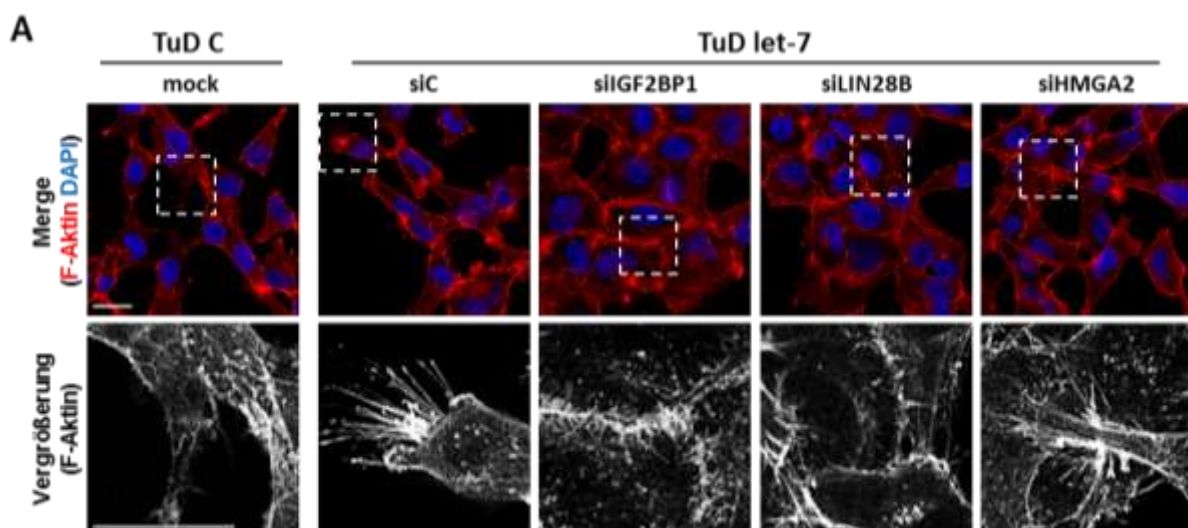


Abb. 36 Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Abb.36

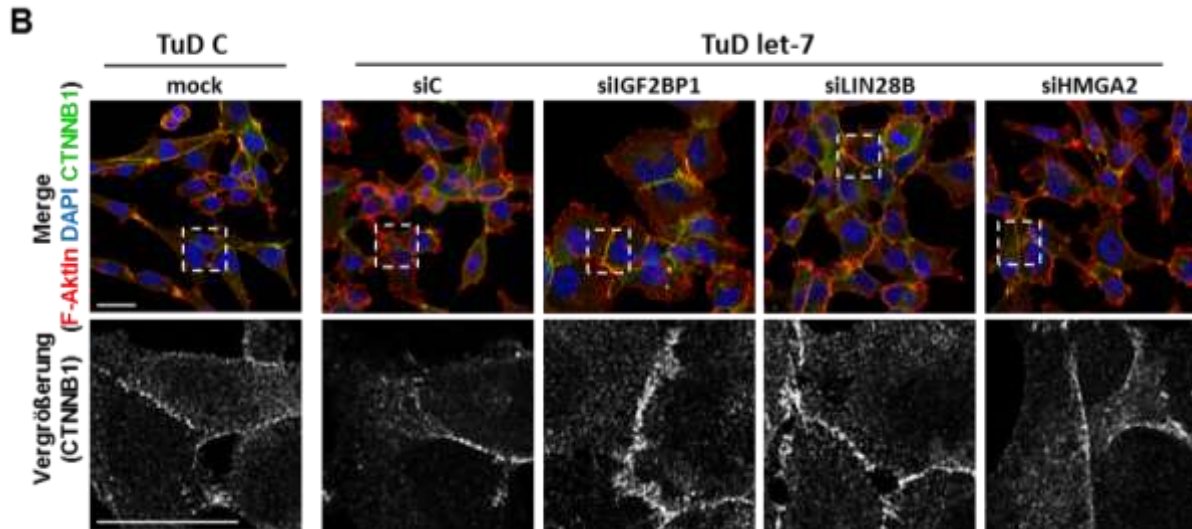


Abb. 36: Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf das F-Aktin-Zytoskelett und die CTNNB1-Lokalisierung. (A,B) MiR-let-7-Decoy und Kontroll-Decoy Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert (siehe Abb. 31). Die Organisation des F-Aktin-Zytoskelett (A, B, rot) wurde mittels Phalloidin, die Zellkerne (A, B, blau) mittels DAPI und die Zellkontakte anhand von CTNNB1 (B, grün) angefärbt. Die Bilderfassung erfolgte mittels konfokaler LSM-Mikroskopie. Die Vergrößerung der weißen Kästchen ist in der unteren Reihe dargestellt. Dabei entspricht der Maßstabsbalken einer Länge von 25 µm.

Das Migrationsverhalten der analysierten Zellpopulationen wurde auf Einzelzellniveau im 2D- und 3D-Zellkultursystem mittels Zeitraffer-Mikroskopie untersucht und automatisiert ausgewertet. Die Analysen der 2D-Zellmigration auf einer Kollagen I-Matrix zeigte, dass die miR-let-7-Decoy Zellen sich schneller bewegten und längere Strecken zurück legten als die Kontroll-Decoy-Population, was in einer signifikant erhöhten Migrationsgeschwindigkeit resultierte (Abb. 37A, B). Wie anhand der veränderten Zellmorphologie zu erwarten war, wurde diese gesteigerte Zellbewegung durch den IGF2BP1- und LIN28B-*knockdown* signifikant reduziert. Hingegen hatte die HMGA2-Depletion wie die Kontrolltransfektion keinen Einfluss auf die erhöhte Migrationsgeschwindigkeit der miR-let-7-Decoy Zellen. Im Vergleich zu den 2D-Analysen war der Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf die Motilität der ES-2 Zellen, eingebettet in einem physiologischeren 3D-Kollagen I-Gel, deutlich stärker ausgeprägt (Abb. 37C). Hierbei war die 3D-Migrationsgeschwindigkeit der miR-let-7-Decoy Zellen auffallend stark und signifikant erhöht (Abb. 37D). Diese gesteigerte Zellbewegung wurde durch den IGF2BP1-*knockdown* auf das Ausgangsniveau des Kontroll-Decoys gesenkt. Auch die LIN28B-Depletion verminderte die gesteigerte 3D-Migration signifikant, wohingegen der HMGA2-Verlust keinen Einfluss hatte.

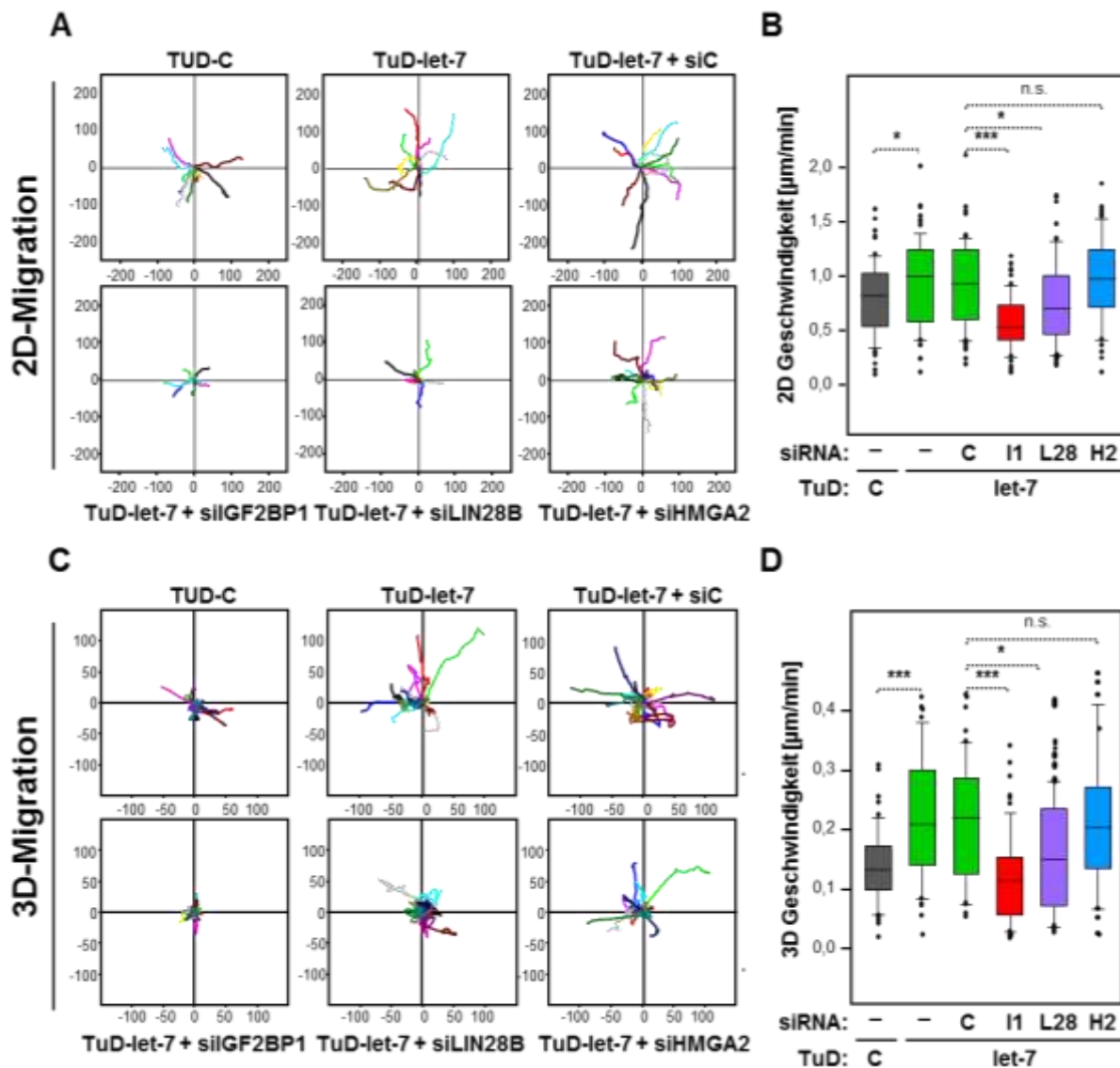


Abb. 37: Einfluss der miR-let-7-Inhibierung auf die Tumorzellmigration im 2D- und 3D-Zellkultursystem. Zellen wie zuvor beschrieben transduziert und transfiziert (siehe Abb. 31). **(A,B)** Für die 2D-Analysen wurden die Zellen auf Kollagen I-beschichteten Kammerobjektträger ausgesät. **(C,D)** Zur Analysen der 3D-Migration wurden die Zellen in ein Kollagen I-Gel (4 mg/mL) eingebettet. Die 2D- und 3D-Zellbewegung wurde auf Einzelzellniveau mittels Zeitraffer-Mikroskopie über einen Zeitraum von 10 h analysiert. Die Zellverfolgung über die Zeit erfolgte automatisiert über das *MiToBo plugin* für ImageJ. 10 Trajektorien aus je einem Beispielfilm sind über einen Zeitraum von 3 h dargestellt. Die mittleren Migrationsgeschwindigkeiten von max. 100 Zellen je Bedingung sind als Boxplot zusammengefasst. Statistische Signifikanz wurden durch Student's T-Test berechnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; nicht signifikant (n.s.).

Zusammengenommen verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Inhibierung von miR-let-7 das Migrationsverhalten von ES-2 Zellen im 2D- und stärker im 3D-Zellkultursystem signifikant erhöht. Dieser migrationsfördernde Einfluss wird maßgeblich durch die miR-let-7-vermittelte Expressionssteigerung von IGF2BP1 und schwächer von LIN28B moduliert. Letzteres könnte jedoch auch indirekt über die verminderte IGF2BP1-Abundanz der LIN28B-depletierten Zellen vermittelt werden.

4. Diskussion

Die bedeutende tumorsuppressive miRNA-Familie let-7 inhibiert die Expression von zahlreichen Onkogenen, wodurch sie der Tumorprogression entgegenwirkt. Die vorliegende Dissertation zeigte, dass eine *Tough Decoy*-basierende Reduktion von miR-let-7 zur Heraufregulation der bekannten miR-let-7-Zieltranskripte IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 führte. Dabei formierten diese Faktoren ein sich selbst-verstärkendes onkogenes Netzwerk, welches den Tumorzellphänotypen der miR-let-7-inhibierten Ovarialkarzinomzellen ES-2 wesentlich modulierte. In *recovery*-Experimenten wurde jedes Onkogen spezifisch depletiert und der Einfluss des analysierten Faktors auf die Tumorzelleigenschaften separat bemessen. Der architektonische Transkriptionsfaktor HMGA2 beeinträchtigte einzig das Tumorzellwachstum unter permissiven Kultivierungsbedingungen, d.h. in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Wachstumsfaktoren. Hingegen förderten die RNA-Bindeproteine LIN28B und bedeutender IGF2BP1 die Tumorzellvitalität, das für Stammzellen charakteristische Selbsterhaltungspotenzial sowie das 2D- und 3D-Migrationsverhalten. Neben der Charaktersierung des der miR-let-7-Familie entgegenwirkenden onkogenen Netzwerkes aus IGF2BP1-LIN28B-HMGA2 zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass im Gegensatz zu postulierten Studien die längsten IGF2BP1 mRNA Isoformen in Tumorzellen abundant exprimiert wurden. Diese IGF2BP1-kodierenden Transkripte, welche den ~6,7 kb langen 3'-UTR enthalten, bieten somit die Grundlage für eine miRNA-vermittelte Regulation, wobei miR-let-7 als stärkste IGF2BP1-regulierende miRNA-Familie identifiziert wurde.

4.1 Die Rolle von IGF2BP1 als miRNA-Zieltranskript

IGF2BP1 wird hauptsächlich während der Embryogenese exprimiert und ist in adulten gesunden Geweben meist nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu wird IGF2BP1 in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen *de novo* synthetisiert (Bell et al., 2013). Im Einklang mit seiner pro-mesenchymalen Rolle ist dieses onkofötale Protein besonders in Tumorzellen mit mesenchymalen Charakteristika zu finden (Zirkel et al., 2013). Die IGF2BP1-Expression wird auf posttranskriptioneller Ebene kontrolliert, wobei IGF2BP1 in Tumorzelllinien als ein *bona fide* miR-let-7-Ziel identifiziert wurde (Boyerinas et al., 2008). Dementgegen wird der IGF2BP1 3'-UTR durch *alternative cleavage and polyadenylation* (APA) in Tumorzellen „verkürzt“, wodurch die miR-let-7-vermittelte Repression umgangen und die IGF2BP1-Expression wesentlich gesteigert werden sollte (Mayr and Bartel, 2009). Hier wurden die längsten IGF2BP1 mRNA-Isoformen jedoch in mesenchymal- und epithelial-artigen Tumorzelllinien sowie in HEK293A-Zellen unabhängig von der endogenen IGF2BP1-Expression nachgewiesen, was die Möglichkeit einer

miR-let-7-vermittelten Regulation bot. Bekräftigt wurde dieses Ergebnis durch die Expressionsanalyse der IGF2BP1-mRNAs in den R2-Mikroarrays der *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), in welcher 66 % der 917 analysierten Krebszelllinien eine hohe Abundanz der längsten IGF2BP1-Transkripte aufwiesen. Auch wenn die Effizienzen der *Mikroarray*-Sonden hier nicht überprüft werden konnten, ergaben sich für die gelisteten mesenchymal-artigen Tumorzelllinien ES-2, HT-144 und PANC-1 mit zwei unterschiedlichen Methoden vergleichbare Ergebnisse. Für die epithelial-artigen Tumorzellen MCF-7 wurde im CCLE-Datensatz ein verstärkter Trend zu den langen mRNA-Varianten beobachtet, welche durch eine schlechtere Sondereffizienz in diesem geringfügigen Expressionsbereich der IGF2BP1-mRNA erklärt werden könnte und eine weiteren Überprüfung bedarf. Die biologische Relevanz der langen IGF2BP1-mRNAs wurde zusätzlich dadurch bekräftigt, dass diese in primären Tumorgeweben unterschiedlichsten Ursprungs exprimiert wurden und sogar in aggressiven Tumorstadien des Ovarialkarzinoms nachweisbar waren. Zudem war eine hohe Abundanz der langen IGF2BP1-Isoformen in ovarialen Tumoren mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert (Daten nicht gezeigt).

Prinzipiell negierten diese Ergebnisse das postulierte APA-Modell nicht, da in 30 % der CCLE-Tumorzelllinien die kürzeren IGF2BP1-mRNAs eine hohe Abundanz aufwiesen. Allerdings war dies für die Mehrheit der analysierten Tumorzellen eben nicht der Fall. Demnach beruht die Heraufregulation von IGF2BP1 im Wesentlichen kaum auf einer „Verkürzung“ des 3'-UTRs. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse ergibt sich aus einer näheren Betrachtung des postulierten APA-Modells. Diese Hypothese basierte zum Teil auf *Northern Blot* Analysen, in welchen IGF2BP1 nur in 10 von 27 analysierten Tumorzelllinien detektiert wurde. Im Gegensatz zu IGF2BP1 war für andere analysierte Gene wie beispielsweise Cyclin D1 (CCND1) oder DCR1 offensichtlich zu erkennen, dass die verkürzte mRNA-Variante in Tumorzellen verstärkt gebildet wurde. Da IGF2BP1 in Normalgewebe nicht exprimiert wurde, dienten einzig die mittels gescherter Adenovirus 5-DNA transformierten HEK293T-Zellen als nicht transformierte Referenz-Zelllinie (Graham et al., 1977; Mayr and Bartel, 2009). Hinsichtlich der dargestellten Luziferasereporter-Analysen ist anzumerken, dass man angesichts der bekannten miR-let-7-vermittelten Inhibition und einer großen Anzahl an *in silico* ermittelbaren miRNA-Bindestellen im überaus langen IGF2BP1 3'-UTRs ein hohes regulatorisches Potenzial erwarten würde. Daher war anzunehmen, dass der Verlust dieses 3'-UTRs die Expression von IGF2BP1 wesentlich steigert. Weiterhin kann die artifizielle 3'-UTR-vermittelte Kontrolle des Firefly Luziferase-Reportergens, welches meist eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist, nicht mit der endogenen Regulation der IGF2BP1-mRNAs gleich gesetzt werden. Interessanterweise wurde für das längste IGF2BP1-Transkript in Abhängigkeit des Zellsystems mRNA-Halbwertszeiten bis zu 6 h beschrieben (Mayr and Bartel, 2009).

Die Annahme, wonach die miR-let-7-vermittelte Inhibition das onkofötale Expressionsmuster von IGF2BP1 maßgeblich beeinflusst, wurde anhand einer signifikanten Antikorrelation der miR-let-7a- und der IGF2BP1-Proteinabundanz in mesenchymal-artigen Tumorzelllinien und der murinen Embryogenese bekräftigt. Weiterhin wurden die langen IGF2BP1-Transkripte in den CCLE-Krebszelllinien mit LIN28B, dem zentralen Inhibitor der miR-let-7-Biogenese, koexprimiert. Zudem stieg die IGF2BP1-Expression infolge eines globalen miRNA-Verlustes in ES-2 Zellen und murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) an. Allerdings wurde die Repression des Luziferasereporters, welcher den längsten IGF2BP1 3'-UTR kodierte, in diesen DCR1-depletierten Zellsystemen durch die Inaktivierung aller bekannten miR-let-7-Bindestellen nicht vollständig aufgehoben. Dieses Ergebnis sowie die Tatsache, dass eine *in silico* Analyse über acht Datenbanken knapp 1300 kanonische miRNAs als putative Interaktionspartner für den langen IGF2BP1 3'-UTR prognostizierte, legten die Existenz weitere IGF2BP1-regulierende miRNAs nahe. Jedoch berücksichtigten diese bioinformatischen Vorhersagen die Zellkontext-abhängige Abundanz der miRNAs sowie den Einfluss von *trans*-agierenden Faktoren wie RBPs nicht.

In Kombination mit *next generation sequencing* Analysen identifizierte das miTRAP-Verfahren unter Verwendung des ~6,7 kb langen IGF2BP1 3'-UTRs in Tumorzellextrakten eine Vielzahl von putativen IGF2BP1-regulierenden miRNAs und bestätigte die Bindung der bekannte miR-let-7-Familie. Durch die Inaktivierung aller miR-let-7-Bindestellen durch zwei Punktmutationen in der *seed*-Region ging die Assoziation dieser miRNA-Familie im ES-2 Zelllysate verloren, was die hohe Selektivität dieser Methode mit dieser außergewöhnlich langen *in vitro* transkribierten Köder-RNA bestätigte. Hinzukommend wurde die spezifische Kopräzipitation von miRNAs nicht durch deren Abundanz im Zellextrakt beeinflusst. Der Verlust von miR-let-7 verminderte ebenso die Assoziation von Argonaut-Proteinen (AGO1, AGO2) der miRISC-Komplexe um 40 % respektive 60 %. Damit übereinstimmend repräsentierte die miR-let-7-Familie ca. 60 % aller signifikant kopräzipitierten miRNAs der WT-RNA. Eine solche starke Assoziation von miR-let-7 wurde in miTRAP-Experimenten mit C643-, U2OS- und MCF-7-Zelllysate bestätigt. Im Einklang mit diesen starken Anreicherungen wurde anhand von *loss*- und *gain-of-function* Analysen in ES-2 Zellen eine erhebliche 3'-UTR-abhängige Inhibition der IGF2BP1-Expression durch die miR-let-7-Familie verifiziert, was im Einklang mit publizierten Studien stand (Boyerinas et al., 2008).

Die vier Vertreter der miR-181-5p-Familie waren in allen analysierten Tumorzellextrakten mit einer Präsenz von ~40 % die zweitstärksten angereicherten miRNAs. Interessanterweise beeinflusste diese nicht kanonische miRNA-Familie infolge einer Überexpression die IGF2BP1-Expression nicht. Allerdings wurde der IGF2BP1 3'-UTR-Luziferasereporter signifikant reprimiert, was wiederum eine potenzielle Regulation von IGF2BP1 durch miR-181-5p nahe legte. Möglicherweise wurde eine miR-181-5p-vermittelte Inhibition der endogenen IGF2BP1-Expression durch die unmittelbare Nähe zur CDS beeinträchtigt (Grimson et al., 2007). Alternativ,

wäre im Hinblick auf die starke Assoziation von miR-181-5p als auch miR-let-7 vorstellbar, dass der lange IGF2BP1 3'-UTR auch als kompetitive endogene RNA (ceRNA) fungiert. Bei Letzteren handelt es sich um kodierende als auch nicht kodierende RNAs, welche miRNAs aus dem Zellsystem titrieren und dadurch die Regulation von miRNA-Zieltranskripten vermindern (Salmena et al., 2011). So zeigten publizierte Studien, dass der HMGA2 3'-UTR als ceRNA der miR-let-7-Familie diene, wodurch die Expression des TGF- β Korezeptors erhöht und Progression von Lungenkrebs *in vitro* und *in vivo* gefördert wurde (Kumar et al., 2014). Weiterhin beeinflussten die Effekte von ceRNAs wiederum die Expression von onkogenen Faktoren wie HMGA2, KRAS oder IGF2BP3 als auch die des Tumorsuppressors PTEN (de Giorgio et al., 2013; Poliseno et al., 2010; Yan et al., 2015b). Angesichts des marginalen Effektes von miR-181-5p auf die endogene IGF2BP1-Expression wäre folgendes Modell durchaus vorstellbar. Interessanterweise wurde vorgeschlagen, dass ein großer Anteil an miRNA-Bindestellen als nicht funktioneller kompetitiver Inhibitor sogenannte miRNA-*sponge* fungiert, wobei die Expression der ceRNAs moderat oder sogar nicht beeinflusst wird (Seitz, 2009). Letzteres wurde für miR-339 und die IPS1-RNA in *Arabidopsis thaliana* bestätigt (Franco-Zorrilla et al., 2007). In Tieren wurde diese Hypothese bisher noch charakterisiert. Eine solche *sponge*-Wirkung stellt daher für miR-181-5p ein interessantes Modell dar. Ob die längsten IGF2BP1-mRNAs tatsächlich eine zentrale Funktion als ceRNAs besitzen, könnte in zukünftigen Studien adressiert werden.

Neben der stark assoziierten miR-181-5p-Familie identifizierten die miTRAP-Studien weiterhin eine Vielzahl von schwach koprazipitierten miRNAs. Angesichts der schwachen Assoziationen wurde eine untergeordnete Rolle dieser miRNAs in der IGF2BP1-Regulation vermuten. Dementsprechend konnte für miR-17-5p, miR-24-3p und im Einklang mit neusten Studien für miR-196a-5p eine moderate 3'-UTR-abhängige Inhibition der IGF2BP1-Expression in ES-2 Zellen nach miRNA-Überexpression beobachtet werden (Rebucci et al., 2015). Diese Ergebnisse bestätigen, dass diese miTRAP-identifizierten miRNA-Kandidaten tatsächlich die IGF2BP1-Expression regulieren können. Allerdings werden diese miRNA-vermittelten Effekte in den *loss-of-function* im direkten Vergleich zur miR-let-7-Überexpression überbewertet. Dies lässt sich darin begründen, dass die ausgewählten miRNA-Kandidaten angesichts ihrer geringen Abundanz im ES-2 Zellsystem deutlich stärker überexprimiert wurden. Die abundante miR-let-7a wies trotz der schlechteren Überexpression immer noch einen deutlich stärkeren Effekt auf. Allerdings besitzt diese miRNA-Familie auch fünf validierte Bindestellen im langen IGF2BP 3'-UTR, wohingegen für miR-196b-5p nur drei Bindesequenzen beschrieben wurden. Neben der Anzahl der Bindungsstellen hängt eine miRNA-vermittelte Regulation vor allem von der zellkontext-abhängigen Abundanz der miRNA einerseits und der Menge möglicher Zieltranskripte andererseits ab (Wilczynska and Bushell, 2015). Angesichts dessen sind für miR-let-7 neben einigen ceRNAs eine Vielzahl von Ziel-mRNAs bekannt (Barh et al., 2010; Kallen et al., 2013;

Kumar et al., 2014). Auch wenn für die hier analysierten miRNA-Kandidaten und miR-let-7 die möglichen Zieltranskripte nicht analysiert wurden, verdeutlichen diese Ergebnisse, dass miR-let-7 die stärkste IGF2BP1-regulierende miRNA in ES-2 Zellen war. Darüber hinaus sollten die miRNA-Regulation der hier identifizierten Kandidaten abgesehen von miR-17-5p in weiterführenden *loss-of-function* Analysen validiert werden, da diese im Vergleich zu miRNA-Überexpressionen weniger fehlerbehaftet sind. Die transiente Einbringung von miRNAs als typische chemisch synthetisierte RNA-Duplexe führt zu einem supraphysiologisch Anstieg der miRNA-Abundanz im Zellsystem. Dabei wird die kanonische miRNA-Prozessierung umgangen, wodurch der *passanger strand* des miRNA-Duplexes nicht abgebaut werden könnte und folglich, nach dem dieser in den RISC inkoooperiert wurde, Nebeneffekte (*off-target-effects*) induzieren könnte. Zudem können diese übermäßigen miRNA-Überexpressionen den RISC-Komplex übersättigen und endogene miRNAs verdrängen (Khan et al., 2009). Dahingegen sind miRNA-Depletionen nur durch die Verfügbarkeit des Inhibitors begrenzt. Jedoch ist eine Unterscheidung von einzelnen miRNA-Familienmitgliedern nicht möglich und diese Inhibitoren maskieren die endogenen miRNAs meist ohne deren Abbau zu induzieren.

Im Hinblick auf eine mögliche biologische Relevanz dieser Vielzahl an putativen IGF2BP1-regulierenden miRNAs könnte in weiterführenden Studien überprüft werden, ob diese Kandidaten einen synergistischen Einfluss auf die IGF2BP1-Expression ausüben. Zudem könnte der IGF2BP1 3'-UTR möglicherweise als ceRNA für diese miRNA-Kandidaten oder in Einzelfällen sogar als miRNA-*sponge* fungieren. Darüber hinaus formiert miR-17-5p über die Inhibition von IGF2BP1 möglicherweise einen negativen *feedback*-Mechanismus. Interessanterweise wird miR-17-5p vom onkogenen miR-17/92-Cluster exprimiert, welches vom IGF2BP1-Zieltranskript MYC aktiviert wird (O'Donnell et al., 2005). Diese Hypothese bedarf allerdings einer Überprüfung.

4.2 Die Bedeutung des miR-let-7-abhängigen onkogenen IGF2BP1-LIN28B-HMGA2-Netzwerks in Ovarialkarzinomzellen

Die Expression der bedeutenden miR-let-7-regulierten Onkogene IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 wurde durch die Reduktion der tumorsuppressiven miR-let-7-Familie in ES-2 Zellen wesentlich gesteigert, wobei diese 3'-UTR-vermittelten Effekte mit der Anzahl an miR-let-7-Bindestellen dieser Transkript korrelierten. Darüber hinaus war der Verlust von miR-let-7 mit einem verstärkten Tumorzellwachstum und Migrationsverhalten in 2D- und sogar 3D-Zellkultursystemen sowie mit einer erhöhten Anoikis-Resistenz respektive einem gesteigertem Selbsterhaltungspotential assoziiert. Dies verdeutlichte eine Erhöhung des onkogenen Potenzials der miR-let-7-depletierten Zellen. Die Modulation dieses Tumorzellphänotypen konnte anhand von siRNA-basierenden *recovery*-Analysen separat den analysierten onkogenen Faktoren zu geordnet werden.

Obwohl HMGA2 in dieser *loss-of-function* Studie das stärkste heraufregulierte Transkript war, wies es das geringste onkogene Potenzial von den drei getesteten Faktoren auf. Dieser Transkriptionsfaktor modulierte in den miR-let-7-*Decoy* Zellen einzig die 2D-Proliferation und das 3D-Sphäroidwachstum in Anwesenheit von FBS. Diese Beobachtungen bestätigten HMGA2 als einen wesentlichen Modulator des Zellwachstums, was in MEFs und Tumorzellen beschrieben wurde (Malek et al., 2008; Wu et al., 2011; Zhou et al., 1995). So belegten *knockdown*-Analysen in einigen HMGA2-exprimierenden Ovarialkarzinomzelllinien einen wesentlichen Einfluss auf die adhärenzte Proliferation und das 3D-Wachstum dieser Tumorzellen (Malek et al., 2008; Yan et al., 2015a). Dieser pro-proliferative Effekt wurde einem G1-Zellzykluarrest sowie ausschließlich in stabilen RNAi-Experimenten einer gesteigerten Apoptose zu geschrieben (Malek et al., 2008). Letzteres wurde in diesen Analysen nicht festgestellt. Die Untersuchungen der Zellmorphologie und des Migrationsverhaltens zeigten einheitlich, dass die HMGA2-Depletion dabei wirkungslos blieb. Im Gegensatz dazu beeinflusste HMGA2 in neusten *knockdown*-Studien das Migrations- und Invasionspotenzial der epithelialen Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3, wobei die Expression der EMT-Marker Vimentin, Slug sowie N-Cadherin gesenkt und E-Cadherin deutlich erhöht wurde (Yan et al., 2015a). Eine solche Expressionsveränderung wurde in den HMGA2-depletierten miR-let-7-*Decoy* Zellen nicht festgestellt, wobei E-Cadherin in ES-2 Zellen nicht exprimiert war (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse relativieren die Auffassung, wonach HMGA2 die Transformation von epithelialen Ovarialzellen durch die Modulation von EMT-relevanten Genen und miRNAs wie miR-200a/c oder miR-29b induziert (Wu et al., 2011). Allerdings wies diese transformierte Ovarialzelllinie neben einer HMGA2-Überexpression eine fragliche Heraufregulation von sieben miR-let-7-Vertretern auf. Dementgegen belegen Shell et al., dass eine gesteigerte HMGA2-Expression in diversen Ovarialkarzinomzelllinien mit einer Reduktion der miR-let-7-Familie sowie einem mesenchymal-artigen Expressionsmuster assoziiert ist (Shell et al., 2007). Des Weiteren ist ein hohes HMGA2/miR-let-7d-Verhältnis in primären Ovarialkarzinomen mit einer schlechteren 5-jährigen Überlebensrate korreliert (Shell et al., 2007). Insbesondere im aggressiven serösen Ovarialkarzinom stellt HMGA2 einen putativen Tumormarker dar und ist ein vielversprechender Kandidat für die Therapie von ovarialen Tumoren (Malek et al., 2008; Wu and Wei, 2013). Somit erlaubt die *recovery*-Analyse von HMGA2 in einer einzigen Ovarialkarzinom-abstammenden Zelllinie nur ein vorläufiges Fazit. Dennoch verdeutlicht diese *in vitro* Studie, dass die miR-let-7-vermittelte Inhibition der HMGA2-Expression in ES-2 Zellen das 2D- und 3D-Tumorzellwachstum unter permissiven Kultivierungsbedingungen maßgeblich moduliert. Für weiterführende Analysen stellen beispielsweise SKOV3-Zellen ein weiteres interessantes Zelllinienmodell dar, falls die hier analysierten Onkogene in dieser Tumorzelllinie exprimiert werden.

Das RNA-Bindeprotein LIN28B war von allen analysierten Onkogenen das schwächste miR-let-7-regulierte Zieltranskript. Jedoch stimulierte überexprimiertes LIN28B aufgrund der

starken Repression der miR-let-7-Familie die Expression von IGF2BP1, HMGA2 sowie LIN28B selbst. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der zentralen Rolle der LIN28-Proteine in der miR-let-7-Biogenese, wobei diese die DROSHA- und DCR1-vermittelte Prozessierung von miR-let-7 inhibieren und den Abbau der pre-miRNAs induzieren (Mayr and Heinemann, 2013). Die Expressionssteigerung in den LIN28B-überexprimierenden Zellen fiel stärker aus als der beobachtete Anstieg nach der stabilen Transduktion des miR-let-7-*Decoys*. Dennoch legt dieses Ergebnis nahe, dass LIN28B die Expression dieser onkogenen Faktoren auch in den miR-let-7-*Decoy* Zellen über diesen *feedback*-Mechanismus verstärkt (Rybak et al., 2008; Wang et al., 2015b). Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass LIN28B die Translation dieser mRNAs auch direkt und damit unabhängig von miR-let-7 beeinflusste (Hafner et al., 2013). Interessanterweise vermittelte LIN28B in den miR-let-7-*Decoy* Zellen die Modulation der Anoikis-Resistenz respektive das für Stammzellen typische Selbsterneuerungspotenzial dieser Tumorzellen (He et al., 2009). Dahingegen fiel der Einfluss auf das Wachstumsverhalten unter permissiven Kultivierungsbedingungen nur marginal und nicht signifikant aus. Die LIN28B-vermittelte Beeinflussung der Selbsterhaltung dieser Ovarialkarzinomzellen steht im Einklang mit publizierten Studien in Stammzellen und anderen Tumorzellen (Shyh-Chang and Daley, 2013; Wang et al., 2015b). Im primären epithelialen Ovarialkarzinom war eine erhöhte Expression von LIN28B und des IGF2BP1-Paralogs IGF2BP3 mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert (Hsu et al., 2015). Hierbei stieg das Risiko dieser Patienten eine Resistenz gegen Chemotherapeutika zu entwickeln an. In *in vitro* Analysen verminderte ein stabiler LIN28B-*knockdown* sogar die adhärenzte Proliferation sowie das Migrations- und Invasionspotenzial der ovariellen Karzinomzellen BG-1 (Hsu et al., 2015). Damit übereinstimmend förderte LIN28B signifikant das 2D- und hier erstmalig gezeigt das 3D-Migrationsverhalten der miR-let-7-*Decoy*-Zellen. Insgesamt verdeutlichten diese *recovery*-Analysen, dass eine miR-let-7-vermittelte Inhibition der LIN28B-Expression die Modulation der Anoikis-Resistenz respektive der Selbsterhaltung als auch die Zellbewegung von ES-2 Zellen vermittelte. Allerdings wurde im Rahmen dieser *knockdown*-Studie nicht geklärt, inwieweit LIN28B diese Tumorzelleigenschaften über miR-let-7-abhängige oder -unabhängige Regulationsmechanismen modulierte. Dies könnte in zukünftigen Studien analysiert werden. Dafür sollte zunächst überprüft werden, ob der LIN28B-*knockdown* in Gegenwart des miR-let-7-*Decoys* die miR-let-7-Inhibition kompensieren könnte. Angesichts der verminderten IGF2BP1-Expression infolge der LIN28B-Depletion, wäre eine miR-let-7-vermittelte Modulation des Tumorzellphänotypen der LIN28B-depletierten Zellen durchaus vorstellbar.

IGF2BP1 war hier mit Abstand das stärkste miR-let-7-regulierte Mitglied der IGF2BP-Familie. Beachtlicherweise modulierte IGF2BP1 von allen analysierten Onkogenen die bedeutendsten Effekte der getesteten Tumorzelleigenschaften. Dabei vermittelte IGF2BP1 die Modulation der 2D-Proliferation und des 3D-Sphäroidwachstums, wobei letzteres im Rahmen dieser Studie

erstmalig beschrieben wurde. Damit Überstimmend wurde IGF2BP1 in verschiedenen Tumorarten einschließlich dem Ovarialkarzinom eine zentrale Rolle in der Regulation der Tumorzellproliferation und des Tumorwachstums zugesprochen (Bell et al., 2015; Gutschner et al., 2014; Kobel et al., 2007). Der IGF2BP1-vermittelte Einfluss auf das 3D-Sphäroidwachstum könnte darauf hindeuten, dass diese Protein auch *in vivo* einen Einfluss auf das Wachstum von ovariellen Tumoren hat, was für Leber- und Kolonkarzinomzellen im Xenograft-Mausmodell bereits gezeigt wurde (Gutschner et al., 2014; Hamilton et al., 2013). Auffällig war zudem der beachtliche Effekt von IGF2BP1 auf das Selbsterhaltungspotenzial, wobei dieser stärker ausfiel als für LIN28B. Dieses Ergebnis kann dahingehend interpretiert werden, dass IGF2BP1 als zentraler posttranskriptioneller Regulator mit seinen vielzähligen Zieltranskripten sogar ein höheres onkogenes Potenzial als der miR-let-7-Inhibitor LIN28B aufweisen könnte (Bell et al., 2013). Des Weiteren resultierte der Verlust von IGF2BP1 in Überstimmung mit publizierten Studien in einer *mesenchymal-epithelial transition* (MET) ähnlichen morphologischen Veränderung (Zirkel et al., 2013). Diese epitheliale Zellmorphologie war mit einer Modulation des Aktin-Zytoskeletts assoziiert, wodurch wie in Stöhr et al. beschrieben die 2D-Migration der miR-let-7-*Decoy*-Zellen von IGF2BP1 verstärkt wurde (Stohr et al., 2012). Darüber hinaus wurde hier erstmals ein IGF2BP1-vermittelter Einfluss auf das 3D-Migrationsverhalten beobachtet. Die beobachtete Diskrepanz der 2D- und 3D-Migrationsgeschwindigkeit infolge der miR-let-7-Reduktion könnte möglicherweise dadurch begründet werden, dass die ES-2 Zellen auf den Kollagen I-beschichteten Kavitäten ihr maximales Migrationspotenzial erreicht hatten. Hingegen benötigen diese Zellen mehr Kraft um die 3D-Matrix zu durchdringen. Dies könnte mutmaßlich durch die gesteigerte Expression von IGF2BP1 vermittelt wurden sein, da dieses Protein die Dynamik des Aktinzytoskeletts moduliert und somit zur Ausbildung von Lamellopodien und vermutlich Fillopodien beiträgt (Stohr and Huttelmaier, 2012; Vainer et al., 2008). Diese Ergebnisse bestätigten IGF2BP1 als einen zentralen Modulator der Tumorzellmigration (Stohr and Huttelmaier, 2012). Zudem deutete die IGF2BP1-vermittelte Modulation des 3D-Migrationspotenzials darauf hin, dass IGF2BP1 die Invasivität und somit die Metastasierung der ES-2 Zellen mutmaßlich *in vivo* fördern könnte. Hinweise darauf lieferte ein Mausmodell, in welchem eine IGF2BP1-Überexpression in murinen Mamma-Epithelzellen zur Ausbildung von zum Teil metastasierenden Brusttumoren führte (Tessier et al., 2004). Im Xenograft-Modell förderte IGF2BP1 ebenso die Dissemination von Kolonkarzinomzellen ins Blut, was eine Funktion von IGF2BP1 in den anfänglichen Prozessen der Metastasierung unterstützte (Hamilton et al., 2013). Zusammengefasst verdeutlichen diese *recovery*-Studien, dass die miR-let-7-vermittelte Inhibition von IGF2BP1 den Tumorzellphänotypen von ES-2 Zellen hinsichtlich des Wachstums, der Selbsterhaltung und des Migrationsverhaltens maßgeblich modulierte, wodurch diesem RNA-Bindeprotein im ES-2 Zellsystem ein hohes onkogenes Potenzial zugesprochen

werden kann. Im Rahmen dieser Studie wurde jedoch nicht überprüft, ob IGF2BP1 diese Tumorzelleigenschaften durch eine Expressionskontrolle von bekannten Zieltranskripten vermittelt, was in weiterführenden Analysen überprüft werden könnte.

Im primären Ovarialkarzinom ist eine hohe IGF2BP1-Expression mit einer schlechten Prognose und einem fortgeschrittenen Tumorgrad assoziiert (Boyerinas et al., 2012; Kobel et al., 2007). Neuste Studien zeigten, dass die beiden übrigen IGF2BP-Vertreter ebenso in ovariellen Karzinomen exprimiert werden und dies mit einer geringen Überlebensrate der Patienten korreliert war (Davidson et al., 2014; Hsu et al., 2015). Dabei wurden pro-proliferative sowie Migrations- und Invasions-fördernde Einflüsse von IGF2BP2 und IGF2BP3 in Ovarialkarzinomzellen beschrieben, was eine onkogene Rolle nahe legte. Hier wurde erstmalig gezeigt, dass die miR-let-7-Inhibierung ebenso die Expression der beiden übrigen IGF2BPs erhöhte. Daher könnte in zukünftigen Studien überprüft werden, inwieweit die miR-let-7-vermittelte Regulation dieser IGF2BP-Mitglieder den Tumorzellphänotypen von Ovarialkarzinomzellen beeinflusst.

Die Expressionsanalyse der *recovery*-Experimente zeigte, dass jedes der drei analysierten Onkogene die Abundanz der beiden übrigen Faktoren gering beeinflusste. Dies legte eine Vernetzung dieser miR-let-7-Zieltranskripte nahe. Wie bereits erwähnt, verstärkt LIN28B miR-let-7-abhängig und möglicherweise miR-let-7-unabhängig die Expression von IGF2BP1, HMGA2 sowie die Eigene. Darüber hinaus warf der moderate Einfluss des IGF2BP1-*knockdowns* auf die HMGA2- und LIN28B-Abundanz die Frage auf, ob IGF2BP1 nicht nur selbst ein miR-let-7-Ziel ist, sondern auch die miR-let-7-vermittelte Regulation dieser Transkripte inhibieren könnte. Aufgrund der beschriebenen hohen mRNA-Halbwertszeiten des längsten IGF2BP1-Transkripts wäre es ebenso vorstellbar, dass IGF2BP1 auch die eigene mRNA stabilisiert (Mayr and Bartel, 2009). Publierte Studien zeigten, dass IGF2BP1 mit seinen Ziel-mRNAs in zytoplasmatische mRNPs assoziiert, wodurch es die Translation moduliert oder das Zieltranskript vor einem nukleolytischen Abbau respektive einer miRNA-Regulation schützt (Bell et al., 2013). So verhinderte IGF2BP1 eine miRNA-vermittelte Degradation der BTRC1- und MITF-mRNA (Elcheva et al., 2009; Goswami et al., 2010). Diese Vermutungen wurden in weiterführenden Studien mit Dr. Nadine Bley und Simon Müller in ES-2 Zellen näher analysiert (zusammengefasst in Busch et al., in Revision). Diverse Korrelationsanalysen unterstützten diese Hypothese, da HMGA2 respektive LIN28B in zwei *Mikroarray*-Datensätzen primärer ovarialer Tumore die am stärksten positiv korrelierten mRNAs von IGF2BP1 waren. In den 917 analysierten *CCLF*-Tumorzelllinien waren diese beiden Transkripte ebenso unter den 20 besten korrelierten Genen zu finden (Daten z.T. nicht gezeigt). Im Einklang damit steigerte eine forcierte Überexpression des GFP-fusionierten humanen IGF2BP1 und des Huhn-Orthologs ZBP1 die Protein- und mRNA-Expression von HMGA2, LIN28B sowie IGF2BP1 selbst in einer dosis-abhängigen Weise. Eine solche

Expressionserhöhung wurde für eine publizierte ZBP1-RNA-Bindemutante nicht festgestellt. Hingegen senkte ein CRISP/CAS9-vermittelter *knockout* von IGF2BP1 die Expression dieser miR-let-7-Zieltranskripte. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass IGF2BP1 seine eigene und die Expression von LIN28B und HMGA2 kontrolliert. Damit übereinstimmend wurde HMGA2 in neuronalen Stammzellen bereits als IGF2BP1-Zieltranskript identifiziert (Nishino et al., 2013). Interessanterweise stabilisiert das IGF2BP1-Paralog IGF2BP3 die HMGA2-mRNA, indem es mit dem HMGA2 3'-UTR assoziiert und eine miR-let-7-vermittelte Degradation dieses Transkriptes verhindert (Jonson et al., 2014). Dementsprechend wurden in den von Hafner et al. publizierten PAR-CLIP Analysen mit IGF2BP1-überexprimierenden HEK293T-Zellen putative Bindestellen von IGF2BP1 im 3'-UTR als auch in der CDS von HMGA2, LIN28B sowie IGF2BP1 selbst identifiziert (Hafner et al., 2010a). Im Einklang mit diesen Indizien assoziierte IGF2BP1 in miTRAP-Analysen mit ES-2 Zellextrakt an den langen Wildtyp und miR-let-7-mutierten 3'-UTR von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2. Die IGF2BP1-Assoziationen wurden allerdings von der miR-let-7-Inaktivierung nicht beeinträchtigt. Dies geht mit den putativen CLIP-Sequenzen einher, welche abgesehen von zwei Bindungsstellen in der IGF2BP1-mRNA nicht mit den validierten miR-let-7-Bindesequenzen im 3'-UTR der analysierten Transkripte überlappten. Dahingegen gingen die AGO2-Kopräzipitationen für alle drei miR-let-7-mutierten Köder-RNAs in den miTRAP-Studien verloren, was eine spezifische Assoziation von miRNAs bestätigte und eine zentrale miR-let-7-vermittelte Regulation von HMGA2 und LIN28B nahe legte. Die Untersuchung des HMGA2-, LIN28B- und IGF2BP1-3'-UTRs in Luziferasereporter-Analysen zeigte, dass die Luziferaseaktivitäten der WT 3'-UTR-Reporter in den IGF2BP1- respektive ZBP1-überexprimierenden ES-2 Zellen Dosis- und RNA-abhängig erhöht wurden. Hingegen blieben die Luziferaseaktivitäten der miR-let-7-inaktivierten 3'-UTR-Reporter unbeeinflusst. Zusammengefasst verdeutlichten diese Ergebnisse, dass IGF2BP1 die Expression von HMGA2, LIN28B und die Eigene verstärkt, indem dieses RNA-Bindeprotein über eine mögliche Assoziation an den 3'-UTR vor einer miR-let-7-Attacke schützt. Ungeklärt blieb bisher jedoch, ob die miR-let-7-Bindestellen tatsächlich nicht von den vorgeschlagenen IGF2BP1-Bindesequenzen überlagert werden. Eine simultane Assoziation von miR-let-7 und des IGF2BP3-Protein wurde für den HMGA2 3'-UTR vorgeschlagen (Jonson et al., 2014). Des Weiteren sollte in weiterführende Analysen adressiert werden, inwieweit ein IGF2BP1-abhängiger Einschluss dieser Zieltranskripte in zytoplasmatische mRNPs vor einer miR-let-7-vermittelten Repression schützt und ob es sich dabei nach der derzeitigen Hypothese tatsächlich um „*virgin*“ mRNAs handelt (Bell et al., 2013).

Zusammengefasst wurde im Rahmen dieser Dissertation und in weiterführenden Studien ein sich selbstverstärkendes miR-let-7-abhängiges onkogenes Netzwerk bestehend aus IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 identifiziert (Abb. 38A). Im Mittelpunkt dieses Netzwerkes steht die starke miR-let-7-vermittelte Inhibition dieser onkogenen Faktoren. Demzufolge trägt eine Reduktion

von miR-let-7 wesentlich zur Heraufregulation dieser Onkogene bei. Hierbei verstärkt LIN28B alle drei Onkogene indirekt durch die Repression von miR-let-7. Zusätzlich schützt IGF2BP1 die HMGA2-, LIN28B-mRNA sowie sich selbst vor einer miR-let-7-abhängigen Degradation. Auf transkriptioneller Ebene fördert HMGA2 möglicherweise die beiden übrigen Faktoren, was allerdings einer Überprüfung bedarf. Dieses sich selbstverstärkende Netzwerk erhöht das onkogene Potenzial der Ovarialkarzinomzellen ES-2, indem HMGA2 maßgeblich das Tumorzellwachstum fördert und LIN28B sowie bedeutender IGF2BP1 die Selbsterhaltung, die Tumorzellmigration aber auch Vitalität verstärken. Dadurch wirkt dieses onkogene Netzwerk aus IGF2BP1-LIN28B-HMGA2 der tumorsuppressiven Rolle von miR-let-7 entgegen.

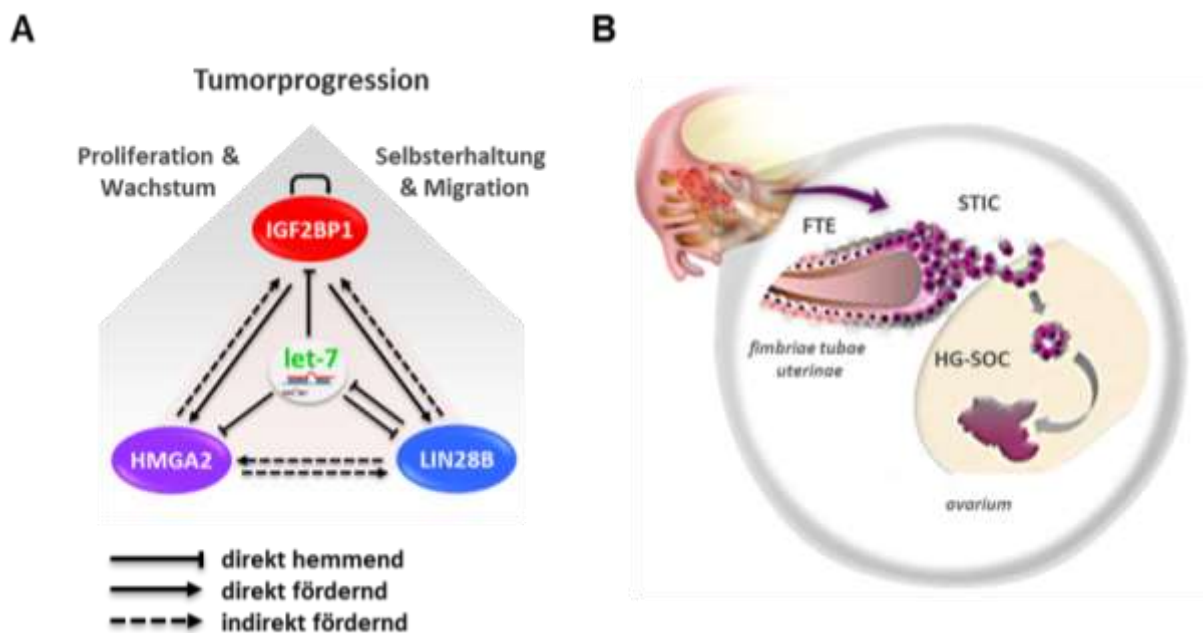


Abb. 38: Modell des miR-let-7-abhängigen onkogenen Netzwerks von IGF2BP1-LIN28B-HMGA2. (A) Schema verdeutlicht, dass miR-let-7-Ziele IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 ein sich selbst verstärkendes onkogenes Netzwerk formieren, welches die verschiedenen Zelleigenschaften von Tumorzellen modulieren und dadurch die Tumorprogression verstärken könnten. Modifiziert nach Busch et al. (in Revision) (B) Schematische Darstellung der derzeitigen Hypothese zur Entstehung des hochgradig serösen Ovarialkarzinom (HG-SOC). Der Ursprung des HG-SOC wird im Eileiter vermutet und ist mit TP53 Mutationen assoziiert. Die Epithelzellen der *fimbriae tubae uterinae* (FTE) durchlaufen eine maligne Transformation zum serösen tubaren intraepithelialen Karzinom (STIC). Die Tumorzellen des STIC metastasieren zu den Ovarien und/oder in den Peritonealraum, wodurch sich schließlich das HG-SOC formiert. Modifiziert nach (Jones and Drapkin, 2013).

Der wesentliche Einfluss des miR-let-7-abhängigen onkogenen IGF2BP1-LIN28B-HMGA2-Netzwerks auf den Tumorzellphänotypen im 3D-Zellkultursystem könnte mutmaßlich ein Indiz für eine wichtige Funktion in der Tumorprogression *in vivo* sein. Alle drei analysierten Onkogene wurden in primären Ovarialkarzinomen nachgewiesen, wobei IGF2BP1 und HMGA2 besonders mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert waren (Hsu et al., 2015; Kobel et al., 2007; Shell et al., 2007). Interessanterweise wurde in über 900 primären ovarialen Tumorsproben eine Fehlregulation des miR-let-7-Signalwegs festgestellt (Helland et al., 2011). Dies war mit einem Subtyp des hochgradig aggressiven serösen Ovarialkarzinoms (HG-SOC) assoziiert. Auf

molekularer Ebene wurde dieser aggressive Ovarialkarzinomtyp durch eine MYCN-Amplifikation, welche in eine Überexpression von LIN28B resultierte, eine Herabregulation der miR-let-7-Familie sowie eine HMGA2-Amplifikation charakterisiert (Helland et al., 2011). Neben genomischen Veränderungen wird das HG-SOC hauptsächlich durch TP53-Mutationen und seltener durch somatische Mutationen von BRCA1/2 gekennzeichnet (Domcke et al., 2013). Diese Charakteristika sind ebenso in ovarialen Tumorzelllinien zu finden. Letztere wurden nach ihrem Genprofil für die Eignung als ein *in vitro* HG-SOC-Modell bewertet, wobei die ES-2 Zellen trotz ihrer Histologie aufgrund ihrer TP53-Mutation als ein mögliches hochgradig seröses Ovarialkarzinommodell eingestuft wurden (Domcke et al., 2013). Angesichts dieser Einstufung lässt sich das hier identifizierte miR-let-7-abhängige onkogene Netzwerk in die postulierte Hypothese der Tumorprogression des HG-SOC einordnen und bietet zudem verschiedene Perspektiven für weiterführende Studien (Abb. 38B). Im Fall des HG-SOC verdichten sich die Indizien, dass diese ovarialen Tumore auf Vorläuferläsionen im Eileiter zurückzuführen sind. Hierbei stellen TP53-Mutation ein frühzeitiges Event dar (Jones and Drapkin, 2013). Diese Vorläuferläsion wird als „p53-Signatur“ bezeichnet. Interessanterweise wurde in Tumorzelllinien ein indirekter Zusammenhang zwischen der Mutation respektive der Inhibition von TP53 und dem Verlust der miR-let-7-Familie postuliert (Lee et al., 2013). Durch diese p53-Signatur erlangen die epithelialen Eileiterzellen der *fimbriae tubae uterinae* einen neoplastischen Phänotypen und eine verstärkte Proliferation, wodurch ein seröses tubares intraepitheliales Karzinom (STIC) entsteht. Diese STIC-Zellen entwickeln eine Anoikis-Resistenz und metastasieren zu den Ovarien und/oder in den Peritonealraum. Die lokalisierte Dissemination und das vorangegangene Durchbrechen der Basalmembran leiten die Entstehung eines hochgradig invasiven serösen Karzinoms ein (Jones and Drapkin, 2013). Diese HG-SOC-Tumorprogression ist neben TP53- und BRCA1/2-Mutationen mit fokalen Deletionen und Amplifikationen assoziiert (Jones and Drapkin, 2013). Das häufigste Amplikon ist das MYC-Gen, dessen Protein als Inhibitor der miR-let-7-Familie beschrieben wurde (Bowtell, 2010; Chang et al., 2008; Chang et al., 2009; Wang et al., 2011). Wie bereits erwähnt wurden auch HMGA2- und MYCN-Amplifikationen beschrieben (Helland et al., 2011). Letzteres war im aggressiven Neuroblastom mit einem *gain* des IGF2BP1-Gens assoziiert und könnte möglicherweise auch im HG-SOC zur Aktivierung dieses Onkogens beitragen (Bell et al., 2015). Zusammengenommen könnte die folgende Hypothese aufgestellt werden. In der frühzeitigen Phase der HG-SOC-Tumorgenese könnte es bedingt durch TP53-Mutationen zur Reduktion der miR-let-7-Familie kommen. Diese könnte durch eine Aktivierung von LIN28B aufgrund einer MYCN-Amplifikation im Verlauf verstärkt werden. In einer späteren Phase könnten IGF2BP1 und HMGA2 ebenso durch Amplifikationen respektive BRCA1/2-Mutationen aktiviert werden, wobei ein möglicher Zusammenhang zwischen BRCA1 und HMGA2 vermutet wird (Wu and Wei, 2013). Die Heraufregulation von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2

könnte durch den Verlust von miR-let-7 mit fortschreitender Tumorprogression erheblich gefördert werden, wobei sich diese onkogenen Faktoren zusätzlich selbst verstärken könnten. Schließlich könnte dieses onkogene Netzwerk im aggressiven serösen Ovarialkarzinom die Tumorprogression und somit die Metastasierung verstärken oder gar induzieren.

Um eine mögliche biologische Relevanz des miR-let-7-abhängigen onkogenen Netzwerks *in vivo* zu bestätigen, stehen für weiterführende Studien verschiedene experimentelle Ansätze zur Verfügung. Eine Möglichkeit ist eine Heterotransplantation der miR-let-7-*Decoy*-exprimierenden ES-2 Zellen in immundefiziente Mäuse. Dabei könnte durch eine intraperitoneale oder intrabursale Injektion der Tumorzellen die klinische Manifestation des Ovarialkarzinoms bestmöglich reproduziert werden (Shaw et al., 2004). In diesem Zusammenhang könnte die Bedeutung jedes einzelnen Onkogens separat durch langfristige Depletionen dieser Faktoren in den injizierten miR-let-7-*Decoy* Zellen *in vivo* bestätigt werden. Des Weiteren wurden einige gentechnisch veränderte Mausmodelle entwickelt. Dabei ermöglicht es eine Eileiter-spezifische Einbringung von Onkogenen und/oder die Unterdrückung von Tumorsuppressor-Genen die molekulare Pathogenese des HG-SOC zu analysieren (Kuhn et al., 2015). So generierten Kim et al. unter Verwendung des *anti-Müllerian hormone receptor type 2-directed cis regulatory elements* (Amhr2-Cre) einen DCR1/PTEN Doppel-*knockout* im Eileiter eines solchen Mausmodells (Kim et al., 2012b). Diese Mäuse entwickelten aus dem Eileiter ein seröses Karzinom, welches im Verlauf der Progression die Ovarien umhüllte und infolge einer aggressiven Metastasierung zur Aszites und zum Tod aller Tiere nach maximal 13 Monaten führte. In *in vitro* Analysen resultierte ein DCR1-*knockout* in MEFs zum starker Anstieg von IGF2BP1 als auch von HMGA2 und LIN28B (Daten z.T. nicht gezeigt). Demzufolge könnte in zukünftigen Studien überprüft werden, ob es im Verlauf der Tumorprogression dieser Mausmodells tatsächlich zur Fehlregulation von miR-let-7 und folglich zur Heraufregulation des onkogenen IGF2BP1-LIN28B-HMGA2-Netzwerkes kommt.

Ausblickend auf den erworbenen Einblick in die molekulare Pathologie des Ovarialkarzinoms könnte das hier identifizierte onkogene Netzwerk auch einen neuen Ansatz für eine gezielte Tumorthherapie bieten, was für weiterführende Studien von besonderem Interesse wäre. Die Primärtherapie (Erstlinienhandlung) des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms basiert auf einer operativen Resektion des Tumors und einer anschließenden systematischen Behandlung (Kim et al., 2012a). Letzteres umfasst platinbasierende Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Carboplatin kombiniert mit Taxane (Kim et al., 2012a). Ergänzend zu dieser Standard-Chemotherapie gewinnen zielgerichtete Therapieansätze sogenannte *targeted therapies* an Bedeutung (Yap et al., 2009). So wird beispielsweise Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gerichtet gegen den Angiogenesemarker *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA), als gezielte Therapie ergänzend in der Erstlinienhandlung aber auch im Rezidivfall verwendet (Yap et al., 2009). Trotz einer hohen Ansprechrate in der primären platinbasierenden Chemotherapie

kommt es bei Patientinnen mit hochgradigen (Figo III, IV) Ovarialkarzinomen häufig zur Rekurrenz der Erkrankung, welche häufig zum Tode führt. Im Rezidivfall ändert sich allerdings die therapeutische Intention, da es hier häufig zur Entstehung einer Resistenz gegenüber Standardtherapeutika kommt (sog. platinresistente Rezidivfälle) (Kim et al., 2012a). Um die Prognose dieser Patientengruppe aber auch die von platinsensitiven Rezidivfällen zu verbessern sind neue *targeted therapies* von hohem Interesse. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, welche einer Chemoresistenz zu Grunde liegen, bisher nur unzureichend charakterisiert. Eine Hypothese basiert auf einer kleinen Subpopulation an Tumorzellen, welche aufgrund von Stammzell-ähnlichen Eigenschaften als *cancer stem cells* (CSC) bezeichnet werden (Zhan et al., 2013). CSC besitzen die Fähigkeit sich selbst zu erhalten, zu differenzieren und Tumorwachstum zu initiieren. Es wird vermutet, dass diese Zellen eine Resistenz gegen Chemotherapeutika entwickeln können, woraus im Rezidivfall eine chemoresistente Tumorzellpopulation hervorgeht (Zhan et al., 2013). Da LIN28B und bedeutender IGF2BP1 das für Stammzellen-charakteristische Selbsterhaltungspotenzial der ES-2 Zellen infolge der miR-let-7-Inhibierung modulierten, könnten diese beiden Faktoren des onkogenen Netzwerkes in die Aquirierung einer Chemoresistenz involviert sein. Interessanterweise wurden IGF2BP1 und LIN28B in Tumorproben chemoresistenter Ovarialkarzinome mit einer hohen Abundanz nachgewiesen, wobei dies mit einer schlechten Prognose korreliert war (Boyerinas et al., 2012; Hsu et al., 2015). Hinzukommend belegen einige Studien, dass auch eine Reduktion von miR-let-7 mit einer Resistenz gegen Standard-Chemotherapeutika assoziiert war (Blower et al., 2008; Boyerinas et al., 2012; Cai et al., 2013; Yang et al., 2008). So wiesen Chemotherapie-resistente Patienten mit epithelialen Ovarialkarzinomen eine signifikant reduzierte Expression von miR-let-7i oder miR-let-7d auf, wobei letzteres mit einer hohen Expression von IGF2BP1 assoziiert war (Boyerinas et al., 2012; Yang et al., 2008). In *in vitro* Studien resultierte eine miR-let-7-Inhibierung in einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin, wohingegen miR-let-7-Überexpressionen diese Chemoresistenz in Ovarialkarzinomzelllinien und sogar im Fall von miR-let-7e im subkutanen Xenograft-Modell senkte (Cai et al., 2013; Yang et al., 2008). Darüber hinaus sank die miR-let-7e-Expression in einer Dosis-abhängigen Weise nachdem die Ovarialkarzinomzellen ES-2, SKOV3 und A2780 mit Cisplatin behandelt wurden (Cai et al., 2013). Diese Studien deuten stark darauf hin, dass die Reduktion von miR-let-7- und somit die Heraufregulation des hier identifizierten onkogenen Netzwerkes in aggressiven Ovarialkarzinomen mit einer Chemoresistenz assoziiert sein könnte oder diese möglicherweise sogar induzieren könnte. Um diese Hypothese in zukünftigen Studien zu prüfen, sollte die Expression von IGF2BP1, LIN28B, HMGA2 und miR-let-7 in primären ovarialen Tumorproben analysiert und dies mit dem Tumorgrad, der Prognose und der Ansprechrate gegenüber der eingesetzten Chemotherapie korreliert werden. Dadurch könnte charakterisiert werden,

inwieweit das hier identifizierte onkogene Netzwerk im Ovarialkarzinom vertreten ist. Unter der Verwendung von miR-let-7-*Decoy*-exprimierenden Ovarialkarzinomzellen könnte anschließend in *in vitro* Studien respektive möglicherweise in Mausmodellen die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika getestet werden. Weiterhin sollte geklärt werden, welche IGF2BP1-, LIN28B- aber auch HMGA2-regulierten Zieltranskripte den Einfluss auf das Selbsterhaltungspotenzial sowie auf die übrigen Tumorzelleigenschaften vermitteln. So wurde in Ovarialkarzinomzellen bereits gezeigt, dass eine miR-let-7-vermittelte Heraufregulation von IGF2BP1 die Resistenz gegen Taxane erhöht, indem IGF2BP1 den ABC-Transporter *multidrug resistance 1* (MDR1) stabilisiert (Boyerinas et al., 2012). Darüber hinaus könnte IGF2BP1 durch die Expressionskontrolle des *inhibitor of apoptosis protein* (IAP) mutmaßlich mit einer Resistenz gegenüber Carboplatin im HG-SOC assoziiert sein (Faye et al., 2015; Janzen et al., 2015). Die im Fall von LIN28B beobachtete verminderte platinbasierende Sensitivität war mit einer Reduktion des *copper transporter 1* (CTR1), welcher in die Platin-Aufnahme involviert ist, assoziiert (Hsu et al., 2015). Abschließend könnte eine zielgerichtete Therapie gegen das IGF2BP1-LIN28B-HMGA2-Netzwerk mit neuen putativen Chemotherapeutika entwickelt werden. Das bereits in klinischen Studien zur Behandlung des Neuroblastoms eingesetzte Difluoromethyl-Ornithin (DFMO) wäre dafür eine interessante Substanz. Der Wirkungsmechanismus dieses Arzneistoffes beruht vermutlich auf der Zerstörung der LIN28B/miR-let-7-Achse, wodurch möglicherweise alle Faktoren des miR-let-7-abhängigen onkogenen Netzwerkes reprimiert und somit die Tumorprogression inhibiert werden könnten. (Lozier et al., 2015).

5 Zusammenfassung

Die tumorsuppressive miRNA-Familie let-7 reprimiert diverse Onkogen-kodierende mRNAs. Allerdings ist miR-let-7 in verschiedenen Tumoren wie dem Ovarialkarzinom häufig fehlreguliert, wodurch die miR-let-7-Expression reduziert und die regulierten Onkogene heraufreguliert werden.

Diese Studie identifizierte ein sich selbstverstärkendes miR-let-7-abhängiges onkogenes Netzwerk bestehend aus den bekannten miR-let-7 Zielen IGF2BP1, LIN28B und HMGA2. Die IGF2BP1-Expression sollte in Tumorzellen allerdings weitgehend unabhängig von miR-let-7 heraufreguliert werden, da der längste 3'-UTR durch *alternative cleavage and polyadenylation* (APA) verkürzt wird. Hingegen werden die längsten IGF2BP1-kodierenden mRNAs, welche den ~6,7 kb langen 3'-UTR kodieren, in Tumorzelllinien und primären Tumorgeweben mit einer hohen Abundanz exprimiert. Dies legt nahe, dass die APA-Regulation nicht wesentlich zur Heraufregulation des onkofötalen IGF2BP1-Proteins in Tumorzellen beiträgt. Stattdessen ist die Expression von IGF2BP1 negativ mit der miR-let-7-Menge in diversen Tumorzelllinien korreliert. Damit übereinstimmend wird die IGF2BP1-Abundanz durch LIN28B, dem zentralen Inhibitor der miR-let-7-Biogenese, gefördert. Weiterführende Studien zeigten, dass IGF2BP1 die Expression von LIN28B, HMGA2 sowie sich selbst verstärkt, indem dieses RNA-Bindeprotein über eine mögliche Assoziation an den 3'-UTR die miR-let-7-vermittelte Degradation dieser Onkogene verhindert. Ein hohes onkogenes Potenzial dieses miR-let-7-abhängigen onkogenen Netzwerkes konnte in Ovarialkarzinom-abstammenden ES-2 Zellen, welche stabil mit einem miR-let-7-gerichteten *Tough Decoy* transduziert wurden, bestätigt werden. In diesen miR-let-7-depletierten Zellen förderte HMGA2 einzig das Tumorzellwachstum unter permissiven Kultivierungsbedingungen, d.h. in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Wachstumsfaktoren. Hingegen modulierten LIN28B und wesentlicher IGF2BP1 die Tumorzellvitalität, das für Stammzellen charakteristische Selbsterhaltungspotenzial sowie die 2D- und sogar 3D-Migration. Dies verdeutlichte, dass dieses onkogene Netzwerk von IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 der tumorsuppressiven Rolle von miR-let-7 in diesem Zellsystem entgegenwirkte. Abschließend legen diese Ergebnisse nahe, dass dieses miR-let-7-abhängige Netzwerk einen vielversprechenden Kandidat für eine gezielte Tumorthherapie des Ovarialkarzioms darstellen könnte.

6 Referenzen

- Alajez, N. M., Shi, W., Wong, D., Lenarduzzi, M., Waldron, J., Weinreb, I., Liu, F. F., 2012. Lin28b promotes head and neck cancer progression via modulation of the insulin-like growth factor survival pathway. *Oncotarget*. 3, 1641-52.
- Ameres, S. L., Zamore, P. D., 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14, 475-88.
- Arlotta, P., Tai, A. K., Manfioletti, G., Clifford, C., Jay, G., Ono, S. J., 2000. Transgenic mice expressing a truncated form of the high mobility group I-C protein develop adiposity and an abnormally high prevalence of lipomas. *J Biol Chem*. 275, 14394-400.
- Bak, R. O., Hollensen, A. K., Mikkelsen, J. G., 2013a. Managing microRNAs with vector-encoded decoy-type inhibitors. *Mol Ther*. 21, 1478-85.
- Bak, R. O., Hollensen, A. K., Primo, M. N., Sorensen, C. D., Mikkelsen, J. G., 2013b. Potent microRNA suppression by RNA Pol II-transcribed 'Tough Decoy' inhibitors. *RNA*. 19, 280-93.
- Barh, D., Malhotra, R., Ravi, B., Sindhurani, P., 2010. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr Oncol*. 17, 70-80.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., Wilson, C. J., Lehar, J., Kryukov, G. V., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M. F., Monahan, J. E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A., Jane-Valbuena, J., Mapa, F. A., Thibault, J., Bric-Furlong, E., Raman, P., Shipway, A., Engels, I. H., Cheng, J., Yu, G. K., Yu, J., Aspesi, P., Jr., de Silva, M., Jagtap, K., Jones, M. D., Wang, L., Hatton, C., Palesscandolo, E., Gupta, S., Mahan, S., Sougnez, C., Onofrio, R. C., Liefeld, T., MacConaill, L., Winckler, W., Reich, M., Li, N., Mesirov, J. P., Gabriel, S. B., Getz, G., Ardlie, K., Chan, V., Myer, V. E., Weber, B. L., Porter, J., Warmuth, M., Finan, P., Harris, J. L., Meyerson, M., Golub, T. R., Morrissey, M. P., Sellers, W. R., Schlegel, R., Garraway, L. A., 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 483, 603-7.
- Bartel, D. P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136, 215-33.
- Beachy, S. H., Onozawa, M., Chung, Y. J., Slape, C., Bilke, S., Francis, P., Pineda, M., Walker, R. L., Meltzer, P., Aplan, P. D., 2012. Enforced expression of Lin28b leads to impaired T-cell development, release of inflammatory cytokines, and peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 120, 1048-59.
- Bell, J. L., Turlapati, R., Liu, T., Schulte, J. H., Huttelmaier, S., 2015. IGF2BP1 harbors prognostic significance by gene gain and diverse expression in neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 33, 1285-93.
- Bell, J. L., Wachter, K., Muhleck, B., Pazaitis, N., Kohn, M., Lederer, M., Huttelmaier, S., 2013. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci*. 70, 2657-75.
- Bernstein, P. L., Herrick, D. J., Prokipcak, R. D., Ross, J., 1992. Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev*. 6, 642-54.
- Blower, P. E., Chung, J. H., Verducci, J. S., Lin, S., Park, J. K., Dai, Z., Liu, C. G., Schmittgen, T. D., Reinhold, W. C., Croce, C. M., Weinstein, J. N., Sadee, W., 2008. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Ther*. 7, 1-9.
- Bowtell, D. D., 2010. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*. 10, 803-8.
- Boyerinas, B., Park, S. M., Hau, A., Murmann, A. E., Peter, M. E., 2010. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 17, F19-36.
- Boyerinas, B., Park, S. M., Murmann, A. E., Gwin, K., Montag, A. G., Zillhardt, M., Hua, Y. J., Lengyel, E., Peter, M. E., 2012. Let-7 modulates acquired resistance of ovarian cancer to Taxanes via IMP-1-mediated stabilization of multidrug resistance 1. *Int J Cancer*. 130, 1787-97.
- Boyerinas, B., Park, S. M., Shomron, N., Hedegaard, M. M., Vinther, J., Andersen, J. S., Feig, C., Xu, J.,

- Burge, C. B., Peter, M. E., 2008. Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res.* 68, 2587-91.
- Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J., Brattain, D. E., 1981. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 41, 1751-6.
- Braun, J., Misiak, D., Busch, B., Krohn, K., Huttelmaier, S., 2014. Rapid identification of regulatory microRNAs by miTRAP (miRNA trapping by RNA in vitro affinity purification). *Nucleic Acids Res.* 42, e66.
- Bravo-Cordero, J. J., Hodgson, L., Condeelis, J., 2012. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 24, 277-83.
- Cai, J., Yang, C., Yang, Q., Ding, H., Jia, J., Guo, J., Wang, J., Wang, Z., 2013. Deregulation of let-7e in epithelial ovarian cancer promotes the development of resistance to cisplatin. *Oncogenesis.* 2, e75.
- Castellano, L., Stebbing, J., 2013. Deep sequencing of small RNAs identifies canonical and non-canonical miRNA and endogenous siRNAs in mammalian somatic tissues. *Nucleic Acids Res.* 41, 3339-51.
- Chang, T. C., Yu, D., Lee, Y. S., Wentzel, E. A., Arking, D. E., West, K. M., Dang, C. V., Thomas-Tikhonenko, A., Mendell, J. T., 2008. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet.* 40, 43-50.
- Chang, T. C., Zeitels, L. R., Hwang, H. W., Chivukula, R. R., Wentzel, E. A., Dews, M., Jung, J., Gao, P., Dang, C. V., Beer, M. A., Thomas-Tikhonenko, A., Mendell, J. T., 2009. Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 3384-9.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M., Hannon, G. J., 2010. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature.* 465, 584-9.
- Cheng, C., Bhardwaj, N., Gerstein, M., 2009. The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs. *BMC Genomics.* 10, 431.
- Chi, S. W., Zang, J. B., Mele, A., Darnell, R. B., 2009. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature.* 460, 479-86.
- Christiansen, J., Kolte, A. M., Hansen, T., Nielsen, F. C., 2009. IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes. *J Mol Endocrinol.* 43, 187-95.
- Ciafre, S. A., Galardi, S., 2013. microRNAs and RNA-binding proteins: a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer. *RNA Biol.* 10, 935-42.
- Cifone, M. A., Fidler, I. J., 1980. Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from a murine fibrosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 1039-43.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D. W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G. J., Lawson, N. D., Wolfe, S. A., Giraldez, A. J., 2010. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science.* 328, 1694-8.
- Cleynen, I., Brants, J. R., Peeters, K., Deckers, R., Debiec-Rychter, M., Scot, R., Van de Ven, W. J., Petit, M. M., 2007. HMGA2 regulates transcription of the Imp2 gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor-kappaB. *Mol Cancer Res.* 5, 363-72.
- Dahiya, N., Sherman-Baust, C. A., Wang, T. L., Davidson, B., Shih Ie, M., Zhang, Y., Wood, W., 3rd, Becker, K. G., Morin, P. J., 2008. MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One.* 3, e2436.
- Dahm, R., Kiebler, M., 2005. Cell biology: silenced RNA on the move. *Nature.* 438, 432-5.
- Dai, N., Rapley, J., Angel, M., Yanik, M. F., Blower, M. D., Avruch, J., 2011. mTOR phosphorylates IMP2 to promote IGF2 mRNA translation by internal ribosomal entry. *Genes Dev.* 25, 1159-72.
- Darr, H., Benvenisty, N., 2009. Genetic analysis of the role of the reprogramming gene LIN-28 in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 27, 352-62.
- Davidson, B., Rosenfeld, Y. B., Holth, A., Hellesylt, E., Trope, C. G., Reich, R., Yisraeli, J. K., 2014. VICKZ2 protein expression in ovarian serous carcinoma effusions is associated with poor survival. *Hum Pathol.* 45, 1520-8.
- de Giorgio, A., Krell, J., Harding, V., Stebbing, J., Castellano, L., 2013. Emerging roles of competing

- endogenous RNAs in cancer: insights from the regulation of PTEN. *Mol Cell Biol.* 33, 3976-82.
- Dimitriadis, E., Trangas, T., Milatos, S., Foukas, P. G., Gioulbasanis, I., Courtis, N., Nielsen, F. C., Pandis, N., Dafni, U., Bardi, G., Ioannidis, P., 2007. Expression of oncofetal RNA-binding protein CRD-BP/IMP1 predicts clinical outcome in colon cancer. *Int J Cancer.* 121, 486-94.
- Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C., Schultz, N., 2013. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun.* 4, 2126.
- Doyle, G. A., Betz, N. A., Leeds, P. F., Fleisig, A. J., Prokipcak, R. D., Ross, J., 1998. The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 26, 5036-44.
- Dweep, H., Sticht, C., Gretz, N., 2013. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Curr Genomics.* 14, 127-36.
- Easow, G., Teleman, A. A., Cohen, S. M., 2007. Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *RNA.* 13, 1198-204.
- Ebert, M. S., Neilson, J. R., Sharp, P. A., 2007. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods.* 4, 721-6.
- Eichhorn, S. W., Guo, H., McGeary, S. E., Rodriguez-Mias, R. A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S. H., Ghoshal, K., Villen, J., Bartel, D. P., 2014. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell.* 56, 104-15.
- Elcheva, I., Goswami, S., Noubissi, F. K., Spiegelman, V. S., 2009. CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Mol Cell.* 35, 240-6.
- Elcheva, I., Tarapore, R. S., Bhatia, N., Spiegelman, V. S., 2008. Overexpression of mRNA-binding protein CRD-BP in malignant melanomas. *Oncogene.* 27, 5069-74.
- Fang, Z., Rajewsky, N., 2011. The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One.* 6, e18067.
- Farina, K. L., Huttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R., Singer, R. H., 2003. Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol.* 160, 77-87.
- Faye, M. D., Beug, S. T., Graber, T. E., Earl, N., Xiang, X., Wild, B., Langlois, S., Michaud, J., Cowan, K. N., Korneluk, R. G., Holcik, M., 2015. IGF2BP1 controls cell death and drug resistance in rhabdomyosarcomas by regulating translation of cIAP1. *Oncogene.* 34, 1532-41.
- Fedele, M., Battista, S., Kenyon, L., Baldassarre, G., Fidanza, V., Klein-Szanto, A. J., Parlow, A. F., Visone, R., Pierantoni, G. M., Outwater, E., Santoro, M., Croce, C. M., Fusco, A., 2002. Overexpression of the HMGA2 gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas. *Oncogene.* 21, 3190-8.
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J. A., Paz-Ares, J., 2007. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet.* 39, 1033-7.
- Frost, R. J., Olson, E. N., 2011. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 21075-80.
- Fusco, A., Fedele, M., 2007. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 7, 899-910.
- Gaken, J., Mohamedali, A. M., Jiang, J., Malik, F., Stangl, D., Smith, A. E., Chronis, C., Kulasekararaj, A. G., Thomas, N. S., Farzaneh, F., Tavassoli, M., Mufti, G. J., 2012. A functional assay for microRNA target identification and validation. *Nucleic Acids Res.* 40, e75.
- Gantier, M. P., McCoy, C. E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A. T., Behlke, M. A., Hertzog, P. J., Mackay, F., Williams, B. R., 2011. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* 39, 5692-703.
- Glasmacher, E., Hoefig, K. P., Vogel, K. U., Rath, N., Du, L., Wolf, C., Kremmer, E., Wang, X., Heissmeyer, V., 2010. Roquin binds inducible costimulator mRNA and effectors of mRNA decay to induce microRNA-independent post-transcriptional repression. *Nat Immunol.* 11, 725-33.
- Goswami, S., Tarapore, R. S., Teslaa, J. J., Grinblat, Y., Setaluri, V., Spiegelman, V. S., 2010. MicroRNA-340-mediated degradation of microphthalmia-associated transcription factor mRNA is

- inhibited by the coding region determinant-binding protein. *J Biol Chem.* 285, 20532-40.
- Graf, R., Munschauer, M., Mastrobuoni, G., Mayr, F., Heinemann, U., Kempa, S., Rajewsky, N., Landthaler, M., 2013. Identification of LIN28B-bound mRNAs reveals features of target recognition and regulation. *RNA Biol.* 10, 1146-59.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36, 59-74.
- Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., Bartel, D. P., 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 27, 91-105.
- Gu, L., Shigemasa, K., Ohama, K., 2004. Increased expression of IGF II mRNA-binding protein 1 mRNA is associated with an advanced clinical stage and poor prognosis in patients with ovarian cancer. *Int J Oncol.* 24, 671-8.
- Gu, W., Wells, A. L., Pan, F., Singer, R. H., 2008. Feedback regulation between zipcode binding protein 1 and beta-catenin mRNAs in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 28, 4963-74.
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., Bartel, D. P., 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 466, 835-40.
- Guo, Y., Chen, Y., Ito, H., Watanabe, A., Ge, X., Kodama, T., Aburatani, H., 2006. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene.* 384, 51-61.
- Gurtan, A. M., Ravi, A., Rahl, P. B., Bosson, A. D., JnBaptiste, C. K., Bhutkar, A., Whittaker, C. A., Young, R. A., Sharp, P. A., 2013. Let-7 represses Nr6a1 and a mid-gestation developmental program in adult fibroblasts. *Genes Dev.* 27, 941-54.
- Gutschner, T., Hammerle, M., Pazaitis, N., Bley, N., Fiskin, E., Uckelmann, H., Heim, A., Grobeta, M., Hofmann, N., Geffers, R., Skawran, B., Longerich, T., Breuhahn, K., Schirmacher, P., Muhleck, B., Huttelmaier, S., Diederichs, S., 2014. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) is an important protumorigenic factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 59, 1900-11.
- Ha, M., Kim, V. N., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15, 509-24.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A. C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G. S., Dewell, S., Zavolan, M., Tuschl, T., 2010a. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell.* 141, 129-41.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jungkamp, A. C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G. S., Dewell, S., Zavolan, M., Tuschl, T., 2010b. PAR-CLIP--a method to identify transcriptome-wide the binding sites of RNA binding proteins. *J Vis Exp.*
- Hafner, M., Max, K. E., Bandaru, P., Morozov, P., Gerstberger, S., Brown, M., Molina, H., Tuschl, T., 2013. Identification of mRNAs bound and regulated by human LIN28 proteins and molecular requirements for RNA recognition. *RNA.* 19, 613-26.
- Hamilton, K. E., Noubissi, F. K., Katti, P. S., Hahn, C. M., Davey, S. R., Lundsmith, E. T., Klein-Szanto, A. J., Rhim, A. D., Spiegelman, V. S., Rustgi, A. K., 2013. IMP1 promotes tumor growth, dissemination and a tumor-initiating cell phenotype in colorectal cancer cell xenografts. *Carcinogenesis.* 34, 2647-54.
- Hammer, N. A., Hansen, T., Byskov, A. G., Rajpert-De Meyts, E., Grondahl, M. L., Bredkjaer, H. E., Wewer, U. M., Christiansen, J., Nielsen, F. C., 2005. Expression of IGF-II mRNA-binding proteins (IMPs) in gonads and testicular cancer. *Reproduction.* 130, 203-12.
- Hammerle, M., Gutschner, T., Uckelmann, H., Ozgur, S., Fiskin, E., Gross, M., Skawran, B., Geffers, R., Longerich, T., Breuhahn, K., Schirmacher, P., Stoecklin, G., Diederichs, S., 2013. Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the IGF2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1). *Hepatology.* 58, 1703-12.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144, 646-74.
- Hannus, M., Beitzinger, M., Engelmann, J. C., Weickert, M. T., Spang, R., Hannus, S., Meister, G., 2014. siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects.

- Nucleic Acids Res. 42, 8049-61.
- Hansen, T. V., Hammer, N. A., Nielsen, J., Madsen, M., Dalbaeck, C., Wewer, U. M., Christiansen, J., Nielsen, F. C., 2004. Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 24, 4448-64.
- Haraguchi, T., Nakano, H., Tagawa, T., Ohki, T., Ueno, Y., Yoshida, T., Iba, H., 2012. A potent 2'-O-methylated RNA-based microRNA inhibitor with unique secondary structures. *Nucleic Acids Res.* 40, e58.
- Haraguchi, T., Ozaki, Y., Iba, H., 2009. Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 37, e43.
- Hassan, T., Smith, S. G., Gaughan, K., Oglesby, I. K., O'Neill, S., McElvaney, N. G., Greene, C. M., 2013. Isolation and identification of cell-specific microRNAs targeting a messenger RNA using a biotinylated anti-sense oligonucleotide capture affinity technique. *Nucleic Acids Res.* 41, e71.
- Hausser, J., Zavolan, M., 2014. Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet.* 15, 599-612.
- He, S., Nakada, D., Morrison, S. J., 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25, 377-406.
- Heldin, C. H., Johnsson, A., Wennergren, S., Wernstedt, C., Betsholtz, C., Westermark, B., 1986. A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature.* 319, 511-4.
- Helland, A., Anglesio, M. S., George, J., Cowin, P. A., Johnstone, C. N., House, C. M., Sheppard, K. E., Etemadmoghadam, D., Melnyk, N., Rustgi, A. K., Phillips, W. A., Johnsen, H., Holm, R., Kristensen, G. B., Birrer, M. J., Pearson, R. B., Borresen-Dale, A. L., Huntsman, D. G., deFazio, A., Creighton, C. J., Smyth, G. K., Bowtell, D. D., 2011. Deregulation of MYCN, LIN28B and LET7 in a molecular subtype of aggressive high-grade serous ovarian cancers. *PLoS One.* 6, e18064.
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., Tollervey, D., 2013. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell.* 153, 654-65.
- Hendrickson, D. G., Hogan, D. J., McCullough, H. L., Myers, J. W., Herschlag, D., Ferrell, J. E., Brown, P. O., 2009. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol.* 7, e1000238.
- Hollensen, A. K., Bak, R. O., Haslund, D., Mikkelsen, J. G., 2013. Suppression of microRNAs by dual-targeting and clustered Tough Decoy inhibitors. *RNA Biol.* 10, 406-14.
- Hsu, K. F., Shen, M. R., Huang, Y. F., Cheng, Y. M., Lin, S. H., Chow, N. H., Cheng, S. W., Chou, C. Y., Ho, C. L., 2015. Overexpression of the RNA-binding proteins Lin28B and IGF2BP3 (IMP3) is associated with chemoresistance and poor disease outcome in ovarian cancer. *Br J Cancer.* 113, 414-24.
- Hu, X., Guo, J., Zheng, L., Li, C., Zheng, T. M., Tanyi, J. L., Liang, S., Benedetto, C., Mitidieri, M., Katsaros, D., Zhao, X., Zhang, Y., Huang, Q., Zhang, L., 2013. The heterochronic microRNA let-7 inhibits cell motility by regulating the genes in the actin cytoskeleton pathway in breast cancer. *Mol Cancer Res.* 11, 240-50.
- Huang, X., Huang, M., Kong, L., Li, Y., 2015. miR-372 suppresses tumour proliferation and invasion by targeting IGF2BP1 in renal cell carcinoma. *Cell Prolif.* 48, 593-9.
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I., Preiss, T., 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 16961-6.
- Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* 12, 99-110.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J., Singer, R. H., 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature.* 438, 512-5.
- Ioannidis, P., Mahaira, L., Papadopoulou, A., Teixeira, M. R., Heim, S., Andersen, J. A., Evangelou, E., Dafni, U., Pandis, N., Trangas, T., 2003. 8q24 Copy number gains and expression of the c-myc

- mRNA stabilizing protein CRD-BP in primary breast carcinomas. *Int J Cancer*. 104, 54-9.
- lorio, M. V., Croce, C. M., 2012. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*. 4, 143-59.
- Jansson, M. D., Lund, A. H., 2012. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*. 6, 590-610.
- Janzen, D. M., Tiourin, E., Salehi, J. A., Paik, D. Y., Lu, J., Pellegrini, M., Memarzadeh, S., 2015. An apoptosis-enhancing drug overcomes platinum resistance in a tumour-initiating subpopulation of ovarian cancer. *Nat Commun*. 6, 7956.
- Jens, M., Rajewsky, N., 2015. Competition between target sites of regulators shapes post-transcriptional gene regulation. *Nat Rev Genet*. 16, 113-26.
- Jonas, S., Izaurralde, E., 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*. 16, 421-33.
- Jones, P. M., Drapkin, R., 2013. Modeling High-Grade Serous Carcinoma: How Converging Insights into Pathogenesis and Genetics are Driving Better Experimental Platforms. *Front Oncol*. 3, 217.
- Jonson, L., Christiansen, J., Hansen, T. V., Vikesa, J., Yamamoto, Y., Nielsen, F. C., 2014. IMP3 RNP safe houses prevent miRNA-directed HMGA2 mRNA decay in cancer and development. *Cell Rep*. 7, 539-51.
- Jonson, L., Vikesaa, J., Krogh, A., Nielsen, L. K., Hansen, T., Borup, R., Johnsen, A. H., Christiansen, J., Nielsen, F. C., 2007. Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics*. 6, 798-811.
- Kallen, A. N., Zhou, X. B., Xu, J., Qiao, C., Ma, J., Yan, L., Lu, L., Liu, C., Yi, J. S., Zhang, H., Min, W., Bennett, A. M., Gregory, R. I., Ding, Y., Huang, Y., 2013. The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Mol Cell*. 52, 101-12.
- Kalluri, R., Weinberg, R. A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 119, 1420-8.
- Kawamata, T., Tomari, Y., 2010. Making RISC. *Trends Biochem Sci*. 35, 368-76.
- Khan, A. A., Betel, D., Miller, M. L., Sander, C., Leslie, C. S., Marks, D. S., 2009. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol*. 27, 549-55.
- Kim, A., Ueda, Y., Naka, T., Enomoto, T., 2012a. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 31, 14.
- Kim, H. H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E. K., Martindale, J. L., Gorospe, M., 2009. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev*. 23, 1743-8.
- Kim, J., Coffey, D. M., Creighton, C. J., Yu, Z., Hawkins, S. M., Matzuk, M. M., 2012b. High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 3921-6.
- Kim, Y. N., Koo, K. H., Sung, J. Y., Yun, U. J., Kim, H., 2012c. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol*. 2012, 306879.
- Kislauskis, E. H., Zhu, X., Singer, R. H., 1994. Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol*. 127, 441-51.
- Kobayashi, E., Masuda, M., Nakayama, R., Ichikawa, H., Satow, R., Shitashige, M., Honda, K., Yamaguchi, U., Shoji, A., Tochigi, N., Morioka, H., Toyama, Y., Hirohashi, S., Kawai, A., Yamada, T., 2010. Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma. *Mol Cancer Ther*. 9, 535-44.
- Kobel, M., Weidensdorfer, D., Reinke, C., Lederer, M., Schmitt, W. D., Zeng, K., Thomssen, C., Hauptmann, S., Huttelmaier, S., 2007. Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncogene*. 26, 7584-9.
- Kolenda, T., Przybyla, W., Teresiak, A., Mackiewicz, A., Lamperska, K. M., 2014. The mystery of let-7d - a small RNA with great power. *Contemp Oncol (Pozn)*. 18, 293-301.
- Koshiyama, M., Matsumura, N., Konishi, I., 2014. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *Biomed Res Int*. 2014, 934261.

- Kowalewska, M., Bakula-Zalewska, E., Chechlinska, M., Goryca, K., Nasierowska-Guttmejer, A., Danska-Bidzinska, A., Bidzinski, M., 2013. microRNAs in uterine sarcomas and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors: a preliminary report. *Tumour Biol.* 34, 2153-60.
- Kuhn, E., Tisato, V., Rimondi, E., Secchiero, P., 2015. Current preclinical models of ovarian cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*
- Kumar, M. S., Armenteros-Monterroso, E., East, P., Chakravorty, P., Matthews, N., Winslow, M. M., Downward, J., 2014. HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature.* 505, 212-7.
- Kurman, R. J., Shih Ie, M., 2011. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 42, 918-31.
- Lal, A., Navarro, F., Maher, C. A., Maliszewski, L. E., Yan, N., O'Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D. M., Tsai, P., Hofmann, O., Becker, K. G., Gorospe, M., Hide, W., Lieberman, J., 2009. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell.* 35, 610-25.
- Lapidus, K., Wyckoff, J., Mouneimne, G., Lorenz, M., Soon, L., Condeelis, J. S., Singer, R. H., 2007. ZBP1 enhances cell polarity and reduces chemotaxis. *J Cell Sci.* 120, 3173-8.
- Lau, D. H., Lewis, A. D., Ehsan, M. N., Sikic, B. I., 1991. Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin. *Cancer Res.* 51, 5181-7.
- Lederer, M., Bley, N., Schleifer, C., Huttelmaier, S., 2014. The role of the oncofetal IGF2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3) in cancer. *Semin Cancer Biol.* 29, 3-12.
- Lee, J. Y., Kim, H. J., Yoon, N. A., Lee, W. H., Min, Y. J., Ko, B. K., Lee, B. J., Lee, A., Cha, H. J., Cho, W. J., Park, J. W., 2013. Tumor suppressor p53 plays a key role in induction of both tristetraprolin and let-7 in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 5614-25.
- Lee, Y. S., Dutta, A., 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 21, 1025-30.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., Bartel, D. P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 120, 15-20.
- Li, X., Zhang, J., Gao, L., McClellan, S., Finan, M. A., Butler, T. W., Owen, L. B., Piazza, G. A., Xi, Y., 2012. MiR-181 mediates cell differentiation by interrupting the Lin28 and let-7 feedback circuit. *Cell Death Differ.* 19, 378-86.
- Lieber, M., Mazzeita, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., Todaro, G., 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer.* 15, 741-7.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., Johnson, J. M., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 433, 769-73.
- Lisowska, K. M., Olbryt, M., Dudaladava, V., Pamula-Pilat, J., Kujawa, K., Grzybowska, E., Jarzab, M., Student, S., Rzepecka, I. K., Jarzab, B., Kupryjanczyk, J., 2014. Gene expression analysis in ovarian cancer - faults and hints from DNA microarray study. *Front Oncol.* 4, 6.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402-8.
- Lozier, A. M., Rich, M. E., Grawe, A. P., Peck, A. S., Zhao, P., Chang, A. T., Bond, J. P., Sholler, G. S., 2015. Targeting ornithine decarboxylase reverses the LIN28/Let-7 axis and inhibits glycolytic metabolism in neuroblastoma. *Oncotarget.* 6, 196-206.
- Lu, M., Nakamura, R. M., Dent, E. D., Zhang, J. Y., Nielsen, F. C., Christiansen, J., Chan, E. K., Tan, E. M., 2001. Aberrant expression of fetal RNA-binding protein p62 in liver cancer and liver cirrhosis. *Am J Pathol.* 159, 945-53.
- Maizels, Y., Oberman, F., Miloslavski, R., Ginzach, N., Berman, M., Yisraeli, J. K., 2015. Localization of cofilin mRNA to the leading edge of migrating cells promotes directed cell migration. *J Cell Sci.* 128, 1922-33.
- Malek, A., Bakhidze, E., Noske, A., Sers, C., Aigner, A., Schafer, R., Tchernitsa, O., 2008. HMGA2 gene

- is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. *Int J Cancer*. 123, 348-56.
- Mark, J., Ekedahl, C., Dahlenfors, R., Westermarck, B., 1987. Cytogenetical observations in five human anaplastic thyroid carcinomas. *Hereditas*. 107, 163-74.
- Martinez-Sanchez, A., Murphy, C. L., 2013. *MicroRNA Target Identification-Experimental Approaches*. Biology (Basel). 2, 189-205.
- Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., Sonenberg, N., 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*. 317, 1764-7.
- Mattila, P. K., Lappalainen, P., 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9, 446-54.
- Mayr, C., Bartel, D. P., 2009. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell*. 138, 673-84.
- Mayr, C., Hemann, M. T., Bartel, D. P., 2007. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*. 315, 1576-9.
- Mayr, F., Heinemann, U., 2013. Mechanisms of Lin28-mediated miRNA and mRNA regulation--a structural and functional perspective. *Int J Mol Sci*. 14, 16532-53.
- Meyer, M., Kircher, M., 2010. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010, pdb prot5448.
- Mogilyansky, E., Rigoutsos, I., 2013. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ*. 20, 1603-14.
- Molenaar, J. J., Domingo-Fernandez, R., Ebus, M. E., Lindner, S., Koster, J., Drabek, K., Mestdagh, P., van Sluis, P., Valentijn, L. J., van Nes, J., Broekmans, M., Haneveld, F., Volckmann, R., Bray, I., Heukamp, L., Sprussel, A., Thor, T., Kieckbusch, K., Klein-Hitpass, L., Fischer, M., Vandesompele, J., Schramm, A., van Noesel, M. M., Varesio, L., Speleman, F., Eggert, A., Stallings, R. L., Caron, H. N., Versteeg, R., Schulte, J. H., 2012. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet*. 44, 1199-206.
- Mongroo, P. S., Noubissi, F. K., Cuatrecasas, M., Kalabis, J., King, C. E., Johnstone, C. N., Bowser, M. J., Castells, A., Spiegelman, V. S., Rustgi, A. K., 2011. IMP-1 displays cross-talk with K-Ras and modulates colon cancer cell survival through the novel proapoptotic protein CYFIP2. *Cancer Res*. 71, 2172-82.
- Mori, H., Sakakibara, S., Imai, T., Nakamura, Y., Iijima, T., Suzuki, A., Yuasa, Y., Takeda, M., Okano, H., 2001. Expression of mouse igf2 mRNA-binding protein 3 and its implications for the developing central nervous system. *J Neurosci Res*. 64, 132-43.
- Mueller-Pillasch, F., Pohl, B., Wilda, M., Lacher, U., Beil, M., Wallrapp, C., Hameister, H., Knochel, W., Adler, G., Gress, T. M., 1999. Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis. *Mech Dev*. 88, 95-9.
- Nair, V. S., Maeda, L. S., Ioannidis, J. P., 2012. Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. *J Natl Cancer Inst*. 104, 528-40.
- Nam, E. J., Yoon, H., Kim, S. W., Kim, H., Kim, Y. T., Kim, J. H., Kim, J. W., Kim, S., 2008. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 14, 2690-5.
- Natkunam, Y., Vainer, G., Chen, J., Zhao, S., Marinelli, R. J., Hammer, A. S., Hamilton-Dutoit, S., Pikarsky, E., Amir, G., Levy, R., Yisraeli, J. K., Lossos, I. S., 2007. Expression of the RNA-binding protein VICKZ in normal hematopoietic tissues and neoplasms. *Haematologica*. 92, 176-83.
- Nguyen, L. H., Robinton, D. A., Seligson, M. T., Wu, L., Li, L., Rakheja, D., Comerford, S. A., Ramezani, S., Sun, X., Parikh, M. S., Yang, E. H., Powers, J. T., Shinoda, G., Shah, S. P., Hammer, R. E., Daley, G. Q., Zhu, H., 2014. Lin28b is sufficient to drive liver cancer and necessary for its maintenance in murine models. *Cancer Cell*. 26, 248-61.
- Nielsen, C. B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J., Burge, C. B., 2007. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA*. 13, 1894-910.
- Nielsen, J., Adolph, S. K., Rajpert-De Meyts, E., Lykke-Andersen, J., Koch, G., Christiansen, J., Nielsen,

- F. C., 2003. Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1. *Biochem J.* 376, 383-91.
- Nielsen, J., Christiansen, J., Lykke-Andersen, J., Johnsen, A. H., Wewer, U. M., Nielsen, F. C., 1999. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol.* 19, 1262-70.
- Nishino, J., Kim, S., Zhu, Y., Zhu, H., Morrison, S. J., 2013. A network of heterochronic genes including Imp1 regulates temporal changes in stem cell properties. *Elife.* 2, e00924.
- Nottrott, S., Simard, M. J., Richter, J. D., 2006. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol.* 13, 1108-14.
- Noubissi, F. K., Elcheva, I., Bhatia, N., Shakoori, A., Ougolkov, A., Liu, J., Minamoto, T., Ross, J., Fuchs, S. Y., Spiegelman, V. S., 2006. CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature.* 441, 898-901.
- Noubissi, F. K., Goswami, S., Sanek, N. A., Kawakami, K., Minamoto, T., Moser, A., Grinblat, Y., Spiegelman, V. S., 2009. Wnt signaling stimulates transcriptional outcome of the Hedgehog pathway by stabilizing GLI1 mRNA. *Cancer Res.* 69, 8572-8.
- Noubissi, F. K., Nikiforov, M. A., Colburn, N., Spiegelman, V. S., 2010. Transcriptional Regulation of CRD-BP by c-myc: Implications for c-myc Functions. *Genes Cancer.* 1, 1074-82.
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., Mendell, J. T., 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* 435, 839-43.
- Oberman, F., Rand, K., Maizels, Y., Rubinstein, A. M., Yisraeli, J. K., 2007. VICKZ proteins mediate cell migration via their RNA binding activity. *RNA.* 13, 1558-69.
- Ohdaira, H., Sekiguchi, M., Miyata, K., Yoshida, K., 2012. MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells. *Cell Prolif.* 45, 32-8.
- Oleynikov, Y., Singer, R. H., 2003. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol.* 13, 199-207.
- Orom, U. A., Lund, A. H., 2007. Isolation of microRNA targets using biotinylated synthetic microRNAs. *Methods.* 43, 162-5.
- Pan, F., Huttelmaier, S., Singer, R. H., Gu, W., 2007. ZBP2 facilitates binding of ZBP1 to beta-actin mRNA during transcription. *Mol Cell Biol.* 27, 8340-51.
- Paoli, P., Giannoni, E., Chiarugi, P., 2013. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 1833, 3481-98.
- Park, S. M., Shell, S., Radjabi, A. R., Schickel, R., Feig, C., Boyerinas, B., Dinulescu, D. M., Lengyel, E., Peter, M. E., 2007. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle.* 6, 2585-90.
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., Sharp, P. A., 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell.* 21, 533-42.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., Filipowicz, W., 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science.* 309, 1573-6.
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., Pandolfi, P. P., 2010. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature.* 465, 1033-8.
- Prat, J., 2015. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol.* 26, 87-9.
- Rajewsky, N., 2006. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet.* 38 Suppl, S8-13.
- Rebucci, M., Sermeus, A., Leonard, E., Delaive, E., Dieu, M., Fransolet, M., Arnould, T., Michiels, C., 2015. miRNA-196b inhibits cell proliferation and induces apoptosis in HepG2 cells by targeting IGF2BP1. *Mol Cancer.* 14, 79.
- Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M., Giegerich, R., 2004. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA.* 10, 1507-17.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 403, 901-6.

- Robinson, M. D., Oshlack, A., 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 11, R25.
- Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E. H., Taneja, K. L., Singer, R. H., 1997. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol.* 17, 2158-65.
- Roush, S., Slack, F. J., 2008. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 18, 505-16.
- Ru, Y., Kechris, K. J., Tabakoff, B., Hoffman, P., Radcliffe, R. A., Bowler, R., Mahaffey, S., Rossi, S., Calin, G. A., Bemis, L., Theodorescu, D., 2014. The multiMiR R package and database: integration of microRNA-target interactions along with their disease and drug associations. *Nucleic Acids Res.* 42, e133.
- Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E. E., Nitsch, R., Wulczyn, F. G., 2008. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol.* 10, 987-93.
- Saetrom, P., Heale, B. S., Snove, O., Jr., Aagaard, L., Alluin, J., Rossi, J. J., 2007. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res.* 35, 2333-42.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., Pandolfi, P. P., 2011. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell.* 146, 353-8.
- Sambrook, J., Russell, D. W., 2006. Separation of RNA According to Size: Electrophoresis of RNA through Agarose Gels Containing Formaldehyde. *CSH Protoc.* 2006.
- Sankaranarayanan, R., Ferlay, J., 2006. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 20, 207-25.
- Sassen, S., Miska, E. A., Caldas, C., 2008. MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Arch.* 452, 1-10.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., Gey, G. O., 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 97, 695-710.
- Schulman, B. R., Esquela-Kerscher, A., Slack, F. J., 2005. Reciprocal expression of lin-41 and the microRNAs let-7 and mir-125 during mouse embryogenesis. *Dev Dyn.* 234, 1046-54.
- Seitz, H., 2009. Redefining microRNA targets. *Curr Biol.* 19, 870-3.
- Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., Rajewsky, N., 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 455, 58-63.
- Shaw, T. J., Senterman, M. K., Dawson, K., Crane, C. A., Vanderhyden, B. C., 2004. Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Mol Ther.* 10, 1032-42.
- Shell, S., Park, S. M., Radjabi, A. R., Schickel, R., Kistner, E. O., Jewell, D. A., Feig, C., Lengyel, E., Peter, M. E., 2007. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 11400-5.
- Shin, C., Nam, J. W., Farh, K. K., Chiang, H. R., Shkumatava, A., Bartel, D. P., 2010. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell.* 38, 789-802.
- Shyh-Chang, N., Daley, G. Q., 2013. Lin28: primal regulator of growth and metabolism in stem cells. *Cell Stem Cell.* 12, 395-406.
- Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., Jemal, A., 2011. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 61, 212-36.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 51, 1409-16.
- Sparanese, D., Lee, C. H., 2007. CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 35, 1209-21.
- Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., Kauppinen, S., 2012. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence.* 3, 1.
- Stohr, N., Huttelmaier, S., 2012. IGF2BP1: a post-transcriptional "driver" of tumor cell migration. *Cell Adh Migr.* 6, 312-8.
- Stohr, N., Kohn, M., Lederer, M., Glass, M., Reinke, C., Singer, R. H., Huttelmaier, S., 2012. IGF2BP1

- promotes cell migration by regulating MK5 and PTEN signaling. *Genes Dev.* 26, 176-89.
- Tan, M. H., Nowak, N. J., Loor, R., Ochi, H., Sandberg, A. A., Lopez, C., Pickren, J. W., Berjian, R., Douglass, H. O., Jr., Chu, T. M., 1986. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest.* 4, 15-23.
- Tessier, C. R., Doyle, G. A., Clark, B. A., Pitot, H. C., Ross, J., 2004. Mammary tumor induction in transgenic mice expressing an RNA-binding protein. *Cancer Res.* 64, 209-14.
- Thiery, J. P., 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2, 442-54.
- Thomson, D. W., Bracken, C. P., Goodall, G. J., 2011. Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res.* 39, 6845-53.
- Thomson, J. M., Newman, M., Parker, J. S., Morin-Kensicki, E. M., Wright, T., Hammond, S. M., 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* 20, 2202-7.
- Thomson, J. M., Parker, J., Perou, C. M., Hammond, S. M., 2004. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods.* 1, 47-53.
- Thornton, J. E., Gregory, R. I., 2012. How does Lin28 let-7 control development and disease? *Trends Cell Biol.* 22, 474-82.
- Toledano, H., D'Alterio, C., Czech, B., Levine, E., Jones, D. L., 2012. The let-7-Imp axis regulates ageing of the *Drosophila* testis stem-cell niche. *Nature.* 485, 605-10.
- Vainer, G., Vainer-Mosse, E., Pikarsky, A., Shenoy, S. M., Oberman, F., Yeffet, A., Singer, R. H., Pikarsky, E., Yisraeli, J. K., 2008. A role for VICKZ proteins in the progression of colorectal carcinomas: regulating lamellipodia formation. *J Pathol.* 215, 445-56.
- Vikesaa, J., Hansen, T. V., Jonson, L., Borup, R., Wewer, U. M., Christiansen, J., Nielsen, F. C., 2006. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J.* 25, 1456-68.
- Viswanathan, S. R., Powers, J. T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T. L., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L. A., Lockhart, V. L., Shah, S. P., Tanwar, P. S., Mermel, C. H., Beroukhim, R., Azam, M., Teixeira, J., Meyerson, M., Hughes, T. P., Llovet, J. M., Radich, J., Mullighan, C. G., Golub, T. R., Sorensen, P. H., Daley, G. Q., 2009. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet.* 41, 843-8.
- Vo, N. K., Dalton, R. P., Liu, N., Olson, E. N., Goodman, R. H., 2010. Affinity purification of microRNA-133a with the cardiac transcription factor, Hand2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 19231-6.
- Volinia, S., Galasso, M., Sana, M. E., Wise, T. F., Palatini, J., Huebner, K., Croce, C. M., 2012. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 3024-9.
- Wachter, K., Kohn, M., Stohr, N., Huttelmaier, S., 2013. Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA-binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains. *Biol Chem.* 394, 1077-90.
- Wang, R. J., Li, J. W., Bao, B. H., Wu, H. C., Du, Z. H., Su, J. L., Zhang, M. H., Liang, H. Q., 2015a. MicroRNA-873 (miRNA-873) inhibits glioblastoma tumorigenesis and metastasis by suppressing the expression of IGF2BP1. *J Biol Chem.* 290, 8938-48.
- Wang, T., Wang, G., Hao, D., Liu, X., Wang, D., Ning, N., Li, X., 2015b. Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. *Mol Cancer.* 14, 125.
- Wang, X., Cao, L., Wang, Y., Liu, N., You, Y., 2012. Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett.* 3, 955-960.
- Wang, Z., Lin, S., Li, J. J., Xu, Z., Yao, H., Zhu, X., Xie, D., Shen, Z., Sze, J., Li, K., Lu, G., Chan, D. T., Poon, W. S., Kung, H. F., Lin, M. C., 2011. MYC protein inhibits transcription of the microRNA cluster MC-let-7a-1~let-7d via noncanonical E-box. *J Biol Chem.* 286, 39703-14.
- Weidensdorfer, D., Stohr, N., Baude, A., Lederer, M., Kohn, M., Schierhorn, A., Buchmeier, S., Wahle, E., Huttelmaier, S., 2009. Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA.* 15, 104-15.
- Weinlich, S., Huttelmaier, S., Schierhorn, A., Behrens, S. E., Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H.,

2009. IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA*. 15, 1528-42.
- Wilczynska, A., Bushell, M., 2015. The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ.* 22, 22-33.
- Wu, J., Liu, Z., Shao, C., Gong, Y., Hernando, E., Lee, P., Narita, M., Muller, W., Liu, J., Wei, J. J., 2011. HMGA2 overexpression-induced ovarian surface epithelial transformation is mediated through regulation of EMT genes. *Cancer Res.* 71, 349-59.
- Wu, J., Wei, J. J., 2013. HMGA2 and high-grade serous ovarian carcinoma. *J Mol Med (Berl)*. 91, 1155-65.
- Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R., He, X., 2010. Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*. 29, 2302-8.
- Wulczyn, F. G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwidzinski, E., Ninnemann, O., Strehle, M., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., 2007. Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB J.* 21, 415-26.
- Yan, J., Zhang, Y., Shi, W., Ren, C., Liu, Y., Pan, Y., 2015a. The critical role of HMGA2 in regulation of EMT in epithelial ovarian carcinomas. *Tumour Biol*.
- Yan, L., Zhou, J., Gao, Y., Ghazal, S., Lu, L., Bellone, S., Yang, Y., Liu, N., Zhao, X., Santin, A. D., Taylor, H., Huang, Y., 2015b. Regulation of tumor cell migration and invasion by the H19/let-7 axis is antagonized by metformin-induced DNA methylation. *Oncogene*. 34, 3076-84.
- Yang, D. H., Moss, E. G., 2003. Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expr Patterns*. 3, 719-26.
- Yang, J. S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., Papapetrou, E. P., Sadelain, M., O'Carroll, D., Lai, E. C., 2010. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 15163-8.
- Yang, N., Kaur, S., Volinia, S., Greshock, J., Lassus, H., Hasegawa, K., Liang, S., Leminen, A., Deng, S., Smith, L., Johnstone, C. N., Chen, X. M., Liu, C. G., Huang, Q., Katsaros, D., Calin, G. A., Weber, B. L., Butzow, R., Croce, C. M., Coukos, G., Zhang, L., 2008. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 68, 10307-14.
- Yap, T. A., Carden, C. P., Kaye, S. B., 2009. Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*. 9, 167-81.
- Yekta, S., Shih, I. H., Bartel, D. P., 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 304, 594-6.
- Yisraeli, J. K., 2005. VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. *Biol Cell*. 97, 87-96.
- Yoda, M., Cifuentes, D., Izumi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Giraldez, A. J., Tomari, Y., 2013. Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs. *Cell Rep*. 5, 715-26.
- Zaidi, M. R., Okada, Y., Chada, K. K., 2006. Misexpression of full-length HMGA2 induces benign mesenchymal tumors in mice. *Cancer Res.* 66, 7453-9.
- Zhan, Q., Wang, C., Ngai, S., 2013. Ovarian cancer stem cells: a new target for cancer therapy. *Biomed Res Int*. 2013, 916819.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., Anderson, T. A., 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 302, 1-12.
- Zhang, H. L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S. M., Liebelt, D. A., Dichtenberg, J. B., Singer, R. H., Bassell, G. J., 2001. Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron*. 31, 261-75.
- Zhang, L., Liu, Y., Hao, S., Woda, B. A., Lu, D., 2011. IMP2 expression distinguishes endometrioid from serous endometrial adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 35, 868-72.
- Zhou, X., Benson, K. F., Ashar, H. R., Chada, K., 1995. Mutation responsible for the mouse pygmy

- phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature*. 376, 771-4.
- Zhou, X., Zhang, C. Z., Lu, S. X., Chen, G. G., Li, L. Z., Liu, L. L., Yi, C., Fu, J., Hu, W., Wen, J. M., Yun, J. P., 2015. miR-625 suppresses tumour migration and invasion by targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 34, 965-77.
- Zhu, H., Shyh-Chang, N., Segre, A. V., Shinoda, G., Shah, S. P., Einhorn, W. S., Takeuchi, A., Engreitz, J. M., Hagan, J. P., Kharas, M. G., Urbach, A., Thornton, J. E., Triboulet, R., Gregory, R. I., Altshuler, D., Daley, G. Q., 2011. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell*. 147, 81-94.
- Zirkel, A., Lederer, M., Stohr, N., Pazaitis, N., Huttelmaier, S., 2013. IGF2BP1 promotes mesenchymal cell properties and migration of tumor-derived cells by enhancing the expression of LEF1 and SNAI2 (SLUG). *Nucleic Acids Res*. 41, 6618-36.

7 Anhang

Tab. 7: Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Antikörper	Spezie	Bezugsquelle
Primäre Antikörper		
anti-IGF2BP1	Maus	BSBS AB facility
anti-IGF2BP2	Hase	Mobitec
anti-IGF2BP3	Ziege	Santa Cruz
anti-HMGA2	Hase	Cell Signaling
anti-LIN28B	Hase	Cell Signaling
anti-VIM	Maus	BD Bioscience
anti-CDH1	Hase	Abcam
anti-AGO2	Hase	Abcam
anti-AGO1	Hase	Abcam
anti-MBP	Maus	NEB
Anti-DCR1	Hase	Bethyl
anti-TUBA4A	Maus	Sigma Aldrich
anti-VCL	Maus	Sigma Aldrich
anti-GAPDH	Hase	Bethyl
anti-ACTB	Maus	Sigma Aldrich
anti-CTNNB1	Maus	Santa Cruz
Sekundäre Antikörper		
Maus-IRdye680/800	Esel-anti-Maus	LiCOR
Hase-IRdye680/800	Esel-anti-Hase	LiCOR
Ziege-IRdye800	Esel-anti-Ziege	LiCOR
Maus-Alexa488	Esel-anti-Maus	Jackson Immunoresearch

Tab. 8: Liste der Desoxynukleotide für Klonierungen

Gen	Sequenz (5' - 3')
TuD- <i>cel</i> -miR-239b-5p s	GGATCCGGACGGCGCTAGGATCATCAACCAGTACTTTTGTGTA GTACAAACAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACCAGTACTTTT GTGTAGTACAAA
TuD- <i>cel</i> -miR-239b-5p as	GAATTCTCGAGAAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGTTTGT ACTACACAAAAGTACTGGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTTG TTTGTACTACAC
TuD-miR-let-7a-5p s	GGATCCGGACGGCGCTAGGATCATCAACAACCTATAACAACCTAC TACCTCACAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACAACCTATAACAAC CTACTACCTCACA
TuD-miR-let-7a-5p as	GAATTCTCGAGAAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGTTGAG GTAGTAGTTGTATAGTTGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTT GTGAGGTAGTAG
TuD-miR-17-5p s	GGATCCGGACGGCGCTAGGATCATCAACCTACCTGCACTGTAA GCACTTTGCAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACCTACCTGCA CTGTAAGCACTTTGCA
TuD-miR-17-5p as	GAATTCTCGAGAAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGCAAAA GTGCTTACAGTGCAGGTAGTTGTATTCTGTGACCAGAATACT TGCAAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG
TuD-miR-181a-5p s	GGATCCGGACGGCGCTAGGATCATCAACACTCACCGACAGCG TTGAATGTTCAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACAACCTCACCG

	ACAGCGTTGAATGTT
TuD-miR-181a-5p as	GAATTCTCGAGAAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGAACAT TCAACGCTGTCGGTGAGTGTGTATTCTGTGACCAGAATACTT GAACATTCAACGCTGTCGGTGAGT
TuD-miR-196a-5p s	GGATCCGGACGGCGCTAGGATCATCAACCCCAACAACATGAA ACTACCTACAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACCCCAACAAC ATGAAACTACCTACA
TuD-miR-196a-5p as	GAATTCTCGAGAAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGTAGGT AGTTTCATGTTGTTGGGGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTTGT AGGTAGTTTCATGTTGTTGGG
TuD-miR-24-3p s	GGATCCGGACGGCGCTAGGATCATCAACAACATTCAACGCTGT CGGTGAGTCAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACAACATTCAA CGCTGTCGGTGAGTCA
TuD-miR-24-3p as	GAATTCTCGAGAAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGACTCA CCGACAGCGTTGAATGTTGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTT GACTCACCGACAGCGTTGAATGTT
LIN28B CDS s	CCCAATTGATGGCCGAAGGCGGGGC
LIN28B CDS as	GGGTGCACTTATGTCTTTTTCTTTTTTGAAGTGAAGG
2MS2 loops s	CCGGGCCCCACATGAGGATCACCCATGTGGGGGGGGGGGGGG GGGACATGAGGATCACCCATGTCTTTCTCGAGCC
2MS2 loops as	GGCTCGAGAAAGACATGGGTGATCCTCATGTCCCCCCCCCCCC CCCCACATGGGTGATCCTCATGTGGGGCCCCGG
IGF2BP1 3'-UTR s	TCTAGACCAGCCCCTCCCTGTCC
IGF2BP1 3'-UTR as	GGGAGCTCGAACAGAAAGTTATATTCAAAGG
MCS s	CTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTA GTCCAGTGTGGTGAATTCTGCAGATATCCAGCACAG
MCS as	TCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAATCCACCA CACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTA
IGF2BP1 3'-UTR s	GGATCCCCAGCCCCTCCCTGTCC
IGF2BP1 3'-UTR as	GGGAGCTCGAACAGAAAGTTATATTCAAAGG
LIN28B 3'-UTR s	CCGAGCTCGCTAGCCAGGTCTTCTTCATATGTTCTTTCTTTAC CCGGTTGC
LIN28B 3'-UTR as	CGCTCGAGTTATATGTTTTATTTTTAATCAAGTAATTTTTTTAAA CCTCAACATATCCATAATTG
<i>antisense</i> miR-let-7a-5p s	AATTCAACTATACAACCTACTACCTCAGGGCCC
<i>antisense</i> miR-let-7a-5p as	TCGAGGGCCCTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTG
<i>antisense</i> miR-let-7d-5p s	AATTCAACTATGCAACCTACTACCTCTGGGCC
<i>antisense</i> miR-let-7d-5p as	TCGAGGGCCAGAGGTAGTAGGTTGCATAGTTG
<i>antisense</i> miR-let-7i-5p s	AATTCAACAGCACAACTACTACCTCAGGGCCC
<i>antisense</i> miR-let-7i-5p as	TCGAGGGCCCTGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTTG
<i>antisense</i> miR-17-5p s	AATTCCTACCTGCACTGTAAGCACTTTGGGGCCC
<i>antisense</i> miR-17-5p as	TCGAGGGCCCCAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGG
<i>antisense</i> miR-181a-5p s	AATTCACTACCGACAGCGTTGAATGTTGGGCC
<i>antisense</i> miR-181a-5p as	TCGAGGGCCCAACATTCAACGCTGTCGGTGAGTG
<i>antisense</i> miR-196a-5p s	AATTCACCAACAACATGAAACTACCTAGGGCCC
<i>antisense</i> miR-196a-5p as	TCGAGGGCCCTAGGTAGTTTCATGTTGTTGGGG
<i>antisense</i> miR-24-3p s	AATTCCTGTTCTGCTGAACTGAGCCAGGGCCC
<i>antisense</i> miR-24-3p as	TCGAGGGCCCTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGG

Tab. 9: Desoxynukleotide für RT-qPCR-Analysen

Gen	<i>sense</i> (5' – 3')	<i>antisense</i> (5' – 3')
Human		
IGF2BP1	TAGTACCAAGAGACCAGACCC	GATTTCTGCCCGTTGTTGTC
IGF2BP2	ATCGTCAGAATTATCGGGCA	GCGTTTGGTCTCATTCTGTC
IGF2BP3	AGACACCTGATGAGAATGACC	GTTTCCTGAGCCTTTACTTCC
LIN28B	CGGGGCTAGCAAAGGTG	TGTGAATTCCACTGGTTCTCCT
HMGA2	AAGCAGCAGCAAGAACCAAC	TTGTGGCCATTTCTAGGTC
PPIA	GTCAACCCACCGTGTCTT	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT
VCL	TTACAGTGGCAGAGGTGGTG	TCACGGTGTTCATCGAGTTC
GAPDH	CAACGAATTTGGCTACAGCA	AGGGGAGATTTCAGTGTGGTG
ACTB	AGAAAATCTGGCACCACACC	AGAGGCGTACAGGGATAGCA
DCR1	TGAAATGCTTGGCGACTCCT	GCCAATTCACAGGGGGATCA
IGF2BP1 3'-UTR lang	CCTTTTGCAGTTTGGGTTGT	ATCCCCCTCCAGTGTCTCT
IGF2BP1 3'-UTR total	GTTCCAGTGAGGAACCCTGA	AGGTGTGATCCACCCTCTTG
Maus		
IGF2BP1	GACGTGGCCGCCATGAGCTT	AGCCTGGGCGGGGATGAACA
TUBA4A	GCGAAGCAGCAACCATGCGTGAG	GCCATCAGGCTGGATGCCATGT
GAPDH	TCTTCCAGGAGCGAGACCCCA	TTCAAGTGGGCCCCGGCCTT

Tab. 10: *TaqMan*[®] MicroRNA Assays für RT-qPCR-Analysen

Bezeichnung	Assay ID
hsa-let-7a-5	000377
hsa-let-7d-5	000380
hsa-let-7d-5	000382
hsa-miR-125a-3p	002199
hsa-miR-222-3p	002276
hsa-miR-16-5p	000391

Tab. 11: Zusammenfassung der siRNA und synthetischen miRNAs

Gen	Sequenz (5' - 3')
SiRNAs	
Kontrolle, C (<i>cel</i> -miR-239b-5p)	UUGUACUACACAAAAGUACUG
IGF2BP1	CCGGGAGCAGACCAGGCAA UGAAUGGCCACCAGUUGGA CCAGGCAAGCCAUCAUGAAGCUGAA GGCUGCUCCUAUAGCUCCUUAUG GGGAAGAGCUGGAGGCCUA CCAUCCGCAACAUCACAAA AAGCUGAAUGGCCACCAGUUG AACACCUGACUCCAAAGUUCG GUAUGGUACAGUAGAGAAC CCUGAAGAAGGUAGAGCAA GUUCGUAUGGUUAUCAUCA ¹ UAACAUCAGGCCAGUAGAA ²
LIN28B	AGAAGGAGAACCAGUGGAA GGAGAACCAGUGGAAUUCA CCUCCACGAAGUCAUCAU

HMGA2	GCCAUUACUGUCAGAGCAU GCCUUGAUCAUCAUGCUAA CCUAAGAGACCCAGGGGAA ACACACUACUACCUCUUA AGCAGAAGCCACUGGAGAA CGGCCAAGAGGCAGACCUA GCCACAACAAGTTGTTTCAG GAUCCUAUGUUCAAUCUAA
DCR1	
Synthetische miRNAs	
miR-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUUAUAGUU
miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
miR-196a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG

¹ verwendet als siCDS (siehe Abb. 13)

² verwendet als si3UTR (siehe Abb. 13)

Tab. 12: Überblick der *Northern Blot* miRNA-Sonden sowie der Oligodesoxynukleotide zur Generation der IGF2BP1- respektive GAPDH-Sonde

Northern Blot Sonde	Sequenz (5' – 3')
anti miR-let-7a-5p	Dye-782' AACTATGCAACCTACTACCTCT' Dye-782
anti 5S RNA	Dye-782' AAGTACTAACCAGGCCCGAC' Dye-782
IGF2BP1 s	GCTTTACATCGGCAACCTCAACG
IGF2BP1 as	CCCGAACTTTCTTCATTATTTCC
GAPDH s	ATCAATGGAAATCCCATCACCATCT
GAPDH as	GAAATGAGCTTGACAAAGTGGTCGT

Tab. 13: Zusammenfassung der generierten Konstrukte und der Klonierungsstrategien

Plasmid	Ausgangsplasmid	insert	Schnittstellen	Klonierungsstrategie
pcDNA3.1-MS2	pcDNA3.1	2MS2 <i>loops</i>	XhoI/PspOMI	Oligo- <i>annealing</i>
pcDNA3.1-IGF2BP1-3'UTR WT	pcDNA3.1MS2	IGF2BP1 3'UTR WT	XbaI in NheI/XhoI	amplifiziert von Addgene: ID21640
pcDNA3.1-IGF2BP1-3'UTR MUT	pcDNA3.1MS2	IGF2BP1 3'UTR let-7 BS MUT	XbaI in NheI/XhoI	amplifiziert von Addgene: ID21642
pmiR-GLO-MCS	pmiR-GLO	MCS	NheI/XhoI	Oligo- <i>annealing</i>
pmiR-GLO-IGF2BP1-3'UTR WT	pmiR-GLO-MCS	IGF2BP1 3'UTR WT	BamHI/XhoI	amplifiziert von Addgene: ID21640
pmiR-GLO-IGF2BP1-3'UTR MUT	pmiR-GLO-MCS	IGF2BP1 3'UTR let-7 BS MUT	BamHI/XhoI	amplifiziert von Addgene: ID21642
pmiR-GLO-HMGA2-3'UTR WT	pmiR-GLO-MCS	HMGA2 3'UTR	XbaI in NheI / NotI	subkloniert von Addgene: ID14785
pmiR-GLO-HMGA2-3'UTR MUT	pmiR-GLO-MCS	HMGA2 3'UTR let-7 BS MUT	XbaI in NheI / NotI	subkloniert von Addgene: ID14788
pmiR-GLO-LIN28B-3'UTR WT	pmiR-GLO-MCS	LIN28B 3'UTR	NheI/XhoI in Sall	amplifiziert von HEK293 cDNA
pmiR-GLO-LIN28B-3'UTR MUT	pmiR-GLO-MCS	LIN28B 3'UTR let-7 BS MUT	NheI/XhoI in Sall	Mutationen durch Fusions-PCR
pmiR-GLO-AS-miR-let-7a	pmiR-GLO-MCS	<i>antisense</i> miR-let-7a-5p	EcoRI/XhoI	Oligo- <i>annealing</i>
pmiR-GLO-AS-miR-let-7d	pmiR-GLO-MCS	<i>antisense</i> miR-let-7d-5p	EcoRI/XhoI	Oligo- <i>annealing</i>
pmiR-GLO-AS-miR-let-7i	pmiR-GLO-MCS	<i>antisense</i> miR-let-7i-5p	EcoRI/XhoI	Oligo- <i>annealing</i>
pmiR-GLO-AS-miR-17-5p	pmiR-GLO-MCS	<i>antisense</i> miR-17-5p	EcoRI/XhoI	Oligo- <i>annealing</i>
pmiR-GLO-AS-miR-181a-5p	pmiR-GLO-MCS	<i>antisense</i> miR-196a-5p	EcoRI/XhoI	Oligo- <i>annealing</i>
pmiR-GLO-AS-miR-196a-5p	pmiR-GLO-MCS	<i>antisense</i> miR-181a-5p	EcoRI/XhoI	Oligo- <i>annealing</i>

pmiR-GLO-AS-miR-24-3p	pmiR-GLO-MCS	<i>antisense</i> miR-24-3p	EcoRI/XhoI	Oligo-annealing
TuD-miR-C	pLVX-shRNA2	TuD-miR-cel-239b-5p	BamHI/EcoRI	Oligo-annealing und PCR Amplifikation
TuD-miR-let-7	pLVX-shRNA2	TuD-miR-let-7a-5p	BamHI/EcoRI	Oligo-annealing und PCR Amplifikation
TuD-miR-17-5p	pLVX-shRNA2	TuD-miR-17-5p	BamHI/EcoRI	Oligo-annealing und PCR Amplifikation
TuD-miR-181a-5p	pLVX-shRNA2	TuD-miR-181a-5p	BamHI/EcoRI	Oligo-annealing und PCR Amplifikation
TuD-miR-196a-5p	pLVX-shRNA2	TuD-miR-196a-5p	BamHI/EcoRI	Oligo-annealing und PCR Amplifikation
TuD-miR-24-3p	pLVX-shRNA2	TuD-miR-24-3p	BamHI/EcoRI	Oligo-annealing und PCR Amplifikation
pLVX-GFP-LIN28B	pLVX-GFP	CDS LIN28B	MfeI in EcoRI Sall in XhoI	amplifiziert von HEK293 cDNA

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
μ	mikro
μm	Mikrometer
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACTB	β-Aktin
AGO	Argonaute
AM	Acetoxymethylester
Amhr2-Cre	<i>anti-Müllerian hormon receptor type 2-directed cis regulatory elements</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
anti-miR	<i>Antagomir</i>
APA	<i>alternative cleavage and polyadenylation</i>
AS	<i>antisense</i>
BB	<i>binding buffer</i>
bp	Basenpaare
BP	Bindeprotein
BRAC1, 2	<i>breast cancer 1, 2</i>
BS	Bindestelle
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BTRC	<i>β-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C.elegans, cel	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
Cap	7-Methylguanosin (m ⁷ G) Kappe
CBP80	<i>cap binding protein 80</i>
CCHC	Cystein-Cystein-Histidin-Cystein
CCL	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
CDH1	E-Cadherin
cDNA	komplementäre DNA
CDS	Kodierende Sequenz
ceRNA	kompetitive endogene RNA
ciAP1	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
CPM	<i>counts per million</i>
CRD	<i>coding region instability determinat</i>
CRD-BP	<i>CRD binding protein</i>
CRISP	<i>Clustered regularly interspaced short palindromicrepeats</i>
CSC	<i>cancer stem cells</i>
CSD	<i>cold shock</i> Domäne
CTNNB1	β-Catenin
CTR1	<i>copper transporter 1</i>
D	dimensional
d	Tage
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

DCP2	<i>decapping protein 2</i>
DDX6	<i>DEAD box helicase 6</i>
DFMO	Difluoromethyl-Ornithin
DMEM	<i>Dublecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Embryonaltag
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ELAVL1	<i>embryonic lethal abnormal vision like RNA binding protein 1</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
et al.	<i>et altera</i>
FBS	fötales Rinderserum
FDR	<i>false discovery rate</i>
FFL	<i>Firefly</i> Luziferase
FIGO	<i>Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique</i>
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEEG	Glycin-Glutamat-Glutamat-Glycin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLI1	GLI family zinc finger 1
GTP	Guanosintriphosphat
GW182	<i>glycine-tryptophan protein of 182 kDa</i>
GxxG	Glycin-beliebig-beliebig-Glycin
h	Stunden
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HG-SOC	hochgradig seröses Ovarialkarzinom
HMGGA2	<i>high mobility group AT-hook 2</i>
HOXB8	<i>homeobox B8</i>
HSP27	<i>heat shock protein 27</i>
HULC	<i>hepatocellular carcinoma up-regulated long non-coding RNA</i>
IGF2	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IGF2BP1, IMP	<i>IGF2 mRNA-binding protein</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IPS1	<i>induced by phosphate starvation 1</i>
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung
kb	Kilobasenpaare
KH	<i>hnRNPk homology</i>
KOC	<i>KH domain containing protein overexpressed in cancer</i>
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L	Liter
LB	<i>Luria Bertani</i>
LEF1	<i>lymphoid enhancer binding factor 1</i>
let-7	<i>lethal-7</i>
LIN28	<i>cell lineage abnormal 28</i>
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
lncRNA	lange nicht kodierende RNA

m	milli
m	Minute
M	molar
MAPK4	<i>mitogen-activated protein kinase 4</i>
max.	maximal
MBP	Maltosebindprotein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDR1	<i>multidrug resistance 1</i>
MEFs	murine embryonale Fibroblasten
MET	<i>mesenchymal-epithelial transition</i>
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA, miR	microRNA
mirtron	miRNA-kodierendes Intron
MITF	<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>
miTRAP	<i>miRNA trapping of RNA in vitro affinity purification</i>
MK5	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5
MMP	Matrixmetalloproteasen
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC2	mTOR Komplex 2
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
MUT	miR-let-7 inaktiviert
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYCN	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog</i>
n	nano
n.d.	nicht detektiert
n.s.	nicht signifikant
NB	<i>Northern Blot</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
nm	Nanometer
NOT	<i>negative on TATA-less</i>
nt	Nukleotide
p	pico
PAN2	<i>PAN2 poly(A) specific ribonuclease subunit</i>
PAN3	<i>PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit</i>
PAPBC	Poly(A)-Bindeprotein, zytoplasmatisch
PAR-CLIP	<i>photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation</i>
PARN	Poly (A) spezifische Ribonuklease
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentium Hydrogenii</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
Poly (A)	polyadenyliert
pre-mirna	Vorläufer-miRNA
pri-mirna	primäres miRNA-Transkript
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
R6	<i>random-Hexamere</i>

RBP	RNA-bindende Proteine
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RL	<i>Renilla</i> Luziferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleoprotein
RRM	<i>RNA-recognition motifs</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase, Reverse Transkription
RT-qPCR	quantitative <i>real time</i> PCR
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
snoRNA	<i>small nucleolar RNAs</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
β-geo	β-Galaktosidase
STIC	seröses tubares intraepitheliales Karzinom
T	Thymin
TCF4	<i>T-cell specific transcription factor 4</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor</i> β
TMM	<i>weighted trimmed mean of M-values method</i>
TNRC6	<i>trinucleotide repeat-containing</i>
Decoy, TuD	<i>Tough Decoy</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine B isothiocyanat
tRNA	Transfer RNA
TUBA4A	α4-Tubulin
TUTase	<i>terminal uridylyl transferase</i>
UTR	untranslatierter Bereich
UV	ultraviolett
VCL	Vinculin
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VIM	Vimentin
w/v	Gewicht pro Volumen
WAP	<i>whey acidic protein</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung, Zentrifugationsgeschwindigkeit
XRN1	5' - 3' Exoribonuklease 1
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZBP-1	<i>zipcode binding protein 1</i>

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), Dezember 2015

Bianca Busch

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, welche mir diese Dissertation ermöglicht sowie mich während ihrer Entstehung begleitet und unterstützt haben.

An erste Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier nicht nur für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, sondern vor allem für seine stetige Unterstützung und für die Teilnahme am GRK 1591 als PhD-Student bedanken.

Besonderem Dank gilt Dr. Nadine Bley für ihre große Unterstützung, ihren Optimismus, ihr Vertrauen, das Korrekturlesen dieser Arbeit und das eine oder andere Bier zum Feierabend.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier danke ich für ein tolles Arbeitsumfeld sowie ihre permanente Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Besonderem Dank gilt Marcel Köhn, Hendrik Täuber, Anne Baude, Tommy Fuchs, Marcell Lederer, Claudia Misiak, Simon Müller und Markus Glaß.

Dr. Knut Krohn möchte ich für die Durchführung von NGS-Analysen danken. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich ebenso bei Danny Misiak für die bioinformatische Normalisierung und Auswertung dieser Daten.

Darüber hinaus möchte ich dem GRK 1591 für zahlreiche Vorträge sowie interessante Diskussionen und Anregungen danken.

Liane Rauch und Simon Müller möchte ich weiterhin für das Korrekturlesen meiner Dissertation danken.

Mein Dank gilt zudem meinen Freunden insbesondere Annekatriin Barth, Susanne Müller und Juliane Buschmann sowie meiner Familie für ihre mentale Unterstützung in den letzten fünf Jahren sowie für die Bereicherung meines Lebens.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Busch, Bianca
 Geburtsdatum: 18.09.1986
 Geburtsort: Halle (Saale)
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Anschrift (privat) Forsterstr.32, 06112 Halle (Saale)

Ausbildung

1992 - 1996 Grundschule Am Passendorfer Schlösschen, Halle (Saale)
 1996 - 1997 Chrisitan-Wolf-Gymnasium, Halle (Saale)
 1998 – 2005 Anne-Frank-Gymnasium, Sandersdorf, Abschluss: Abitur
 2005 - 2010 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Diplom
 2008 - 2009 Studentische Hilfskraft, Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung für Molekulare Signalverarbeitung
 2009 - 2010 Anfertigung der Diplomarbeit unter Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Medizinische Fakultät, Institut für Molekulare Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Titel: *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur miR-145 und miR-205-Regulation der ACTB-Expression
 2010 - heute Anfertigung der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Medizinische Fakultät, Institut für Molekulare Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 2010 - 2014 Promotionstudent im Graduiertenkolleg (GRK) 1591
 2014 - heute Teilnahme am GRK 1591 als assoziierter Promotionsstudent

Halle (Saale), Dezember 2015
 Bianca Busch

Publikationsliste

Braun J., Misiak D., **Busch B.**, Krohn K., and Hüttelmaier S.; Rapid identification of regulatory microRNAs by miTRAP (miRNA trapping by RNA *in vitro* affinity purification), *Nucleic Acids Res.* 42(8):e66. Epub 2014 Feb 7

Bretschneider M., **Busch B.**, Mueller D., Nolze A., Schreier B., Gekle M. and Grossmann C.; Activated Mineralocorticoid Receptor Regulates MiR-29b in Vascular Smooth Muscle Cells, *FASEB J* (2015 in Revision)

Busch B., Bley N., Mueller S., Misiak D., Glass M., Lederer M., Fuchs T., and Hüttelmaier S, *Nucleic Acids Res.*, (2015; in Revision)