



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Medizinische Fakultät Mannheim  
Dissertations-Kurzfassung**

**Der Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg als Ziel neuer microRNA-Tumorsuppressoren im kolorektalen Karzinom**

Autor: Omar Gamal Abdelrahim  
Institut / Klinik: Zentrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim (CBTM) -  
Experimentelle Chirurgie  
Doktormutter: Prof. Dr. H. Allgayer

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist sowohl bzgl. der Inzidenz als auch bzgl. der Mortalität eine der häufigsten Krebserkrankungen. MicroRNAs sind nicht-kodierende kleine RNAs, die durch Bindung an 3'-UTR von mRNAs, die Proteinexpression regulieren und dadurch beispielsweise als Onkogene oder Tumorsuppressorgene wirken können. Ziel dieser Arbeit war es, eine miRNA zu finden, die über eine für sie neu entdeckte Ziel-mRNA auf das CRC wirkt.

Die Fragestellung wurde mit Hilfe von in silico Analysen, Luciferase-Assays, Western Blots und funktionellen Assays untersucht.

In dieser Arbeit wurde die Januskinase 1 (JAK1) als Ziel für miR-494-5p näher untersucht. Nach der Amplifikation der spezifischen Bindungssequenz für diese miRNA und dem Einbau dieses Produktes in das pLightSwitch-Plasmid zeigte sich im Reportergergenassay eine signifikante Herunterregulierung durch die Anwesenheit von miR-494-5p. Dass diese miRNA an die seed-Sequenz, die in silico dargestellt wurde, bindet, wurde mit der spezifischen Mutagenese dieser Region bestätigt. War der Sequenzabschnitt nicht mehr in seiner ursprünglichen Abfolge vorhanden, sodass in silico keine Bindung zwischen miR-494-5p und der mutierten JAK1-3'-UTR bestand, ließ sich kein Unterschied zur Negativkontrolle feststellen.

Unterschiede in den Proteinkonzentrationen von JAK1 wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot dargestellt. Geeignete Zelllinien für diesen Versuch wurden anhand ihrer miR-494-5p- sowie JAK1-Expression ausgewählt. Es zeigte sich, dass für die Untersuchung der Effekte der miRNA bezüglich der JAK1-Proteinexpression die Zelllinien RKO, HCT15, CaCO2, Colo320 und SW480 am besten geeignet sind. Nach Transfektion dieser Zelllinien mit miR-494-5p zeigte sich bei CaCO2, HCT15 sowie SW480 eine verminderte Proteinkonzentration im Vergleich zu den Negativkontrollen.

Wie sich die Überexpression von miR-494-5p auf die zelluläre Proliferation, Invasion und Migration auswirkt, wurde mit den jeweiligen funktionellen Assays überprüft. All diese Assays wurden mit den Zelllinien HCT116, HCT15, RKO, und CaCO2 durchgeführt. Nach der Transfektion mit der miRNA waren Proliferation, Invasion und Migration in all diesen Zelllinien vermindert ausgeprägt.

Die Stimulation von HCT15-Zellen mit Interleukin-4 zeigte eine verminderte Expression des phosphorylierten JAK1 durch die Überexpression von miR-494-5p.

Die Daten aus den einzelnen Versuchen zeigen, dass miR-494-5p an die JAK1-3'UTR bindet und posttranskriptionell die Aktivität der JAK1-mRNA verringert und zu einer verminderten endogenen JAK1-Proteinexpression führt. Die funktionellen Assays ergaben nach Überexpression von miR-494-5p zusätzlich eine verringerte Invasions- und Migrationsrate in kolorektalen Zelllinien.

Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass miR-494-5p als neu beschriebener Tumorsuppressor im CRC agiert und dies vermutlich zu einem Teil über die Unterdrückung der Januskinase 1 geschieht.