

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

erstellt am
Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Christopher Lößner
geboren in Wiesbaden

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2009

Thema

Etablierung und Validierung quantitativer Proteomik-
Techniken zur Identifizierung von mikroRNA-
Zielproteinen im Mantelzelllymphom

Gutachter: Prof. Dr. Stephan Frings

Prof. Dr. Peter Lichter

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen habe; dass sie - abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist. Weiterhin versichere ich, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Heidelberg, den 15.10.2009

Christopher Lößner

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	V
ABKÜRZUNGEN	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 mikroRNAs	1
1.1.1 Biogenese.....	1
1.1.2 Wirkmechanismus.....	3
1.1.3 Funktionen und Bedeutung von miRNAs.....	4
1.1.4 Identifizierung von miRNA Zielproteinen.....	6
1.2 Quantitative Proteomik	6
1.2.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	7
1.2.2 Massenspektrometrische Quantifizierung.....	10
1.2.3 SILAC.....	12
1.3 Krebs	14
1.3.1 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL).....	15
1.3.2 Mantelzelllymphom.....	15
1.4 mikroRNAs und Krebs	16
1.4.1 Rolle von miR-155 bei Krebs und anderen Krankheiten.....	17
1.4.2 Rolle von miR-15a und miR-16-1 bei Krebs und im Speziellen beim Mantelzelllymphom.....	18
1.5 Zielsetzung	19
2 MATERIALIEN UND METHODEN	20
2.1 Materialien	20
2.1.1 Chemikalien.....	20
2.1.2 Instrumente.....	21
2.1.3 Software.....	22
2.1.4 Kits.....	22
2.1.5 Lösungen und Puffer.....	23
2.1.6 Antikörper.....	27
2.1.7 Zellkultur.....	27
2.1.8 Sonstiges.....	28
2.1.9 Sequenzen.....	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 Zellkultur.....	29
2.2.2 Zellyse.....	30

2.2.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	30
2.2.4	Proteinfällung und Konzentrierung	31
2.2.5	SDS-PAGE.....	31
2.2.6	Western-Blot	32
2.2.7	2D DIGE.....	34
2.2.8	SILAC.....	41
2.2.9	qRT-PCR und mRNA Microarray	45
2.2.10	Bioinformatische Auswertungen.....	45
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Identifizierung von mikroRNA Zielproteinen durch zweidimensionale Gelelektrophorese	48
3.1.1	miR-155 regulierte Proteine in 293T Zellen mittels 2D DIGE	48
3.1.2	miR-15a und miR-16-1 regulierte Proteine in 293T Zellen mittels 2D DIGE.....	53
3.2	Etablierung der relativen quantitativen Proteomanalyse mittels SILAC.....	56
3.2.1	Vermeidung der Konvertierung von Arginin zu Prolin durch Zugabe von nicht markiertem Prolin	57
3.3	Identifizierung von miR-155 regulierten Proteinen in 293T Zellen mittels SILAC-Analyse	62
3.3.1	Experimenteller Aufbau und Überprüfung der Versuchsbedingungen	62
3.3.2	Quantitative Auswertung der SILAC-Analyse mittels MaxQuant	63
3.3.3	Validierung der SILAC-Analyse durch relative quantitative Western-Blot Analyse	66
3.3.4	Funktionelle Untersuchung von miR-155 herunter- und hochregulierten Proteinen mittels Bioinformatik	67
3.3.5	miR-155 Bindung an die mRNAs der identifizierten Zielproteine	68
3.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit Transkriptomik-Daten.....	74
3.3.7	Vergleich der miR-155 herunterregulierten Proteine in 293T und HeLa Zellen.....	75
3.4	Identifizierung von miR-15a und miR-16-1 regulierten Proteinen in Granta-519 mittels SILAC-Analyse	77
3.4.1	Experimenteller Aufbau und Überprüfung.....	77
3.4.2	miR-15a regulierte Proteine in Granta-519 mittels SILAC-Analyse	79
3.4.3	miR-16-1 regulierte Proteine in Granta-519 mittels SILAC-Analyse	80
3.4.4	Gemeinsam bzw. einseitig durch miR-15a bzw. miR-16-1 herunterregulierte Proteine in Granta-519	81
3.4.5	Validierung der Zielproteine von miR-15a und miR-16-1 mittels Western-Blot	82
3.4.6	miRNA Bindung an die mRNAs der identifizierten Zielproteine	83
3.4.7	Vergleich der Proteomik-Daten aus den SILAC-Analysen für miR-15a und miR-16-1 mit Transkriptomik-Daten aus Microarray-Analysen	93
3.4.8	Beeinflusste biologische Prozesse und Signaltransduktionswege.....	96
3.4.9	Vergleich mit anderen proteomischen Untersuchungen zu miR-15a bzw. miR-16-1 Zielproteinen.....	104
3.4.10	Zusammenfassung.....	105
4	DISKUSSION	112
4.1	Optimierung und Validierung der SILAC-Analyse	112
4.1.1	Vermeidung der Arginin zu Prolin Konvertierung	112
4.1.2	Reproduzierbarkeit und Validierung der SILAC-Technik	114

4.2	Quantitative Proteomik-Techniken zur Identifizierung von mikroRNA Zielproteinen	115
4.2.1	2D DIGE.....	115
4.2.2	SILAC.....	117
4.2.3	Vergleich von SILAC mit 2D DIGE.....	117
4.3	Vergleich von Proteomik und Transkriptomik zur Identifizierung von mikroRNA Zielproteinen bzw. Zielgenen	118
4.4	Bindung der mikroRNAs an die Zielsequenzen der identifizierten Zielproteine	119
4.4.1	miRNA Bindungsdetektion mittels Vorhersage-Algorithmen, <i>seed</i> -Sequenzen und Sylamer-Analyse.....	119
4.4.2	Übereinstimmungen der miRNA Zielsequenzen in den verschiedenen mRNA-Bereichen (5'UTR, CDS und 3'UTR)	121
4.4.3	Unterschiede zwischen der stabilen und transienten miRNA Überexpression	121
4.4.4	Ausschluss von möglichen unspezifischen Effekten der miRNA Überexpression	122
4.5	Zelllinien-Spezifität von mikroRNA Zielproteinen	122
4.6	Funktionen der mikroRNA Zielproteine und ihre biologische Relevanz	124
4.6.1	miR-155	124
4.6.2	miR-15a und miR-16-1 im Mantelzelllymphom.....	125
4.7	Aussichten.....	128
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	130
6	ANHANG	149
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	191
8	DANKSAGUNG.....	192

ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

MikroRNAs (miRNAs, miRs) sind endogene etwa 22 Nukleotide lange RNAs. Sie binden an Bereiche innerhalb der *messenger* RNAs (mRNAs) und regulieren dadurch ihre Ziele post-transkriptional. Ihre Wirkung ist dabei nur zu einem geringen Anteil die mRNA Degradation, der Hauptmechanismus besteht in der Inhibition der Translation. Es wird vermutet, dass eine miRNA bis zu 1000 Proteine beeinflusst und insgesamt über 30% der Protein-kodierenden Gene reguliert werden. Somit können miRNAs nahezu jeden zellulären Prozess beeinflussen. Anhand von miRNA-Profilen bei verschiedenen Krebsarten konnte gezeigt werden, dass miRNAs bei Krebs reguliert sind und als Onkogene und Tumorsuppressoren wirken können. Die Funktionen einer miRNA sind in deren regulierten Proteinen begründet. Um die Zielproteine von miRNAs zu identifizieren, können verschiedene Ansätze verfolgt werden. Durch bioinformatische Vorhersage-Algorithmen konnten miRNA Ziele erfolgreich detektiert werden, wobei allerdings ein hoher Prozentsatz der Vorhersagen falsch positive oder falsch negative Ergebnisse sind. Experimentell konnten durch mRNA Microarray Analysen Zielgene von miRNAs identifiziert werden, obwohl diese Methode nur solche miRNA Ziele detektieren kann, deren mRNA degradiert wird.

In dieser Arbeit sollten miRNA Ziele auf Proteinebene identifiziert werden. Um dies zu ermöglichen, wurden zwei verschiedene quantitative Proteomik-Techniken eingesetzt. Bei der 2D DIGE (zweidimensionale *difference in-gel electrophoresis*) handelt es sich um eine Gel-basierte und bei SILAC (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*) um eine Gel-freie, massenspektrometrische Quantifizierungstechnik. SILAC erlaubt die Quantifizierung von Proteinen zweier Zellklone oder -zustände durch Markierung mit stabilen Isotopen. Der Einbau erfolgt *in vivo* durch Zugabe der ¹²C-markierten (leichten) bzw. ¹³C-markierten (schweren) Aminosäuren Lysin und Arginin während der Zellkultivierung. Bei der SILAC-Technik stellte sich als Problem die Arginin zu Prolin Konvertierung heraus, welche zu einer Verschlechterung der Quantifizierungsgenauigkeit führt. Die Lösung bestand darin, dass nicht markiertes Prolin zum Zellkulturmedium hinzugefügt wurde, wodurch Arginin nicht mehr in Prolin umgewandelt wird. Die 2D DIGE- und SILAC-Technik konnten anhand von miR-155 Zielproteinen verglichen werden. Aufgrund der höheren Proteomabdeckung und damit auch der höheren Anzahl durch miR-155 regulierten Proteine stellte sich die SILAC-Technik als die geeignetere Methode heraus. Des Weiteren konnte anhand der miR-155 Zielproteine erstmalig auf Proteomebene gezeigt werden, dass mikroRNA Zielproteine Zelllinien-spezifisch sind. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die für das Mantelzelllymphom relevanten Zielproteine von miR-15a und miR-16-1 in der Granta-519 Zelllinie untersucht. Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur sind diejenigen Prozesse, die durch miR-15a und miR-16-1 Zielproteine beeinflusst werden. Diese Prozesse sind bereits in anderen Krebsentitäten durch miR-15a und miR-16-1 als reguliert beschrieben und auch einige Proteine, wie z.B. PDCD6IP, sind als potentielle miR-15a bzw. miR-16-1 Zielproteine bekannt. Eine Vielzahl der Proteine sind allerdings neue miR-15a und miR-16-1 Effektoren im

Mantelzelllymphom, was durch publizierte Regulationen von Proteinen wie TCL1A, MKI67, MCM6 und MCM2 in Patientenproben bestätigt wird.

In dieser Arbeit konnte quantitative Proteomik zur Identifizierung von mikroRNA Zielproteinen durch die Berücksichtigung der Zelllinien-Spezifität erstmalig mit Relevanz in Krebs auf Proteomebene eingesetzt werden.

MicroRNAs (miRNAs, miRs) are endogenous, about 22 nucleotide long RNAs. By pairing to sites within messenger RNAs (mRNAs), microRNAs regulate their targets post-transcriptionally. The central action of miRNAs is translational inhibition and, only to a minor extent, the degradation of mRNAs. It is assumed that one miRNA influences around 1000 proteins, yielding over 30% of protein-coding genes which are targeted by miRNAs as a whole. As such, miRNAs influence nearly every cellular process. Using miRNA profiles of different cancer entities, it could be shown that miRNAs are regulated in cancer and act as oncogenes and tumour suppressors. To discover the impact of miRNAs, it is necessary to know their regulated proteins. Different approaches have been used to identify target proteins of miRNAs. Bioinformatic prediction algorithms successfully detect miRNA targets, but possess a high percentage of false positive and false negative results. Experimentally, the use of mRNA microarray analysis to identify miRNA target genes discovers only the targets which are regulated at the mRNA level.

In the submitted thesis, miRNA targets should be identified at the protein level. Therefore, two different quantitative proteomic techniques were used. 2D DIGE (two dimensional difference in-gel electrophoresis) is a gel-based and SILAC (stable isotope labelling by amino acids in cell culture) is a gel-free, mass spectrometric quantification technique. Using SILAC, proteins of two distinct cell clones or states could be quantified by stable isotope labelling. The *in-vivo* incorporation of the isotopes during cell cultivation is done by the addition of the ¹²C-labelled (light) or ¹³C-labelled (heavy) amino acids lysine and arginine. One problem using the SILAC approach is the conversion of arginine-to-proline, which results in an impairment of quantification accuracy. The solution to this problem was the addition of unlabelled proline, with the effect of arginine no longer being converted to proline. The 2D DIGE and SILAC methods could be compared by identifying miR-155 target proteins. Because of the higher proteome coverage and the higher number of identified miR-155 regulated proteins, the SILAC technique evolved as the more applicable method. During the analysis of miR-155 target proteins, the cell line specificity of microRNA targets could be demonstrated. Building upon this data, the miR-15a and miR-16-1 target proteins relevant in mantle cell lymphoma were identified and analysed in the Granta-519 cell line. Cell cycle, apoptosis and DNA damage repair were influenced by miR-15a and miR-16-1 target proteins. These processes are already described for miR-15a and miR-16-1 in other cancer entities and some proteins, like PDCD6IP, are known as miR-15a and miR-16-1 targets. A multitude of new miR-15a and miR-16-1 effectors were identified as being relevant for mantle cell lymphoma, as shown by the previously published regulation of proteins like TCL1A, MKI67, MCM6 and MCM2 in patient samples.

In this thesis, for the first time, quantitative proteomics was used to identify microRNA target proteins with relevance in cancer under the consideration of the cell line specificity of microRNAs.

ABKÜRZUNGEN

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
2D	zweidimensional
3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
5'UTR	<i>5' untranslated region</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BRM	<i>bioinformatics resource manager</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	<i>carbon</i> (Kohlenstoff)
CDS	<i>coding sequence</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	<i>double distilled H₂O</i>
DIGE	<i>difference in-gel electrophoresis</i>
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FTMS	<i>Fourier transform mass spectrometry</i>
G	Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
GE	Gelelektrophorese
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
log	Logarithmus
LTQ	<i>linear trap quadrupole</i>
M	molar
m/z	<i>mass to charge ratio</i>
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MCL	Mantelzelllymphom
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA/miR	mikroRNA
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunden
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
N	<i>nitrogen</i> (Stickstoff)
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

nm	Nanometer
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
pmol	Pikomol
ppm	<i>parts per million</i>
pre-miRNA	<i>precursor</i> mikroRNA
pri-miRNA	primäre mikroRNA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quadrupol
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SILAC	<i>stable isotope labelling by amino acids in cell culture</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>time of flight</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

Aminosäure-Abkürzungen

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

1 EINLEITUNG

1.1 mikroRNAs

MikroRNAs (miRNAs, miRs) sind kurze (18 bis 24 Nukleotide lange), endogene und einzelsträngige RNA-Moleküle mit Funktionen bei der post-transkriptionellen Regulation (Bartel, 2004). Der Begriff miRNAs wurde 2001 von drei Gruppen zeitgleich eingeführt (Lagos-Quintana et al, 2001; Lau et al, 2001; Lee & Ambros, 2001). RNAs mit den Charakteristika von miRNAs wurden allerdings bereits 1993 in Form von lin-4, das in der larvalen Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* beteiligt ist, beschrieben (Lee et al, 1993; Wightman et al, 1993). MikroRNAs wurden in Nematoden, Arthropoden, Vertebraten, Pflanzen, Grünalgen und Viren gefunden. Im Menschen sind zurzeit 706 verschiedene miRNAs bekannt, es werden jedoch ständig weitere entdeckt, so dass die Zahl sicherlich noch ansteigen wird (Griffiths-Jones et al, 2008). miRNAs unterscheiden sich von anderen kleinen RNAs, wie z.B. den endogenen *small interfering RNAs* (siRNAs) (Reinhart & Bartel, 2002) oder den *Piwi-interacting RNAs* (piRNAs) (Aravin et al, 2007) durch ihre unterschiedliche Biogenese (Siomi & Siomi, 2009).

1.1.1 Biogenese

MikroRNAs sind im Genom je etwa zur Hälfte im nicht-kodierenden Bereich und zur anderen Hälfte innerhalb der Introns von Protein-kodierenden Genen lokalisiert und können entweder als einzelne miRNAs oder in Clustern von mehreren miRNAs vorliegen (Rodriguez et al, 2004). Sie werden vornehmlich durch die RNA Polymerase II als lange, mehrere tausend Basen umfassende, *primary* miRNAs (pri-miRNAs) transkribiert. Sie besitzen, wie alle RNA Polymerase II Transkripte, eine 5'-Cap Struktur und sind am 3'-Ende polyadenyliert (Kim, 2005). Einzelne miRNAs liegen innerhalb der pri-miRNA als 50-70 Nukleotide lange *stem-loop* (Haarnadelstrukturen) vor. Diese werden noch im Zellkern durch das RNase III Enzym Drosha zusammen mit dem Doppelstrang-bindenden Partner DGCR8 (*Digeorge syndrome critical region gene 8*) zu *precursor* RNAs (pre-miRNAs) prozessiert, die einen für RNase III Spaltungen typischen zwei Nukleotide langen 3'-Überhang haben (Kim, 2005). Die pre-miRNAs werden durch Exportin-5 und den Kofaktor Ran-GTP ins Zytoplasma transportiert (Yi et al, 2003). Durch Dicer, ein weiteres RNase III Enzym, im Komplex mit den Kofaktoren TRBP (*TAR RNA-binding protein*) und PACT (*PKR-activation protein*) werden die pre-miRNAs im Zytoplasma weiter prozessiert (Kok et al, 2007). Durch Abspaltung des *stem-loop* bilden sich 18 bis 24 Nukleotide lange Duplexe, welche erneut an den 3'-Enden zwei Nukleotide lange Überhänge besitzen. Diese Duplex-RNAs werden ATP-abhängig in einen

Proteinkomplex namens RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut, welcher als Kernkomponenten die Argonaut Proteine (Ago1 bis 4) enthält. Nur ein Strang, der sogenannte *guide* Strang, auch reife miRNA genannt, bleibt im RISC Komplex eingebaut. Der andere Strang, als *passenger* Strang oder miRNA* bezeichnet, wird entweder durch Ago2 abgebaut oder anderweitig entfernt (Gregory et al, 2005). Die miRNA vermittelt die Bindung des RISC Komplexes an die mRNA und führt entweder zu einer Degradation der mRNA oder einer translationalen Inhibition (Bartel, 2004). Für einen Überblick über die Biogenese von miRNAs siehe Abbildung 1-1.

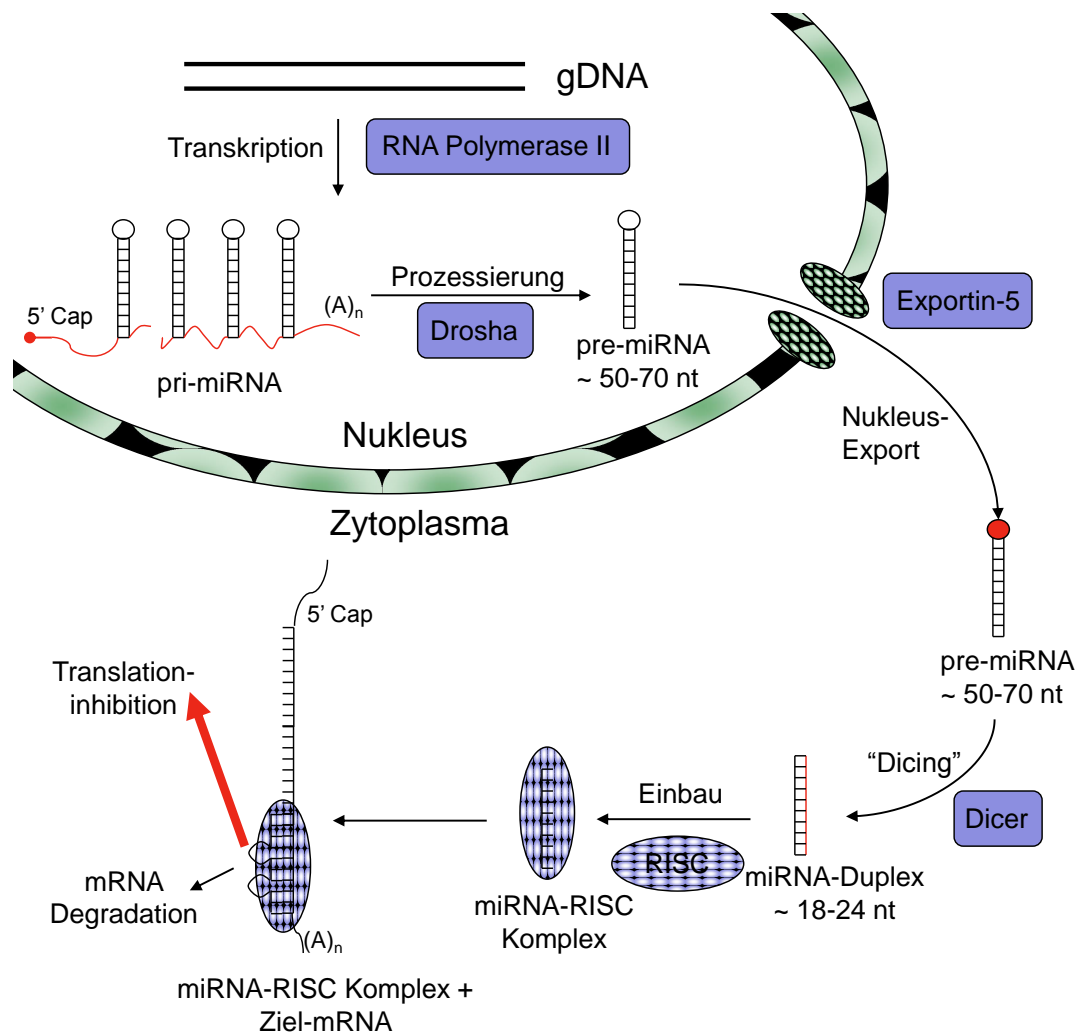


Abbildung 1-1: Biogenese von miRNAs. blau: beteiligte Enzyme; rot: prozessierte Strukturen; grün: Zellkernmembran; weitere Erläuterungen siehe Text

1.1.2 Wirkmechanismus

Ihre Wirkung üben miRNAs durch die Bindung an die mRNAs aus. Dabei ist die Bindung nicht über alle der etwa 22 Basen komplementär, sondern nur an den Positionen 2 bis 7 des 5'-Bereichs der miRNA, der sogenannten *seed*-Sequenz. Die unterschiedlichen Arten der *seed*-Sequenz Bindung sind in Abbildung 1-2 gezeigt.

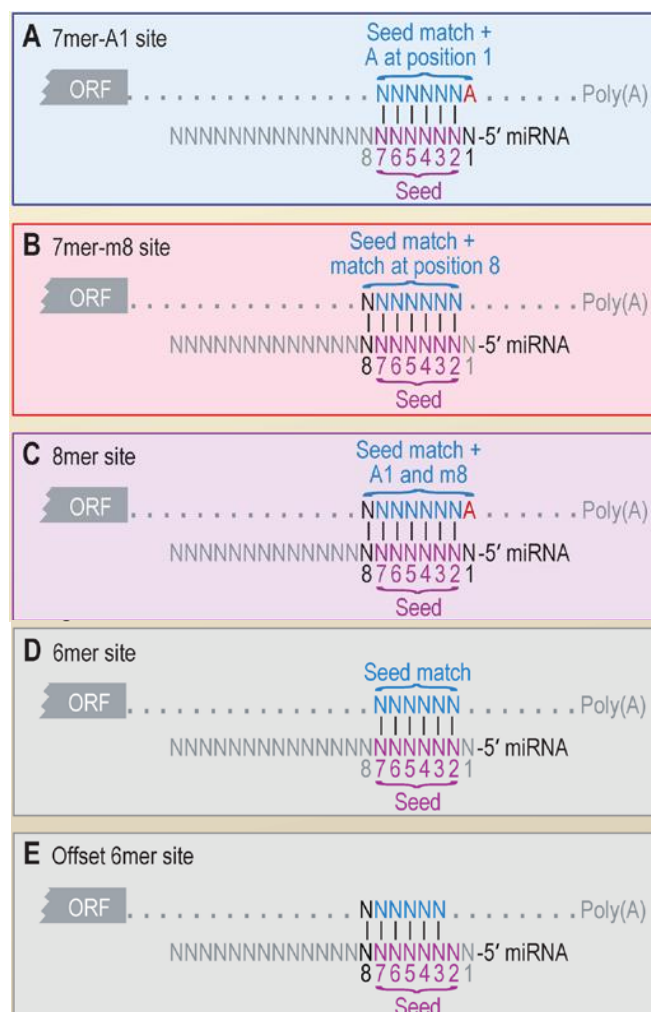


Abbildung 1-2: Verschiedene Möglichkeiten der miRNA-mRNA *seed*-Sequenz Interaktion. A: 7mer-A1, B: 7mer-m8; C: 8mer; D: 6mer; E: *Offset* 6mer (Bartel, 2009)

Alle Interaktionen zeigen eine komplementäre Bindung in der *seed*-Sequenz und je nachdem, ob in Position 1 und/oder 8 eine weitere komplementäre Bindung vorhanden ist, werden die Interaktionen bezeichnet. Nur die *Offset* 6mer Interaktion weicht davon ab, weil bei ihr keine Bindung an Position 2 auftritt (Bartel, 2009). Diese Arten der Interaktionen scheinen zwar der Hauptmechanismus zu sein, aber daneben gibt es weitere Bindungen bei denen nicht perfekte *seed*-Sequenz Interaktionen toleriert werden und dabei zusätzliche

bzw. ergänzende Bindungsbereiche eine Rolle spielen (Didiano & Hobert, 2006). Für die Funktion ist ebenfalls der umgebende Bereich verantwortlich. Dies beinhaltet die Position innerhalb des Sequenzabschnitts, die Zugänglichkeit und weitere Bindungsstellen für die gleiche miRNA bzw. koexprimierte miRNAs in der Umgebung (Bartel, 2009). Eine bis jetzt nicht ausreichend untersuchte und möglicherweise größere Rolle könnten die nicht konservierten und damit Spezies-spezifischen miRNA-mRNA Bindungen spielen (Baek et al, 2008; Bartel, 2009; Selbach et al, 2008).

Neben der Bindung an sich ist ebenfalls zu unterscheiden, in welchem Bereich miRNAs an die mRNAs binden. Der präferentielle Bindungsort ist der 3'UTR- (*untranslated region*) Bereich der mRNA, aber auch die CDS (*coding sequence*) und zu einem geringen Teil der 5'UTR-Bereich können als Bindungsstellen für miRNAs dienen (Chi et al, 2009; Duursma et al, 2008; Forman et al, 2008; Orom et al, 2008; Shen et al, 2008; Tay et al, 2008).

Der Hauptwirkmechanismus von miRNAs ist die Verringerung der Genprodukte (mRNAs bzw. Proteine) (Bartel, 2004; Hutvagner & Zamore, 2002), aber obwohl es eher als Ausnahme anzusehen ist, wurde auch eine Erhöhung der Genprodukte bereits mehrfach beschrieben (Orom et al, 2008; Vasudevan et al, 2007). Bei der Herunterregulation von mRNAs bzw. Proteinen wird angenommen, dass die translationale Inhibition zuerst und in stärkerem Maße auftritt und erst später die mRNAs degradiert werden (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008). Der Abbau von mRNAs geschieht durch eine Translokation in *P-bodies* (Liu et al, 2005), in denen dann die mRNAs degradiert werden (Chan & Slack, 2006). Es ist allerdings auch gezeigt worden, dass *P-bodies* nicht für die Funktion von miRNAs benötigt werden (Eulalio et al, 2007), womit sich die Frage stellt, wie essentiell dieser Mechanismus ist. Die translationale Inhibition kann entweder bei der Initiation (Mathonnet et al, 2007; Pillai et al, 2005; Thermann & Hentze, 2007) oder Elongation (Petersen et al, 2006) geschehen.

1.1.3 Funktionen und Bedeutung von miRNAs

Allein aufgrund der Konservierung von miRNA Bindungsstellen scheinen 30% der Gene potentiell durch mikroRNAs beeinflusst zu werden (Lewis et al, 2005). Es wird geschätzt, dass etwa 1000 Proteine von einer miRNA beeinflusst werden können und dass durchschnittlich 15 miRNAs ein Protein beeinflussen (Griffiths-Jones et al, 2008). Aufgrund der Vielzahl an Zielproteinen ist es daher schwer, den Einfluss auf bestimmte biologische Prozesse einzugrenzen. Einzelne miRNAs zeigen aber eine Tendenz zur Beeinflussung eines bestimmten Prozesses. Dabei kann der Wirkmechanismus in verschiedene Kategorien unterteilt werden. Bei der klassischen Schalter-Interaktion (siehe Abbildung 1-3) wird das Proteinniveau des Zielproteins auf das gewünschte Niveau eingestellt. Bei der Feinregulation werden Proteine, wie bei einem Rheostat (stufenlos einstellbarer elektrischer Widerstand), auf ein Proteinniveau eingestellt, welches nicht zu hoch aber auch nicht zu niedrig sein soll.

Bei der neutralen Beeinflussung wird zwar das Niveau eines Proteins reguliert, allerdings resultiert diese Regulation in keinem funktionellen Effekt (Bartel, 2009).

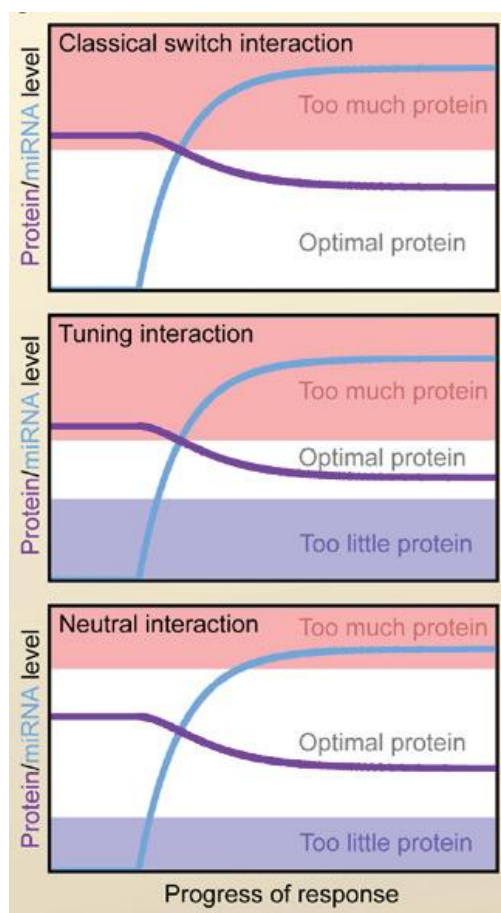


Abbildung 1-3: Regulatorische Wirkung von miRNAs unterteilt in klassische Schalter-Interaktion (*classical switch*), Feinregulierung (*Tuning*) und neutrale Beeinflussung (Bartel, 2009)

Einzelne miRNAs zeigen teilweise selbst bei *in-vivo* Tierexperimenten nur geringe Effekte in Hinblick auf Regulationsstärke und auch Anzahl an regulierten Zielgenen (Xiao et al, 2007). Dies liegt daran, dass 90% der miRNA-mRNA Interaktionen nur eine Bindungsstelle enthalten, was in einer geringen Regulation resultiert. Zudem enthalten die meisten mRNAs mindestens für eine weitere miRNA eine Bindungsstelle (Brennecke et al, 2005). Aufgrund der geringen Regulationen des Proteinniveaus, die durch einzelne miRNAs im Organismus (Baek et al, 2008) verursacht werden, ist anzunehmen, dass miRNAs an Schnittstellen wirken, die eine Verstärkung der Wirkung hervorrufen (Bartel, 2009). Ebenfalls besteht die Theorie, dass mehrere miRNAs kombinatorisch wirken, d.h. gemeinsam Proteine bzw. biologische Prozesse regulieren (Ivanovska & Cleary, 2008).

1.1.4 Identifizierung von miRNA Zielproteinen

Um die Funktionen von mikroRNAs verstehen zu können, ist es notwendig, deren Zielproteine zu kennen. Da die Wirkung von miRNAs sowohl eine Inhibierung der Proteintranslation als auch eine Degradierung von mRNAs zur Folge hat (siehe 1.1.2), betrachten die vielfach verwendeten mRNA Microarrays nur eine mögliche Wirkung von miRNAs (Calin et al, 2008; Lim et al, 2005; Linsley et al, 2007). Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine ist die Verwendung von quantitativen Proteomik-Techniken. Dazu können entweder zweidimensionale Gele (Calin et al, 2008; Zhu et al, 2007) oder massenspektrometrische Quantifizierungstechniken (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008; Vinther et al, 2006; Yang et al, 2009) eingesetzt werden. Diese Techniken werden näher in 1.2.1 und 1.2.2 diskutiert. Daneben können auch Protein-Microarrays (siehe 1.2) verwendet werden (Leivonen et al, 2009). Die beschriebenen Methoden haben alle die Besonderheit, dass neben den primären auch die sekundären Effekte von miRNAs betrachtet werden. Dies wird bei einer biochemischen Methode vermieden, bei der die Komplexe aus miRNA, mRNA und Argonaut-Protein isoliert werden (Beitzinger et al, 2007; Chi et al, 2009; Tan et al, 2009). Die danach sequenzierten miRNAs und mRNA Abschnitte können einander zugeordnet werden. Für diese Zuordnungen wird aber Vorwissen in Form der sogenannten Vorhersage-Algorithmen benötigt, weshalb diese Methode nur bedingt zur Detektion von neuen miRNA-mRNA Interaktionen herangezogen werden kann. Die Vorhersage-Algorithmen verwenden zur Bestimmung von miRNA Zielgenen konservierte Bereiche der *seed*-Sequenz Bindung, die Anzahl der Bindungsstellen, die Art der *seed*-Sequenz Bindung (siehe Abbildung 1-2) und die Bindungsenergien. Die Präferenz für eines der Kriterien ist allerdings bei jedem Vorhersage-Algorithmus unterschiedlich (Enright et al, 2003; Friedman et al, 2009; Kertesz et al, 2007; Lall et al, 2006; Maragkakis et al, 2009; Miranda et al, 2006), wodurch die geringe Übereinstimmung der Vorhersage-Algorithmen untereinander hervorgerufen wird (Bartel, 2009). Zudem weisen die Vorhersage-Algorithmen einen hohen Anteil an falsch positiven Ergebnisse auf (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008). Ein weiteres Problem der Vorhersage-Algorithmen ist, dass sie auf Sequenzen basieren, die, gerade wenn es sich um die untranslatierten Bereiche (3'UTR und 5'UTR) handelt, recht häufig Fehler aufweisen und somit, je nachdem von welcher Datenbank die Sequenzen bezogen werden, die Programme unterschiedliche Zielgene vorhersagen (Ritchie et al, 2009).

1.2 Quantitative Proteomik

Das Gebiet der Proteomik erforscht das Proteom und damit die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment unter definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt. Der Begriff Proteom wurde 1994 vom Australier Marc Wilkins anlässlich eines Kongresses über Proteomforschung in Anlehnung an den Begriff Genom geprägt. Die quantitative Proteomik stellt die Frage nach

der quantitativen Proteinexpression innerhalb der Proteomik (Anderson & Anderson, 1998). Weiter kann die quantitative Proteomik in die absolute Quantifizierung mit Hilfe von Standards (Beynon et al, 2005) und die relative Quantifizierung zum quantitativen Vergleich zweier oder auch mehrerer Zustände (Korbel et al, 2005) unterteilt werden. Dabei sind die Begriffe unabhängig von der verwendeten Methode. Die Begriffe sind nicht strikt festgelegt und so wird auch komparative (Yao et al, 2001) oder differentielle Proteomik (Perlson et al, 2004) synonym zur relativen Quantifizierung verwendet. Die angewendeten Methoden lassen sich in zweidimensionale Gelelektrophorese (siehe 1.2.1), Massenspektrometrie (siehe 1.2.2) und Proteinarrays unterteilen. Bei Proteinarrays und im Speziellen bei Antikörperarrays detektieren Antikörper ihr entsprechendes Antigen in einem Proteinlysate unter Verwendung des Microarray-Formates. Ein Nachteil dieser Methode ist die Verfügbarkeit der Antikörper und damit ein Festlegen auf bestimmte zu quantifizierende Antigene. Der Vorteil dieser Methode ist zweifelsfrei die gute Parallelisierung und damit verbunden ein hoher Probendurchsatz. Da diese Methode eine Auswahl der zu quantifizierenden Proteine erfordert und somit keine potentiell das gesamte Proteom umfassende Quantifizierung ermöglicht, wird hier nicht weiter darauf eingegangen. Zweidimensionale Gelelektrophorese und die massenspektrometrische Quantifizierung werden nachfolgend an Beispielen von relativen Quantifizierungen beschrieben.

1.2.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der klassischen zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D GE), die 1975 erstmalig eingeführt wurde (Klose, 1975; O'Farrell, 1975), werden die Proteine in zwei aufeinanderfolgenden Schritten aufgetrennt. Im ersten Schritt (erste Dimension) werden die Proteine auf Basis ihres isoelektrischen Punktes (isoelektrische Fokussierung; IEF) aufgetrennt. In einem zweiten Schritt, der sogenannten zweiten Dimension, werden die Proteine mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach ihrem Molekulargewicht fraktioniert. Anschließend werden die Proteine, die in sogenannten Proteinspots aufgetrennt sind, entweder mittels Absorptionsfarbstoffen (z.B. kolloidal Coomassie-Brillant-Blau und Silberfärbung) oder Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. SyproRuby) angefärbt. Nach dem Digitalisieren der Gelbilder durch entsprechende Scanner können anschließend computerunterstützt die Proteinspots detektiert werden. Danach werden die Intensitäten der Proteinspots zweier unterschiedlicher Proben verglichen. Die differentiell regulierte Proteinspots werden tryptisch verdaut und mittels MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionisation) oder ESI (electrospray ionisation) Massenspektrometrie (MS) analysiert und identifiziert. Durch 2D GE können hochauflösende Gele mit mehreren tausend quantifizierbaren Proteinspots erzielt werden. Zudem können 2D GE Analysen gut parallelisiert werden. Nachteilig ist der Ausschluss von hydrophoben Membranproteinen und Proteinen mit einem Molekulargewicht von größer als 200 kDa und kleiner als 10 kDa. Desweiteren können Proteine vornehmlich nur in einem pH-Bereich von 3 bis 10 aufgetrennt

werden. Ein weiteres Problem ist das Auftreten von Gel-zu-Gel Variationen, die die quantitative Auswertung erschweren. Diese Variationen können allerdings durch die Verwendung der 2D DIGE (*difference in-gel electrophoresis*) Technik (Unlu et al, 1997) umgangen werden. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoffe (Cy2, Cy3 und Cy5) verwendet, die über eine NHS-Ester Gruppe kovalent an die ϵ -Aminogruppe von Lysinen gebunden werden. Die Cy-Farbstoffe verändern die Nettoladung der Proteine nicht und stimmen untereinander in ihrem Molekulargewicht überein, so dass es generell zu keiner Verschiebung der Proteinspots zueinander kommt. Zudem werden nur ca. drei Prozent des Gesamtproteinlysates durch die Farbstoffe markiert (*minimal labelling*), was insgesamt nur zu einer minimalen Molekulargewichtsveränderung aufgrund der Markierung führt. Die zwei zu vergleichenden Proben werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Zusätzlich wird ein interner Standard, bestehend aus den biologischen Replikaten aller Proben, mit dem dritten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch die Verwendung dieses potentiell gleichen Proteinspotmusters in jedem Gel können Artefakte ausgeschlossen bzw. detektiert werden und zudem wird die Zuordnung der Proteinspots von Gel zu Gel verbessert. Der komplette Arbeitsablauf für 2D DIGE ist in Abbildung 1-4 gezeigt.

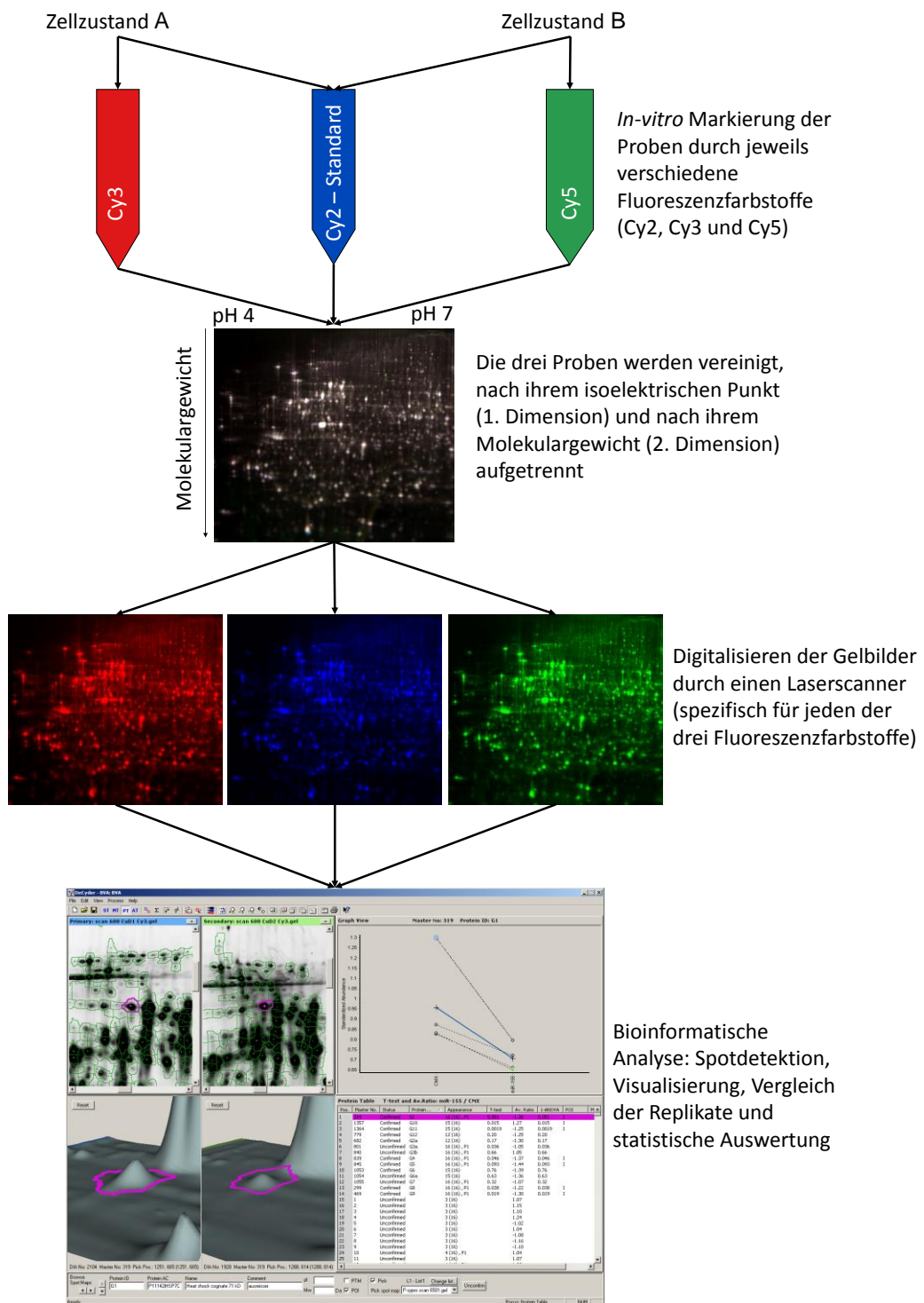


Abbildung 1-4: Arbeitsablauf der 2D DIGE-Technik. Die zwei verschiedenen Zellzustände A und B werden *in-vitro* mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Ebenso wird der interne Standard bestehend aus Zellzustand A und B der verschiedenen Replikate mit einem dritten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nach Vereinigung erfolgt die zweidimensionale Gelelektrophorese, bei der zuerst die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und dann nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Danach erfolgt das Auslesen der Daten für jeden der drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Abschließend werden durch bioinformatische Analysen diejenigen Proteinspots herausgefiltert, die eine Regulation zwischen den beiden verschiedenen Zellzuständen zeigen. Die Identität der Proteine wird abschließend mittels Massenspektrometrie bestimmt.

1.2.1.1 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI und ESI Massenspektrometrie

Nach der 2D GE müssen die regulierten Proteine identifiziert werden. Dies kann entweder nach dem tryptischen Verdau der Proteine mittels *reverse phase* HPLC (*high performance liquid chromatography*) gekoppelter ESI-Tandemmassenspektrometrie (wie in 1.2.2 beschrieben) erfolgen oder mittels MALDI-MS. Die MALDI-MS Identifizierung ist möglich, da die Proteinspots mit einem oder einigen wenigen Proteinen nur eine geringe Komplexität aufweisen und deshalb nicht durch *reverse phase* HPLC fraktioniert werden müssen. Zudem hat die MALDI-MS den Vorteil, dass ein höherer Probendurchsatz gewährleistet ist. Dabei werden die Proben (Analyt) mit einem Überschuss an Matrix kokristallisiert. Ein Laser (z.B. Stickstofflaser, 337nm) regt die Matrixmoleküle an, die zusammen mit den Analyt-Molekülen in die Gasphase übergehen. Die meist einfach geladenen Peptidmoleküle können im TOF (*time of flight*) Analysator entsprechend ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis detektiert werden. Der daraus erhaltene sogenannte PMF (*peptide mass fingerprint*) kann mit *in-silico* generierten PMFs der Gesamtheit der Proteine abgeglichen werden und somit die entsprechenden Peptide und Proteine identifiziert werden (Scheler et al, 1998). Zudem können auch von einzelnen Peptiden MS/MS Fragmentspektren generiert werden und wie in 1.2.2 beschrieben zur Identifizierung der Peptide bzw. Proteine herangezogen werden.

1.2.2 Massenspektrometrische Quantifizierung

Die quantitative Massenspektrometrie hat sich in den letzten Jahren aufgrund der Nachteile der zweidimensionalen Gelelektrophorese (siehe 1.2.1) und der besseren Massenspektrometer in Hinblick auf Sensitivität, Auflösung und Scangeschwindigkeit als zusätzliche Methode zur Quantifizierung von Proteinen etabliert. Dabei werden nicht wie bei der 2D GE die intakten Proteine quantifiziert, sondern die Quantifizierung erfolgt größtenteils auf Peptidebene. Die sogenannte *Shotgun*-Proteomik (Wu & MacCoss, 2002) macht sich zu Nutze, dass Peptide aufgrund ihrer geringeren Größe gegenüber Proteinen besser massenspektrometrisch detektiert werden können. Dabei werden die Proteine durch Trypsin, die am häufigsten verwendete Protease, spezifisch C-terminal nach Arginin und Lysin gespalten. Die erhaltenen Peptide werden bei der ESI-MS/MS aus der Lösung ionisiert und die Peptidionen durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS, MS²) weiter fragmentiert. Dabei erhält man je nach Peptidsequenz charakteristische Ionenserien. Durch Abgleich mit Datenbanken, bei denen das komplette Proteom *in-silico* tryptisch verdaut wird und die Peptid-spezifischen Ionenserien berechnet werden, können die experimentell erhaltenen Daten Peptiden bzw. Proteinen zugeordnet werden (Yates et al, 1995). Bei der *Shotgun*-Proteomik können die Proteine vor dem Verdau sowohl durch SDS-PAGE, aber auch chromatographisch mittels Ionenaustausch-Chromatographie fraktioniert werden. Nach dem

Verdau werden im einfachsten Fall die Peptide mittels *reverse phase* HPLC aufgetrennt oder auch durch zweidimensionale Chromatographie mittels Kopplung von z.B. Ionenaustauschchromatographie mit *reverse phase* HPLC (Delahunty & Yates, 2005). Die Massenspektrometrie von Peptiden ist an sich keine quantitative Technik, d.h. die Intensitäten von Peptidmustern gleicher Peptide aus identischen Proben können sich von Messung zu Messung unterscheiden. Dies liegt vor allem an der nicht ausreichenden Reproduzierbarkeit der Ionisierung (Szajli et al, 2008). In Abbildung 1-5 ist eine Übersicht über die verschiedenen massenspektrometrischen Quantifizierungstechniken gezeigt. Ein Hauptaugenmerk liegt auf dem Zeitpunkt, an dem die beiden zu vergleichenden Zellzustände vereinigt werden, da die vorherigen Fraktionierungsschritte artifizielle Unterschiede bedingen können. Die markierungsfreie (*label-free*) Quantifizierung umgeht den nicht-quantitativen Charakter der Massenspektrometrie durch Normalisierungen und kann anhand der Ionenintensitäten oder *Spectral Counts*, also der Häufigkeit der Identifizierungsereignisse eines Peptides erfolgen. Der Nachteil dieser Methode ist die schlechte Quantifizierungsgenauigkeit, da die Proben erst vergleichsweise spät im Arbeitsablauf vereinigt werden (Old et al, 2005).

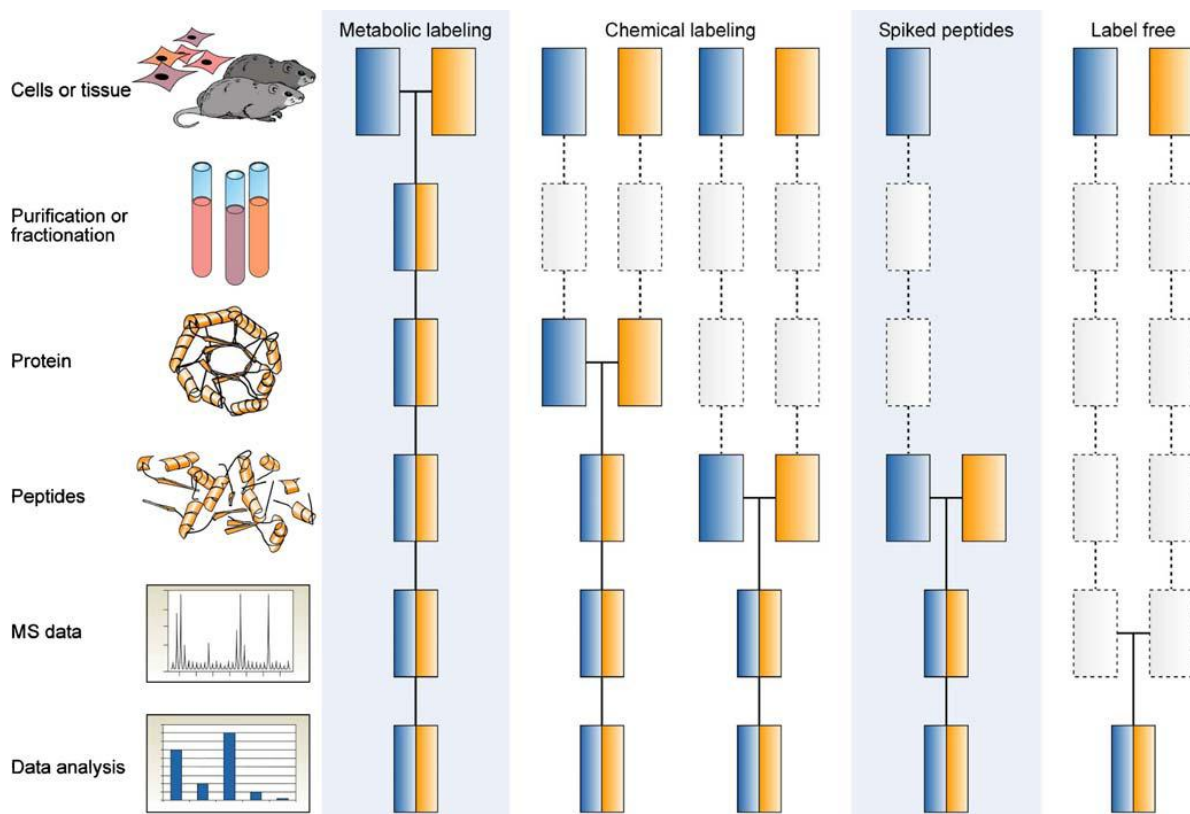


Abbildung 1-5: Überblick über die verschiedenen massenspektrometrischen Quantifizierungstechniken. Die gelben bzw. blauen Boxen repräsentieren die zwei verschiedenen experimentellen Zustände. Die horizontalen Linien zeigen an, wann die beiden Proben vereinigt werden, und die gestrichelten Linien weisen darauf hin, wann artifizielle Variationen möglich sind (Bantscheff et al, 2007).

Die anderen quantitativen massenspektrometrischen Techniken beruhen auf internen Standards, die in die zu quantifizierenden Proben eingebracht werden. Diese Standards sind präferentiell stabile Isotope, die eine andere Masse als die vornehmlich vorkommenden Isotope haben und sich dadurch im Massenspektrum unterscheiden. Anhand der Intensitätsunterschiede der beiden unterscheidbaren Peptidmuster lassen sich die verschiedenen Zustände quantifizieren. Mögliche stabile Isotope sind Deuterium (D) als schweres Isotop von Wasserstoff (H) oder die Isotopen-Paare $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Diese Methode wird als stabile Isotopenverdünnung (*stable isotope dilution*) bezeichnet und wurde bereits 1997 für einzelne Proteine angewendet (Stocklin et al, 1997). Heute wird auch der Begriff absolute Quantifizierung dafür verwendet und ist in Abbildung 1-5 als *spiked peptides* bezeichnet. Dabei besteht wie bei der markierungsfreien Quantifizierung der Nachteil, dass die Vereinigung der Proben erst zu einem späten Zeitpunkt erfolgt und die Methode zudem nur für einzelne Peptide bzw. Proteine anwendbar ist. Desweiteren können Peptide oder Proteine chemisch markiert werden (*chemical labelling*). Dabei kann die Markierung entweder auf Proteinebene erfolgen wie bei ICAT (*isotope-coded affinity tags*) (Gygi et al, 1999) und bei ICPL (*isotope-coded protein label*) (Schmidt et al, 2005) oder auf Peptidebene wie bei iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) (DeSouza et al, 2005) und der ^{18}O Quantifizierung (Schnolzer et al, 1996). Bei der ^{18}O Quantifizierung wird während des tryptischen Verdau enzymatisch ^{18}O eingebaut, was zu einer Massenverschiebung gegenüber ^{16}O führt. Die Quantifizierung kann mittels der MS-Spektren wie bei ICAT und der ^{18}O Quantifizierung oder anhand der MS/MS Spektren wie bei iTRAQ erfolgen. Der größte Vorteil der metabolischen Markierung (*metabolic labelling*) gegenüber den anderen Methoden liegt in der Kombination beider Zustände zum frühest möglichen Zeitpunkt durch *in-vivo* Markierung. Dabei können entweder alle Isotope durch ihre stabilen schweren Formen ausgetauscht werden, wie z.B. bei der ^{15}N Markierung (Washburn et al, 2002) oder durch Markierung einzelner Aminosäuren wie z.B. bei SILAC (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*) (Ong et al, 2002).

1.2.3 SILAC

SILAC (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*) wurde 2002 durch die Gruppe von Matthias Mann erstmalig angewendet (Ong et al, 2002). Im SILAC Ansatz werden Zelllinien in einem Medium kultiviert, das entweder die mit stabilen schweren Isotopen-markierte Form einer Aminosäure enthält oder die entsprechende Aminosäure mit der natürlich vorkommenden Isotopen-Verteilung. Anfänglich wurde als markierte Aminosäure Leucin verwendet, das als schwere Form drei Deuterium enthält. Dieser Ansatz wurde in der Weise modifiziert, dass nun Arginin und Lysin als markierte Aminosäuren in Verbindung mit Trypsin als Protease verwendet werden. Diese Kombination ist deshalb günstig, da Trypsin C-terminal von Arginin und Lysin spaltet und somit jedes entstehende Peptid mindestens eine Markierung enthält. Zudem sind Arginin und Lysin ebenso wie Leucin essentielle

Aminosäuren und werden nicht metabolisch umgesetzt. Dies ist deswegen wichtig, damit nur diese schweren Aminosäuren eingebaut werden und keine anderen schweren Aminosäuren entstehen. Desweiteren werden bevorzugt die stabilen Isotope von Kohlenstoff und Stickstoff (^{13}C und ^{15}N) verwendet, da diese, im Gegensatz zu Deuterium, zu keiner größeren Verschiebung der Elutionszeit von Peptiden während der *reverse phase* HPLC führen. Zudem sind die Massenunterschiede größer, wodurch gerade bei mehrfach geladenen Peptiden die Quantifizierung erleichtert wird (Ong & Mann, 2006). Eine Übersicht über den Arbeitsablauf der SILAC Quantifizierung ist in Abbildung 1-6 gezeigt.

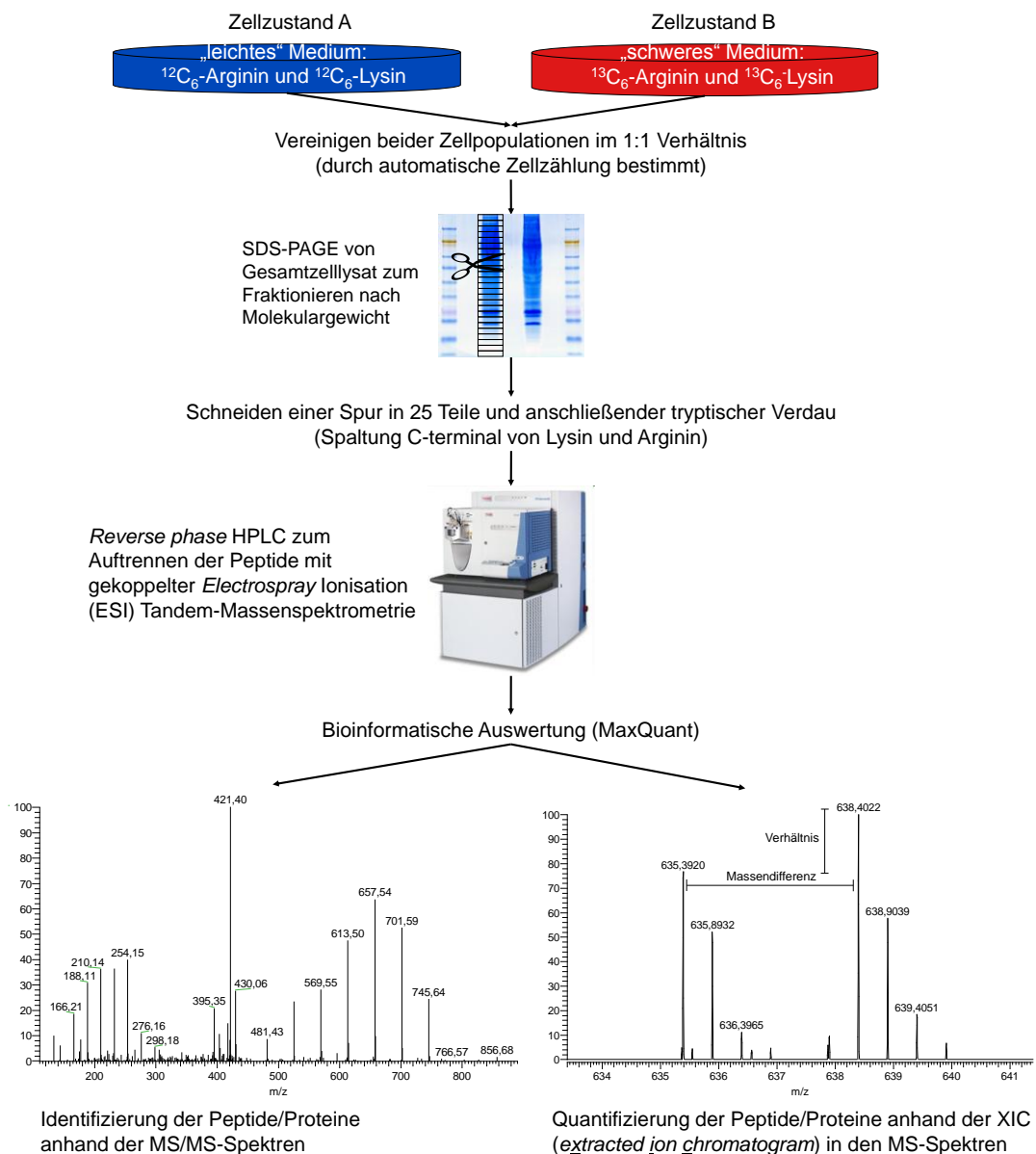


Abbildung 1-6: Übersicht über den Arbeitsablauf der SILAC-Quantifizierung. Erläuterungen siehe Text

Die beiden zu vergleichenden Zellzustände werden entweder mit dem leichten oder schweren Medium, welches die ^{12}C - oder ^{13}C -markierten Aminosäuren Arginin und Lysin enthält, markiert. Für eine vollständige Markierung werden in der Regel fünf Zellteilungen benötigt. Danach werden die Zellen im 1:1 Verhältnis vereinigt. Die Zelllysate werden durch SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht fraktioniert und in Gelstücke geschnitten, deren Proteine anschließend tryptisch verdaut werden. Die entstehenden Peptide werden dann weiter durch *reverse phase* HPLC aufgetrennt. Dabei ist die HPLC an das ESI-Massenspektrometer gekoppelt, wodurch nach erfolgter Ionisation die MS-Spektren aufgenommen werden, aus denen die Peptide ausgewählt und im MS/MS-Modus fragmentiert werden. Die generierten Daten werden bioinformatisch ausgewertet, wobei die MS/MS-Spektren zur Identifizierung der Peptide bzw. Proteine dienen und die MS-Spektren zur Quantifizierung herangezogen werden. Die leichten Peptidmuster können durch eine Massendifferenz von 6,02 Da oder ein Vielfaches bei mehreren eingebauten markierten Aminosäuren von den schweren Peptidmustern unterschieden werden. Bei der Quantifizierung werden die Flächen unter den Peptidmustern der leichten mit den schweren Peptidformen verglichen. Zudem werden die MS-Spektren der Peptide zu verschiedenen Elutionszeiten während der HPLC herangezogen, um mittels mehrere Messwerte zu quantifizieren (XIC: *extracted ion chromatogram*). Die daraus erhaltenen Peptidverhältnisse entsprechen den Regulationen der Proteine unter den verschiedenen Bedingungen (Zustand A und B).

Neben der Anwendung in Zellkulturen fand SILAC auch durch die Verwendung modifizierter Nährmedien Einzug in die Quantifizierung von Proteinen in Hefen (Gruhler et al, 2005a), Pflanzen (Gruhler et al, 2005b) und sogar Mäusen (Kruger et al, 2008). SILAC kann neben der statischen Betrachtung der Proteinmengenunterschiede auch als sogenanntes *dynamic* oder *pulsed* SILAC zur *de-novo* Quantifizierung von Proteinen eingesetzt werden (Doherty et al, 2009). Interaktionen können ebenfalls mittels SILAC spezifisch nachgewiesen werden, wie bereits für Protein-Protein (Blagoev et al, 2003) sowie DNA-Protein (Mittler et al, 2009) Interaktionen gezeigt wurde. Auch modifizierte Proteine können quantifiziert werden, wie z.B. anhand von Phosphorylierungen (Ibarrola et al, 2003) und Methylierungen (Ong et al, 2004) demonstriert. Insgesamt konnten bisher bis zu fünf verschiedene Zustände in einem Experiment mittels SILAC verglichen werden (Molina et al, 2009).

1.3 Krebs

Krebs bezeichnet eine maligne Neoplasie. Eine Neoplasie ist die Neubildung von Körpergewebe durch Fehlregulation des Zellwachstums. Dabei unterscheidet man benigne Neoplasien, die nicht infiltrierend sind, semimaligne Neoplasien, die infiltrierend und destruktiv sind, aber im Gegensatz zu malignen Neoplasien bzw. Tumoren, dem Krebs an sich, keine Metastasen bilden. Hämatookologische Tumore leiten sich aus den Blutzellen oder Blutstammzellen ab und werden weiter unterteilt in Leukämien und Lymphome.

Maligne Lymphome entstehen aus B- oder T-Lymphozyten beziehungsweise Zellen des retikuloendothelialen Systems (Zellen des retikulären Bindegewebes: Aufenthaltsraum für Zellen des Immunsystems in den sekundären lymphatischen Organen) und werden in Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphome unterteilt. Hodgkin-Lymphome sind nach dem Arzt Thomas Hodgkin benannt, der diese Krankheit erstmalig 1832 beschrieb (Hodgkin, 1832). Hodgkin-Lymphome grenzen sich von den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) durch das Auftreten einer besonderen Zellart, den Sternberg-Reed-Zellen, ab.

1.3.1 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)

Non-Hodgkin-Lymphome als Oberbegriff beinhalten eine Vielzahl von heterogenen Krankheiten, die aus historischen Gründen zur Abgrenzung gegenüber den Hodgkin-Lymphomen verwendet wurde. NHL zeigen unterschiedliche genetische Veränderungen, immunologische Charakteristika und auch klinische Erscheinungsformen, weshalb die Behandlung auch sehr unterschiedlich ist. Je nachdem ob der Ursprung von B-lymphatischen oder T-lymphatischen Zellen ist, kann zwischen der B- (80%) oder T- (20%) Klasse unterschieden werden. Nach der WHO-Klassifikation kann die B-Klasse weiter nach zytomorphologischen, immunologischen und genetischen Merkmalen in Vorläufer-B-Zell-Lymphome und Reife-B-Zell-Lymphome unterschieden werden. Neben CLL (*chronic lymphocytic leukemia*), DLBL (*diffuse large B cell lymphoma*) und Burkitt-Lymphom gehört u.a. das Mantelzelllymphom der Gruppe von Reifen-B-Zell-Lymphomen an.

1.3.2 Mantelzelllymphom

Das Mantelzelllymphom (MCL: *mantle cell lymphoma*) macht 5-10% der Non-Hodgkin-Lymphom Fälle aus (Project, 1997). Es zeigt einen aggressiven klinischen Verlauf und ein schlechtes Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie, weshalb die durchschnittliche Überlebenszeit nur bei drei bis vier Jahren liegt (Salaverria et al, 2006). Das genetische Hauptkennzeichen von MCL ist die chromosomale Translokation (11;14)(q13;q32) und die damit verbundene Überexpression von Cyclin D1. Dadurch kommt es im Zusammenspiel mit anderen Proteinen zu einer Deregulation beim Fortschreiten an der G₁-S Phasengrenze im Zellzyklus (Bertoni et al, 2006). Diese Translokation ist allerdings nicht ausreichend für eine maligne Transformation, weshalb andere genetische Aberrationen als kausal angesehen werden (Wlodarska et al, 1999). Die weiteren in MCL detektierten chromosomalen Aberrationen beinhalten hauptsächlich Deletionen, darunter die von 13q14 als essentieller Faktor (Sander et al, 2008; Wlodarska et al, 1999). Da die Häufigkeit der Deletionen sehr unterschiedlich ist, ist in Tabelle 1-1 ein Vergleich von verschiedenen Studien zusammengefasst.

Deletionslokus	Häufigkeit [%]	Referenz
13q14	55	(Kohlhammer et al, 2004)
13q12.3-q14.31	43	(Schraders et al, 2005)
13q14.3-q21.1	52-55	(Tagawa et al, 2005)
13q14.2-q14.3	25	(Rubio-Moscardo et al, 2005)
13q14.2-21.1	27	(Rinaldi et al, 2006)
13q14	43	(Parry-Jones et al, 2007)
13q14	43	(Sander et al, 2008)

Tabelle 1-1: Deletion von 13q14 in MCL und dessen Häufigkeit bei verschiedenen Studien

Die Deletionshäufigkeit des 13q14 Lokus reicht von 25 bis 55%. Die Deletion von 13q14 korreliert zudem mit einer geringeren Überlebensspanne (Parry-Jones et al, 2007; Sander et al, 2008), was die Bedeutung in der Pathogenese von MCL für diese chromosomale Region verdeutlicht. Da die beiden mikroRNAs miR-15a und miR-16-1 auf diesem chromosomalen Abschnitt lokalisiert sind (Calin et al, 2002), wird unter 1.4.2 näher auf die potentielle Rolle von miR-15a und miR-16-1 in MCL eingegangen.

1.4 mikroRNAs und Krebs

MikroRNAs sind in einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie z.B. dem Zellzyklus (Carleton et al, 2007), der Entwicklung (Harfe, 2005) und dem Metabolismus (Boehm & Slack, 2006) sowie in verschiedenen Krankheiten, wie z.B. Diabetes (Poy et al, 2004), neurodegenerativen Krankheiten (Jin et al, 2004) sowie Krebs (Volinia et al, 2006) involviert. Die Hälfte der mikroRNAs sind innerhalb oder in der Nähe von chromosomalen Brüchen, minimalen Regionen von Heterozygotitätsverlusten oder minimalen Regionen von Amplifikationen in Verbindung mit Krebs lokalisiert (Calin et al, 2004). Bei Tumoren können mikroRNAs ähnlich wie Proteine als Tumorsuppressoren (Johnson et al, 2005) oder Onkogene (OncomiRs) (Brennecke et al, 2003) wirken. Bei der tumorsuppressiven Wirkung von miRNAs trägt die fehlende Funktion von miRNAs zur malignen Transformation normaler Zellen bei. Dieser „Funktionsfehler“ von miRNAs kann durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden: Genomische Deletion (Calin et al, 2002), Mutation (Calin et al, 2005), epigenetische Regulation (Saito et al, 2006) oder Veränderung der miRNA Prozessierung (Flavin et al, 2008). Ein Beispiel für miRNAs als Tumorsuppressoren sind die in 1.4.2 beschriebenen mikroRNAs miR-15a und miR-16-1. Ebenfalls wie miR-15a und miR-16-1 haben viele tumorsuppressive miRNAs Homologe auf anderen chromosomalen Regionen. Eine mögliche Erklärung für mehr als eine genomische Kopie von miRNAs ist ein Schutzmechanismus der Evolution, falls ein miRNA Lokus deletiert oder anderweitig ausgeschaltet wird (Garzon et al, 2009). Die Liste der onkogenen miRNAs ist wesentlich kürzer und beinhaltet u.a. miR-155 (Metzler et al, 2004). miRNA Expressionsprofile können dazu herangezogen werden, mit hoher Genauigkeit Tumore von entsprechenden Geweben

zu klassifizieren. Dabei zeigen miRNA Profile gegenüber mRNA Profilen eine bessere Genauigkeit bzw. es müssen dazu weniger miRNAs herangezogen werden (Lu et al, 2005). Deshalb werden große Hoffnungen in miRNAs zur Diagnose und Prognose gesetzt. Ein Beispiel dafür ist miR-155, dessen Expression mit acht weiteren miRNAs mit der Entwicklung bei CLL assoziiert ist (Calin et al, 2005). Desweiteren gibt es Hinweise darauf, dass miRNAs eine Rolle bei der Tumordinvasion und Metastasierung spielen können (Huang et al, 2008; Ma et al, 2007). Aufgrund der bedeutsamen Funktion von miRNAs in Krebs bestehen Ansätze zur therapeutischen Verwendung. Dabei können miRNAs entsprechend ihrer Funktion als Onkogen oder Tumorsuppressor hoch- oder herunterreguliert werden. Dies geschieht entweder durch sogenannte antagomiRs (antagonistisch gegen miRNAs wirkend) oder miRNA Mimikry (miRNAs imitierend). Das besondere Interesse an miRNAs in der Therapie ist darin begründet, dass gleichzeitig mehrere Zielproteine beeinflusst werden und somit ganze Signaltransduktionswege reguliert werden können. Im Umkehrschluss ist dies natürlich auch eine Gefahr, da unspezifische Nebeneffekte entstehen könnten. Deshalb ist die gezielte Einschleusung von miRNAs in das entsprechende Gewebe von großer Wichtigkeit und Gegenstand vieler Untersuchungen (Wang & Wu, 2009).

1.4.1 Rolle von miR-155 bei Krebs und anderen Krankheiten

miR-155 wird als sogenannte multifunktionale miRNA bezeichnet, da sie in einer Vielzahl von verschiedenen biologischen Prozessen wie Hämatopoese, Entzündungen und Immunität sowie in Krankheiten wie Krebs, Herz-Kreislaufkrankungen und Virusinfektionen involviert ist (Faraoni et al, 2009). miR-155 ist kodiert und wird prozessiert von einem Exon einer nicht-kodierenden RNA, welche vom *B-cell integration cluster* (BIC) auf Chromosom 21 transkribiert wird (Eis et al, 2005). In der Hämatopoese ist miR-155 herunterreguliert und deutet damit eine Rolle in der Erythropoese an (Bruchova et al, 2007; Masaki et al, 2007). Die Rolle von miR-155 in Entzündungsreaktionen zeigt sich durch Hochregulation in der rheumatischen Arthritis, einer chronischen Autoimmunkrankheit (Pauley et al, 2008; Stanczyk et al, 2008), und in der Induktion durch bakterielle Lipopolysaccharide (Tili et al, 2007). Desweiteren ist die miR-155 Expression essentiell für Immunreaktionen (Rodriguez et al, 2007). Für miR-155 ist ebenfalls eine Bedeutung bei Kreislaufkrankungen in Verbindung mit der Regulierung des arteriellen Blutdrucks festgestellt worden (Martin et al, 2006). Die Überexpression von miR-155 in EBV (Epstein-Barr Virus) infizierten Zellen (Yin et al, 2008) zeigt deren Rolle bei Virusinfektionen. Es gibt zudem Nachweise, dass miRNAs im Genom von doppelsträngigen DNA Viren wie Herpesviren, Polyomaviren und Adenoviren kodiert sind. Das Kaposi's-Sarkoma-assoziierte Herpesvirus (KSHV) zum Beispiel kodiert eine miRNA (miR-K12-11), die ortholog zur zellulären miR-155 ist. Durch Überexpression dieser miRNA verschafft sich das Virus einen Vorteil in der Wirtszelle (Gottwein et al, 2007; Skalsky et al, 2007). miR-155 ist ebenfalls in einer Vielzahl von Krebsarten überexprimiert und fungiert dadurch als Onkogen. So ist miR-155 z.B. in soliden Neoplasmen wie Brustkrebs (Iorio et al,

2005; Yan et al, 2008), ccRCC (*clear cell renal cell carcinoma*) (Jung et al, 2009), Gebärmutterhalskrebs (Wang et al, 2008), SCC (*squamous cell carcinoma*) (Wong et al, 2008), Pankreaskrebs (Greither et al, 2009) und in Lungenkrebs (Yanaiharu et al, 2006) hochreguliert. Bei Lungenkrebs wird ebenfalls miR-155 als potentieller prognostischer Biomarker untersucht. Daneben gibt es viele Lymphome und Leukämien, bei denen miR-155 überexprimiert ist, so z.B. die Non-Hodgkin-Lymphome des B-Zell Typs DLBCL (*diffuse large B cell lymphoma*) (Eis et al, 2005; Lawrie et al, 2007; Rai et al, 2008), CLL (*chronic lymphocytic leukemia*) (Fulci et al, 2007; Marton et al, 2008), Burkitt Lymphomen (Kluiver et al, 2006; Kluiver et al, 2007) sowie Lymphome des T-Zell-Typs in Form von ATL (*adult T-cell leukemia*) (Bellon et al, 2009) und Hodgkin-Lymphomen (Gibcus et al, 2009) sowie Leukämien wie AML (*acute myeloid leukemia*) (Garzon et al, 2008). Im Gegensatz zu den tiefgehenden Erkenntnissen zur Expression von miR-155 in verschiedenen Krankheiten und Krebsentitäten ist zu den Zielproteinen nur wenig bekannt. Die 26 bis jetzt bekannten miR-155 Zielproteine üben verschiedenste Funktionen von der Wirkung als Kinasen bis zu Transkriptionsfaktoren aus und haben unterschiedlichste potentielle Funktionen in den verschiedenen untersuchten Krankheiten (Faraoni et al, 2009).

1.4.2 Rolle von miR-15a und miR-16-1 bei Krebs und im Speziellen beim Mantelzelllymphom

miR-15 und miR-16 waren unter den ersten miRNAs, die im Menschen identifiziert wurden (Lagos-Quintana et al, 2001). miR-15 und miR-16 wurden später in miR-15a und miR-16-1 umbenannt, da Homologe auftreten, die als miR-15b und miR-16-2 bezeichnet werden. Die Homologe sind auf Chromosom 3 lokalisiert und sind zwischen miR-16-2 zu miR-16-1 komplett identisch und zwischen miR-15b zu miR-15a nur in der 5' Hälfte (Lagos-Quintana et al, 2002; Mourelatos et al, 2002). Die chromosomale Lokalisation von miR-15a und miR-16-1 befindet sich im Abschnitt 13q14.3 und ist damit mit der Regulation dieser beiden miRNAs in CLL assoziiert (Bottoni et al, 2005; Calin et al, 2008). Somit waren miR-15 und miR-16 die ersten miRNAs mit einer potentiellen Funktion bei der Krebsentstehung (Calin et al, 2002). Dabei wird angenommen, dass die beiden homologen miRNAs, miR-15b und miR-16-2 auf Chromosom 3, aufgrund ihrer geringen Expressionsstärke keine Rolle spielen. Durch Mutationen werden häufig Krebsgene in ihrer Funktion beeinflusst. Eine solche Mutation wurde auch bei CLL für miR-16-1 gefunden. Die Basensubstitution C → T in der pri-miR-16-1 führt dabei zu einer geringeren Expression von reifer miR-16-1 (Calin et al, 2005). In CLL sind Zielproteine für miR-15a und miR-16-1 identifiziert worden, die Funktionen beim Zellwachstum, Zellzyklus, Onkogenese, Tumorsuppression und Anti-Apoptose haben. Das am besten untersuchte Protein ist dabei BCL-2 (Calin et al, 2008). miR-15a und miR-16-1 scheinen also durch ihre Herunterregulation die Tumorgenese zu fördern. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der beiden miRNAs ist es nicht verwunderlich, dass miRNA Profile von miR-15a und miR-16-1 in CLL als prognostischer Marker eingesetzt werden können

(Calin et al, 2005). Die Deletion der chromosomale Region 13q14.3 von miR-15a und miR-16-1 ist am Besten in CLL untersucht (Panayiotidis et al, 1997), aber auch beim Mantelzelllymphom ist bekannt, dass diese Region häufig deletiert ist (Cuneo et al, 1999; Kohlhammer et al, 2004; Monni et al, 1998; Parry-Jones et al, 2007; Rinaldi et al, 2006; Rubio-Moscardo et al, 2005; Sander et al, 2008; Schraders et al, 2005; Tagawa et al, 2005). Allerdings konnte noch keine eindeutige Herunterregulation der beiden miRNAs miR-15a und miR-16-1 in MCL nachgewiesen werden (Navarro et al, 2009). Über die Funktion von mikroRNAs im MCL ist zurzeit noch nicht viel bekannt. Es gibt einige Untersuchungen zum miR-17-92 Cluster (Navarro et al, 2009) sowie über die Regulation von miR-15a und miR-16-1 durch DLEU2 (Lerner et al, 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass das in MCL überexprimierte Cyclin D1 bei Verkürzung der mRNA durch miR-16-1 reguliert wird (Chen et al, 2008).

1.5 Zielsetzung

Um miRNA-Zielgene zu identifizieren, wurden bislang bioinformatische Vorhersage-Algorithmen oder mRNA Microarrays verwendet. Die Vorhersage-Algorithmen generieren Listen mit vielen falsch positiven sowie falsch negativen Genen. Die Identifizierung von miRNA Zielen auf mRNA-Ebene mit Hilfe von Microarrays hat dagegen den Nachteil, dass die Hauptwirkung von miRNAs die translationale Inhibition und nicht die mRNA Degradation ist. Aus diesen Gründen ist die Zielsetzung dieser Arbeit die mikroRNA Zielgene anhand ihrer Zielproteine zu identifizieren. Für diesen Zweck sollten verschiedene Proteomik-Techniken angewendet werden, um die geeignete Methode für diese Fragestellung zu evaluieren. Dazu wurde 2D DIGE als Gel-basierte und SILAC als Gel-freie quantitative Proteomik-Technik eingesetzt. Desweiteren sollten die Ergebnisse der miRNA-Zielprotein Identifizierung mit verfügbaren Daten anderer miRNA Zielgen Identifizierungsmethoden (Transkriptomik und Vorhersage-Algorithmen) verglichen werden. Unter Anwendung der geeigneten Proteomik-Technik sollten dann Zielproteine der für die Mantelzelllymphom-Entität relevanten mikroRNAs identifiziert werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Steinheim), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), GE Healthcare GmbH (Freiburg), Promochem GmbH (Wesel), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim), Novagen (Gibbstown, USA), Mallinckrodt-Baker (Deventer, Niederlande), Merck Biosciences (Darmstadt), Gerbu Biochemica GmbH (Gaiberg), VWR (Darmstadt), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Promega GmbH (Mannheim) und Thermo Fisher Scientific (Bonn) bezogen.

Chemikalie	Firma
Acetonitril (HPLC grade)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
HPLC-H ₂ O	Merck Biosciences (Darmstadt)

2.1.2 Instrumente

Gerät	Firma
Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Bonn
CapLC nanoHPLC System	Waters GmbH, Eschborn
Ettan DALTwelve	GE Healthcare GmbH, Freiburg
Ettan IPGphor	GE Healthcare GmbH, Freiburg
Labofuge 400 "Function Line"	Thermo Fisher Scientific, Bonn
LC Packings Ultimate	Dionex Corporation, Sunnyvale, USA
LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Microplate Reader EL 800	BioTek Instruments Inc., Winooski, USA
Optima max E Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Photometer (Ultraspec 3100 pro)	GE Healthcare GmbH, Freiburg
QTOF Ultima	Waters GmbH, Eschborn
Speed Vac Anlage	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Spot Picker	Genetix, Hampshire, UK
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Typhoon 9410	GE Healthcare GmbH, Freiburg
Ultraflex I	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
UV-Leuchttisch (60-ECX-26M)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vi-CELL XR "Cell Counter"	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
XCell II Blot Modul	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
XCell <i>SureLock</i> Mini-Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.3 Software

Software	Firma / Internetadresse
BioTools 3.0	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
BRM 2.0	www.sysbio.org
DeCyder 2D 6.5	GE Healthcare GmbH, Freiburg
EndNote 11 und 12	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
FlexAnalysis 2.4	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
FlexControl 2.4	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
ImageJ 1.42	http://rsbweb.nih.gov/ij/
ImageQuant Tool 5.2	GE Healthcare GmbH, Freiburg
KCjunior 1.1	BioTek Instruments Inc., Winooski, USA
Mascot 2.1 und 2.2	Matrix Science, London, UK
MassLynx 4.2	Waters GmbH, Eschborn
MaxQuant	www.maxquant.org
MeV 4.4	www.tm4.org
MSQuant 1.5	http://msquant.sourceforge.net/
Office 2003 und 2007	Microsoft, Redmond, USA
Protein Lynx Global Server 2.2.5	Waters GmbH, Eschborn
SigmaPlot 10.0	Systat Software Inc., Chicago, USA
Typhoon Scanner Control 5.0	GE Healthcare GmbH, Freiburg
XCalibur 2.0.6	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

2.1.4 Kits

Kit	Firma
miReasy Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan microRNA Assay Kit	Applied Biosystems, Lincoln, USA

2-D Quant Kit (GE Healthcare GmbH, Freiburg) bestehend aus:

Precipitant
 Co-Precipitant
 Copper Solution
 Color Reagent A
 Color Reagent B
 BSA Standard Solution 2 mg/mL

Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible (Thermo Fisher Scientific, Bonn) bestehend aus:

BCA Reagent A
 BCA Reagent B
 Compatibility Reagent No-Weigh Format, 48mal 9,3 mg
 Reconstitution Buffer
 BSA Standard, 2mg/mL
 96-well Microplates

NuPAGE Novex Bis-Tris Gels Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) bestehend aus:

NuPAGE LDS Sample Buffer
 NuPAGE Reducing Agent
 NuPAGE MES Buffer
 NuPAGE Antioxidant
 SeeBlue Plus 2 Marker

ECLplex Kit (GE Healthcare GmbH, Freiburg) bestehend aus:

ECLplex Fluorescent Rainbow Marker
 ECLplex goat- α -mouse IgG-Cy3 secondary antibody
 ECLplex goat- α -rabbit IgG-Cy5 secondary antibody
 Hybond-LFP PVDF Membran
 ECL advanced Blocking Reagent

2.1.5 Lösungen und Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden mit ddH₂O, welches aus demineralisiertem Wasser mittels einer Filteranlage der Firma Millipore GmbH, Schwalbach/Ts. gewonnen wurde, hergestellt.

Lösung/Puffer	Firma
Page Blue Protein Staining Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
SyproRuby	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% Triton X-100 0,5% Na-Deoxycholat 0,1% SDS 10 mM N-Ethylmaleimid 1 Tablette Roche mini complete Protease Inhibitor auf 50 mL
Transferpuffer für Tank-Blotting	50 mL NuPAGE Transfer Buffer (20x) 1 mL NuPAGE Antioxidant Methanol; ein Gel: 100 mL, zwei Gele: 200 mL Ad 1000 mL ddH ₂ O
PBS (10x)	160 g NaCl 4 g KCl 28,8 g Na ₂ HPO ₄ -2 H ₂ O 4 g KH ₂ PO ₄ Ad 2000 mL ddH ₂ O pH 7,2 bis 7,4 stellt sich automatisch ein

2.1.5.1 Lösungen für 2D DIGE

Gellösung für 14 Gele
(12% mit der Dicke von 1,0 mm)

320 mL Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)

200 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

8 mL 10% SDS

8 mL 10% APS

124 μ L TEMED

Ad 800 mL ddH₂O

Verdrängungslösung

25 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

50 mL Glycerin 87%

Kleine Spatelspitze Bromphenolblau
(zum Anfärben der Lösung)

Ad 100 mL ddH₂O

Lysispuffer

7 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

30 mM Tris

4% (w/v) Chaps

pH mit HCl auf 8,5 einstellen

2x Probenpuffer

7 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

2% (w/v) Chaps

2% (v/v) IPG-Puffer (entsprechend des pH-
Bereichs des IPGstrips)

130 mM DTT

Rehydrierungslösung	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 2% (w/v) Chaps 2% (v/v) IPG-Puffer (entsprechend des pH-Bereichs des IPGstrips) 18,2 mM DTT
Äquilibrierungslösung	2% (w/v) SDS 75 mM Tris-HCl pH 8,8 6 M Harnstoff 30% (v/v) Glycerin (87%) 0,002% (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer (1x)	2,5 mM Tris-HCl, pH 8,3 19,2 mM Glycin 0,01% SDS
Laufpuffer (3x)	7,5 mM Tris-HCl, pH 8,3 57,6 mM Glycin 0,03% SDS

2.1.6 Antikörper

Antigen (HGNC Symbol)	Artikel- Bezeichnung	Eingesetzte Konzentration	Firma
KIF11	A301-075A	1:2000	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
UBE2C	ab12290	1:500	Abcam plc, Cambridge, UK
RANGAP1	11102-1-AP	1:500	Proteintech Group Inc., Chicago, USA
KPNA2	ab54489	1:1000	Abcam plc, Cambridge, UK
CKAP5	PA3-16835	1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GAPDH	CB1001	1:10000	EMD Chemicals Inc., Gibbstown, USA
TUBA/TUBB	2148	1:500	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
ANXA5	AP0013PU-N	1:1000	Acris Antibodies GmbH, Herford
MATR3	A300-591A	1:1000	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
PDCD6IP	MCA2493	1:1000	Morphosys AbD GmbH, Düsseldorf

2.1.7 Zellkultur

2.1.7.1 Medien und Zusätze

Substanz	Firma
DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FBS (<i>fetal bovine serum</i>)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
SILAC-DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Dialysiertes FBS (<i>fetal bovine serum</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
¹² C ₆ -L-Arginin	Invitrogen, Karlsruhe
¹² C ₆ -L-Lysin	Invitrogen, Karlsruhe
¹³ C ₆ -L-Arginin	Invitrogen, Karlsruhe
¹³ C ₆ -L-Lysin	Invitrogen, Karlsruhe
L-Prolin	Promega Corporation, Madison, USA
TransIT	Mirus Bio LLC, Madison, USA

2.1.7.2 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Nummer	Firma
293T	Mensch, embryonale Niere	ACC635	DSMZ, Braunschweig
Granta-519	Mensch, B-Zell Lymphom	ACC342	DSMZ, Braunschweig

2.1.8 Sonstiges

Substanz/Material	Firma
Benzonase	Merck Biosciences, Darmstadt
HCCA (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
MTP AnchorChip 800/384	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Peptide calibration standard II (PCS2)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
PicoTip Emitter Silica Tip	New Objective Inc., Woburn, USA
Protease Inhibitor Tabletten Mini Complete (EDTA frei)	Roche Deutschland, Mannheim
ReproSil-Pur C ₁₈ -AQ, 3 μ m, 150mm x 75 μ m	Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen
Trapping Guard Reprosil-Pur C18-AQ, 5 μ m, 10 x 0,3 mm	Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen
Trypsin (Sequencing Grade Modified)	Promega, Madison, USA

2.1.9 Sequenzen

miRNA	Sequenz (5'-3' Orientierung)
hsa-miR-15a MIMAT0000068	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG
hsa-miR-15a* MIMAT0004488	CAGGCCAUAUUGUGCUGCCUCA
hsa-miR-16-1 MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
hsa-miR-16-1* MIMAT0004489	CCAGUAUUAACUGUGCUGCUGA
hsa-miR-155 MIMAT0000646	UUAUUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
hsa-miR-155* MIMAT0004658	CUCCUACAUAUAGCAUUAACA

2.2 Methoden

Falls die Temperatur nicht anders angegeben ist, wurden alle Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1 Zellkultur

Die Zellkultur wurde von der Gruppe Dr. Armin Pscherer innerhalb der Abteilung Molekulare Genetik von Prof. Dr. Peter Lichter durchgeführt.

Die 293T Zelllinie (ACC635) stammt von Zellen der menschlichen embryonalen Niere ab. Sie ist ein Derivat der 293 Zelllinie (ACC305), trägt ein Plasmid mit der temperatursensitiven Mutante des SV-40 *large T-antigen* (TSA1609) und zeichnet sich durch eine hohe Transfektionskompetenz aus.

Granta-519 (ACC342) wurde 1991 aus peripherem Blut einer 58 Jahre alten kaukasischen Frau mit leukämischer Transformation des Mantelzellymphoms gewonnen.

Die 293T und Granta-519 Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) mit 10% FBS (*fetal bovine serum*) und 100 mg/mL Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die SILAC-Analysen wurde dialysiertes FBS verwendet und entweder je 100 mg/L ¹²C₆- oder ¹³C₆-L-Arginin und ¹²C₆- oder ¹³C₆-L-Lysin zusammen mit 200 mg/L L-Prolin zugesetzt. Bei Verwendung des SILAC-Mediums wurden die Zellen für mindestens fünf Zellteilungen wachsen gelassen und anschließend gegebenenfalls transfiziert. Die 293T Zellen wurden entweder mit pCMX Leervektor oder pCMX Vektor mit integrierter pre-miR-155, pre-miR-15a oder pre-miR-16-1 mittels dem Transfektionsreagenz TransIT transfiziert und für weitere zwei Zellteilungen und damit 48 Stunden kultiviert. Die geernteten Zellen wurden durch einen automatischen Zellzähler nach der Trypan-Blau Lebendfärbemethode bestimmt, im 1:1 Verhältnis vereinigt und zweimal mit eiskaltem PBS Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.1 Überprüfung der miRNA-Expression mittels qRT-PCR

Die Kontrolle der Überexpression der entsprechenden miRNAs wurde ebenfalls durch die Gruppe von Dr. Armin Pscherer durchgeführt. Die mikroRNAs wurden durch den miReasy Kit extrahiert und die Expression mittels Primer des TaqMan microRNA Assay Kit durch qRT-PCR bestimmt.

2.2.2 Zellyse

Die Lyse der Zellen zur Gewinnung der Proteine wurde nach einem RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay*) Protokoll durchgeführt. Dazu wurde der RIPA Puffer auf 1% (65 mM) DTT eingestellt. Die weiteren Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem entsprechenden Volumen RIPA-Puffer versetzt, damit eine Konzentration von etwa 5 µg/µL erhalten wird. Die Zellen wurden homogenisiert und anschließend mit 25 Einheiten Benzonase pro 100 µl RIPA-Puffer gemischt. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurden die unlöslichen Bestandteile bei durchschnittlichen 112000 G für 30 Minuten bei 4°C durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert und für die weiteren Experimente verwendet.

2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.2.3.1 2-D Quant

Beim 2-D Quant Kit werden die Proteine präzipitiert, um störende Substanzen wie z.B. Detergenzien oder Reduktionsmittel (siehe 2.2.2 und 2.1.5) zu entfernen. Die Proteinkonzentration kann dann durch die kolorimetrische Bestimmung des ungebundenen Kupfers in Lösung bestimmt werden, da Kupferionen spezifisch an Proteine binden. Dazu wurde eine Kalibrierkurve mit 0 bis 50 µg BSA erstellt, die analog zu den quantitativ zu bestimmenden Proben mitgeführt wurde. 500 µL *Precipitant* wurden vorgelegt und die Proben bzw. Standards hinzugefügt. Danach wurden zusätzlich 500 µL *Co-Precipitant* hinzugegeben und 5 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 16000 G zentrifugiert, um die Proteine zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteine in 100 µL *Copper Solution* aufgenommen. Nach Zugabe von 400 µL ddH₂O wurden die Proben erneut für 5 Minuten gemischt. Danach wurde insgesamt 1 mL einer Mischung aus 100 Teilen *Color Reagent A* mit einem Teil *Color Reagent B* hinzugefügt und erneut kurz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden die Proben bei 480 nm im Photometer bei Verwendung von ddH₂O als Referenz gemessen. Die Mittelwerte der Triplikate wurden berechnet und anhand der Eichgerade wurde die Konzentration der Proben bestimmt.

2.2.3.2 Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible

Der Assay basiert auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteine im alkalischen Milieu und detektiert kolorimetrisch die Kupferkationen (Cu⁺) durch Bicinchoninsäure (BCA:

bicinchoninic acid). Der Standard BCA Assay ist kompatibel mit den meisten ionischen und nicht-ionischen Detergenzien. Allerdings können Disulfid-reduzierende Agenzien wie z.B. DTT ebenfalls Kupfer reduzieren (siehe 2.2.2). Dies wird beim *Reducing Agent Compatible* BCA Assay vermieden, indem ein Kompatibilitätsreagenz hinzugefügt wird, welches die Disulfid-reduzierenden Agenzien modifiziert. Durch die Reduzierung der Volumina und der Verwendung des 96-well Formats wird weniger Probe benötigt und der Durchsatz erhöht.

Es wurden je 9 µl der BSA-Standards (0 bis 2000 µg BSA pro µL RIPA-Puffer „ohne DTT“), Proben-Kontrolle (RIPA-Puffer „mit DTT“ 1:15 verdünnt mit RIPA-Puffer „ohne DTT“) und Probe (1:15 mit RIPA-Puffer „ohne DTT“ verdünnt) in die 96-well Platte vorgelegt. Danach wurden je 4 µL *Compatibility Reagent Solution* (9,3 mg in 100 µL *Working Reconstitution Buffer* bestehend aus einer 1:1 Mischung von *Reconstitution Buffer* und ddH₂O) hinzugefügt, gemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden je 250 µL *Working Color Reagent* bestehend aus 50 Teilen *BCA Reagent A* und einem Teil *BCA Reagent B* hinzugegeben und nach erneutem Mischen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 570 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand von Triplikaten nach Abzug der Absorption der Proben-Kontrolle anhand der BSA-Kalibrierkurve bestimmt.

2.2.4 Proteinfällung und Konzentrierung

Die Fällung der Proteine einhergehend mit einer eventuellen Konzentrierung wurde mittels Chloroform/Methanol Fällung nach Wessels und Flügge (Wessel & Flugge, 1984) durchgeführt.

Zu 100 µL Probe, ggf. mit ddH₂O aufgefüllt, wurden 400 µL Methanol, 100 µL Chloroform und 300 µL ddH₂O hinzugefügt, gemischt und 1 Minute bei 9000 G zentrifugiert. Dadurch bilden sich drei Phasen: die untere Chloroformphase, die mittlere Interphase, in der das Protein präzipitiert ist, und die obere ddH₂O/Methanol-Phase, die verworfen wurde. Danach wurden 300 µL Methanol hinzugefügt, gemischt und für 2 Minuten bei 9000 G zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5 SDS-PAGE

Nach der Fällung (siehe 2.2.4) wurden die Proben für die SDS-PAGE in 5 µL NuPAGE LDS *Sample Buffer* (4x), 2 µL NuPAGE *Reducing Agent* (10x) und 13 µL ddH₂O aufgenommen und für 10 Minuten bei 70°C unter Schütteln gelöst. Die Proben wurden auf NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele (1,0 mm, 10 well) aufgetragen. In die obere Kammer der XCell *SureLock*

Mini-Cell wurde 200 mL NuPAGE MES Laufpuffer (1:20 20x NuPAGE MES *Buffer* mit ddH₂O) mit 500 µL NuPAGE *Antioxidant* gegeben und in die untere Kammer 600 mL NuPAGE MES Laufpuffer. Die Auftrennung erfolgte für 35 Minuten bei konstanten 200 Volt.

2.2.5.1 Präparative Gele für SILAC-Analysen

Für die präparativen Gele der SILAC-Analysen (siehe 2.2.8) wurden 100 oder 300 µg Proteinlysate eingesetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass zwischen jeder Spur mit Probe eine Spur freigelassen wird, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Zur Kontrolle und Überprüfung des Molekulargewichts wurden 5 µL des SeeBluePlus2 Markers eingesetzt. Anschließend wurden die Gele mit der *Page Blue Protein Staining Solution* (Coomassie-Färbung) angefärbt. Dazu wurde dreimal 10 Minuten mit ddH₂O gewaschen, einmal 10 Minuten mit der Färbelösung gefärbt und abschließend 5 Minuten mit ddH₂O entfärbt.

2.2.5.2 Analytische Gele für Western-Blots

Für die analytischen Gele der Western-Blots wurden 10 oder 20 µg Proteinlysate und 1 µL ECLplex *Rainbow* Marker verwendet. Der ECLplex *Rainbow* Marker zeigt sowohl optisch sichtbare Banden als auch Banden in den beiden Fluoreszenzwellenlängenbereichen für Cy3 und Cy5.

2.2.6 Western-Blot

Für das Western-Blotting wurden die unter 2.2.5 und 2.2.5.2 beschriebenen Gele verwendet und die Proteine zuerst auf PVDF Membran mittels Tank-Blotting transferiert. Danach erfolgte die Detektion durch den Erstantikörper gegen das gewünschte Zielprotein und danach die Amplifikation und Visualisierung des Signals durch den mit Cy3 oder Cy5 fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Zweitantikörper.

2.2.6.1 Tank-Blotting

Die Hybond LFP Membran wurde zuerst kurz in Methanol abgespült, mehrmals mit ddH₂O gewaschen und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Ebenfalls in Transferpuffer wurden die Filterpapiere (zwei pro Gel) und die Reservoir-Schwämme inkubiert. Die Apparatur

wurde wie in Abbildung 2-1 gezeigt aufgebaut und mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer fand bei konstanten 30 V über 1 ½ Stunden statt.

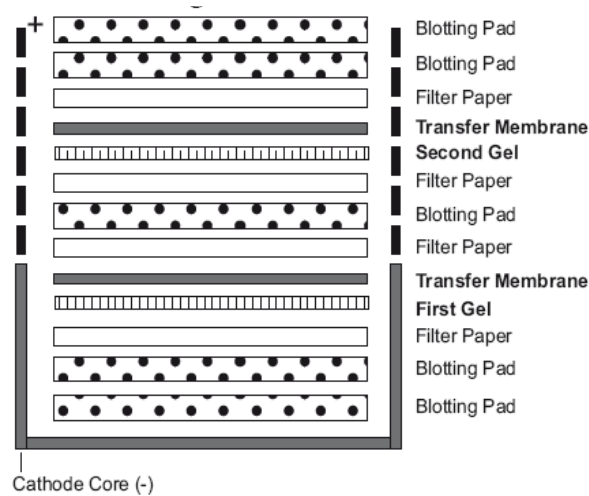


Abbildung 2-1: Tank-Blotting Aufbau. nach NuPAGE Technical Guide Version E (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

2.2.6.2 Immundetektion mittels ECLplex

Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde in 2% ECL *Advanced Blocking Reagent* in PBS-T (1x PBS Puffer mit 0,1% Tween-40) inkubiert. Danach wurde zweimal kurz und zweimal 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation erfolgte bei allen Erstantikörpern für eine Stunde mit der entsprechenden Konzentration in 2% ECL *Advanced Blocking Reagent* in PBS-T. Darauf wurde wiederum zweimal kurz und zweimal 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den Zweitantikörpern im Verhältnis 1:2500 in 2% ECL *Advanced Blocking Reagent* in PBS-T erfolgte für eine Stunde. Danach wurde die Membran dreimal kurz und viermal 5 Minuten mit PBS-T und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Membran wurde dann für eine Stunde im 37°C-Schrank getrocknet und danach am Typhoon Scanner eingescannt. Für Cy3 wurde der grüne Laser (532 nm) mit dem entsprechenden Filter (580 BP30) und für Cy5 der rote Laser (633 nm) mit dem entsprechenden Filter (670 BP30) verwendet und die Membran mit 100 µm Auflösung (Pixelgröße) eingescannt.

2.2.6.3 Auswertung der Western-Blots

Die gescannten Blots wurden als TIFF-Dateien (*tag image file format*) im Graustufenformat mittels ImageJ 1.42 ausgewertet. Dazu wurden die entsprechenden Banden ausgewählt und deren Intensitäten berechnet. Für jede Spur wurden die Werte der Zielproteine anhand der

housekeeping Proteine GAPDH oder TUBA/TUBB (Tubulin) normalisiert. Der Median und die Standardabweichung zwischen den Replikaten wurde berechnet und die Regulation zwischen den verschiedenen Zuständen sowie die statistische Signifikanz mittels Students t-Test ermittelt.

2.2.7 2D DIGE

Die 2D DIGE-Analyse unterteilt sich in die eigentliche 2D DIGE-Analyse bestehend aus der Markierung der Proteine, isoelektrischen Fokussierung, Äquilibrierung, SDS-PAGE, Scannen und der Auswertung sowie der Identifizierung der Proteine mittels eines präparativen Gels durch MALDI- oder ESI-Massenspektrometrie.

2.2.7.1 Markierung der Proteine

Die nach der Chloroform-Methanol-Fällung erhaltenen Präzipitate (siehe 2.2.4) wurden anhand der durch 2D-Quant Bestimmung (siehe 2.2.3.1) gewonnenen Konzentrationen auf 5 µg/µL mit Lysis-Puffer eingestellt und für 30 Minuten gelöst. Danach wurden zu 50 µg der Probe bzw. des internen Standards 400 pmol Cy2, Cy3 oder Cy5 in DMF gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde jeweils 1 µL 10 mM Lysin zum Abstoppen der Reaktion hinzugegeben und erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die entsprechenden Proben wurden danach vereinigt (siehe Tabelle 2-1), mit jeweils 30 µL 2x *Sample Buffer* für 15 Minuten auf Eis inkubiert und mit 390 µL *Rehydration Solution* versetzt.

	Cy2	Cy3	Cy5
1. Gel	Interner Standard	Probe A Replikat 1	Probe B Replikat 6
2. Gel	Interner Standard	Probe B Replikat 5	Probe A Replikat 2
3. Gel	Interner Standard	Probe A Replikat 3	Probe B Replikat 4
4. Gel	Interner Standard	Probe B Replikat 3	Probe A Replikat 4
5. Gel	Interner Standard	Probe A Replikat 5	Probe B Replikat 2
6. Gel	Interner Standard	Probe B Replikat 1	Probe A Replikat 6

Tabelle 2-1: Schema der Probenzusammenstellung für die 2D DIGE Gele

2.2.7.2 Isoelektrische Fokussierung

Die IPGstrips der Länge von 24 cm für die pH-Bereiche 4 bis 7 und 6 bis 9 wurden mit den Proben über Nacht passiv beladen. Die IPGstrips wurden danach mit ddH₂O abgespült und die Proteine in der IPGphor nach folgendem Protokoll (siehe Tabelle 2-2) aufgetrennt.

Konstant	200 V	1 Stunde
Konstant	500 V	1 Stunde
Gradient	1000 V	10 bis 20 Stunden (zur Anpassung für Übernachtslauf)
Konstant	1000 V	1 Stunde
Gradient	8000 V	3 Stunden
Konstant	8000 V	5 Stunden
Insgesamt Voltstunden	ca. 40000	

Tabelle 2-2: IPGphor Protokoll für die isoelektrische Fokussierung. Bei „Gradient“ ist jeweils die Endspannung angegeben

2.2.7.3 Äquilibrierung

Vor der zweiten Dimension wurden die IPGstrips zuerst 15 Minuten in 100 mg DTT/10 mL Äquilibrierungspuffer und danach 15 Minuten in 250 mg Jodacetamid/10 mL Äquilibrierungspuffer zur Reduzierung und Alkylierung inkubiert.

2.2.7.4 SDS-PAGE

Die 2D Gele in den Dimensionen 25x25 cm wurden selbst hergestellt. Dazu wurden bis zu 14 Gele in einer Kammer gleichzeitig gegossen. Die Gellösung wurde von unten in die Gelkassetten eingefüllt und durch die Verdrängungslösung komplett in die Kassetten verdrängt, so dass ca. 1 cm unterhalb der Oberkante die Gelgrenze war. Die Gele wurden mit 0,1% SDS-Lösung besprüht, um eine ebene Front zu erhalten. Die Gele polymerisierten über Nacht bei Raumtemperatur aus und wurden danach bei 4°C im Laufpuffer für höchstens drei Tage gelagert.

Die IPGstrips wurden mit 0,5% Agaroselösung auf den SDS-Polyacrylamidgelen fixiert. In der unteren Kammer befand sich 1facher und in der oberen Kammer 3facher Laufpuffer. Die Proteine wurden bei 1 Watt pro Gel bei 25°C solange aufgetrennt, bis die Bromphenolblaulauffront das Gel verlassen hatte.

2.2.7.5 Scannen

Die Gele wurden mittels des Typhoon 9410 Scanners mit den Einstellungen in Tabelle 2-3 bei 100 µm Auflösung (Pixelgröße) eingescannt.

Farbstoff	Laser	Filter
Cy2	Blau (488 nm)	520 nm BP 40
Cy3	Grün (532 nm)	580 nm BP 30
Cy5	Rot (633 nm)	670 nm BP 30

Tabelle 2-3: Einstellungen für das Scannen von 2D DIGE Gelen am Typhoon-Scanner

Dabei sollten sich die intensivsten Spots nicht in der Sättigung befinden und der Unterschied zwischen den Farbstoffen bzw. Gelen sollte nicht zu groß sein. Die Gelbilder wurden für die Auswertung im .gel Format gespeichert.

2.2.7.6 Auswertung mittels DeCyder 2D 6.5

Das Programm DeCyder 2D 6.5 ist in die beiden Prozesse DIA (*differential in gel analysis*) und BVA (*biological variance analysis*) unterteilt. Nachdem die Gele im .gel Format in das Programm geladen worden waren, wurden mit DIA die zu analysierenden Bereiche ausgewählt und die Spots aller drei Farbstoffe innerhalb eines Gels detektiert. Dabei wurden die Einstellungen aus Tabelle 2-4 verwendet.

Einstellung	Wert
<i>Detect Spots</i>	max. 5000
<i>Slope</i>	< 0,75
<i>Area</i>	> 300
<i>Peak height</i>	> 350 und < 65000
<i>Volume</i>	> 100000

Tabelle 2-4: Einstellungen DIA Spotdetektion

Bei der BVA Auswertung wurden die Gelbilder den verschiedenen Gruppen (interner Standard, Probe A und Probe B) zugeordnet und das *Matching* zwischen den verschiedenen Gelen durchgeführt. Anschließend wurden die Regulationen und der Students t-Test berechnet. Diejenigen Proteinspots wurden manuell inspiziert, die einen t-Test von unter 0,05 aufwiesen und in mindestens ¼ der Gelbilder detektiert wurden. Nach der manuellen

Inspektion auf korrekte Kodetektion und Ausschluss von Artefakten wurden die entsprechenden Spots zur anschließenden Identifizierung ausgewählt.

2.2.7.7 Proteinspot-Identifizierung

Um die Proteinspots zu identifizieren, wurden präparative Gele verwendet. Diese enthalten eine größere Menge an Protein, um die Identifizierung zu ermöglichen. Die bei der Auswertung ausgewählten Proteinspots (siehe 2.2.7.6) wurden nach dem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie identifiziert.

2.2.7.7.1 *Präparatives Gel*

Die präparativen Gele wurden analog zu den analytischen Gelen angefertigt und die erste und zweite Dimension parallel dazu durchgeführt (siehe 2.2.7.2 und 2.2.7.4). Der Unterschied bestand darin, dass die Gele 500 µg Protein aus einem Pool aller Proben (interner Standard) enthielten und davon 50 µg mittels Cy2 markiert wurden. Nach der zweiten Dimension wurde das präparative Gel analog zu den analytischen Gelen gescannt, wobei nur der Cy2-Farbstoff berücksichtigt wurde.

2.2.7.7.2 *SyproRuby-Färbung*

Nach dem Scannen des Cy2-Farbstoffes wurden die präparative Gele zweimal 30 Minuten mit 50% Methanol/7% Essigsäure fixiert. Anschließend wurden die Gele über Nacht mit SyproRuby gefärbt und danach 30 Minuten mit 10% Methanol/7% Essigsäure sowie zweimal 5 Minuten mit ddH₂O gewaschen. Die Gele wurden mit dem Typhoon-Scanner mit dem grünen Laser (532 nm) und dem entsprechenden Filter (610 BP30) bei 100 µm Auflösung ausgelesen.

2.2.7.7.3 *Spot-Picking*

Die zu identifizierenden Spots wurden anhand des Cy2-Farbstoffes zwischen den analytischen Gelen und dem präparativen Gel kodetektiert und auf einem UV-Tisch mittels eines Spot-Pickers ausgestanzt.

2.2.7.7.4 Tryptischer Verdau

Die Inkubation fand auf einem Thermomixer bei 600 rpm statt. Das Protokoll ist in Tabelle 2-5 gezeigt.

Waschen (einmal)	100 µL HPLC-H ₂ O
Inkubation (5 Minuten)	100 µL 40 mM Ammoniumbicarbonat/Acetonitril 1:1
Reduzierung (1 Stunde bei 56°C inkubieren)	50 µL 10 mM DTT
Waschen (einmal)	100 µL 40 mM Ammoniumbicarbonat
Alkylierung (30 Minuten bei 25°C inkubieren)	50 µL 55 mM Jodacetamid
Waschen (fünf Minuten inkubieren)	100 µL HPLC-H ₂ O
Waschen (fünf Minuten inkubieren)	100 µL HPLC-H ₂ O/Acetonitril 1:1
Waschen (einmal)	100 µL 100% Acetonitril
Trocknen (15 Minuten)	
Trypsinzugabe (10 Minuten, 4°C)	10 µL Trypsin-Lösung (10 ng/µL in 40 mM Ammoniumbicarbonat)
Pufferzugabe	10 µL 40 mM Ammoniumbicarbonat
Verdau (über Nacht bei 37°C)	
Extraktion (30 Minuten inkubieren)	10 µL 30% Acetonitril/1% TFA

Tabelle 2-5: Tryptischer Verdau für MALDI- und ESI-MS/MS (QTOF) Identifizierung

2.2.7.7.5 MALDI-MS

Nach dem Verdau wurden die Peptidgemische mit Matrix auf einem Probenräger für die Messung kokristallisiert und im MALDI-Massenspektrometer analysiert. Anschließend erfolgte die Auswertung durch bioinformatische Sequenzdatenbanksuche.

2.2.7.7.5.1 Target-Präparation

Als Probenräger wurde ein MTP *AnchorChip* 800/384 und als Matrix HCCA (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure) verwendet. Für die Herstellung der Matrix-Lösung wurden 1 mg HCCA mit 1 mL Aceton gemischt, wovon 300 µL mit 700 µL Ethanol/Aceton 2:1 vereinigt wurden. Jeweils 1 µL von Probe und Matrixlösung wurden auf einen Probenräger-Spot gegeben und getrocknet. Danach wurde mit 10 µL 10 mM Ammoniumphosphat in 0,1% TFA gewaschen und trocken lassen. Zur Umkristallisation wurde je 1 µL Ethanol/Aceton/0,1% TFA (6:3:1) auf die Spots gegeben. Auf den entsprechenden Kalibrierungsspot wurden jeweils 0,5 µL

Standard (PCS2) und Matrixlösung gegeben. Nach der Präparation von bis zu 384 Proben konnten diese gemessen werden.

2.2.7.7.5.2 Messung

Die Messung inklusive Auswertung erfolgte für bis zu 384 Proben am Ultraflex I automatisch. Die Daten wurden im Positiv-Ionen-Reflektor-Modus bei einer Ionenbeschleunigungsspannung von 25 kV und eine Reflektorspannung von 26,3 kV aufgenommen. Dabei wurde jeweils als externe Kalibrierung ein Standard-Spot mittels FlexControl 2.4 gemessen und danach die vier um diesen Spot liegenden Proben. Das Abtastmuster für den Laser zur Generierung der MS-Spektren ist vorgegeben und es wurde nach optimierten Parametern die Laserintensität selbstständig angepasst. Bei nicht erfolgreicher Messung bzw. zur Validierung der Ergebnisse wurden zusätzlich MS/MS-Spektren im LIFT-Modus generiert. Dazu wurden nach der MS-Spektren Auswertung die in Frage kommenden Peptidionen unter Berücksichtigung der Intensität ausgewählt. Beim LIFT-Modus beträgt die Ionenbeschleunigungsspannung 8 kV, die LIFT-Spannung 19 kV und die Reflektorspannung 29 kV.

2.2.7.7.5.3 Auswertung

Die Spektren wurden mittels FlexAnalysis 2.4 prozessiert. Dabei wurden die Spektren intern anhand der Trypsin-Fragmente kalibriert und das monoisotopische Signal entsprechend den Einstellungen für den SNAP Algorithmus detektiert. Signale, die durch Kontaminationen hervorgerufen werden, wurden aus den Signallisten entfernt. Diese Signallisten dienen nachfolgend mittels BioTools 3.0 in Mascot 2.1 als Input für die Identifizierung durch PMF (*peptide mass fingerprint*). Dazu wurde die SwissProt-Datenbank für die Taxonomie *human* verwendet. Bei den Analysen zu miR-155 (siehe 3.1.1) handelte es sich um die Datenbankversion vom 19.1.08 mit 18887 Sequenzen und für miR-15a und miR-16-1 (siehe 3.1.2) um die Version vom 23.7.08 mit 20070 Sequenzen. Als Suchparameter wurde als Enzym Trypsin mit einer erlaubten verpassten Spaltstelle gewählt. Als fixierte Modifikationen wurde die Carbamidomethylierung von Cystein und als variable Modifikationen die Oxidation von Methionin gewählt. Als Fehlertoleranz in der Peptidmasse wurde 100 ppm für die miR-155 (siehe 3.1.1) Analyse und 50 ppm für die miR-15a und miR-16-1 Analysen (siehe 3.1.2) gewählt. Der Ladungszustand der Peptide wurde auf +1 festgesetzt und die monoisotopischen Massen wurden berücksichtigt. Der Signifikanz-Schwellenwert lag bei 56 unter Berücksichtigung von einem p-Wert von kleiner als 0,05. Für die MS/MS-Spektren wurde die MS/MS Ionensuche mittels Mascot 2.1 durchgeführt und die Werte wie bereits

oben beschrieben verwendet, wobei die Fragmentmassentoleranz auf unter 0,8 Da und als Instrumenttyp MALDI-TOF/TOF ausgewählt wurde.

2.2.7.8 nanoHPLC-ESI-MS/MS (QTOF)

Vor der eigentlichen Messung mittels ESI-Massenspektrometrie wurden die Peptide extrahiert. Danach wurden die Peptide mittels *reverse phase* nanoHPLC getrennt und anschließend mittels ESI-MS/MS (QTOF) analysiert.

2.2.7.8.1 Extraktion

Überstand aus 2.2.7.7.4 abnehmen	
Gelstück + 5 µL Acetonitril/0,1% TFA 1:1	5 Minuten Ultraschallbad
Überstand abnehmen und vereinigen	
+ 5 µL 100% Acetonitril	5 Minuten Ultraschallbad
Überstand abnehmen und vereinigen	
+ 5 µL 0,1% TFA	5 Minuten Ultraschallbad
Überstand abnehmen und vereinigen	
+ 5 µL 100% Acetonitril	5 Minuten Ultraschallbad
Überstand abnehmen und vereinigen	
Überstände trocknen	2 Stunden, 35°C in Speed-Vac
Peptide in 5 µL 0,1% TFA lösen	5 Minuten Ultraschallbad

Tabelle 2-6: Peptid-Extraktion für die nanoHPLC ESI-MS/MS (QTOF) Messung

Nach der Extraktion der Peptide (siehe Tabelle 2-6) konnte die Messung vorgenommen werden.

2.2.7.8.2 Messung

Die Messungen wurde durch Kerstin Kammerer der Gruppe Funktionelle Proteomanalyse durchgeführt. Die nanoHPLC wurde an der CapLC durchgeführt. Die Peptide wurden an einer Trapping Guard (10x0,3 mm) Säule mit Reprosil-Pur C18-AQ, 5µm und einer Flussrate von 300 µL/min konzentriert und entsalzt. Für die analytische *reverse phase* nanoHPLC wurde eine Reprosil-Pur C18-AQ, 3 µm (1500 x 0,075 mm) Säule und eine Flussrate von 200 nL/min verwendet. Der binäre Trennungsgradient wurde aus Lösung A (94,9% HPLC-H₂O, 5%

Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) und B (94,9% Acetonitril, 5% HPLC H₂O und 0,1% Ameisensäure) erzeugt und der zeitliche Verlauf ist in Tabelle 2-7 dargestellt.

Zeit (min)	Lösung A (%)	Lösung B (%)
0 bis 5	95	5
5 bis 10	85	15
10 bis 35	60	40
35 bis 50	40	60
50 bis 55	5	95

Tabelle 2-7: nanoHPLC Gradientenverlauf (QTOF)

Positiv geladene Peptidionen wurden durch *Electrospray* Ionisation bei 2,3 kV erzeugt. Die Datenaufnahme erfolgte im *Data-Dependent-Analysis* (DDA) Modus am QTOF Massenspektrometer. Hierbei wurde eine Sekunde lang ein MS-Spektrum über einen Bereich von 400 bis 1500 m/z durch MassLynx 4.2 aufgenommen. Von den drei abundantesten *Precursor*-Ionen wurden anschließend über 3 Sekunden hin MS/MS-Spektren generiert. Die Rohdaten wurden mittels Protein Lynx Global Server 2.2.5 durch den MaxEnt3 Algorithmus dekonvolviert.

2.2.7.8.3 Auswertung

Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch Datenbanksuche mittels Mascot 2.1. Die Einstellungen waren analog zu 2.2.7.7.5.3, wobei die SwissProt Datenbankversion vom 23.7.08 mit 20070 Sequenzen verwendet wurde. Desweiteren war die Peptidmassentoleranz bei 200 ppm, die Fragmentmassentoleranz bei 0,1 Da und der Instrumententyp ESI-QUAD-TOF. Als signifikant wurden diejenigen Proteine angesehen, die einen p-Wert von weniger als 0,05 hatten und mindestens ein *bold red* Peptid (Peptid mit der höchsten Wahrscheinlichkeit zu diesem Protein zu gehören) enthielten.

2.2.8 SILAC

Beim SILAC-Arbeitsablauf wurden die Proteine nach ihrer Lyse (siehe 2.2.2) sowie der Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.3.1 oder 2.2.3.2) durch ein 1D-SDS Gel aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung angefärbt (siehe 2.2.5 und 2.2.5.1). Die anschließenden Arbeitsschritte sind im Folgenden dargestellt.

2.2.8.1 Gel-Slicing

Die SDS-PAGE Gele wurden durch eine angefertigte Stanze in 51 ca. 1 mm hohe Gelstücke geteilt. Diese Gelstücke wurden weiter in ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert und in entsprechende Fraktionen (26 in 3.3.2 oder 24 in 3.4.2 und 3.4.3) unterteilt.

2.2.8.2 Tryptischer Verdau und Extraktion der Peptide

Die Inkubationsschritte fanden auf einem Thermomixer bei 600 rpm statt. Das Protokoll ist in Tabelle 2-8 gezeigt.

Waschen (10 Minuten inkubieren)	200 µL HPLC-H ₂ O
Dehydrierung (10 Minuten inkubieren)	200 µL 100% Acetonitril
Reduzierung (30 Minuten bei 56°C inkubieren)	50 µL 10 mM DTT
Dehydrierung (10 Minuten inkubieren)	200 µL 100% Acetonitril
Alkylierung (20 Minuten bei 25°C inkubieren)	50 µL 55 mM Jodacetamid
Dehydrierung (10 Minuten inkubieren)	200 µL 100% Acetonitril
Waschen (30 Minuten bei 37°C inkubieren)	100 µL 100 mM Ammoniumbicarbonat/Acetonitril 1:1
Trypsinzugabe (30 Minuten, 4°C)	20 µL Trypsin-Lösung (13 ng/µL in 10 mM Ammoniumbicarbonat und 10% Acetonitril)
Pufferzugabe	10 bis 20 µL 100 mM Ammoniumbicarbonat
Verdau (über Nacht bei 37°C)	
Extraktion (15 Minuten bei 37°C inkubieren)	50 bis 75 µL 5% Ameisensäure/Acetonitril 1:2
SpeedVac Konzentrierung bei 35°C für 1 ½ Stunden	

Tabelle 2-8: Tryptischer Verdau und Extraktion für die SILAC-Analyse

2.2.8.3 nanoHPLC ESI-MS/MS (LTQ Orbitrap)

Die Proben wurden in 11 µL 0,1% TFA während 10 Minuten im Ultraschallbad gelöst und 5 µL davon wurden zur Analyse verwendet. Konzentrierung, Entsalzung und *reverse phase*

nanoHPLC wurden an der LC Packings Ultimate durchgeführt. Das Konzentrieren und Entsalzen wurde bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ an einer Trapping Guard (10 x 0,3 mm) Säule mit Reprosil-Pur C18-AQ, 5 μm durchgeführt. Für die analytische *reverse phase* nanoHPLC wurde eine Reprosil-Pur C18-AQ, 3 μm (1500 x 0,075 mm) Säule und eine Flussrate von 400 nL/min verwendet. Der lineare Stufengradient wurde aus Lösung A (94,9% HPLC-H₂O, 5% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) und B (94,9% Acetonitril, 5% HPLC H₂O und 0,1% Ameisensäure) erzeugt und der zeitliche Verlauf ist in Tabelle 2-9 dargestellt.

Zeit (min)	Lösung A (%)	Lösung B (%)
0 bis 10	93	7
10 bis 80	70	30
80 bis 90	55	45
90 bis 100	10	90

Tabelle 2-9: nanoHPLC Gradientenverlauf (LTQ Orbitrap)

Die nanoHPLC war direkt an die ESI-MS/MS Analyse gekoppelt. Der *Electrospray* wurde durch eine PicoTip Emitter Silica Tip bei einer Spannung von 1,7 kV erzeugt. Die LTQ Orbitrap XL wurde durch Xcalibur 2.0.6 gesteuert. Bei der Datenaufnahme wurde eine TOP6 Methode angewendet. Dabei dauert ein Scanzzyklus ca. 2 ms. Innerhalb dieser Zeit wird ein FTMS Scan mit einer Auflösung von 60000 in einem Bereich von 370 bis 2000 m/z durchgeführt. Nach einem kurzen (ca. 0,2 ms) FTMS *prescan* durch den die sechs intensivsten *Precursor*-Ionen bestimmt wurden, erfolgte die MS/MS Datengenerierung dieser sechs Ionen parallel in der LTQ. Dabei wurden Ionen mit annotierten Ladungen von eins oder nicht annotierter Ladung ausgeschlossen. Um repetitive MS/MS Datengenerierung der *Precursor*-Ionen auszuschließen, wurde eine dynamische *Exclusion*-Liste verwendet. In dieser Liste wurden bis zu 500 Einträge mit einer Dauer von 30 Sekunden gespeichert und eine Massenabweichung von unter 10 ppm berücksichtigt.

2.2.8.4 Auswertung

Die durch die LTQ Orbitrap XL generierten Daten wurden mittels MSQuant (Andersen et al, 2003; Schulze & Mann, 2004) oder MaxQuant (Cox & Mann, 2008; Cox et al, 2009) quantifiziert.

2.2.8.4.1 MSQuant

Für die Quantifizierung mittels MSQuant wurden die Daten zuerst mit DTASuperCharge 1.29 prozessiert (Zuordnung der Ladungszustände und der monoisotopischen Massen). Danach wurden die Daten mittels Mascot 2.1 in der MSIPi Datenbank, Version 3.43, gesucht. Dabei wurde als Enzym Trypsin verwendet, dass zur MSIPi Datenbank kompatibel ist. Es wurde höchstens eine verpasste Spaltstelle berücksichtigt. Als fixierte Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cystein gewählt. Die variablen Modifikationen enthielten die Markierungen durch $^{13}\text{C}_6$ von Arginin und Lysin, die N-terminale Acetylierung, Deamidierung von Asparagin- und Glutaminsäureresten sowie die Oxidation von Methionin. Die Peptidmassentoleranz betrug 10 ppm, die Fragmentionentoleranz 0,8 Da und die Signale waren monoisotopisch und zwei- oder dreifach geladen. Der Instrumententyp war als ESI-TRAP festgesetzt. Die eigentliche Quantifizierung erfolgte mit MSQuant Version 1.5. Dabei wurden Peptide mit einem minimalen Mascot-Score von 20 und Proteine mit mindestens zwei Peptiden und einem Score von insgesamt 60 berücksichtigt.

2.2.8.4.2 MaxQuant

Es wurden die MaxQuant Versionen 1.0.12.22 bei 3.3.2 und 1.0.12.31 bei 3.4.2 und 3.4.3 verwendet. Bei der Prozessierung der Daten durch quant.exe wurde als Instrumententyp Orbitrap/FT Ultra ausgewählt. Die SILAC Bedingungen waren *doublets* mit den schweren Markierungen $^{13}\text{C}_6$ für Lysin und Arginin, sowie maximal drei markierte Aminosäuren in einem Peptid. Als Datenbank wurde jeweils die humane IPI Version 3.52 verwendet, die als *Decoy* Datenbank (siehe unten) vorlag. Die variablen Modifikationen waren die Methionin Oxidation und die Acetylierung des Protein N-Terminus, als fixierte Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cystein eingegeben. Als Enzym wurde Trypsin, das auch nach Prolin schneidet, mit maximal zwei verpassten Spaltstellen gewählt. Die Fragmentionentoleranz betrug 0,5 Da und die intensivsten 6 MS/MS Signale pro 100 Da wurden berücksichtigt. Die durch quant.exe generierten .msm Dateien für die leicht markierten Peptide, schwer markierten Peptide sowie die Peptide, deren Markierung nicht bestimmt werden konnte, wurden einzeln in Mascot 2.2 gesucht. Die resultierenden .dat Dateien wurden in Kombination mit den Rohdaten durch identify.exe weiter prozessiert. Dabei wurde eine Peptid- und Protein-Falschpositivrate von weniger als 0,01, eine maximale Peptid-PEP (*posterior error probability*) von 1, eine minimale Peptidlänge von 6 und mindestens ein *unique* (einmaliges) Peptid pro Proteingruppe festgesetzt. Dazu wurden für die Proteinquantifizierung *razor* (nach dem Occam's razor Prinzip am wahrscheinlichsten zum Protein gehörig) und *unique* Peptide herangezogen. Die minimalen Quantifizierungsereignisse wurden auf 1 festgesetzt und die Requantifizierung der Peptide wurde erlaubt. Die durch identify.exe generierte Datei proteinGroups.xls wurde für die

weitere Auswertung herangezogen. In dieser Datei werden Gruppen mit mehreren Proteinen erstellt, falls durch die massenspektrometrische Analyse die Proteine nicht eindeutig unterscheidbar sind. Pro Gruppe wurde jeweils das erste und damit wahrscheinlichste Protein berücksichtigt bzw. die Gruppe danach benannt. Dabei galten alle Proteine als identifiziert, die nach einer *target decoy* Datenbank Suchstrategie (Elias & Gygi, 2007) bestimmten Falschpositivrate von unter 1% hatten. Zudem wurden Kontaminationen basierend auf einer Liste von bekannten Verunreinigungen ausgeschlossen. Als quantifiziert galten diejenigen Proteine, die mindestens anhand von drei Messpunkten quantifiziert werden konnten. Messpunkte können verschiedene Peptide, Modifikationen, Ladungen oder repetitive Messungen sein.

2.2.9 qRT-PCR und mRNA Microarray

Die mRNA Expressions-Niveaus wurden durch die Gruppe von Dr. Armin Pscherer ermittelt. Anhand adäquater Primer wurden die Expressionen mittels qRT-PCR bestimmt. Die Microarray-Analyse wurde mittels der Illumina *Bead Chip* Technologie durch die Expression Profiling Gruppe der Genomics&Proteomics Core Facility am DKFZ durchgeführt und die Auswertung erfolgte durch die Gruppe von Dr. Armin Pscherer.

2.2.10 Bioinformatische Auswertungen

2.2.10.1 Vergleich von Proteomik- mit Transkriptomik-Daten

Um die Proteomik-Daten mit den Transkriptomik-Daten vergleichen zu können, wurden die HGNC *gene symbol* Annotationen (Eyre et al, 2006) verwendet. Eine Liste aller 19460 HGNC *gene symbol* Einträge wurde für den ENSEMBL 52 GENES (SANGER UK) *Homo sapiens genes* (NCBI36) Datensatz mittels BioMart (Durinck et al, 2005) heruntergeladen. Die ersten fünf Gennamen der SILAC-Analysen Annotationen wurden gegen diesen Datensatz mittels BRM (*bioinformatics resource manager*) (Shah et al, 2007) abgeglichen. Das gleiche geschah für die Gennamen der Illumina Microarray Daten (siehe 2.2.9). Danach konnten mittels BRM die entsprechenden Einträge aus beiden Datensätzen einander zugeordnet werden.

2.2.10.1.1 Erstellung der Heatmap und des hierarchischen Clusterings

Für die Erstellung der *Heatmap* und des hierarchischen Clusterings wurde MeV (*multi experiment viewer*) Version 4.4 des TM4 Software Packets (www.tm4.org/) verwendet. Die Daten aus 2.2.10.1 wurden dazu geladen und das hierarchische Clustering (HCL) wurde anhand der Expressionsdaten mit den Standard-Einstellungen durchgeführt.

2.2.10.2 Abgleich mit Zielgen Vorhersage-Algorithmen

Beim Abgleich mit den Daten aus den Vorhersage-Algorithmen wurden die jeweils aktuellen Datensätze von TargetScan (Grimson et al, 2007; Lewis et al, 2005), PicTar (Krek et al, 2005; Lall et al, 2006), miRanda (Enright et al, 2003), PITA TOP (Kertesz et al, 2007), RNA22 3'UTR, 5'UTR und CDS (Miranda et al, 2006) sowie DIANA-microT (Maragkakis et al, 2009) verwendet und anhand der HGNC *gene symbols* mit den SILAC-Analysen Daten mittels BRM verglichen.

2.2.10.3 Seed-Sequenz Analysen

Die *seed*-Sequenz Analysen wurden durch Dr. Agnes Hotz-Wagenblatt der Gruppe Funktionelle Proteomanalyse durchgeführt. Dabei wurde nach Übereinstimmungen der 8mer, 7mer-A1 und 7mer-m8 Sequenzen in den 5'UTR, CDS und 3'UTR Bereichen der durch SILAC-Analyse quantifizierten Proteinen gesucht. Die Sequenzen für die verschiedenen Bereiche wurden anhand der ENSG Identifikationsnummern der IPI Datenbank (www.ebi.ac.uk/IPI/) aus der Ensembl Datenbank (www.ensembl.org) generiert.

2.2.10.4 Sylamer-Auswertung

Die Sylamer-Analyse (van Dongen et al, 2008) dient zur Darstellung von angereicherten Sequenzmotiven innerhalb einer nach Regulationsstärke sortierten Liste. Dabei berechnet sich der Anreicherungsfaktor aufgrund der Ziel-Sequenzlänge und der zufälligen Wahrscheinlichkeit. Es wurden jeweils 6, 7 und 8mer Sequenzmotive berücksichtigt. Für die nach Regulationsstärke sortierten Listen wurde die ENSG Identifikationsnummer verwendet und den 5'UTR, CDS und 3'UTR Sequenzen, welche mittels BioMart aus der Ensembl Datenbank gewonnen wurden, zugeordnet.

2.2.10.5 Funktionelle Anreicherungen

2.2.10.5.1 *BRM*

Bei der Funktionellen Anreicherungsanalyse mittels BRM wurden die HGNC *gene symbol* Einträge verwendet, denen die *gene ontology* Annotationen der biologischen Prozesse zugeordnet wurden. Eine Anreicherung der regulierten Proteine gegenüber der Gesamtheit der Einträge wurde mittels des Fishers exaktem t-Test berechnet. Es wurden nur biologische Prozesse mit mindestens zwei Einträgen und einem p-Wert von unter 0,01 berücksichtigt.

2.2.10.5.2 *DAVID 2008*

Für die DAVID-Analyse (*database for annotation, visualisation and integrated discovery*) 2008 (Version 6) (Dennis et al, 2003; Huang da et al, 2009) wurden die HGNC *gene symbol* Einträge verwendet und gegen die Gesamtheit aller HGNC Einträge analysiert. Für das *Functional Annotation Clustering* wurden die GO (*gene ontology*) Annotationen der biologischen Prozesse oder die BIOCARTA (www.biocarta.com) und KEGG *Pathways* (www.genome.jp) bei Verwendung der Standard-Einstellungen berücksichtigt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung von mikroRNA Zielproteinen durch zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Identifizierung von miRNA Zielproteinen ist von besonderem Interesse, da die vornehmliche Wirkungsweise von miRNAs in der translationalen Inhibition besteht und nur zu einem geringen Teil die mRNA der Zielproteine abgebaut wird. Deshalb ist in dieser Arbeit die Verwendung von quantitativen Proteomik-Techniken die Methode der Wahl. In einem ersten Ansatz wurde versucht, die Proteine des Gesamtzelllysates mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zu quantifizieren. Dabei wurde die 2D DIGE (*difference in-gel electrophoresis*) Methode (Unlu et al, 1997) eingesetzt. Diese Methode hat den Vorteil, dass durch die verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen die zwei zu vergleichenden Proben zusammen mit einem internen Standard in einer isoelektrischen Fokussierung (erste Dimension) und in einem Polyacrylamidgel (zweite Dimension) aufgetrennt werden können und somit artifizielle Gel-zu-Gel Varianzen vermieden werden.

3.1.1 miR-155 regulierte Proteine in 293T Zellen mittels 2D DIGE

Durch die Gruppe von Dr. Armin Pscherer wurden 293T Zellen zur Verfügung gestellt, die 48 Stunden nach der Transfektion mit pri-miR-155 enthaltendem pCMX Vektor geerntet wurden. Als Kontrolle wurden 293T Zellen verwendet, die mit dem Leervektor (pCMX) transfiziert worden waren. Vier voneinander unabhängige Transfektionen wurden am gleichen Tag durchgeführt, wodurch vier biologische Replikate erhalten wurden. Mittels qRT-PCR wurde überprüft, ob die Überexpression funktionierte (siehe Abbildung 3-1).

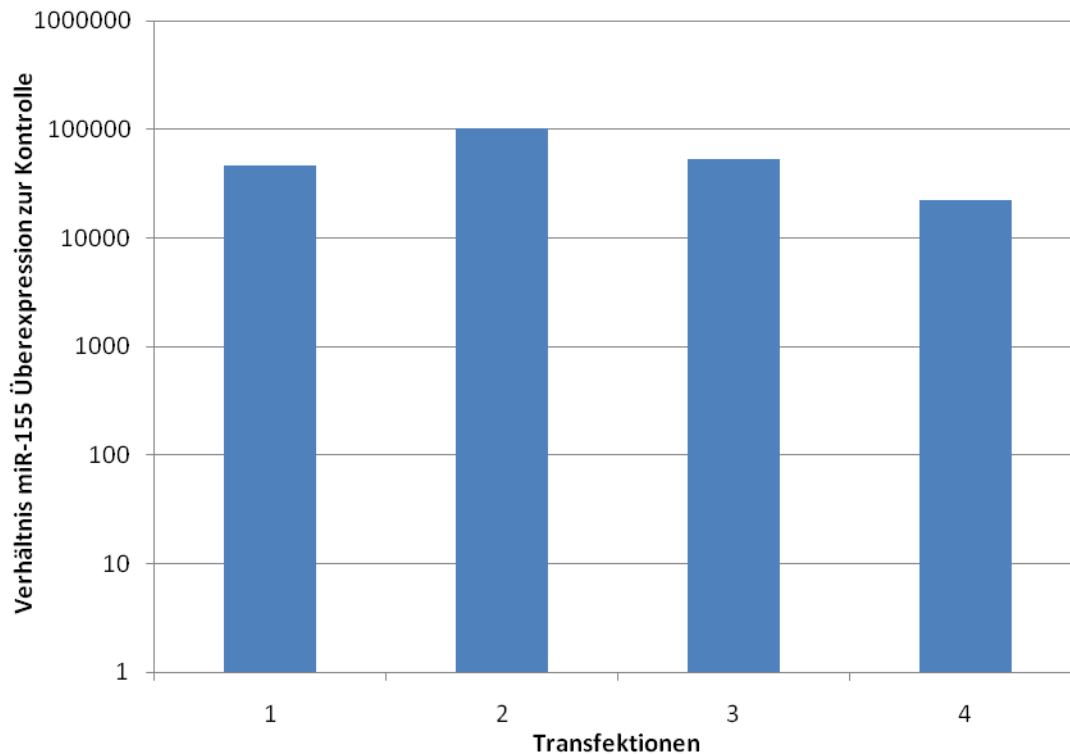


Abbildung 3-1: Kontrolle der Überexpression von miR-155 in 293T Zellen mittels qRT-PCR. Dabei wurde das Niveau der reifen miR-155 bestimmt und anhand der *housekeeping* Gene UB6 und U66 normalisiert. Die miR-155 Niveaus aus den miR-155 überexprimierenden 293T Zellen wurden ins Verhältnis zu den Kontroll 293T Zellen (nur pCMX Vektor) gesetzt (y-Achse, logarithmische Darstellung). Die verschiedenen Balken repräsentieren die vier biologischen Replikate.

Die Überexpression von miR-155 zeigt eine über 1000fache Erhöhung bei vergleichbaren Werten in den verschiedenen Transfektionen und war somit gut für die weiteren Untersuchungen geeignet.

Die weiteren Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe Funktionelle Proteomanalyse von mir selbst durchgeführt. Die Zellen der vier biologischen Replikate wurden unter Verwendung des RIPA-Protokoll lysiert (siehe 2.2.2), die Proteinkonzentration mittels 2D-Quant Kit bestimmt (siehe 2.2.3.1) und danach die Proteine zur Konzentrierung und Aufreinigung nach der Chloroform-Methanol Methode gefällt (siehe 2.2.4). Dabei konnten die Proteinkonzentration und der pH-Wert optimal nach dem 2D DIGE-Protokoll eingestellt werden und die Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Nach der isoelektrischen Fokussierung im pH-Bereich von 4 bis 7 sowie 6 bis 9 erfolgte die zweidimensionale Gelelektrophorese. Die erhaltenen Gele wurden durch den Laserscanner ausgelesen und mittels DeCyder 2D 6.5 ausgewertet. Dabei diente die DIA (*differential in-gel analysis*) zur Spotdetektion innerhalb eines Gels und BVA (*biological variance analysis*) zum Abgleich zwischen den Gelen und zur statistischen Auswertung mit Berücksichtigung des internen Standards (siehe 2.2.7). Abbildung 3-2 zeigt Beispielgelbilder der beiden unterschiedlichen pH-Bereiche bei der isoelektrischen Fokussierung.

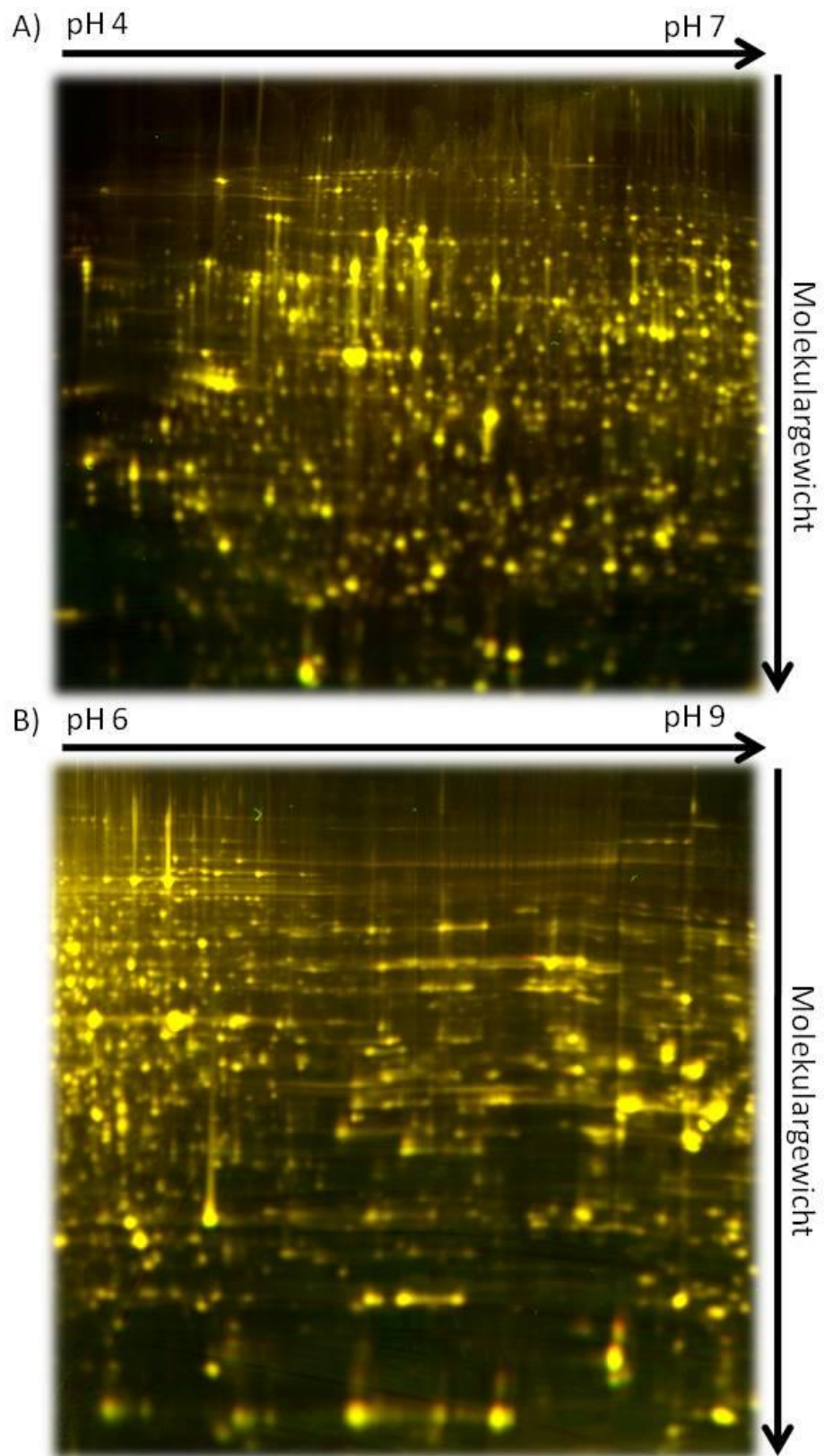


Abbildung 3-2: 2D DIGE Bilder von 293T Zellen im pH-Bereich von A) 4 bis 7 und B) 6 bis 9. Die Bilder wurden bearbeitet, um auch schwache Proteinspots optisch sichtbar zu machen. Die gelbe Farbe entsteht durch die Überlagerung der roten bzw. grünen Falschfarbe der beiden Proben (miR-155 Überexpression und Kontrolle). Der interne Standard wurde hier zur besseren Übersicht unberücksichtigt gelassen.

Wie bereits durch die überwiegend gelbe Farbe der Proteinspots zu erkennen ist (siehe Abbildung 3-2), sind die Unterschiede durch miR-155 Überexpression eher gering. Einige rote bzw. grüne Proteinspots im niedrigen Molekulargewichtsbereich sind auf die nicht 100%ige Molekulargewichtsübereinstimmung zwischen den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bzw. der Häufigkeit von markierten Lysinen zu erklären. Dieser Effekt tritt nur bei niedrigem Molekulargewicht auf, da dort der relative Molekulargewichtsunterschied am größten ist. Durch die Verwendung der beiden überlappenden pH-Bereiche konnten ca. 1500 Proteinspots detektiert und quantifiziert werden. Es ist allerdings anzumerken, dass dieser Anzahl nur 300 bis 500 Proteine entsprechen, da viele Spots auf post-translationalen Modifikationen sowie Isoformen der Proteine basieren (Fountoulakis et al, 2004).

Als reguliert wurden Proteinspots betrachtet, die eine Regulation von 1,2 oder größer zeigten (-1,2 oder 1,2), einen Students t-Test von unter 0,05 anhand der vier biologischen Replikate aufwiesen und die durch manuelle Überprüfung bestätigt wurden (siehe 2.2.7). Die regulierten Proteine sollten anschließend mittels eines präparativen Gels identifiziert werden. Das präparative Gel enthielt eine Proteinmenge von 500 µg und wurde zusätzlich mit 50 µg Cy2-Farbstoff markierten Proteinen versetzt. Somit konnte die Lokalisation der regulierten Proteinspots mittels Cy2-Farbstoff auf das SyproRuby gefärbte präparative Gel übertragen werden. Die Proteinspots wurden auf einem UV-Tisch ausgestochen und anschließend tryptisch verdaut. Die Identifizierung der Spots erfolgte mittels MALDI-Massenspektrometrie und PMF (*peptide mass fingerprint*) oder MS/MS, falls keine eindeutige Identifikation durch PMF möglich war. Bei den 2D DIGE Gelen im pH-Bereich von 6 bis 9 wurde kein Proteinspot als reguliert und im Bereich von 4 bis 7 wurden fünf Proteinspots als reguliert detektiert. Die dazugehörigen Proteine konnten eindeutig mit einem Mascot-Score von über 56 identifiziert werden und sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. STMN1 konnte mittels PMF nicht identifiziert werden, da dieses Protein recht klein ist (17,3 kDa) und somit potentiell zu wenige Peptide zur Identifizierung verfügbar sind. Mittels MS/MS konnte ein Peptid eindeutig STMN1 zugeordnet werden. STMN1 zeigt als einziges der identifizierten Proteine eine Hochregulation auf. Alle anderen Proteine sind herunterreguliert (siehe Tabelle 3-1). Die fünf regulierten Proteine wurden anhand ihrer HGNC (*HUGO gene nomenclature committee*) Symbole (ACTB, GRP75=HSPA9, CH60=HSPD1, ENOA=ENO1, STMN1) mit den durch Vorhersage-Algorithmen gewonnenen Daten verglichen. Nur STMN1 zeigt eine Übereinstimmung mit der Vorhersage durch den Algorithmus miRanda. Zur Validierung wurden Western-Blots für GRP75, CH60, ENOA und STMN1 durchgeführt, die allerdings keine differentielle Regulation bestätigten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die per 2D DIGE als reguliert detektierten Proteine in mehreren Isoformen vorliegen, wodurch eine Quantifizierung des Gesamtproteins durch Western-Blot Analyse keine mit der 2D DIGE-Analyse übereinstimmenden Ergebnisse liefert.

Protein Name (SwissProt)	Protein Acceesion (SwissProt)	Molekular- gewicht (kDa)	2D DIGE			PMF-MALDI			MS/MS-MALDI		
			Spot Nr.	Regulation (miR-155/Kontrolle)	t-Test	Mascot Score	Expect- Value	gefundene/ gesuchte Peptide	Mascot Score	Expect- Value	Sequenz
Actin, cytoplasmic 1	P60709 ACTB_HUMAN	42	1	-1,37	4,60E-02	87	3,80E-05	9/29			
Stress-70 protein, mitochondrial	P38646 GRP75_HUMAN	73,9	2	-1,22	3,80E-02	112	1,30E-07	12/30			
60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	P10809 CH60_HUMAN	61,2	3	-1,3	1,90E-02	110	1,90E-07	13/35			
Stathmin	P16949 STMN1_HUMAN	17,3	4	1,27	1,50E-02				31	2,90E-02	ASGQAFE LILSPR
Alpha-enolase	P06733 ENOA_HUMAN	47,5	5	-1,25	1,90E-03	100	2,10E-06	8/18			

Tabelle 3-1: Quantifizierung (2D DIGE) und Identifizierung (MALDI-MS) der fünf durch miR-155 Überexpression in 293T Zellen regulierten Proteinspots im pH-Bereich von 4 bis 7. Regulation: negative Werte zeigen eine Herunterregulation und positive Werte eine Hochregulation des Proteins durch miR-155 Überexpression an; t-Test: Students t-Test der vier biologischen Replikate; Expect-Value: Wahrscheinlichkeitswert für zufällige Identifikation; Sequenz: identifiziertes Peptid

3.1.2 miR-15a und miR-16-1 regulierte Proteine in 293T Zellen mittels 2D DIGE

Als nächstes wurde die synergetische Wirkung der beiden mikroRNAs miR-15a und miR-16-1 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass miRNAs die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zur gleichen Familie gehören, synergetisch wirken und somit stärkere Regulationen und auch eine größere Anzahl von regulierten Proteinen hervorrufen können (Calin et al, 2008). miR-15a und miR-16-1 befinden sich auf einem gemeinsamen chromosomalen Abschnitt und weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf, womit sie viele Zielproteine gemeinsam bzw. synergetisch regulieren sollten (siehe 1.1.3). Es wurden die beiden miRNAs in ihren entsprechenden Vektoren (miR-15a-pCMX und miR-16-1-pCMX) in 293T Zellen kotransfiziert, so dass die Zellen beide miRNAs überexprimieren. Die Transfektionen wurden in sechs biologischen Replikaten durchgeführt. Durch die Verwendung einer höheren Anzahl an biologischen Replikaten für die 2D DIGE-Analyse im Vergleich zu 3.1.1 sollte versucht werden, geringere Regulationsunterschiede signifikant zu quantifizieren.

Die Herstellung der Vektorkonstrukte, die Transfektion der 293T Zellen, deren Kultivierung und Ernte sowie die qRT-PCR zur Überprüfung der miRNA Überexpression wurden von der Gruppe Dr. Armin Pscherer durchgeführt.

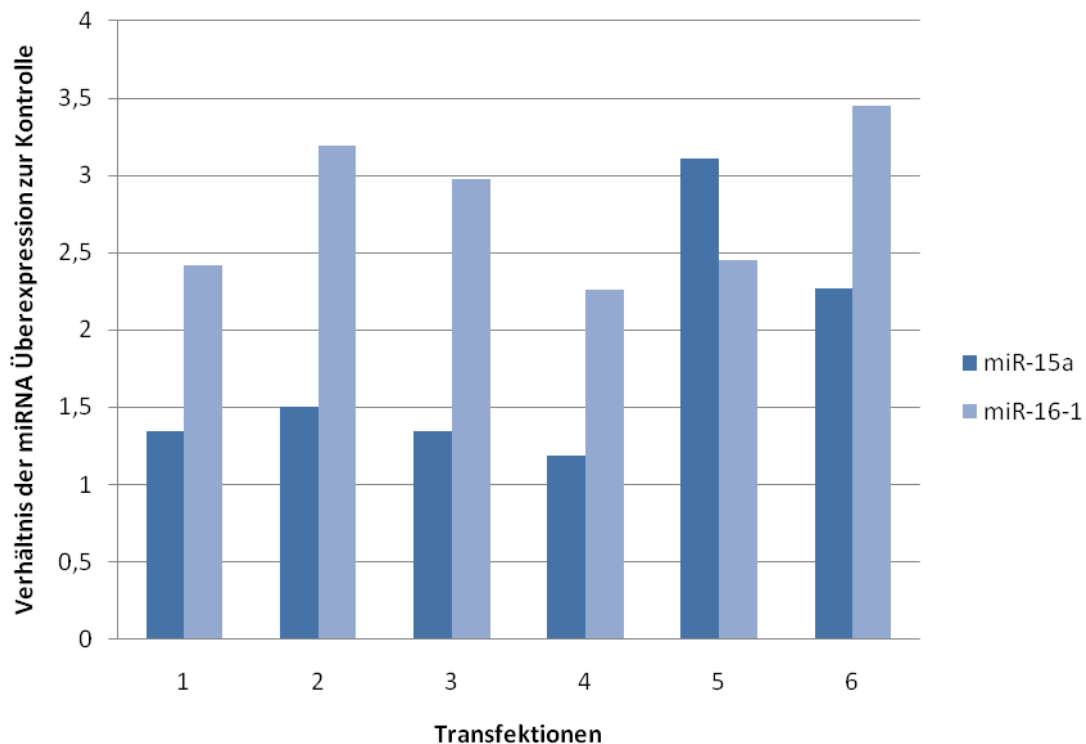


Abbildung 3-3: Kontrolle der Überexpression von miR-15a und miR-16-1 in 293T Zellen mittels qRT-PCR. Dabei wurde das Niveau der reifen miR-15a bzw. miR-16-1 bestimmt und anhand der *housekeeping* Gene UB6 und U66 normalisiert. Die miR-15a bzw. miR-16-1 Niveaus aus den miRNA überexprimierenden 293T Zellen wurden ins Verhältnis zu den Kontroll 293T Zellen (nur pCMX Vektor) gesetzt (γ -Achse, logarithmische Darstellung). Die sechs verschiedenen biologischen Replikate sind gezeigt.

Abbildung 3-3 zeigt, dass miR-15a mit einem Mittelwert von 1,8 weniger stark überexprimiert wird als miR-16-1 mit einem Mittelwert von 2,8. Dabei ist anzumerken, dass für beide miRNAs die Überexpression im Vergleich zu miR-155 wesentlich geringer ausfällt. Die nachfolgende 2D DIGE-Analyse wurde analog zu 3.1.1 durchgeführt, wobei in diesem Fall sechs biologische Replikate verwendet wurden. Es wurde berücksichtigt, dass in Replikat 5 miR-15a vergleichsweise stärker überexprimiert wurde. Bei der 2D DIGE-Auswertung für die Gele im pH-Bereich von 6 bis 9 konnten erneut keine regulierten Proteinspots detektiert werden. Die im pH-Bereich von 4 bis 7 regulierten Spots sind in Tabelle 3-2 gezeigt.

Protein Name (SwissProt)	Protein Accession (SwissProt)	Molekulargewicht (kDa)	2D DIGE-Analyse			PMF (MALDI)			MS/MS (QTOF)	
			Spot Nr.	Regulation	t-Test	Mascot Score	gefundene/ gesuchte Peptide	Expect-Value	Mascot Score	Peptide
78 kDa glucose-regulated protein	P11021 GRP78_HUMAN	72,4	1	-1,39	2,40E-02	93	9/21	1,10E-05		
			2	-1,47	6,10E-03					
78 kDa glucose-regulated protein	P11021 GRP78_HUMAN	72,4	3	-1,24	1,30E-02	68	8/26	2,90E-03		
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978 HNRPK_HUMAN	51,2	4	-1,21	3,40E-03				376	10
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978 HNRPK_HUMAN	51,2	5	-1,22	3,40E-03	61	6/20	1,70E-02	599	10
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978 HNRPK_HUMAN	51,2	6	-1,2	1,70E-02				604	14
26S protease regulatory subunit 6B	P43686 PRS6B_HUMAN	47,5	7	-1,24	1,60E-02				125	3
			8	-1,23	2,90E-02					
			9	-1,25	1,10E-04					

Tabelle 3-2: Quantifizierung (2D DIGE) und Identifizierung (MALDI- bzw. QTOF-MS) der neun durch Überexpression von miR-15a und miR-16-1 in 293T Zellen regulierten Proteinspots im pH-Bereich von 4 bis 7. Regulation: negative Werte zeigen eine Herunterregulation und positive Werte eine Hochregulation des Proteins durch miR-15a bzw. miR-16-1 Überexpression an; t-Test: Students t-Test der sechs biologischen Replikate; *Expect-Value*: Wahrscheinlichkeitswert für zufällige Identifikation; Sequenz: identifiziertes Peptid

Alle regulierten Proteinspots zeigen eine Herunterregulation des entsprechenden Proteins aufgrund von miR-15a und miR-16-1 Überexpression auf (siehe Tabelle 3-2). Wenn ein Proteinspot mittels MALDI Massenspektrometrie nicht identifiziert werden konnte (Spot 2, 4 und 6 bis 9) oder der Mascot-Score in der Nähe des Signifikanzschwellenwertes von 56 lag (61 bei Spot 5), wurden die Spots zusätzlich mittels ESI-QTOF analysiert. Durch diese Herangehensweise konnten sechs der neun regulierten Proteinspots identifiziert werden. Bei Proteinspot 1 bis 3 handelt es sich aufgrund der charakteristischen Anordnung der Proteinspots im 2D Gel um das gleiche Protein mit unterschiedlichen Modifikationen. Obwohl Spot 2 nicht identifiziert werden konnte, kann somit geschlussfolgert werden, dass es sich dabei ebenfalls um GRP78 handelt. Nur bei den Proteinspots 8 und 9 konnten keine Proteine identifiziert werden. GRP78 und HNRPK wurden in mehreren Spots identifiziert, was darauf hindeutet, dass diese Proteine in mehreren Modifikationen vorliegen, die alle eine Herunterregulation zeigen. Erneut wurden die regulierten Proteine anhand ihrer HGNC Symbole (HNRPK=HNRNPK, GRP78=HSPA5, PRS6B=PSMC4) mit den Daten aus den Vorhersage-Algorithmen verglichen. Dabei zeigt GRP78 sowohl mit miRanda für miR-16 als auch mit RNA22 CDS für miR-15 und miR-16 Übereinstimmungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl für miR-155 als auch für miR-16-1 und miR-15a potentielle Zielproteine durch die 2D DIGE Methode identifiziert werden konnten. Diese zeigen zum Teil auch eine Übereinstimmung mit den Vorhersage-Algorithmen. Die verhältnismäßig geringen Regulationen waren zwar zu erwarten gewesen (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008), aber die Anzahl der regulierten Proteine ist sehr klein. Es ist anzunehmen, dass miRNAs auf eine größere Anzahl von Proteinen einen Einfluss haben. Um dies zu überprüfen, wurde mit der SILAC Methode eine potentiell sensitivere Technik angewendet.

3.2 Etablierung der relativen quantitativen Proteomanalyse mittels SILAC

Bei der SILAC-Methode handelt es sich um eine verhältnismäßig neue Methode, die erstmals 2002 publiziert wurde (Ong et al, 2002). Da diese Methode in der Gruppe Funktionelle Proteomanalyse des DKFZ nicht etabliert war, musste sie zuerst angepasst werden. Dafür war eine Optimierung der verschiedenen Arbeitsschritte (Zellkultur, Massenspektrometrie und bioinformatische Auswertung) notwendig. Bei der Zellkultur war zu überprüfen, ob der Einbau der schweren Aminosäuren (siehe 1.2.3) vollständig erfolgt. Als Massenspektrometer kristallisiert sich die LTQ Orbitrap der Firma Thermo Scientific als Standard heraus, da dieses Gerät eine hohe Massengenauigkeit (Auflösung) in den MS-Spektren zeigt, welche zur Quantifizierung benötigt wird (siehe 1.2.3). Zudem weist die LTQ Orbitrap eine hohe Geschwindigkeit bei der Generierung von MS/MS-Spektren auf, wodurch viele Peptide identifiziert werden können. Des Weiteren zeigt dieses Hybridmassenspektrometer eine gute Sensitivität zur Detektion geringer Peptidmengen auf. Eine LTQ Orbitrap XL konnte ab

Mitte 2008 für dieses Projekt verwendet werden. Mit der massenspektrometrischen Datengenerierung geht die bioinformatische Auswertung einher. Dazu konnten die beiden Programme MSQuant (Andersen et al, 2003; Schulze & Mann, 2004) und neuerdings (seit Dezember 2008) MaxQuant (Cox & Mann, 2008; Cox et al, 2009) in Zusammenarbeit mit dem Datenbank-Suchalgorithmus Mascot (Perkins et al, 1999) angewendet werden.

Die bioinformatische Auswertung und die massenspektrometrische Datengenerierung konnten entsprechend etabliert bzw. angewendet werden und auch der Einbau der schweren Aminosäuren erfolgte nach fünf Zellteilungen vollständig. Es trat allerdings ein unerwarteter Effekt bei der metabolischen Markierung in der Zellkultur auf, der in der Literatur bereits in Einzelfällen als Arginin-Prolin Konvertierung beschrieben wurde (Blagoev & Mann, 2006). Da sich dieser Effekt als entscheidendes Problem herausstellte, wird auf diesen Punkt nachfolgend näher eingegangen.

3.2.1 Vermeidung der Konvertierung von Arginin zu Prolin durch Zugabe von nicht markiertem Prolin

Für die SILAC-Analyse werden die stabilen Isotope der beiden essentiellen Aminosäuren Arginin und Lysin als Markierung verwendet. Es ist von Bedeutung, dass die verwendeten Aminosäuren essentiell für den Organismus bzw. die Zelllinie sind. Nur dann ist gewährleistet, dass die zugesetzten schwer markierten Aminosäuren eingebaut werden und nicht aus „leichten“ Vorläufer-Aminosäuren synthetisiert werden können, was zu einer unvollständigen Markierung führen würde. Außerdem muss sichergestellt sein, dass die schwer markierten Aminosäuren Arginin und Lysin metabolisch nicht zu anderen Aminosäuren umgewandelt werden. Ein solcher Effekt der Konvertierung ist für Arginin beschrieben, welches über den Ornithin-Harnstoff Zyklus zu Prolin umgewandelt werden kann (Blagoev & Mann, 2006);(Morris, 2007). Das Resultat ist eine Intensitätsverringering des schweren Isotopen-Musters von Prolin-haltigen Peptiden in den MS-Spektren aufgrund eines weiteren schweren Isotopen-Musters. Dieses besteht neben schwerem Arginin noch aus schwerem Prolin, welches durch fünf ^{13}C markiert ist. Somit wird das monoisotopische Signal um 5,02 Da verschoben (siehe Abbildung 3-4).

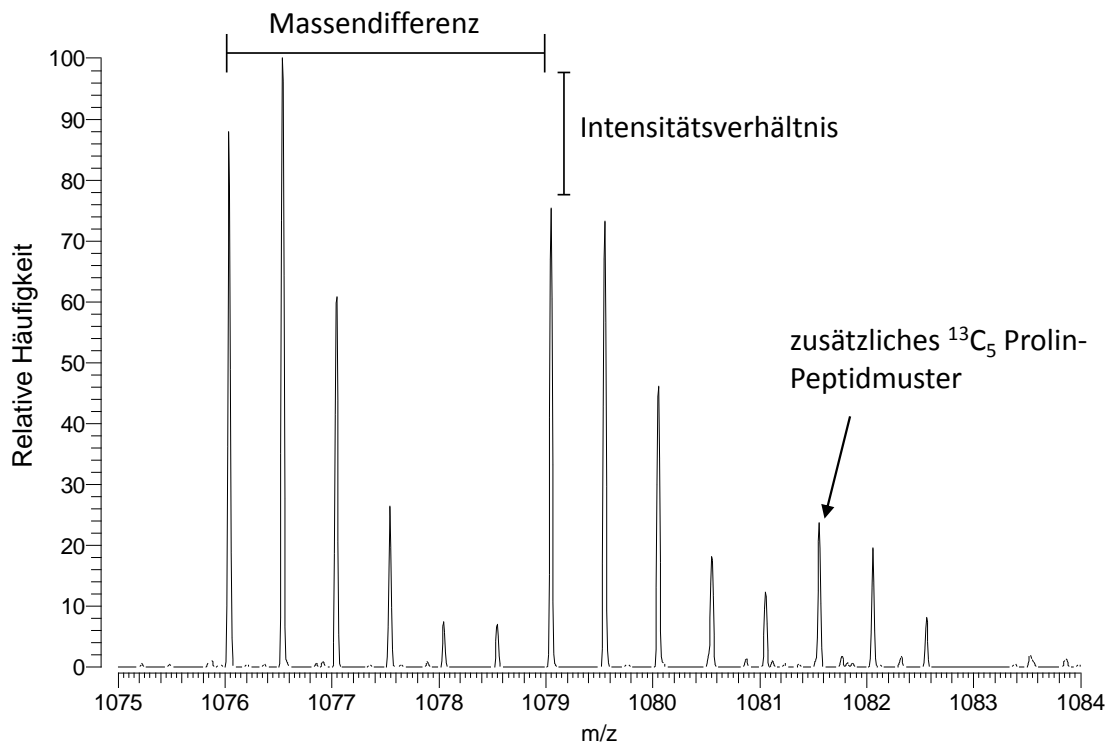


Abbildung 3-4: ESI-MS-Spektrum eines Prolin-haltigen SILAC Peptidpaares. Auf der x-Achse ist das Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) und auf der y-Achse die relative Häufigkeit angezeigt. Das leichte Isotopen-Muster, des doppelt geladenen Peptids, mit dem monoisotopischen Signal bei 1076 m/z wird durch 3 Da vom monoisotopischen Signal bei 1079 m/z des schweren Isotopen-Musters getrennt. Das Isotopen-Muster des Peptids, welches zusätzlich schweres Prolin enthält, ist weitere 2,5 Da separiert. Die Intensität des schweren Isotopen-Musters bei 1079 m/z ist um den Wert des schweren Prolin-haltigen Peptidisotopen-Musters (1081,5 m/z) gegenüber dem leichten Isotopen-Muster (1076 m/z) reduziert.

Um die Auswirkungen der Arginin-Prolin Konvertierung auf eine größere Anzahl von Proteinen bzw. Peptiden für die Quantifizierung zu untersuchen, wurden unbehandelte 293T Zellen verglichen. Dabei wurden die 293T Zellen entweder unter den Standard SILAC-Bedingungen kultiviert (siehe 2.2.1) oder es wurden zusätzlich 200 mg/L nicht markiertes L-Prolin hinzugefügt (Prolin-Bedingungen) (Bendall et al, 2008).

Die Lebensfähigkeit (*cell viability*) der 293T Zellen wurde bei den verschiedenen Bedingungen getestet, da eine Reduzierung der Lebensfähigkeit bei Prolin-Zugabe für bestimmte Zelllinien beschrieben wurde (Park et al, 2009). Es ergab sich eine Lebensfähigkeitsrate von 88% +/-1 für die 293T Zellen unter Standard SILAC-Bedingungen, welche vergleichbar mit der Rate von 86% +/-2 unter Prolin-Bedingungen ist. Ein negativer Einfluss der Prolin-Zugabe konnte somit für die verwendete 293T Zelllinie ausgeschlossen werden. Zur Untersuchung des Arginin-Prolin Konvertierungseffekts wurden unbehandelte 293T Zellen für sieben Zellteilungen kultiviert. Es wurden fünf Zellteilungen für die komplette Markierung benötigt und zwei weitere Zellteilungen (48 Stunden), um die Zeitspanne von der Transfektion bis zur Ernte der Zellen zu simulieren. Die entsprechenden Zellen wurden durch die Gruppe von Dr. Armin Pscherer entweder unter Standard SILAC-Bedingungen oder

Prolin-Bedingungen kultiviert, geerntet und im Verhältnis von 1:1 (durch automatische Zellzählung) vereinigt. Die anschließenden Schritte (Zelllyse (siehe 2.2.2), Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.3.1), Proteinfällung (siehe 2.2.4), SDS-PAGE von je 100 µg Proteinlysate (siehe 2.2.5.1), Herausschneiden 26 einzelner Gelstücke, tryptischer Verdau eines repräsentativen Gelstücks, Extraktion der Peptide aus den Gelstücken sowie die massenspektrometrische Analyse mittels nanoHPLC-ESI-MS/MS (LTQ Orbitrap XL) (siehe 2.2.8)) wurden durch mich durchgeführt. Die beiden erhaltenen Rohdatensätze (Standard SILAC-Bedingungen und Prolin-Bedingungen) wurden mittels DTASuperCharge v.1.29 prozessiert, durch Mascot 2.1 in der MSIP1 3.43 Datenbank-Suche identifiziert und die Peptide bzw. Proteine mittels MSQuant 1.5 quantifiziert. Bei den Standard SILAC-Bedingungen bzw. Prolin-Bedingungen wurden 850 bzw. 886 Peptide (Mascot-Score ≥ 20) und 104 bzw. 99 Proteine (Mascot-Score ≥ 60 , p-Wert $< 0,01$, ≥ 2 Peptide) erhalten. Die \log_2 Verhältnisse (Flächen unter den schweren Isotopen-Mustern dividiert durch die Flächen unter den leichten Isotopen-Mustern) der Peptide bzw. Proteine wurden untersucht. Dabei sollte eine Gaußverteilung um den \log_2 Wert von 0 auftreten, da keine differentielle Regulation zu erwarten ist. Die Verteilung der Peptid-Verhältnisse ist allerdings bei den Standard SILAC-Bedingungen zu negativen Werten verschoben und 10% der Peptide haben einen \log_2 Wert von weniger als -0,5 (siehe Abbildung 3-5 A)). Dagegen zeigt die Verteilung der Peptid-Verhältnisse unter Prolin-Bedingungen die erwartete Gaußverteilung (siehe Abbildung 3-5 C)). Der gleiche Effekt tritt auf Proteinebene auf, wobei die \log_2 Werte bei den Standard SILAC-Bedingungen wiederum in den negativen Bereich verschoben sind (siehe Abbildung 3-5 B)) und sich die erwartete Gaußverteilung bei den Protein-Verhältnissen unter Prolin-Bedingungen zeigt (siehe Abbildung 3-5 D)).

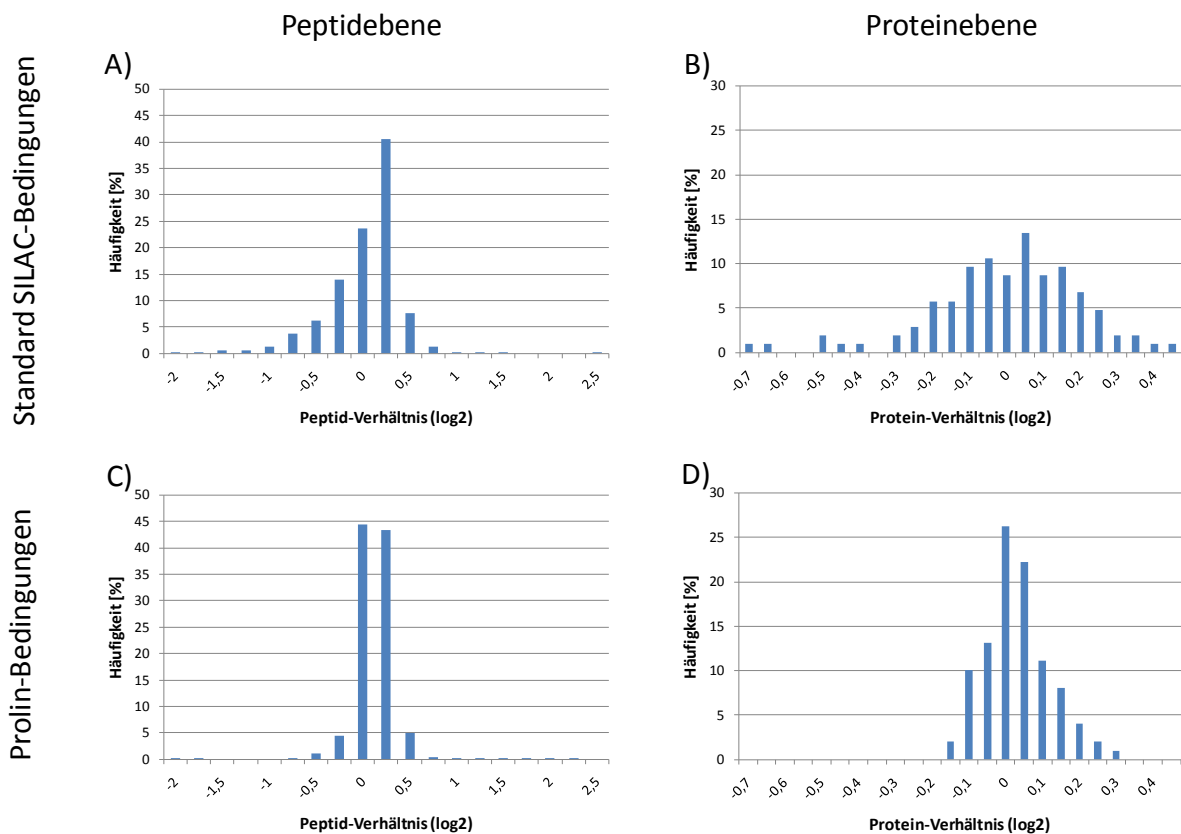


Abbildung 3-5: Häufigkeitsverteilung der Verhältnisse von Peptiden A) und C) bzw. Proteinen B) und D) unter Standard SILAC-Bedingungen A) und B) bzw. Prolin-Bedingungen (zusätzlich 200 mg/L nicht markiertes L-Prolin) C) und D), wobei unbehandelte 293T Zellen, die für sieben Zellteilungen kultiviert wurden, untersucht wurden. Die Histogramme stellen Protein- bzw. Peptidverhältnisse (x-Achse) und deren entsprechende Häufigkeit in Prozent dar.

Allerdings sind die Effekte auf Proteinniveau geringer als auf Peptidniveau, da zur Quantifizierung von Proteinen mindestens zwei Peptide herangezogen werden und es aufgrund des Auftretens von Prolin (4,71%; Amino Acid Explorer, www.ncbi.nlm.nih.gov) unwahrscheinlich ist, dass die Mehrheit der Peptide mindestens ein Prolin enthält. Ein anderes Problem ist, dass sich die Standard-Abweichung verdoppelt und dies zu höheren Varianzen führt, was eine akkurate Quantifizierung unmöglich macht. Um diesen Effekt eindeutig auf Prolin zurückzuführen, wurde untersucht, in wieweit die Anzahl an Prolinen pro Peptid mit dem log₂ Peptid-Verhältnis korreliert. Je mehr Prolin in einem Peptid vorkommen, desto höher sollte die Wahrscheinlichkeit sein, dass ein oder mehrere schwere Prolin eingebaut werden und damit das Verhältnis stärker negative log₂-Werte annimmt. Diese Untersuchung wurde anhand der bereits oben erwähnten Daten von unbehandelten 293T Zellen unter Standard SILAC-Bedingungen gewonnen. Die Korrelation zwischen Anzahl der Prolin pro Peptid und log₂ Werten wird durch die polynomiale Regressionsgrade mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,78 in Abbildung 3-6 beschrieben.

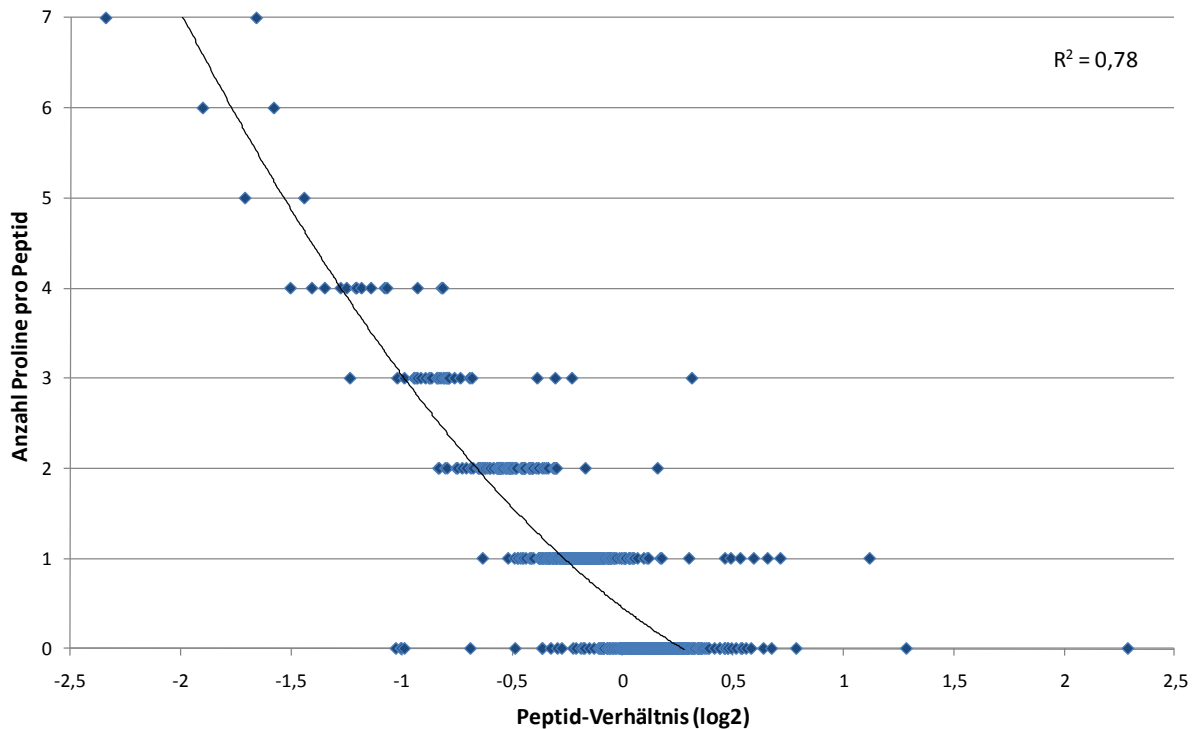


Abbildung 3-6: Abhängigkeit der Peptid-Verhältnisse (log2) zur Anzahl an Prolinen, die in einem Peptid enthalten sind. Jeder Punkt repräsentiert eines der 850 Peptide, die in dieser Probe (Standard SILAC-Bedingungen) quantifiziert wurden. Die Trendlinie repräsentiert die polynomiale Regressionsgrade mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,78.

Die Kurvensteigung erhöht sich, je größer die Anzahl an Proline ist, da bei steigender Anzahl von Prolinen in einem Peptid die Wahrscheinlichkeit abnimmt, dass für alle Proline ein schweres Prolin einbaut wird. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der Arginin Konvertierungseffekt auf der Umwandlung zu Prolin beruht. Da Arginin auch in Glutaminsäure umgewandelt werden kann (Morris, 2007), wurde mit der gleichen Herangehensweise untersucht, ob dieses Phänomen ebenfalls bei Glutaminsäure auftritt. Ein solcher Zusammenhang konnte nicht festgestellt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei der Konvertierung von Arginin zu Prolin um einen globalen Effekt handelt, der zu einer starken Verschlechterung der Ergebnisse in Hinblick auf Varianz und Regulationsverhältnisse der Quantifizierung führt. Mit der ausgewählten Optimierung (Hinzufügen von nicht markiertem L-Prolin) konnte dieser Effekt vermieden werden.

3.3 Identifizierung von miR-155 regulierten Proteinen in 293T Zellen mittels SILAC-Analyse

3.3.1 Experimenteller Aufbau und Überprüfung der Versuchsbedingungen

Für die Identifizierung von miR-155 Zielproteinen wurde die 293T Zelllinie verwendet, die ein niedriges endogenes Niveau von miR-155 aufweist (Eis et al, 2005). Im relativen quantitativen Proteomikansatz mittels SILAC wurde die miR-155 Überexpression mit dem endogenen miR-155 Niveau in 293T Zellen verglichen. miR-155 wurde überexprimiert, indem ein Vektorkonstrukt (pCMX) verwendet wurde, welches die pri-miR-155 unter der Kontrolle des viralen RNA Polymerase II Promoters enthält. Um vektor- bzw. transfektionsbedingte Unterschiede auszuschließen, wurden als Kontrolle Zellen verwendet, die mit dem pCMX Vektor transfiziert wurden, welcher keine Integrationssequenz besitzt. Diese beiden Zustände wurden wechselseitig mit dem entsprechenden leichten bzw. schweren SILAC Medium markiert, wobei zur vollständigen Markierung die Zellen für fünf Zellteilungen (fünf Tage bei 293T Zellen) kultiviert wurden. Danach wurden die Zellen entweder mit den pri-miR-155 enthaltenden Vektoren oder den Leervektoren transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Überexpression von miR-155 durch qRT-PCR überprüft (siehe Abbildung 3-7).

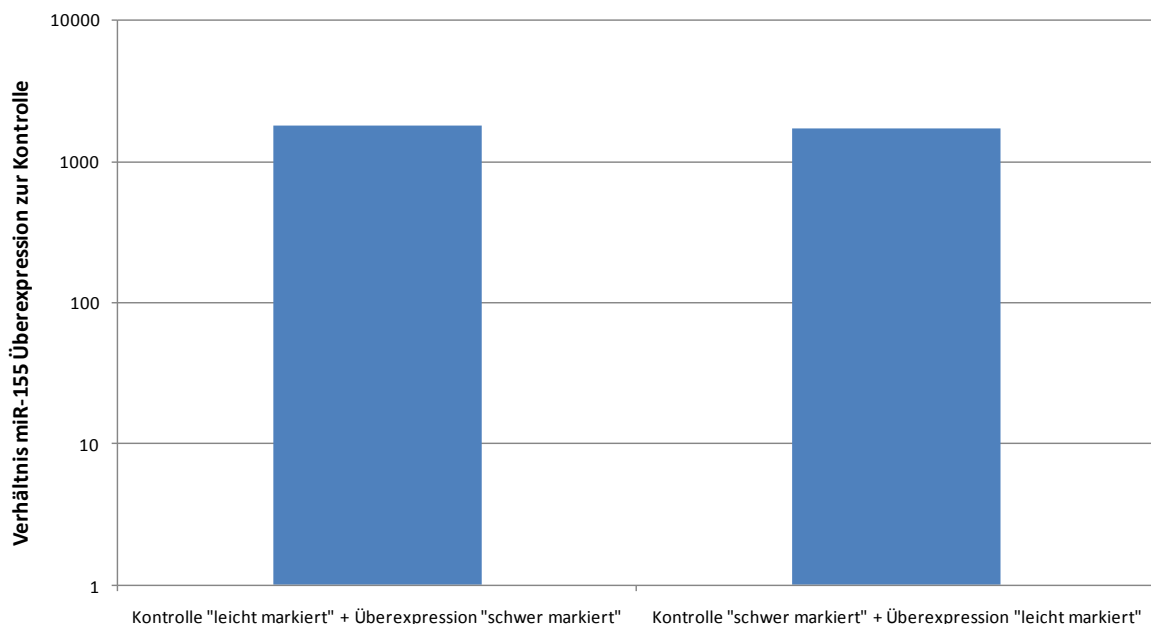


Abbildung 3-7: Kontrolle der Überexpression von miR-155 in 293T Zellen mittels qRT-PCR. Dabei wurde das Niveau der reifen miR-155 bestimmt und anhand der *housekeeping* Gene UB6 und U66 normalisiert. Die miR-155 Niveaus aus den miR-155 überexprimierenden 293T Zellen wurden ins Verhältnis zu den Kontroll 293T Zellen (nur pCMX Vektor) gesetzt (y-Achse, logarithmische Darstellung). Beide biologischen Replikate, die wechselseitig markiert wurden, zeigen eine über 1000fache Überexpression von miR-155.

Das Expressionsniveau von miR-155 zeigt sich für beide biologischen Replikate über 1000fach gegenüber dem endogenen Niveau erhöht. Das Ernten 48 Stunden nach der

miRNA Transfektion deutet sich durch eigene Untersuchungen in der Arbeitsgruppe als ein geeigneter Wert an, was durch die Literatur bestätigt wird (Calin et al, 2008). Zu diesem Zeitpunkt ist das miR-155 Expressionsniveau am höchsten und nimmt danach ab. Zudem wird eine gewisse Zeit benötigt, bis die entsprechende miRNA ihren Effekt auf Proteinebene hervorruft. Es ist allerdings anzumerken, dass es dazu bisher keine Experimente mit größeren Datensätzen gibt. Die Zellkultivierung, Transfektion und Überprüfung der miR-155 Expression mittels qRT-PCR (siehe 2.2.1) wurde durch die Gruppe Dr. Armin Pscherer durchgeführt. Die anschließende Zellyse (2.2.2), Konzentrationsbestimmung (2.2.3.1), Proteinfällung (2.2.4), SDS-PAGE von je 100 µg Proteinlysate (2.2.5.1), Herausschneiden je 26 einzelner Gelstücke pro Spur, tryptischer Verdau, Extraktion der Peptide aus den Gelstücken sowie die massenspektrometrische Analyse mittels nanoHPLC-ESI-MS/MS (LTQ Orbitrap XL) (siehe 2.2.8) wurden durch mich durchgeführt.

3.3.2 Quantitative Auswertung der SILAC-Analyse mittels MaxQuant

Die 80 aus der nanoHPLC-ESI-MS/MS gewonnenen Rohdatensätze (26 Gelstücke, je zwei Replikate (wechselseitige Markierung) und ggf. repetitive Messungen, falls es zu Unregelmäßigkeiten bei der Analyse kam) wurden mittels MaxQuant 1.0.12.22 (Cox & Mann, 2008; Cox et al, 2009) ausgewertet. Insgesamt konnten 2730 Proteine identifiziert und 1851 Proteine quantifiziert werden (siehe 2.2.8.4.2). Als reguliert wurden diejenigen Proteine zugelassen, die nach dem „Signifikanz B“-Wert weniger als 1% Falschpositive enthalten und deren Varianz zwischen den Messpunkten niedriger als 50% ist. Der „Signifikanz B“-Wert zeigt, an wie signifikant unterschiedlich das Verhältnis eines Proteins zur Gesamtverteilung der Proteinverhältnisse ist. Diese Werte werden nach Signalintensitäten gruppiert, wodurch es möglich ist, dass Proteine, die mit höheren Intensitäten der Messpunkte quantifiziert wurden, auch mit geringeren Regulationen signifikant sind. Der Wert von 1% für den „Signifikanz B“-Wert wurde aus der Literatur übernommen (Selbach et al, 2008). Die Varianzrestriktion schließt große Unterschiede zwischen den Messpunkten aus. Dies kann durch unterschiedliche Regulation von Isoformen hervorgerufen werden. Zudem wird dadurch vermieden, dass Kontaminationen aus der Zellkultur oder von der Probenbearbeitung, die in den beiden Replikaten entgegengesetzt reguliert sind, in den Ergebnissen erscheinen. 16 Proteine wurden mit einer Varianz von über 50% gefunden, sie konnten entweder als Kontaminationen oder Isoformen identifiziert werden, da sie entweder wechselseitig reguliert sind oder über große Bereiche des SDS-PAGE Gels verteilt sind. Dies ist außerdem von Interesse, weil dadurch Kontaminationen identifiziert werden konnten, die über die bereits in der MaxQuant-Analyse beinhalteten Ausschlüsse von Kontaminationen hinausgehen. 33 Proteine sind unter diesen Parametern herunterreguliert (siehe Tabelle 6-1; Anhang) und stellen damit potentielle miR-155 Zielproteine dar. Diese Proteine zeigen Regulationsverhältnisse von 0,9 bis 0,5, entsprechend 11% bis 100% und einem Mittelwert von 0,8 bzw. 25%, was erwartungsgemäß gering ist.

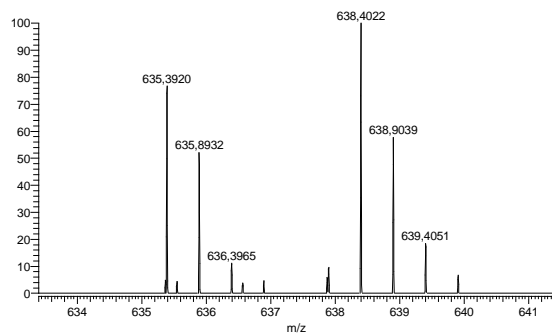
Die 22 hochregulierten Proteine sind in Tabelle 6-2 (siehe Anhang) aufgeführt. Auch bei den hochregulierten Proteinen waren die Regulationen mit Werten von 1,2 (20%) bis 1,7 (70%) und einem Mittelwert von 1,3 (30%) vergleichsweise gering.

Im Vergleich der hoch- zu herunterregulierten Proteine wird deutlich, dass $\frac{2}{3}$ der Proteine herunterreguliert sind, was als Haupteffekt von miR-155 zu erwarten ist (siehe 1.1.3). Im Vergleich zur Gesamtheit der quantifizierten Proteine sind knapp 3% reguliert und 1,8% herunterreguliert und somit potentielle miR-155 Zielproteine. In Abbildung 3-8 sind Beispiele für je ein herunterreguliertes, nicht reguliertes und hochreguliertes Protein anhand von jeweils zwei repräsentativen Peptiden gezeigt.

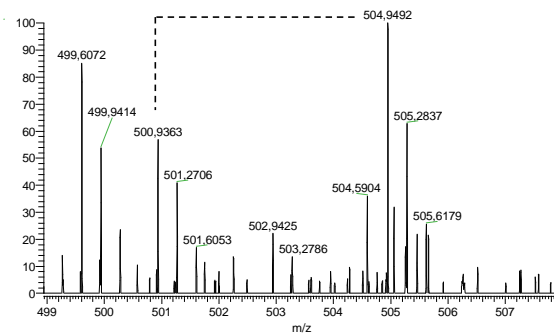
Es ist anzumerken, dass in der Abbildung 3-8 nur die MS-Spektren zu einem gewissen Zeitpunkt gezeigt sind und die Quantifizierung mittels MaxQuant über den zeitlichen Verlauf der Chromatographie erfolgt (XIC: *extracted ion chromatogram*). Die MS-Spektren dienen also nur zur Veranschaulichung, stellen aber nicht die Quantifizierung dar. Um die durch SILAC-Analyse gewonnenen Daten zu validieren, wurde relative quantitative Western-Blot Analyse als orthogonale Methode eingesetzt.

A) KIF11 (herunterreguliert: 0,69fach)

TVLQELINVLK*;
Gelstück 6; RT: 92,14; z=2

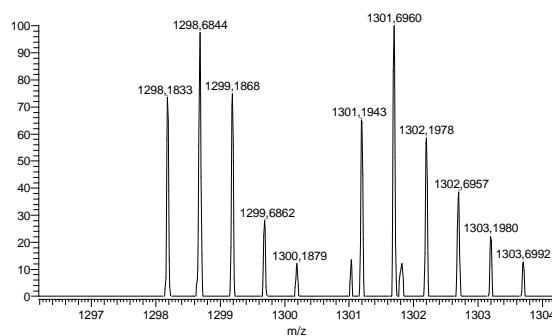


SK*VEETTEHLVTK*;
Gelstück 6; RT: 18,53; z=3

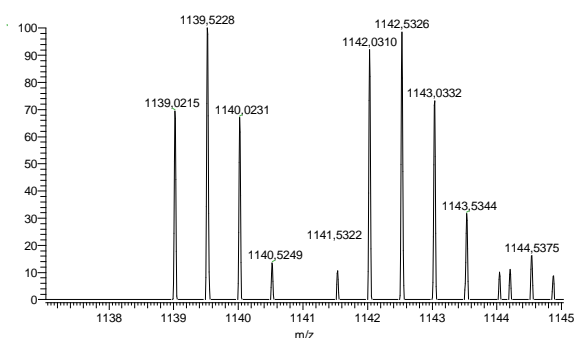


B) GAPDH (nicht reguliert: 0,97fach)

VIHDFNGIVEGLMTTVHAITATQK*;
Gelstück 13; RT: 84,59; z=2

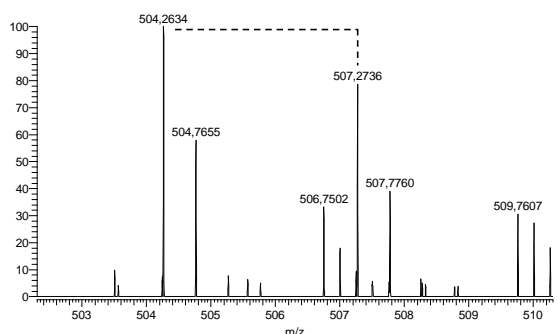


WGDAGA EYVVESTGVFTTMEK*;
Gelstück 15; RT: 66,95; z=2



C) DHFR (hochreguliert: 1,46fach)

TWFSIPEK*;
Gelstück 17; RT: 43,45; z=2



LLPEYPGVLSDVQEEK*;
Gelstück 17; RT: 46,89; z=2

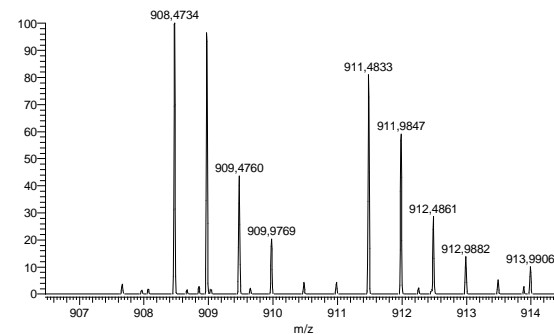


Abbildung 3-8: SILAC-Quantifizierung. Beispiele von MS-Spektren für herunterregulierte, nicht regulierte und hochregulierte Proteine mit je zwei repräsentativen SILAC-Peptidpaaren: A) KIF11 als Beispiel für ein herunterreguliertes Protein B) GAPDH als Beispiel für ein nicht reguliertes Protein C) DHFR als Beispiel für ein hochreguliertes Protein. Zu jedem Peptid ist die Peptidsequenz angegeben, in der die ^{13}C markierte Aminosäure durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet ist. Des Weiteren ist das Gelstück, in dem das Peptid detektiert wurde, die Retentionszeit (RT) der *reverse phase* HPLC in Minuten sowie die Ladung (z) des jeweiligen Peptids angegeben. x-Achse: Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) und y-Achse: relative Häufigkeit

3.3.3 Validierung der SILAC-Analyse durch relative quantitative Western-Blot Analyse

Aus den 33 herunterregulierten Proteinen (siehe Tabelle 6-1; Anhang) waren für fünf Proteine (KIF11, UBE2C, RANGAP1, KPNA2, CKAP5) kommerziell erhältliche und mit Zelllysaten validierte Antikörper verfügbar. Ein weiterer Antikörper gegen das hochregulierte Proteine DHFR zeigte leider kein Signal in 293T Zelllysaten. Die Western-Blot Analysen (siehe 2.2.6) wurden mit vier unabhängigen biologischen Replikaten aus Zellkulturen, die nicht in SILAC Medium kultiviert worden waren, durchgeführt. Verglichen wurde wiederum die miR-155 Überexpression gegen die Kontrolle (Leervektor) in 293T Zellen. Die Überexpression wurde bereits für diese Proben überprüft, da dieselben Proben wie für die 2D DIGE Versuche verwendet wurden (siehe Abbildung 3-1). Unter den fünf mittels Western-Blot überprüften Proteinen wurde für alle eine Herunterregulation nachgewiesen (siehe Abbildung 3-9). KIF11 und CKAP5 zeigen dabei die stärkste Herunterregulation und sind nach dem Students t-Test zwischen den vier biologischen Replikaten signifikant herunterreguliert.

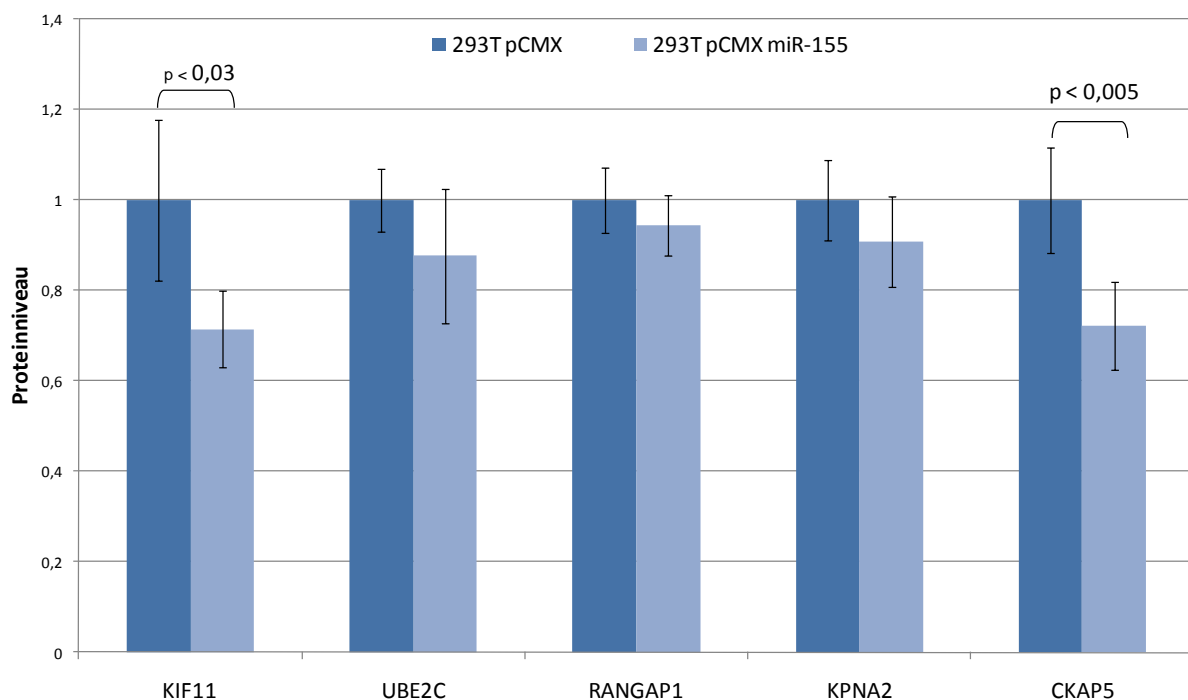


Abbildung 3-9: Validierung von der durch miR-155 Überexpression herunterregulierten Proteine (SILAC-Analyse) durch Western-Blot. Das Proteinniveau von Kontrolle (pCMX-Leervektor) gegen miR-155 überexprimierende 293T Zellen wurde verglichen. Die Blots wurden mittels ImageJ 1.42 ausgewertet und die Bandenintensitäten anhand von GAPDH als *housekeeping* Protein normalisiert. Die Werte für die Kontrolle wurden auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zwischen den vier Messungen. Bei KIF11 und CKAP5 liegen die p-Werte des Students t-Tests unter 0,05 und sind im Graphen vermerkt.

Es konnte gezeigt werden, dass durch das verwendete Western-Blotting System (ECLplex, siehe 2.2.6) auch geringe Regulationsunterschiede statistisch signifikant nachgewiesen werden können. Diese Analyse dient somit zur Validierung der SILAC-Ergebnisse in Hinblick auf Reproduzierbarkeit der relativen Quantifizierung an sich und auch zum Beweis, dass durch die SILAC Medium Bedingungen keine Artefakte entstanden sind.

3.3.4 Funktionelle Untersuchung von miR-155 herunter- und hochregulierten Proteinen mittels Bioinformatik

Zur systematischen Analyse der regulierten Proteine nach ihren biologischen Funktionen wurde eine „Funktionelle Anreicherungs“-Analyse mittels BRM (Shah et al, 2007) durchgeführt. Dabei werden den regulierten Proteinen Funktionen zugeordnet, die den Gruppen (*terms*) der biologischen Prozessen (*biological processes*) nach GO-Annotationen (*gene ontology*; www.geneontology.org) (Ashburner et al, 2000) entsprechen und statistisch überprüft, ob die regulierten Proteine gegenüber der Gesamtheit der Proteine eine Unterscheidung zulassen. Dabei wurden Gruppen nur dann berücksichtigt, wenn mindestens zwei verschiedene Proteine enthalten sind und der p-Wert nach Fishers exaktem t-Test unter einem Wert von 0,01 liegt (siehe Tabelle 3-3).

Biologischer Prozess (GO Benennung)	Protein (HGNC Symbol)	Fishers exakter t-Test (p-Wert)
Intrazellulärer Proteintransport	CENPE; RANGAP1; TMEM97; CAPRIN1	0
Zellteilung	KIF11; HMGCS1; EIF1; CS	0
Kinetochor Anordnung	KIF11; HMGCS1	0
G2 Phase des mitotischen Zellzyklus	HMGCS1; RANGAP1	0
Zentrosom Organisation und Biogenese	RBM12; ABCF2	0
Spindelpolkörper Organisation und Biogenese	RBM12; EIF1	0
Membran Organisation und Biogenese	CENPE; TMEM97	0,0001
Mitose	HMGCS1; EIF1; CS	0,0002
Mikrotubuli basierende Bewegung	KIF11; EIF1	0,002
Zellzyklus	KIF11; EIF1; CS	0,0022
Vesikel vermittelter Transport	CENPE; TMEM97	0,0062

Tabelle 3-3: Funktionelle Anreicherung der durch Überexpression von miR-155 herunterregulierten Proteine in biologischen Prozessen nach GO-Annotationen

Die GO Benennungen für die herunterregulierten Proteine sind in zwei GO Gruppen von besonderer Bedeutung zu unterscheiden und zwar in die Bereiche Zellteilung und Zellzyklus zu dem auch „G2 Phase des mitotischen Zellzyklus“, „Spindelpolkörper Organisation und Biogenese“ sowie „Mitose“ gehören.

Dagegen sind die biologischen Funktionen der hochregulierten Proteine (siehe Tabelle 3-4) metabolischen Prozessen, wie z.B. „Ein-Kohlenstoff Verbindung metabolischer Prozesse“, „Oxidation Reduktion“ und „Mitochondrialer Elektronentransport, NADH zu Ubichinon“ zuzuordnen.

Biologischer Prozess (GO Benennung)	Protein (HGNC Symbol)	Fishers exakter t-Test (p-Wert)
Ein-Kohlenstoff Verbindung metabolischer Prozesse	NDUFS1; PPA2	0
Oxidation Reduktion	PCK2; NDUFS1; NDUF9; SHMT2	0,0001
Mitochondrialer Elektronentransport, NADH zu Ubichinon	CLIC4; NDUF9	0,0002
Sinneswahrnehmung von Geräuschen	PCK2; CLIC4	0,002
Transport	CLIC4; NDUF9; SHMT2	0,0034

Tabelle 3-4: Funktionelle Anreicherung der durch Überexpression von miR-155 hochregulierten Proteine in biologischen Prozessen nach GO-Annotationen

Mittels dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die biologischen Funktionen zwischen den hoch- und herunterregulierten Proteinen unterschiedlich sind und durch die herunterregulierten, potentiellen miR-155 Zielproteine wichtige Prozesse wie Zellzyklus und Zellteilung beeinflusst werden.

3.3.5 miR-155 Bindung an die mRNAs der identifizierten Zielproteine

MikroRNAs üben ihre Wirkung durch die Bindung an die entsprechende mRNA aus. Dabei ist die Bindung nicht komplett komplementär und kann in verschiedenen Bereichen (5'UTR, CDS und 3'UTR) der mRNA stattfinden (Bartel, 2004). Zur Überprüfung der Bindung der in dieser Arbeit durch SILAC-Analyse gefundenen miR-155 Zielproteine bzw. deren mRNA-Abschnitte mit miR-155 wurden folgende Vergleiche durchgeführt: Übereinstimmungen mit bioinformatischen Vorhersagen durch Algorithmen (siehe 3.3.5.1), Wiederfindung der *seed*-Sequenz (7mer-A1, 7mer-m8 und 8mer) in der mRNA (siehe 3.3.5.2) und Anreicherung von 6mer, 7mer oder 8mer Sequenzmotiven unter den regulierten Proteinen bzw. deren mRNAs (siehe 3.3.5.3).

3.3.5.1 Vergleich mit den Kandidatenlisten der Vorhersage-Algorithmen

Die mittels SILAC-Analyse quantifizierten Proteine wurden mit den Kandidatenlisten der Vorhersage-Algorithmen anhand der HGNC Symbole mittels BRM (Shah et al, 2007) verglichen. Es wurden dazu die am häufigsten verwendeten Algorithmen verwendet, die

komplette Listen ihrer vorhergesagten Gene zur Verfügung stellen (RNA22 CDS, 3'UTR und 5'UTR (Miranda et al, 2006), DIANA microT (Maragkakis et al, 2009), PITA (Kertesz et al, 2007), TargetScan (Lewis et al, 2005), PicTar (Lall et al, 2006) und miRanda (Enright et al, 2003)). In Tabelle 3-5 ist gezeigt, dass ein repräsentativer Anteil von vorhergesagten Genen in dem Datensatz der durch SILAC quantifizierten Proteine enthalten ist (zwischen 4,5% und 13,5%; Durchschnitt 8,8%).

	Vorhergesagte Gene (HGNC Symbol)	Übereinstimmung mit SILAC quantifizierten Proteinen [absolut]	Übereinstimmung mit SILAC quantifizierten Proteinen [%]
RNA22 CDS	430	58	13,5
RNA22 3'UTR	317	27	8,5
RNA22 5'UTR	44	2	4,5
DIANA-microT	187	11	5,9
PITA	329	31	9,4
TargetScan	240	25	10,4
PicTar	171	18	10,5
miRanda	836	63	7,5

Tabelle 3-5: Anzahl der in Vorhersage-Algorithmen enthaltenen Zielgene für miR-155 und Übereinstimmung mit den in der SILAC-Analyse quantifizierten Proteinen

Abbildung 3-10 zeigt die Übereinstimmung der durch Vorhersage-Algorithmen erhaltenen Zielgene mit den experimentell gewonnenen SILAC Daten und unterscheidet dabei zwischen herunterregulierten, nicht regulierten und hochregulierten Proteinen.

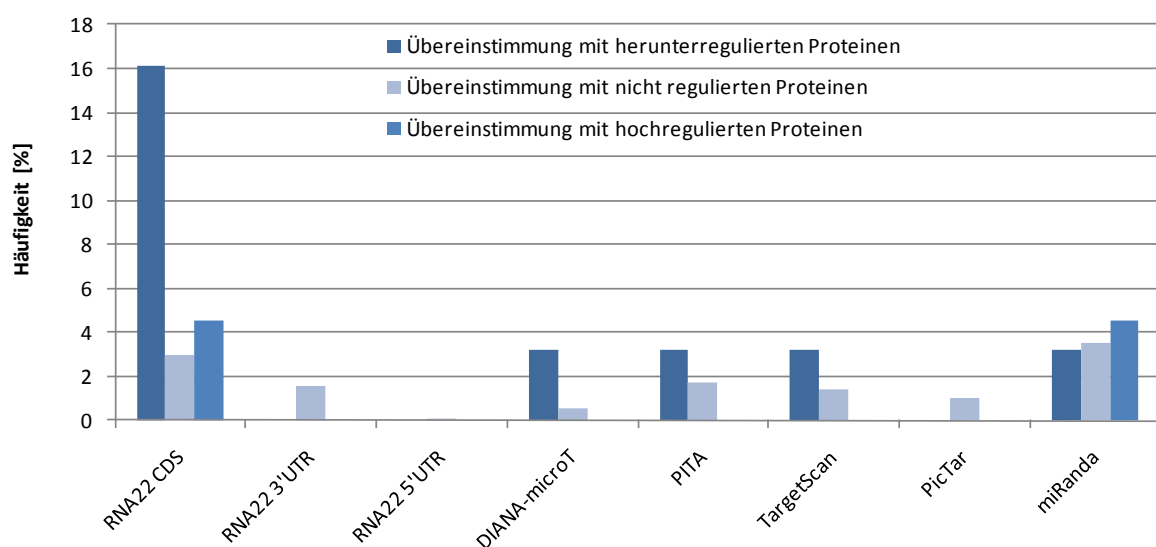


Abbildung 3-10: Vergleich der Kandidaten der Vorhersage-Algorithmen für miR-155 mit den experimentell durch SILAC-Analyse quantifizierten Proteinen. Die prozentuale Häufigkeit der Übereinstimmung zur Gesamtzahl der herunterregulierten, nicht regulierten, hochregulierten Proteinen ist auf der y-Achse angegeben.

Die größte Übereinstimmung ist bei den herunterregulierten, potentiellen Zielproteinen zu erwarten (siehe 1.1.3). Dies trifft auch für DIANA-microT, PITA und TargetScan zu, wobei der Wert bei nur 3% (1 von 31) liegt. Bei miRanda besteht ebenfalls eine 3%ige Übereinstimmung mit den herunterregulierten Proteinen, wobei gleich viel bzw. eine größere Übereinstimmung zu den nicht bzw. hochregulierten Proteinen besteht. Somit ist die Spezifität geringer als bei DIANA-microT, PITA und TargetScan. Das beste Ergebnis liefert RNA22 CDS. Mit 16% (5 von 31) Übereinstimmung mit den experimentellen Daten sowie der deutlich geringeren Übereinstimmung mit den hochregulierten bzw. nicht regulierten Proteinen hat dieses Programm die besten Werte bei Sensitivität und Spezifität in dieser Analyse.

3.3.5.2 Übereinstimmung mit den *seed*-Sequenzen

Bei den *seed*-Sequenz Übereinstimmungen mit den mRNAs der Zielproteine wird nur die Sequenzhomologie berücksichtigt. Im Gegensatz dazu berücksichtigen die Vorhersage-Algorithmen zusätzlich die evolutionäre Konservierung bzw. Bindungsenergien. Deshalb wurde untersucht, wie sich die komplementäre Bindung der *seed*-Sequenz an das Zielgen in den herunterregulierten, nicht regulierten bzw. hochregulierten Proteinen verteilt. Die *seed*-Sequenz ist eine 1 bis 8 Nukleotide umfassende Sequenz, die sich im 5' Bereich der miRNA befindet und komplett komplementär an den entsprechenden Bereich der mRNA bindet. In diesen Untersuchungen wurde zwischen den 5'UTR, CDS und 3'UTR Bereichen der mRNA Sequenzen unterschieden. Zudem wurden die 8mer, 7mer-A1 sowie die 7mer-m8 Sequenzen der miRNA berücksichtigt (siehe 1.1.2). Die bioinformatische Detektion der *seed*-Sequenzen in den verschiedenen mRNA Regionen wurde durch Dr. Agnes Hotz-Wagenblatt der Gruppe Funktionelle Proteomanalyse durchgeführt. Dazu wurden die 5'UTR, CDS und 3'UTR Bereiche der verschiedenen Transkripte aus der Ensembl-Datenbank generiert und nach Übereinstimmung mit den *seed*-Sequenzen überprüft (siehe 2.2.10.3). Die resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 3-11 gezeigt.

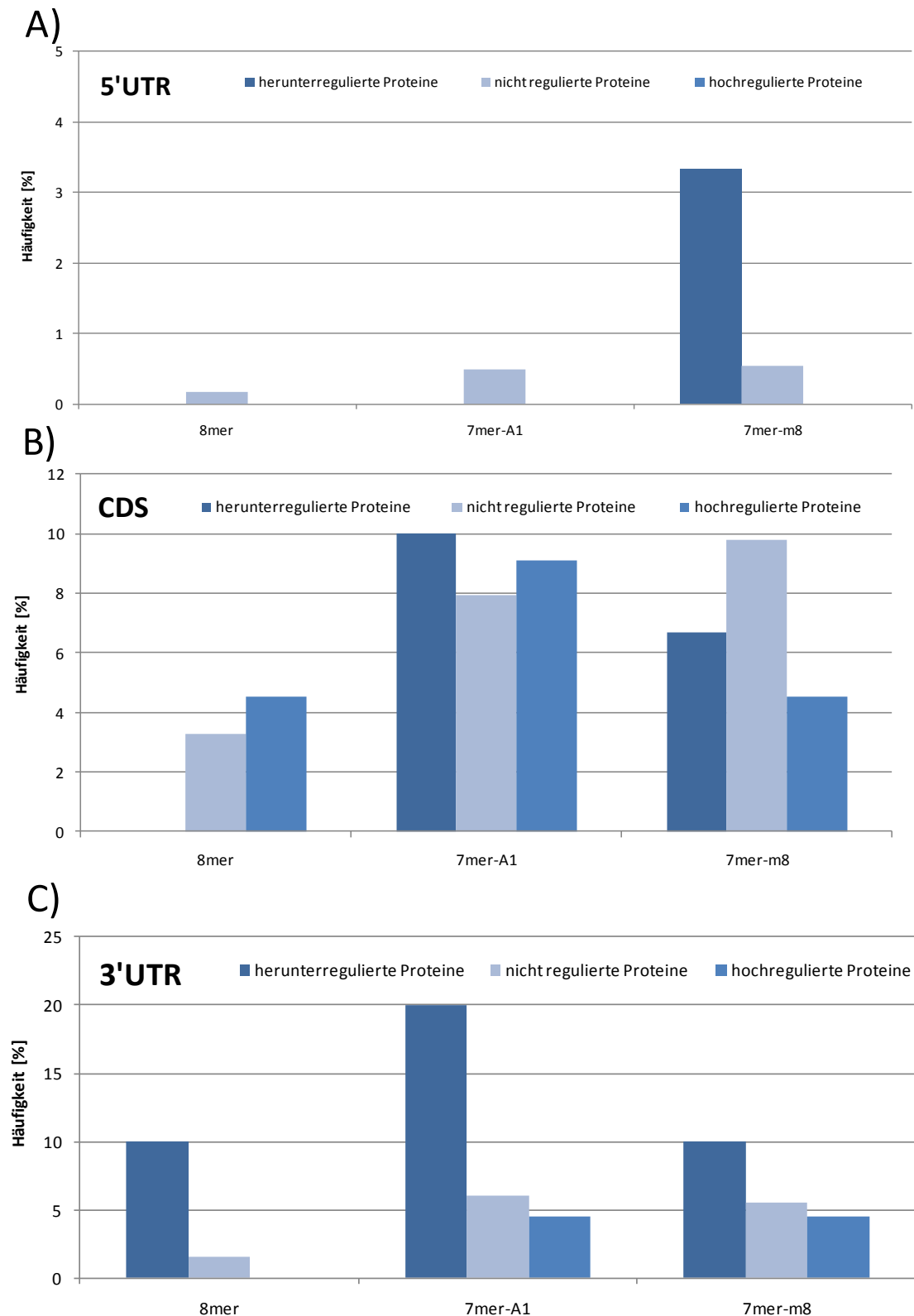


Abbildung 3-11: Übereinstimmung der *seed*-Sequenzen (8mer, 7mer-A1 und 7mer-m8) von miR-155 im 5'UTR, CDS und 3'UTR Bereich der mRNAs der durch SILAC-Analyse quantifizierte Proteine (unterteilt in herunterregulierte, nicht regulierte und hochregulierte Proteine). Die Häufigkeit der Übereinstimmung im Vergleich zur Gesamtzahl ist angegeben: A) Übereinstimmung der *seed*-Sequenzen im 5'UTR Bereich, B) Übereinstimmung der *seed*-Sequenzen im CDS Bereich, C) Übereinstimmung der *seed*-Sequenzen im 3'UTR Bereich

In Abbildung 3-11 C) ist zu erkennen, dass die *seed*-Sequenz Übereinstimmungen im 3'UTR für alle drei *seed*-Sequenzen (8mer, 7mer-A1 und 7mer-m8) deutlich zwischen herunterregulierten und nicht regulierten bzw. hochregulierten Proteinen unterscheiden lassen (3, 6 bzw. 3 Übereinstimmungen von 30). Dabei zeigt die 8mer Sequenz die höchste Spezifität und 7mer-A1 die höchste Sensitivität.

Die Abbildung 3-11 A) und B) zeigen, dass für die *seed*-Sequenzen in diesen Bereichen keine solche Sensitivität oder Spezifität erreicht werden kann. Die 7mer-m8 zeigt zwar für den 5'UTR Bereich eine gute Spezifität, aber keine gute Sensitivität (1 von 30). Gegenätzlich ist es bei den 7mer-A1 und 7mer-m8 *seed*-Sequenzen in der CDS, die eine gute Sensitivität, aber keine gute Spezifität (6 bzw. 4 von 30) aufweisen.

3.3.5.3 Anreicherung von Sequenzmotiven mittels Sylamer-Analyse

Bei der Sylamer-Analyse (van Dongen et al, 2008) werden die quantifizierten Proteine anhand ihrer Regulationsstärke sortiert, wobei die am stärksten herunterregulierten Proteine (Zielproteine) einen Wert von 1 haben. Dabei können mehrere 5'UTR, CDS oder 3'UTR Sequenzen aufgrund von Transkriptvarianten einem Protein zugeordnet sein. Der Anreicherungsfaktor der Sequenzmotive berechnet sich anhand der Ziel-Sequenzlänge und der zufälligen Wahrscheinlichkeit (siehe 2.2.10.4). Bei einer Anreicherung von Sequenzen mit miR-155 Sequenzübereinstimmungen wäre ein Maximum für diese Motive in der Nähe des Ursprungs (1) zu erwarten. Abbildung 3-12 zeigt eine solche Untersuchung für miR-155 und den verschiedenen Sequenzabschnitten (3'UTR, 5'UTR und CDS) sowie den Sequenzmotivlängen (6, 7 und 8mer).

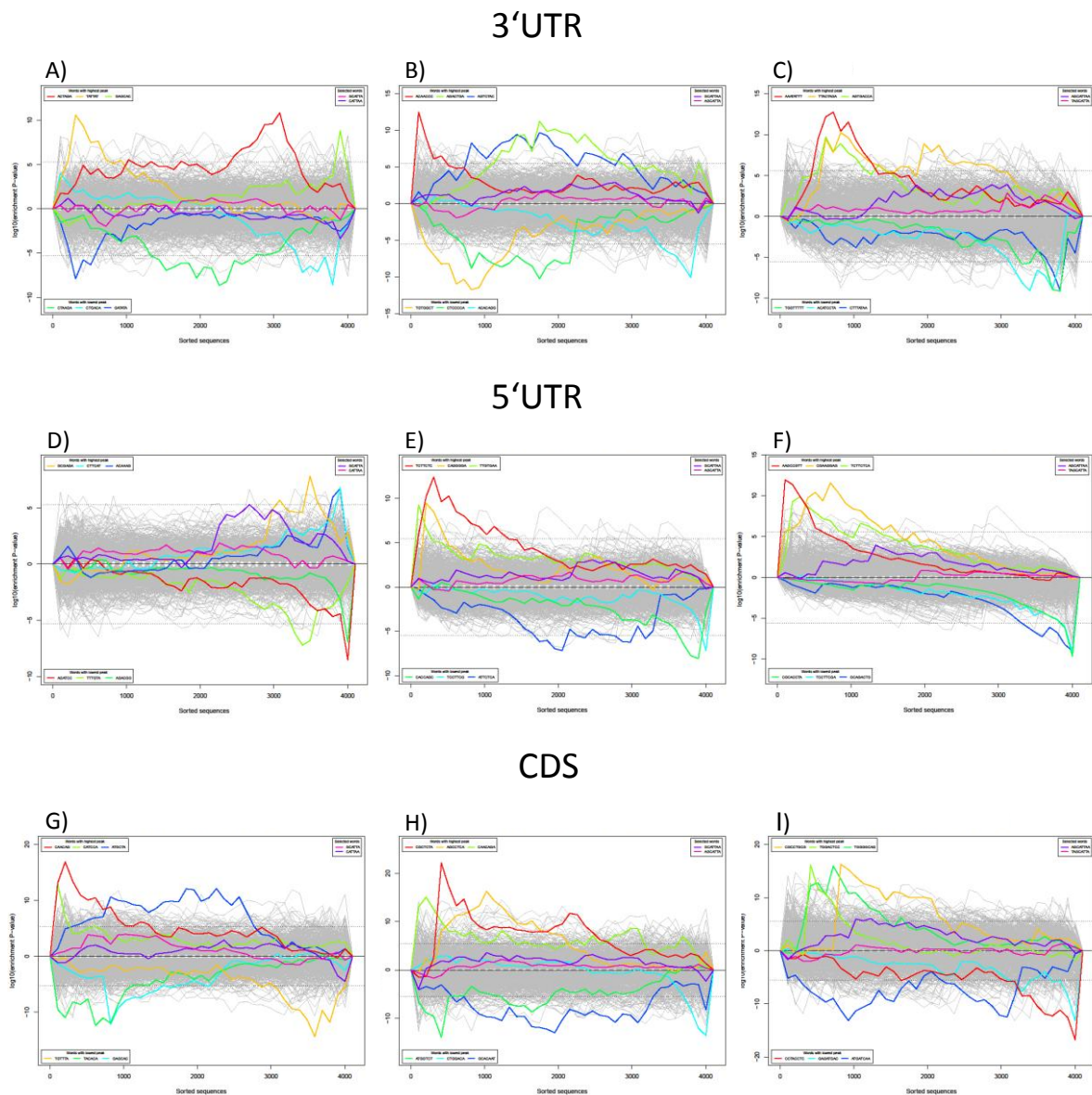


Abbildung 3-12: Sequenzmotiv-Anreicherung für miR-155 der nach Regulationsstärke sortierten Zielproteine mittels Sylamer-Analyse: A) bis C) Verwendung von 3'UTR D) bis F) 5'UTR und G) bis I) CDS Sequenzen, sowie Berücksichtigung von 6mer (A), D), G)), 7mer (B), E), H)) und 8mer (C), F), I)) Sequenzmotiven. x-Achse: sortierte Liste nach Regulationsstärke; y-Achse: Anreicherungsfaktor

Die Sylamer-Auswertung deutet darauf hin, dass es für die durch SILAC-Analyse generierten Daten keine Anreicherung von Sequenzmotiven nach der Regulationsstärke gibt. Weder die häufigsten Sequenzmotive noch die miR-155 Sequenzmotive heben sich aus dem „Rauschen“ hervor. Dies lässt darauf schließen, dass die durch miR-155 bedingte Regulation auf Proteinebene unabhängig von der Regulationsstärke ist bzw. miR-155 Zielproteine nicht durch Sequenzmotivübereinstimmungen charakterisiert werden.

3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit Transkriptomik-Daten

In Tabelle 3-6 sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen von miR-155 Zielproteinen zusammengefasst (siehe 3.3.2, 3.3.3 und 3.3.5) und mit den mRNA Expressionsniveau-Daten (qRT-PCR), welche durch die Gruppe von Dr. Armin Pscherer zu Verfügung gestellt worden waren, verglichen. Dabei wurden die 14 Proteine ausgewählt, die neben einer Herunterregulation durch SILAC-Analyse entweder ebenfalls eine Herunterregulation des Proteinniveaus durch Western-Blot, oder des mRNA-Niveaus durch qRT-PCR aufweisen oder eine Bindung der miRNA an die Zielsequenz durch Vorhersage-Algorithmen oder *seed*-Sequenz Übereinstimmungen zeigen.

HGNC Symbol _a	Proteinniveau		mRNA-Niveau	Bindung der miRNA an die Zielsequenzen	
	SILAC _b	Western-Blot _b	qRT-PCR _b	Vorhersage-Algorithmen _c	<i>seed</i> -Sequenz Übereinstimmung
PCM1	0,54	-	0,99 [#]		CDS 7mer-m8
FAM115A	0,68	-	1,05 [#]		CDS 7mer-m8
KIF11	0,69	0,7**	1,07		CDS 7mer-A1
HMGCS1	0,69	-	0,87*	PITA, RNA22-CDS	3'UTR 8mer
RBM12	0,71	-	-		5'UTR 7mer-m8
FAM3C	0,72	-	-	RNA22-CDS	3'UTR 7mer-A1; CDS 7mer-A1
UBE2C	0,74	0,84	0,95		
SEC24C	0,78	-	0,9**		
RANGAP1	0,83	0,91	1,04		
CENPF	0,84	-	1,21**	miRanda	
KPNA2	0,84	0,9	1,08		
CKAP5	0,86	0,74**	0,93	TargetScan, DIANA, RNA22-CDS	3'UTR 8mer
CS	0,88	-	-	RNA22-CDS	3'UTR 7mer-A1
SFXN1	0,89	-	1,14	RNA22-CDS	CDS 7mer-A1

Tabelle 3-6: Zusammenfassung der Ergebnisse von durch miR-155 Überexpression herunterregulierten Proteinen in 293T Zellen. Western-Blot (vier biologische Replikate), qRT-PCR (drei biologische Replikate); _a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org); _b: Verhältnis miR-155 überexprimierende 293T Zellen zu Kontroll Zellen (pCMX-Leervektor); _c: verwendete Vorhersage-Algorithmen: RNA22 CDS, 5'UTR, 3'UTR, miRanda, TargetScan, Pictar, DIANA microT, PITA; *: Students t-Test p-Wert < 0,1; **: Students t-Test p-Wert < 0,05; #: nur eine qRT-PCR Messung, deshalb kein Students t-Test p-Wert möglich; fett: Übereinstimmung zwischen SILAC und Western-Blot bzw. qRT-PCR

Beim Vergleich der Proteinniveaus wird deutlich, dass zwischen SILAC-Analyse und Western-Blot Analyse die Daten gut korrelieren. Eine Abweichung dieser Werte ist mit der Qualität der verwendeten Antikörper verbunden bzw. der Tatsache, dass Isoformen, die eventuell nur von einer Methode erfasst werden, zu Abweichungen führen können. Beim Vergleich der Proteinniveaus mit den Werten für die mRNA-Expression fällt auf, dass mit den Ausnahmen SEC24C und HMGCS1 auf mRNA-Niveau keine Herunterregulation vorliegt.

Zudem ist die Regulation auf mRNA-Ebene wesentlich schwächer ausgeprägt als auf Proteinebene. Bei CENPF zeigt das mRNA-Niveau sogar eine gegenteilige Regulation zum Proteinniveau. Es ist also festzustellen, dass einer Regulation von miR-155 auf Proteinniveau keine Regulation auf mRNA-Niveau zugrunde liegt. Des Weiteren dient der Vergleich mit den Daten der Vorhersage-Algorithmen und den *seed*-Sequenz Übereinstimmungen dazu, ein Indiz zu erhalten, ob eine Bindung der entsprechenden mRNA mit miR-155 vorliegt. Dies lässt Schlussfolgerungen zu, ob das entsprechende Protein ein primäres miR-155 Ziel ist oder ob es sich um sekundäre Effekte durch miR-155 Überexpression handelt. Zehn der insgesamt 33 herunterregulierten Proteine zeigen eine Bindung von miR-155 an deren mRNA. Von den 23 herunterregulierten Proteinen, die keine Übereinstimmung mit den Vorhersage-Algorithmen oder *seed*-Sequenz haben, konnten drei auf Proteinebene durch Western-Blot (UBE2C, RANGAP1, KPNA2) und eins auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR (SEC24C) bestätigt werden. Durch Vergleich des Bindungsbereichs der miRNA im 5'UTR, CDS oder 3'UTR lassen sich den einzelnen Zielproteinen unterschiedliche Bindungsbereiche zuordnen. So zeigt z.B. CKAP5 durch TargetScan und DIANA microT eine Bindung im 3'UTR an, die durch die *seed*-Sequenz Übereinstimmung im 3'UTR durch ein 8mer bestätigt wird. SFXN1 hat dagegen eine Bindung in der CDS, welche durch RNA22-CDS und einer 7mer-A1 *seed*-Sequenz Übereinstimmung bestätigt wird. Andere Ergebnisse sind teils widersprüchlich, aber es lässt sich nicht ausschließen, dass es auch Bindungen in unterschiedlichen Bereichen (CDS und 3'UTR) geben kann.

3.3.7 Vergleich der miR-155 herunterregulierten Proteine in 293T und HeLa Zellen

Für einzelne mikroRNA Zielproteine ist bereits beschrieben, dass der biologische Kontext, sprich die verwendete Zelllinie einen Einfluss auf die potentiellen miRNA Zielproteine hat (Inomata et al, 2009). Im großen Ansatz mit mehreren hundert quantifizierten Proteinen wurde dies bislang nicht untersucht. Deshalb wurde in dieser Arbeit die durch SILAC-Analyse bei miR-155 Überexpression herunterregulierten Proteine in 293T Zellen mit den durch pSILAC (*pulsed* SILAC) quantifizierten Proteinen in HeLa Zellen (Selbach et al, 2008) verglichen.

Die 33 durch miR-155 Überexpression herunterregulierten Proteine in 293T Zellen wurden mit den veröffentlichten Daten (<http://psilac.mdc-berlin.de/>) zu miR-155 in HeLa Zellen anhand der IPI Nummern verglichen (siehe Abbildung 3-13).

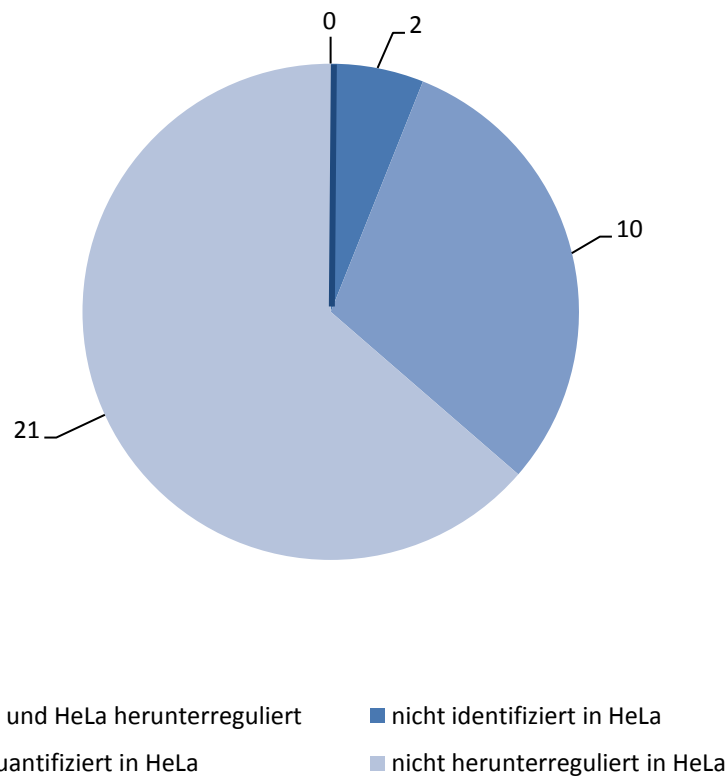


Abbildung 3-13: Vergleich der durch miR-155 Überexpression herunterregulierten Proteine in 293T (eigene Untersuchungen) und HeLa Zellen (Selbach et al, 2008)

Kein Protein wurde übereinstimmend in beiden Zelllinien als herunterreguliert detektiert, obwohl 21 der 33 in 293T Zellen herunterregulierten Proteine ebenfalls in HeLa quantifiziert wurden. Zehn Proteine wurden, wegen zu wenigen Messpunkten, in HeLa nicht quantifiziert und zwei Proteine nicht identifiziert. Anhand dieser Daten kann geschlussfolgert werden, dass ein Großteil der miRNA Zielproteine Zelllinien-spezifisch ist und es deshalb nötig ist, miRNA-Zielprotein Untersuchungen in der entsprechenden Zelllinie durchzuführen. Da im Gegensatz zu den hier beschriebenen Experimenten bei Selbach et al kein Vektorkonstrukt zur Überexpression von miR-155 verwendet wurde, sondern synthetische miRNAs zum Einsatz kamen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass daraus Unterschiede resultieren. Zur Verwendung von verschiedenen miRNA Überexpressionsmethoden und deren eventuellen spezifischen Zielproteinmustern gibt es zurzeit keine veröffentlichten Untersuchungen.

3.4 Identifizierung von miR-15a und miR-16-1 regulierten Proteinen in Granta-519 mittels SILAC-Analyse

Wie für miR-155 durch Vergleich der eigenen Ergebnisse in 293T Zellen mit publizierten Zielprotein-Untersuchungen von miR-155 in HeLa gezeigt werden konnte (siehe 3.3.7), zeigen mikroRNAs in verschiedenen Zelllinien ein unterschiedliches Zielprotein-Profil auf. Daher ist es von Bedeutung, Zielproteine in einer Zelllinie zu untersuchen, die der Entität von Interesse zugeordnet ist. Da in unserem Fall die Wirkung der beiden mikroRNAs miR-15a und miR-16-1 in der Mantelzelllymphom Entität untersucht werden sollte, wurde eine entsprechende MCL Zelllinie (Granta-519) verwendet.

3.4.1 Experimenteller Aufbau und Überprüfung

Zur Identifizierung von miR-15a und miR-16-1 Zielproteinen wurde die Mantelzelllymphom Zelllinie Granta-519 (Jadayel et al, 1997) verwendet, die eine Deletion der chromosomalen Lokalisation von miR-15a und miR-16-1 aufzeigt (Kohlhammer et al, 2004; Korz et al, 2002). Diese Zelllinie lässt sich zwar nur mit geringer Effizienz transfizieren, aber durch die stabile Überexpression von miR-15a und miR-16-1 in dieser Zelllinie, die in der Gruppe von Dr. Armin Pscherer durchgeführt wurde, konnte diese Zelllinie verwendet werden. Abbildung 3-14 zeigt die Überprüfung der miR-15a bzw. miR-16-1 Überexpression in Granta-519.

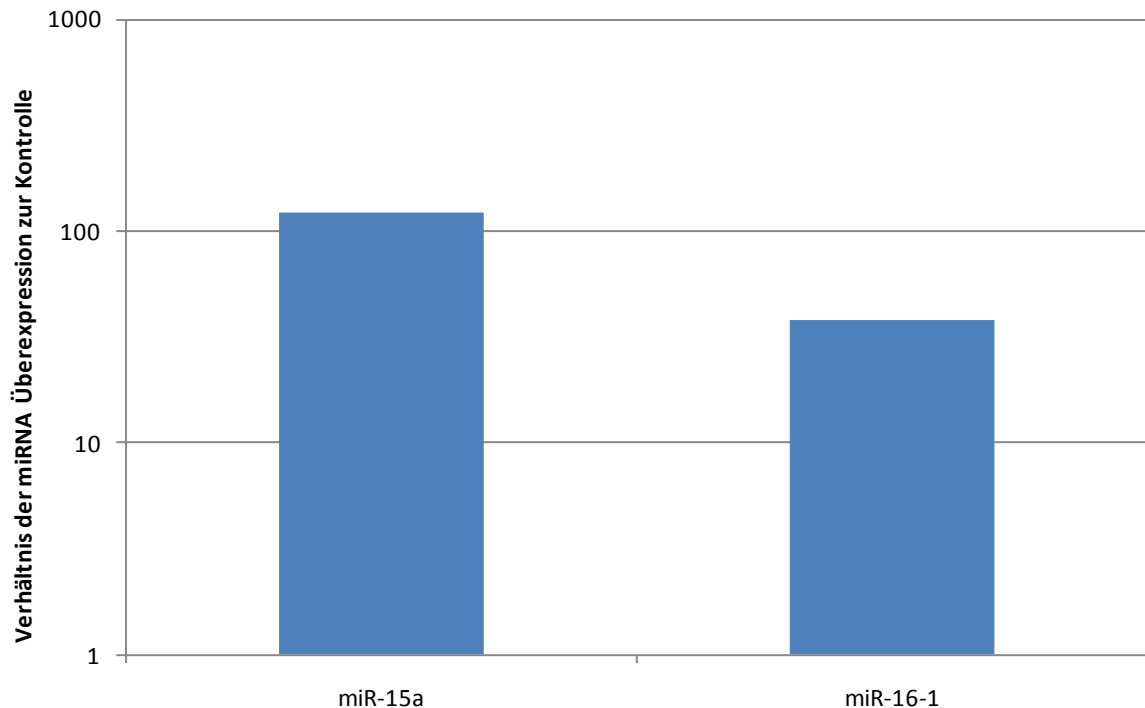


Abbildung 3-14: Kontrolle der Überexpression von miR-15a bzw. miR-16-1 in stabilen Granta-519 Zellen mittels qRT-PCR. Dabei wurde das Niveau der reifen miR-15a bzw. miR-16-1 bestimmt und anhand der *housekeeping* Gene U6 und S5 normalisiert. Die miRNA-Niveaus der stabilen Zellklone wurden ins Verhältnis zur Kontrolle (G71) gesetzt, welche nur die Selektionskassette enthält; y-Achse: logarithmische Darstellung der Verhältnisse

Die Expression von miR-15a ist gegenüber der Kontrolle ca. 40fach erhöht und die von miR-16-1 sogar über 100fach.

Obwohl ein Selektionssystem eingesetzt wurde, das die Integration der miRNAs nur in einem spezifischen Bereich des Genoms garantieren sollte, fand die Integration von miR-15a bzw. miR-16-1 unspezifisch statt. Dabei stellt Granta-519 die Standard-Zelllinie dar und G71 ist ein Klon der Granta-519 Zelllinie, in dem die Selektionskassette ortsspezifisch integriert wurde und der Ausgangspunkt für die Integration von miR-15a bzw. miR-16-1 war.

Um einen Effekt durch den Unterschied zwischen G71 und Granta-519 auszuschließen, wurden zwei Gelspuren (24 Gelstücke) à 300 µg Protein mittels nanoHPLC ESI-MS/MS analysiert (siehe 2.2.8). Die erhaltenen 48 Rohdatensätze wurden mittels MaxQuant 1.0.12.31 ausgewertet (siehe 2.2.8.4.2). 1881 Proteine konnten quantifiziert werden. In Abbildung 3-15 ist die Verteilung der Proteinniveau-Verhältnisse zwischen G71 und Granta-519 anhand der Anzahl an Proteinen gezeigt.

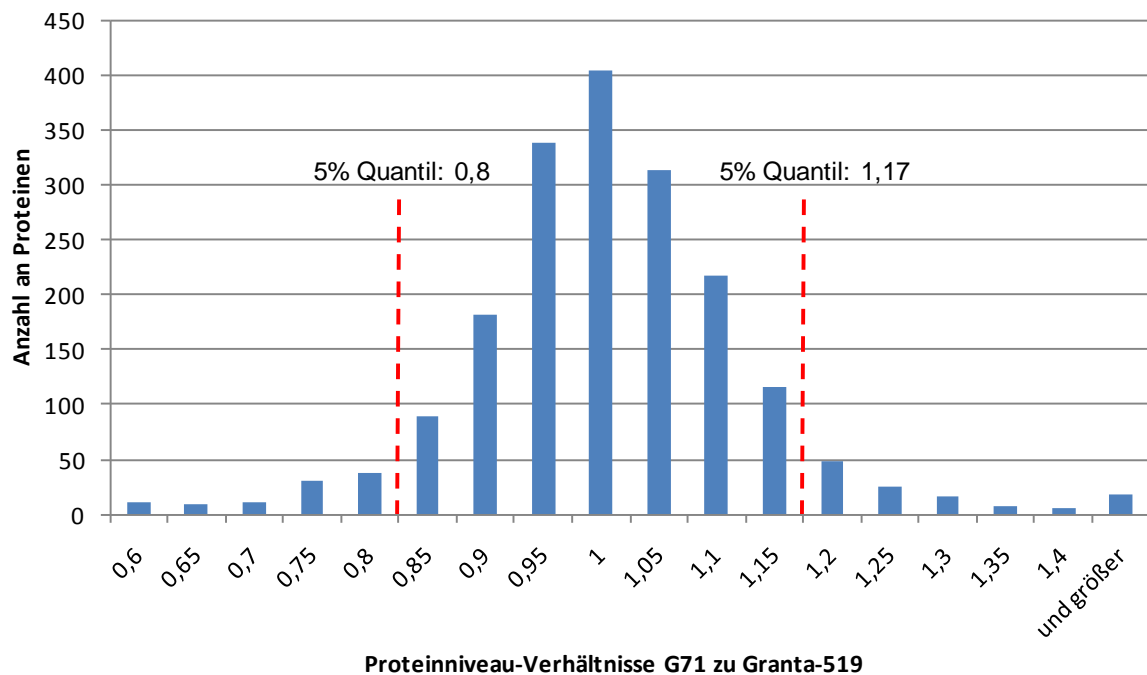


Abbildung 3-15: Verteilung der Proteinniveau-Verhältnisse zwischen G71 und Granta-519. Histogramm der Verhältnisse mit der Anzahl an Proteinen. Die Werte für die beiden 5% Quantile sind jeweils angegeben.

Die meisten Proteine (90%), gezeigt anhand der Grenzen für die 5% Quantile der herunter- bzw. hochregulierten Proteine, befinden sich um 1, was darauf hindeutet, dass es nur geringe Unterschiede im Proteinniveau zwischen G71 und Granta-519 gibt. Es ist darauf zu achten, dass die Unterschiede zu den miRNA überexprimierenden Zellen größer sind als die hier gezeigten Quantil-Werte. Da es nur einen geringen Unterschied zwischen G71 und Granta-519 im Proteinniveau gibt, wurden in den SILAC-Analysen miR-15a bzw. miR-16-1 stabil überexprimierende Zellen mit dem endogenen miR-15a bzw. miR-16-1 Expressionsniveau in Granta-519 verglichen.

3.4.2 miR-15a regulierte Proteine in Granta-519 mittels SILAC-Analyse

Regulierte Proteine sollen durch den Vergleich von miR-15a Überexpression (stabil) in Granta-519 mit dem endogenen miR-15a Niveau in Granta-519 mittels SILAC-Analyse identifiziert werden. Die Etablierung der stabilen Klone, die Zellkultivierung sowie Zellernte und Zählung (siehe 2.2.1) wurden durch die Gruppe von Dr. Armin Pscherer durchgeführt. Die anschließenden Schritte wurden analog zu 3.4.1 durchgeführt. In den 49 erhaltenen Rohdatensätzen konnten 2087 Proteine quantifiziert werden. Davon sind 281 Proteine mit einem „Signifikanz B“-Wert von weniger als 5% reguliert. Von diesen 281 Proteinen sind 136 (6,5% der quantifizierten Proteine) herunter- und 145 hochreguliert. Der „Signifikanz B“-Wert von weniger als 5% ($< 0,05$) wurde gewählt, da bei diesem Vergleich viele und auch

starke Proteinniveau-Unterschiede auftraten. Eine Grenze von 1% würde zu viele regulierte Proteine ausschließen. Es wurde somit eine Regulation für die herunterregulierten Proteine von 0,75 oder niedriger und von 1,55 oder höher für die hochregulierten Proteine berücksichtigt. Diese Werte liegen außerhalb der in Abbildung 3-15 gezeigten Grenzen und sind damit keine Effekte, die aufgrund des Unterschieds zwischen Granta-519 und dessen Selektionsklon G71 entstanden sind. In Tabelle 6-3 und Tabelle 6-5 (siehe Anhang) sind alle durch miR-15a in Granta-519 regulierten Proteine dargestellt. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit zwischen den beiden wechselseitig markierten biologischen Replikaten wurde der Pearson-Korrelationsfaktor bestimmt. Für die 1212 in beiden Replikaten quantifizierten Proteine ist der Faktor 0,44. Ohne die möglichen Kontaminationen und Isoformen, d.h. durch Ausschluss der Quantifizierungen mit einer Varianz von über 50% (siehe 3.3.2), ist der Korrelationsfaktor für die 1090 Proteine 0,9 und damit nah am Idealwert von 1.

3.4.3 miR-16-1 regulierte Proteine in Granta-519 mittels SILAC-Analyse

Die Versuche wurden analog zu 3.4.2 durchgeführt, allerdings wurde 100 µg Protein für die SDS-PAGE eingesetzt. Es wurden 56 Rohdatensätze analysiert. Daraus konnten 1903 Proteine quantifiziert werden, 241 davon zeigten eine Regulation. Darunter sind 127 (6,7%) der quantifizierten Proteine herunterreguliert und 114 (6%) hochreguliert. Die Regulationsgrenzen befinden sich dabei unter 0,73 und über 1,39. Damit sind die Regulationsgrenzen ober- bzw. unterhalb der in Abbildung 3-15 gezeigten Grenzen. In Tabelle 6-4 und Tabelle 6-6 (siehe Anhang) sind alle durch miR-16-1 Überexpression regulierten Proteine gezeigt.

Sowohl bei miR-15a als auch bei miR-16-1 sind mehr Proteine herunterreguliert als bei miR-155 in 293T Zellen und diese Regulationen sind zudem stärker ausgeprägt. Dies ist auf die stabil miRNA überexprimierenden Zellen zurückzuführen, bei denen die mikroRNAs über einen längeren Zeitraum ihre Wirkung entfalten können und im Gegensatz dazu miR-155 nach der transienten Transfektion nur für 48 Stunden in 293T Zellen wirken kann. Allerdings ist das Verhältnis bei miR-15a und miR-16-1 zwischen herunter- und hochregulierten Proteinen in etwa 1:1 und damit nicht wie bei miR-155 3:2. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit zwischen den beiden wechselseitig markierten biologischen Replikaten wurde erneut der Pearson-Korrelationsfaktor bestimmt. Für die 1155 in beiden Replikaten quantifizierten Proteine liegt der Faktor 0,61 und für die quantifizierten Proteine mit einer Varianz unter 50% (siehe 3.3.2) (1115 Proteine) bei 0,94.

3.4.4 Gemeinsam bzw. einseitig durch miR-15a bzw. miR-16-1 herunterregulierte Proteine in Granta-519

Aufgrund der ähnlichen Sequenz von miR-15a und miR-16-1 ist zu erwarten, dass es viele gemeinsame Zielproteine von miR-15a und miR-16-1 gibt. Um dies zu überprüfen, wurden die 1714 Proteine herangezogen, die sowohl im SILAC-Experimenten für miR-15a (siehe 3.4.2) als auch für miR-16-1 (siehe 3.4.3) quantifiziert werden konnten. Aus diesen 1714 Proteinen ist in

Abbildung 3-16 die Anzahl der jeweils nur durch miR-15a (siehe Tabelle 6-8; Anhang) oder nur durch miR-16-1 (siehe Tabelle 6-7; Anhang) herunterregulierten Proteine sowie die Anzahl der durch beide miRNAs herunterregulierten Proteine dargestellt.

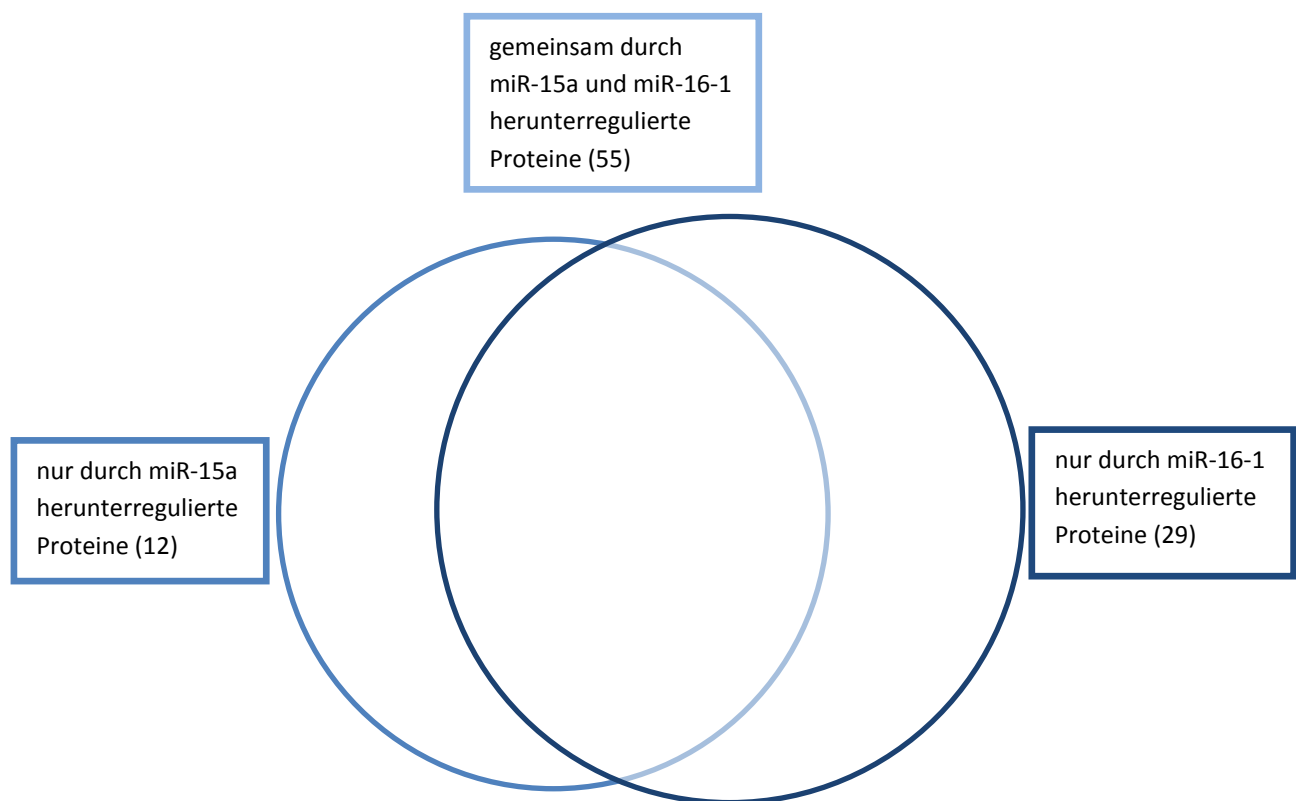


Abbildung 3-16: Venn-Diagramm der durch Überexpression von miR-15a und miR-16-1 herunterregulierten Proteine. Alle dazu herangezogenen Proteine wurden in beiden Versuchen quantifiziert, aber ggf. nur durch eine miRNA signifikant reguliert

Mit 55 Proteinen (57%) ist ein Großteil der durch miR-15a oder miR-16-1 herunterregulierten Proteine durch beide miRNAs beeinflusst. Zwölf Proteine (13%) werden nur durch miR-15a herunterreguliert und 29 Proteine (30%) nur durch miR-16-1. Darunter

sind z.B. die Proteine TCL1A, CDC2, CENPF und TOP2A nur durch miR-16-1 und z.B. PDCD4 nur durch miR-15a herunterreguliert (siehe Tabelle 6-7 und Tabelle 6-8 im Anhang für vollständige Listen). Die gemeinsam durch miR-15a bzw. miR-16-1 regulierten Proteine korrelieren mit einem Pearson-Faktor von 0,95 sehr gut und besser als alle gemeinsam quantifizierte Proteine (Pearson-Faktor 0,79). Es zeigt sich also, dass trotz vieler gemeinsam regulierter Proteine dennoch auch miRNA spezifische Zielproteine detektiert werden können.

3.4.5 Validierung der Zielproteine von miR-15a und miR-16-1 mittels Western-Blot

Wie bereits in 3.3.3 für miR-155 gezeigt, wurden die Ergebnisse aus der SILAC-Analyse mittels Western-Blot validiert. Dabei wurden KPNA2, PDCD5IP und MATR3 als herunterregulierte Proteine und ANXA5 als hochreguliertes Protein untersucht.

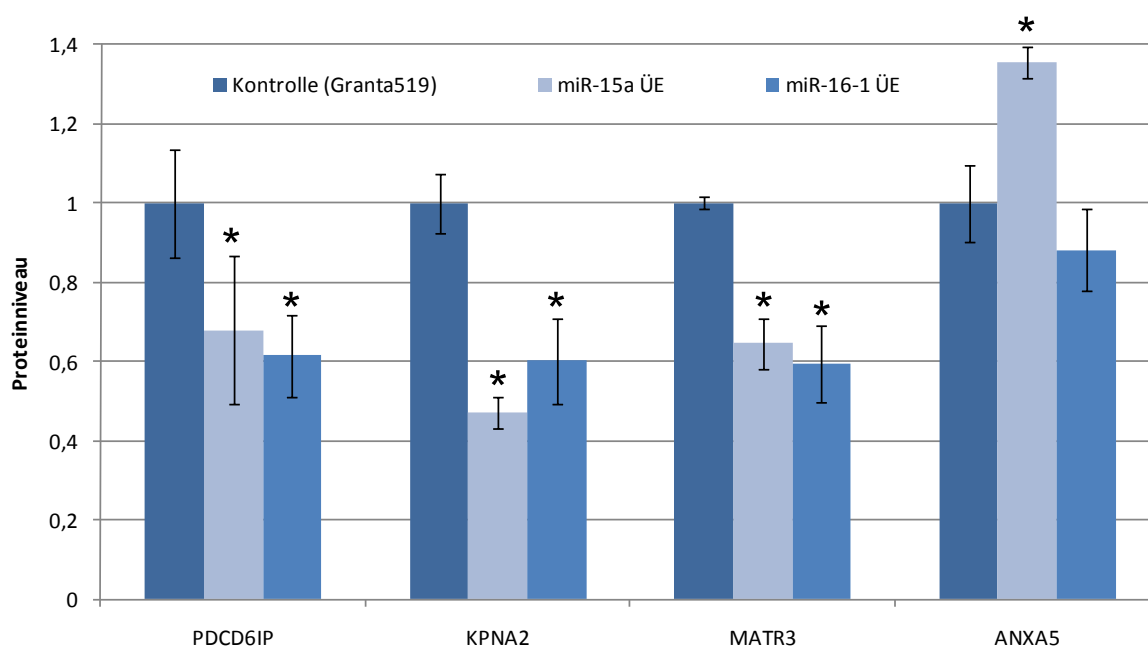


Abbildung 3-17: Western-Blot Validierung der durch Überexpression von miR-15a und miR-16 regulierten Proteine. Das Proteinniveau von Kontrolle (Granta-519) und miR-15a bzw. miR-16-1 Überexpression wurde verglichen. Die Blots wurden mittels ImageJ 1.42 ausgewertet und die Bandenintensitäten anhand von GAPDH bzw. Tubulin als *housekeeping* Proteine normalisiert. Die Werte für die Kontrolle wurden jeweils auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zwischen den Messungen der drei biologischen Replikate; *: Students t-Tests unter 0,05; ÜE: Überexpression

PDCD6IP ist ein Beispiel für ein Protein, das durch beide miRNAs gleichermaßen in der SILAC-Analyse als herunterreguliert gefunden wurde, was auch durch Western-Blot Analyse

bestätigt wird. KPNA2 ist in der SILAC-Analyse nur durch miR-16-1 herunterreguliert. Im Western-Blot dagegen zeigt KPNA2 durch beide miRNAs eine Herunterregulation. Da eine überlappende Anzahl an Peptiden in der SILAC-Analyse für miR-15a und miR-16-1 quantifiziert wurde und der Antikörper gegen das komplette Protein hergestellt wurde, ist dieser Sachverhalt nicht zu erklären. MATR3 ist in der SILAC-Analyse nur durch miR-16-1 signifikant herunterreguliert und durch miR-15a zwar auch herunterreguliert, aber nicht signifikant. Durch Western-Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass auch miR-15a MATR3 herunterreguliert. ANXA5 ist ein Beispiel für ein hochreguliertes Protein. In der SILAC-Analyse zeigten beide miRNAs eine Hochregulation. Im Western-Blot konnte dies nur für miR-15a verifiziert werden. Der Antikörper gegen CASP1, ebenfalls ein durch beide miRNAs hochreguliertes Protein, zeigte kein Signal in Granta-519 Zellen. CDK2, das durch miR-16-1 herunterreguliert ist, konnte aufgrund von mehreren Banden im Western-Blot nicht verlässlich quantifiziert werden. Die Western-Blot Validierung bestätigt zwar alle durch SILAC-Analyse gefundenen Regulationen, allerdings gibt es Unterschiede in der miRNA spezifischen Regulation. Zudem zeigt diese Validierung erneut, dass die durch SILAC-Analyse gefundenen Regulationen unabhängig vom verwendeten Medium (SILAC-Medium) sind.

3.4.6 miRNA Bindung an die mRNAs der identifizierten Zielproteine

Da mikroRNAs ihre Funktion durch die Bindung an die entsprechende mRNA ausüben, wurden die folgenden Analysen analog zu 3.3.5 durchgeführt.

3.4.6.1 Vergleich mit den Kandidatenlisten der Vorhersage-Algorithmen

Die Übereinstimmung der gefunden miRNA Zielproteine (herunterregulierte Proteine) wurde mit den Daten aus den Vorhersage-Algorithmen abgeglichen. Bei den Vorhersage-Algorithmen ist anzumerken, dass sie aufgrund der gleichen *seed*-Sequenz von miR-16-1 und miR-16-2 zwischen diesen beiden miRNAs nicht unterscheiden. Zudem sind bei TargetScan nur gemeinsame Daten für miR-15 und miR-16 möglich, da die miR-15a, miR-15b und miR-16-1 sowie miR-16-2 eine ähnliche *seed*-Sequenz aufweisen. Bei miRanda ist die Besonderheit, dass auch der *passenger* Strang (siehe 1.1.1) berücksichtigt wird, welcher bei miR-16-1 auch den von miR-16-2 enthält.

Viele Vorhersage-Algorithmen geben für miR-15a und miR-16 Listen mit großen Übereinstimmungen heraus (siehe Abbildung 3-18).

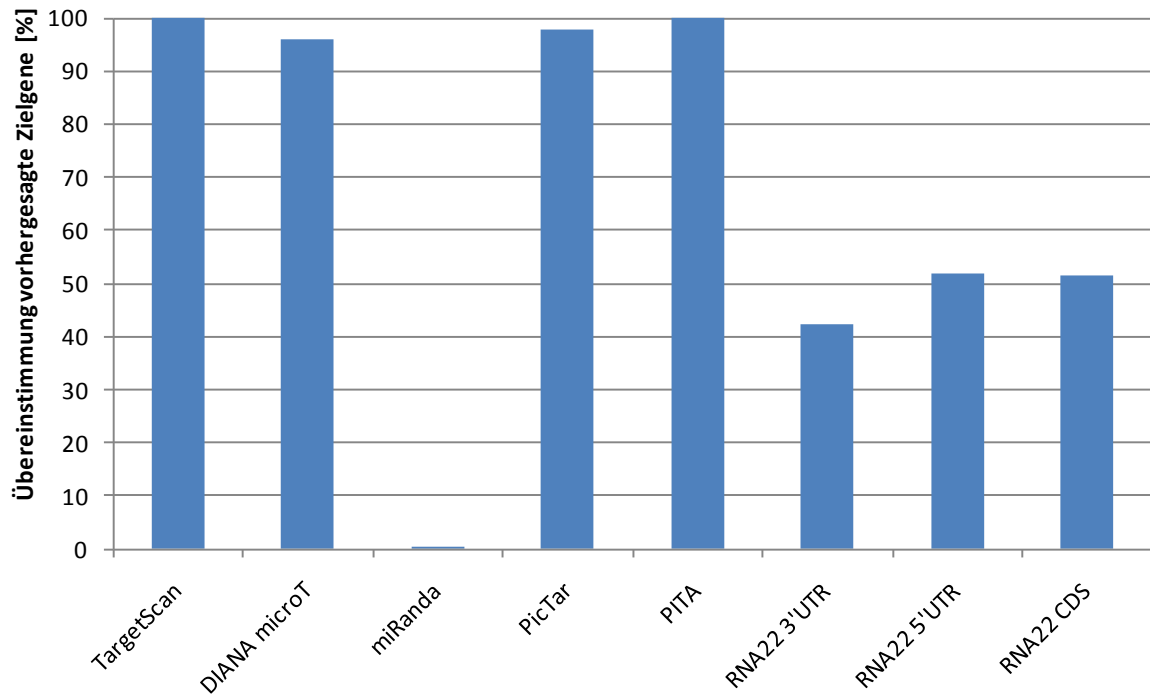


Abbildung 3-18: Übereinstimmung für miR-15a und miR-16 vorhergesagten Zielgene. Es wurde jeweils der prozentuale Wert der Übereinstimmung anhand der miRNA mit den meisten vorhergesagten Zielgenen berechnet.

Für miRanda existiert so gut wie keine Übereinstimmung, da für miR-15a nur 33 Zielgene vorhergesagt werden und für miR-16 1659 Zielgene. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen TargetScan, DIANA microT, PicTar, PITA auf der einen Seite (annähernd 100% Übereinstimmung zwischen miR-15a und miR-16 Zielgenen) und RNA22 3'UTR, RNA22 5'UTR und RNA22 CDS auf der anderen Seite (ca. 50% Übereinstimmung) zu erkennen. Ein Grund dafür ist die unterschiedliche Detektion, da bei RNA22 bevorzugt Bindungsenergien und bei den anderen Algorithmen Sequenzübereinstimmungen berücksichtigt werden. Der experimentelle Wert mittels Proteomik befindet sich bei 57% Übereinstimmung der Zielproteine dieser beiden miRNAs (siehe 3.4.4).

3.4.6.1.1 miR-15a

Für miR-15a konnten 2040 Proteine anhand ihrer HGNC Symbole mittels BRM (Shah et al, 2007) mit den vorhergesagten Zielgenen der Algorithmen abgeglichen werden (siehe Tabelle 3-7), womit zwischen 5 und 14% der vorhergesagten Zielgene bzw. Zielproteine abgedeckt werden können.

	Vorhergesagte Gene (HGNC Symbol)	Übereinstimmung mit SILAC quantifizierten Proteinen [absolut]	Übereinstimmung mit SILAC quantifizierten Proteinen [%]
miR-15 16 TargetScan	1934	108	5,58
miR-15a DIANA microT	634	63	9,94
miR-15a miRanda	33	2	6,06
miR-15a PicTar	613	71	11,58
miR-15a PITA TOP	808	86	10,64
miR-15a RNA22 3UTR	1025	96	9,37
miR-15a RNA22 5UTR	234	32	13,68
miR-15a RNA22 CDS	2510	310	12,35

Tabelle 3-7: Anzahl der in Vorhersage-Algorithmen enthaltenen Zielgene für miR-15 und Übereinstimmung mit den in der SILAC-Analyse quantifizierten Proteinen

Anschließend wurden die Ergebnisse aus den Vorhersage-Algorithmen nach ihrer Wiederfindungsrate in den Zielgenen der Proteomikdaten untersucht, wobei zwischen herunterregulierten, nicht regulierten und hochregulierten Proteinen unterschieden wurde (siehe Abbildung 3-19).

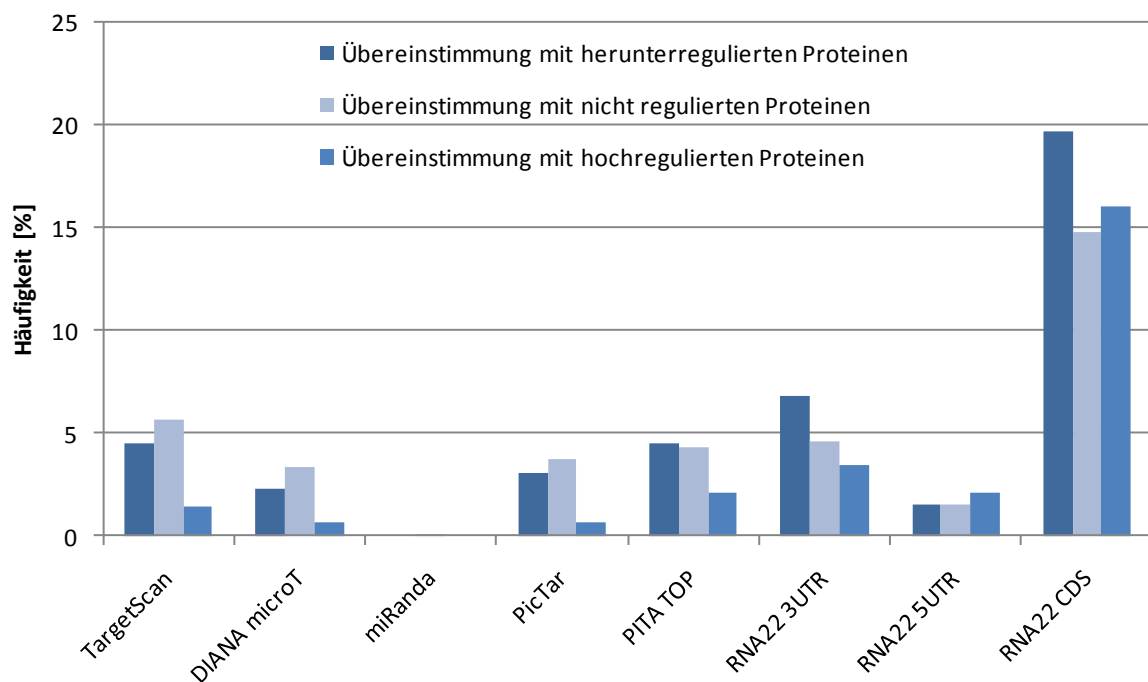


Abbildung 3-19: Vergleich der Kandidaten der Vorhersage-Algorithmen für miR-15 mit den experimentell durch SILAC-Analyse quantifizierten Proteinen. Die prozentuale Häufigkeit der Übereinstimmung zur Gesamtzahl der herunterregulierten, nicht regulierten und hochregulierten Proteinen ist angegeben.

Dabei fällt auf, dass kein Algorithmus die nötige Spezifität und Sensitivität aufzeigt. Nur RNA22 3'UTR und RNA22 CDS haben eine etwas höhere Übereinstimmung mit den

herunterregulierten als mit den hochregulierten oder nicht regulierten Proteinen. Bei allen anderen Algorithmen (TargetScan, DIANA microT, PicTar, PITA TOP, RNA22 5'UTR) haben entweder die nicht regulierten oder hochregulierten Proteine eine größere Übereinstimmung als mit den herunterregulierten Proteinen. Die Daten für miRanda sind aufgrund der geringen Anzahl von Vorhersagen (nur zwei Einträge finden sich unter den quantifizierten Proteinen wieder) nicht auswertbar.

3.4.6.1.2 miR-16-1

Bei miR-16-1 konnten ebenfalls zwischen 5 und 12% der vorhergesagten Zielgenen in den quantifizierten Proteinen gefunden werden (siehe Abbildung 3-20).

	Vorhergesagte Gene (HGNC Symbol)	Übereinstimmung mit SILAC quantifizierten Proteinen [absolut]	Übereinstimmung mit SILAC quantifizierten Proteinen [%]
miR-15 16 TargetScan	1934	100	5,17
miR-16 DIANA microT	611	62	10,15
miR-16 miRanda	1659	180	10,85
miR-16 PicTar	605	64	10,58
miR-16 PITA	808	85	10,52
miR-16 RNA22 3UTR	787	82	10,42
miR-16 RNA22 5UTR	210	22	10,48
miR-16 RNA22 CDS	1950	225	11,54

Abbildung 3-20: Anzahl der in Vorhersage-Algorithmen enthaltenen Zielgene für miR-16 und Übereinstimmung mit den in der SILAC-Analyse quantifizierten Proteinen

Wie bereits für miR-15a gezeigt, ist auch für miR-16-1 die Detektionsfähigkeit der Vorhersage-Algorithmen in den Punkten Spezifität und Sensitivität nicht geeignet, um die herunterregulierten von den hochregulierten bzw. nicht regulierten Proteinen zu unterscheiden (siehe Abbildung 3-21).

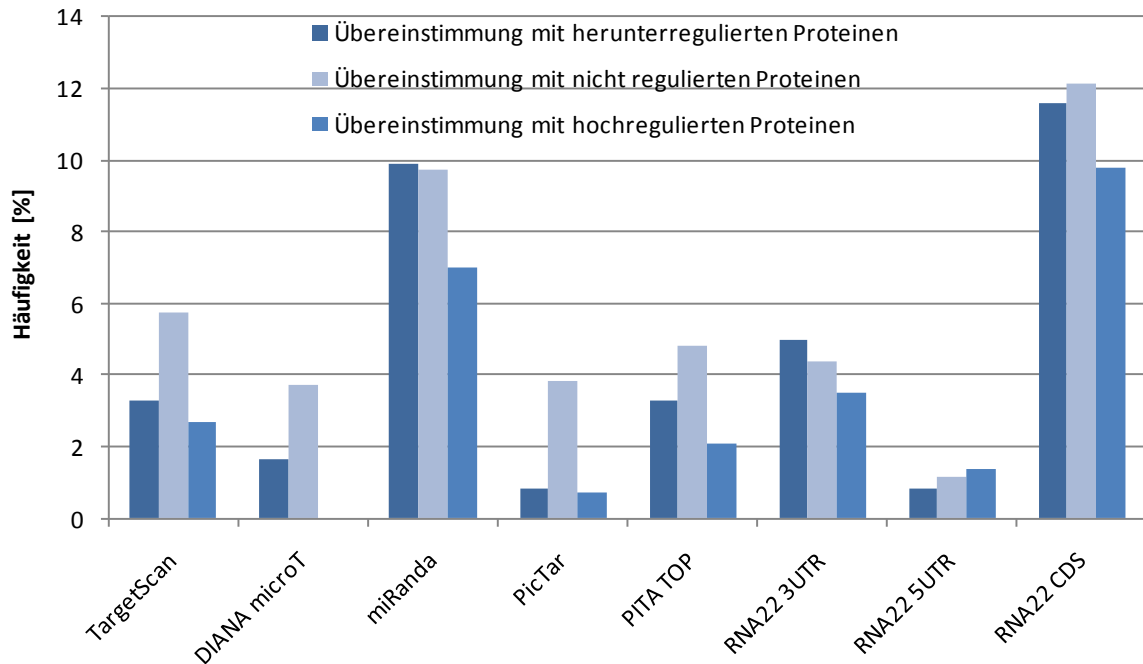


Abbildung 3-21: Vergleich der Kandidaten der Vorhersage-Algorithmen für miR-16 mit den experimentell durch SILAC-Analyse quantifizierten Proteinen. Die prozentuale Häufigkeit der Übereinstimmung zur Gesamtzahl der herunterregulierten, nicht regulierten und hochregulierten Proteinen ist angegeben.

3.4.6.2 Übereinstimmungen mit den *seed*-Sequenzen

Analog zu 3.3.5.2 wurde für miR-15a und miR-16-1 eine Untersuchung der *seed*-Sequenzen (7mer-A1, 7mer-m8 und 8mer) in den 3'UTR, 5'UTR und CDS Bereichen der in 3.4.2 und 3.4.3 quantifizierten Proteinen durchgeführt. Da neben dem *guide* miRNA Strang auch der *passenger* (miRNA*) Strang (siehe 1.1.1) eine Rolle für die miRNA Zielproteine spielen kann (Ro et al, 2007), wurden in diesen Untersuchungen auch diese *seed*-Sequenzen berücksichtigt.

3.4.6.2.1 miR-15a

Die Auswertung für miR-15a ist in Abbildung 3-22 gezeigt.

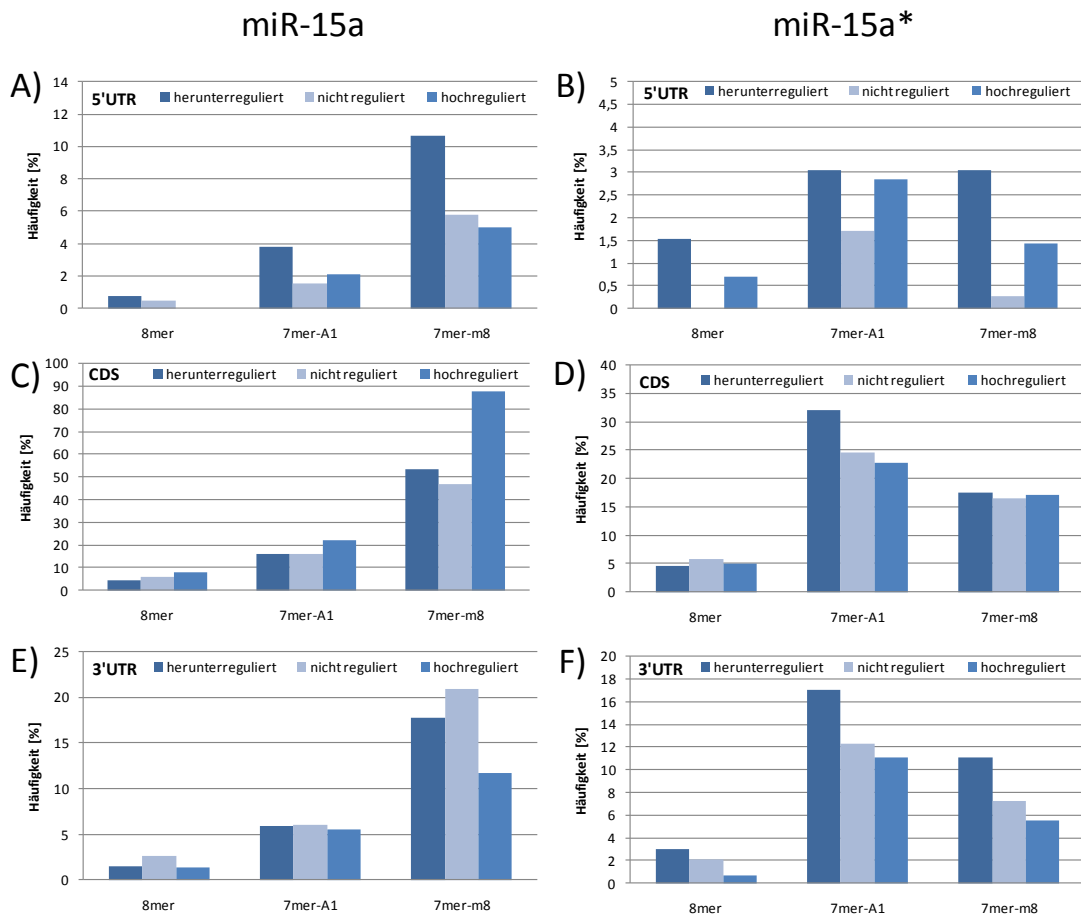


Abbildung 3-22: Übereinstimmung der *seed*-Sequenzen (8mer, 7mer-A1 und 7mer-m8) von miR-15a und miR-15a* im 5'UTR, CDS und 3'UTR Bereich der mRNAs der durch SILAC-Analyse quantifizierten Proteine (unterteilt in herunterregulierte, nicht regulierte und hochregulierte Proteine). Die Häufigkeit der Übereinstimmung im Vergleich zur Gesamtzahl ist angegeben: A) und B) Übereinstimmung im 5'UTR Bereich, C) und D) Übereinstimmung im CDS Bereich, E) und F) Übereinstimmung im 3'UTR Bereich für die *seed*-Sequenzen von miR-15a in A), C) und E) sowie für miR-15a* in B), D) und F)

Bei miR-15a in Abbildung 3-22 A), C) und E) ist zu erkennen, dass nur für den 5'UTR-Bereich (A)) eine Unterscheidung zwischen den herunterregulierten Proteinen und den hochregulierten bzw. nicht regulierten Proteinen anhand der Häufigkeit der Übereinstimmungen möglich ist. Auffällig ist für die 7mer-m8 *seed*-Sequenz im CDS-Bereich (siehe C)) eine sehr hohe Übereinstimmung, die für die hochregulierten Proteine annähernd 90% beträgt, wobei auch für die herunterregulierten bzw. nicht regulierten Proteine Werte von um die 50% erreicht werden. Bei den miR-15a* *seed*-Sequenzen kann die beste Unterscheidung zwischen den herunterregulierten und hochregulierten bzw. nicht regulierten Proteinen im 5'UTR und 3'UTR (B) und F)) beobachtet werden. Beim Vergleich der miR-15a (A), C) und E)) mit der miR-15a* (B), D) und F)) *seed*-Sequenz Übereinstimmung werden ähnliche Werte erreicht, wobei die hohen Werte bei 7mer-m8 der CDS von miR-15a (C)) als Ausreißer anzusehen sind und geringere Übereinstimmungen im 5'UTR-Bereich bei miR-15a* zu finden sind.

3.4.6.2.2 miR-16-1

Die Auswertung für miR-16-1 ist in Abbildung 3-23 gezeigt.

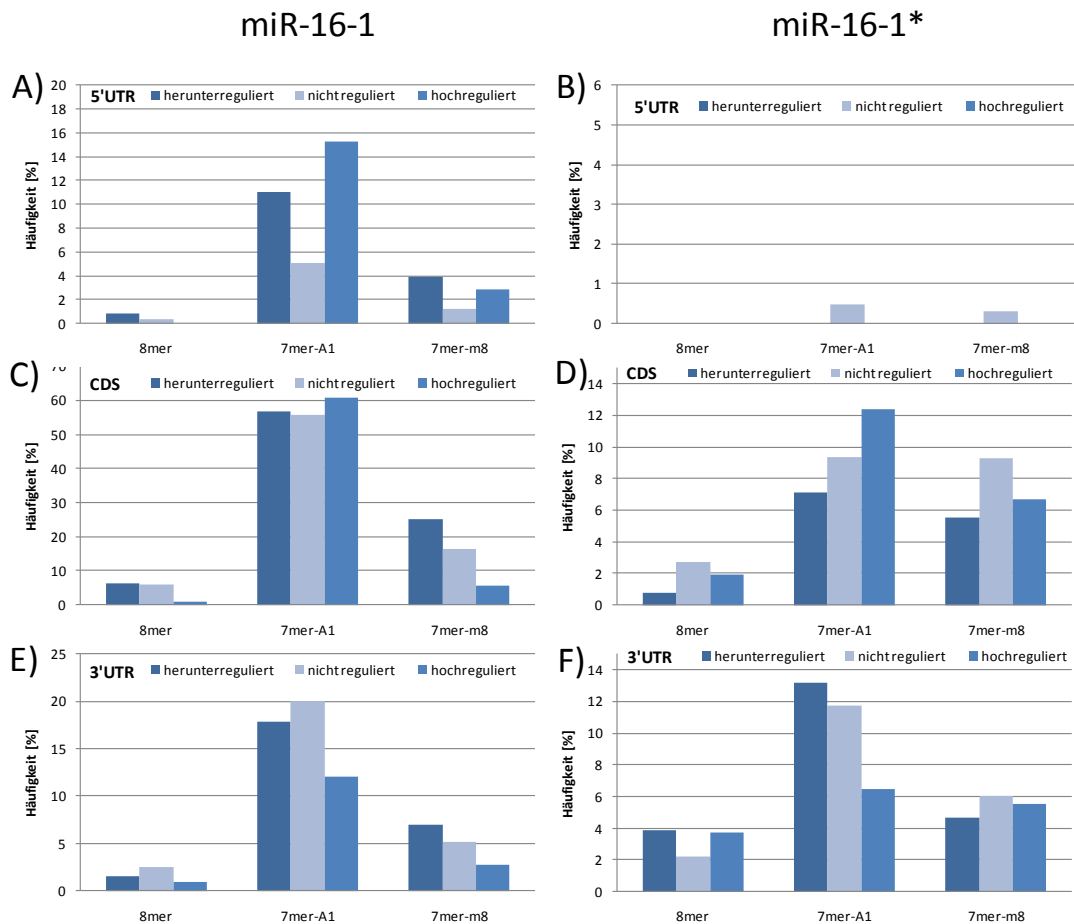


Abbildung 3-23: Übereinstimmung der seed-Sequenzen (8mer, 7mer-A1 und 7mer-m8) von miR-16-1 und miR-16-1* im 5'UTR, CDS und 3'UTR Bereich der mRNAs der durch SILAC-Analyse quantifizierten Proteine (unterteilt in herunterregulierte, nicht regulierte und hochregulierte Proteine). Die Häufigkeit der Übereinstimmung im Vergleich zur Gesamtzahl ist angegeben: A) und B) Übereinstimmung im 5'UTR Bereich, C) und D) Übereinstimmung im CDS Bereich, E) und F) Übereinstimmung im 3'UTR Bereich für die seed-Sequenzen von miR-16-1 in A), C) und E) sowie für miR-16-1* in B), D) und F).

Für miR-16-1 ist die Unterscheidung zwischen herunterregulierten und nicht regulierten bzw. hochregulierten Proteinen am besten durch die 7mer-m8 seed-Sequenz sowohl in der 5'UTR-, CDS- als auch der 3'UTR-Region möglich. Wie bereits im CDS-Bereich für miR-15a anhand der 7mer-m8 Sequenz gesehen, zeigt hier die 7mer-A1 Sequenz im CDS-Bereich mit um die 60% für herunterregulierte, nicht regulierte und hochregulierte Proteine eine sehr hohe Übereinstimmung. Bei der miR-16-1* Sequenz kann keine gute Unterscheidung anhand einer Sequenz oder in einem Bereich getroffen werden. Die Übereinstimmungen sind wie bei

miR-15a auch zwischen miR-16-1 und miR-16-1* vergleichbar, wenn man erneut den CDS-Bereich bei miR-16-1 als Ausreißer ansieht und eine verringerte Übereinstimmung im 5'UTR-Bereich berücksichtigt.

3.4.6.3 Anreicherung von Sequenzmotiven mittels Sylamer-Analyse

Die Sylamer-Analysen für miR-15a und miR-16-1 wurden analog zu 3.3.5.3 durchgeführt. Abbildung 3-24 stellt die Ergebnisse für miR-15a und Abbildung 3-25 für miR-16-1 unter Verwendung der verschiedenen Sequenzabschnitte (6, 7 und 8mer) dar.

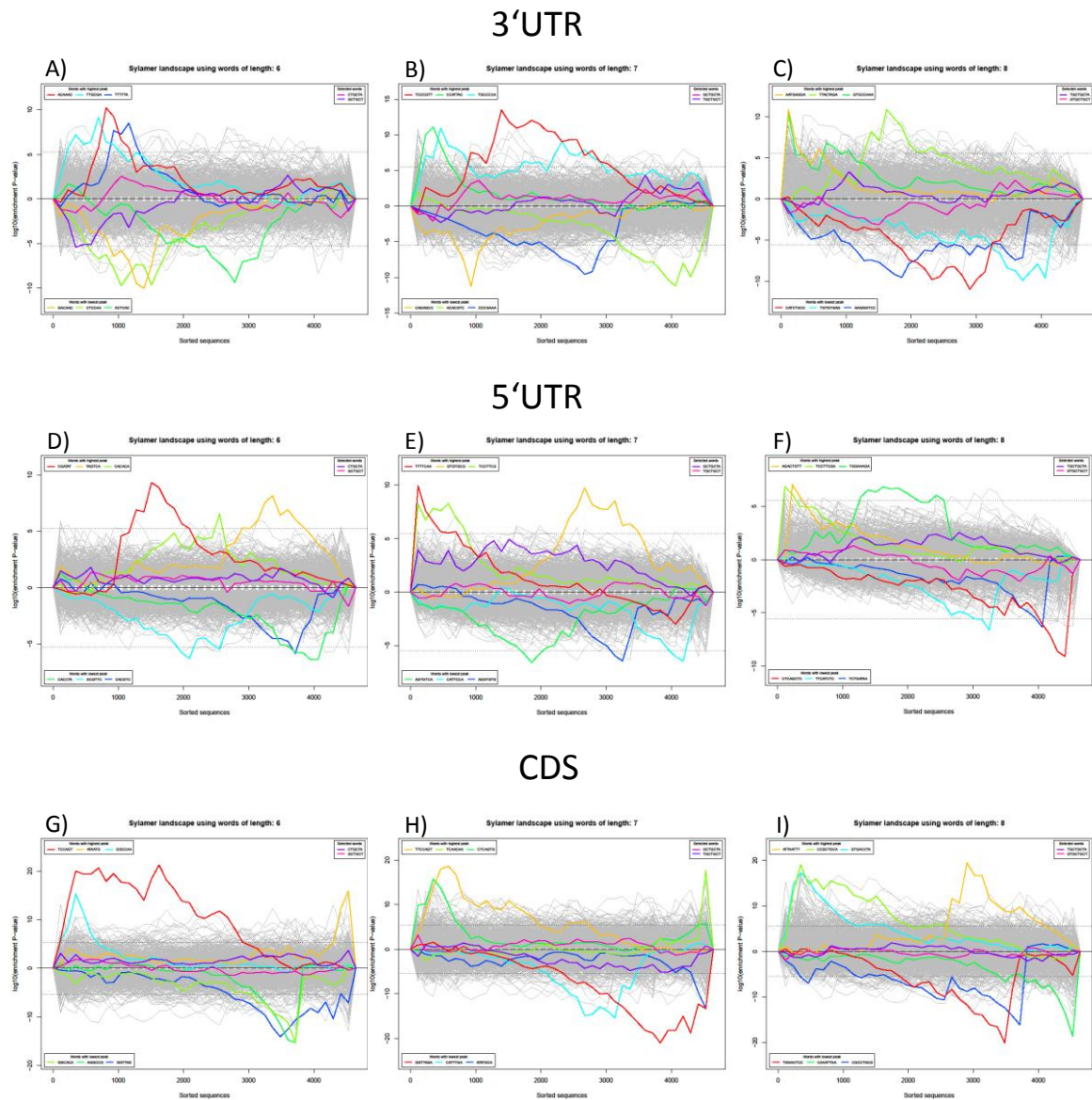


Abbildung 3-24: Sequenzmotiv-Anreicherung für miR-15a der nach Regulationsstärke sortierten Zielproteine mittels Sylamer-Analyse: A) bis C) Verwendung von 3'UTR D) bis F) 5'UTR und G) bis I) CDS Sequenzen, sowie Berücksichtigung von 6mer (A), D), G)), 7mer (B), E), H)) und 8mer (C), F), I)) Sequenzmotiven; x-Achse: sortierte Liste nach Regulationsstärke; y-Achse: Anreicherungsfaktor

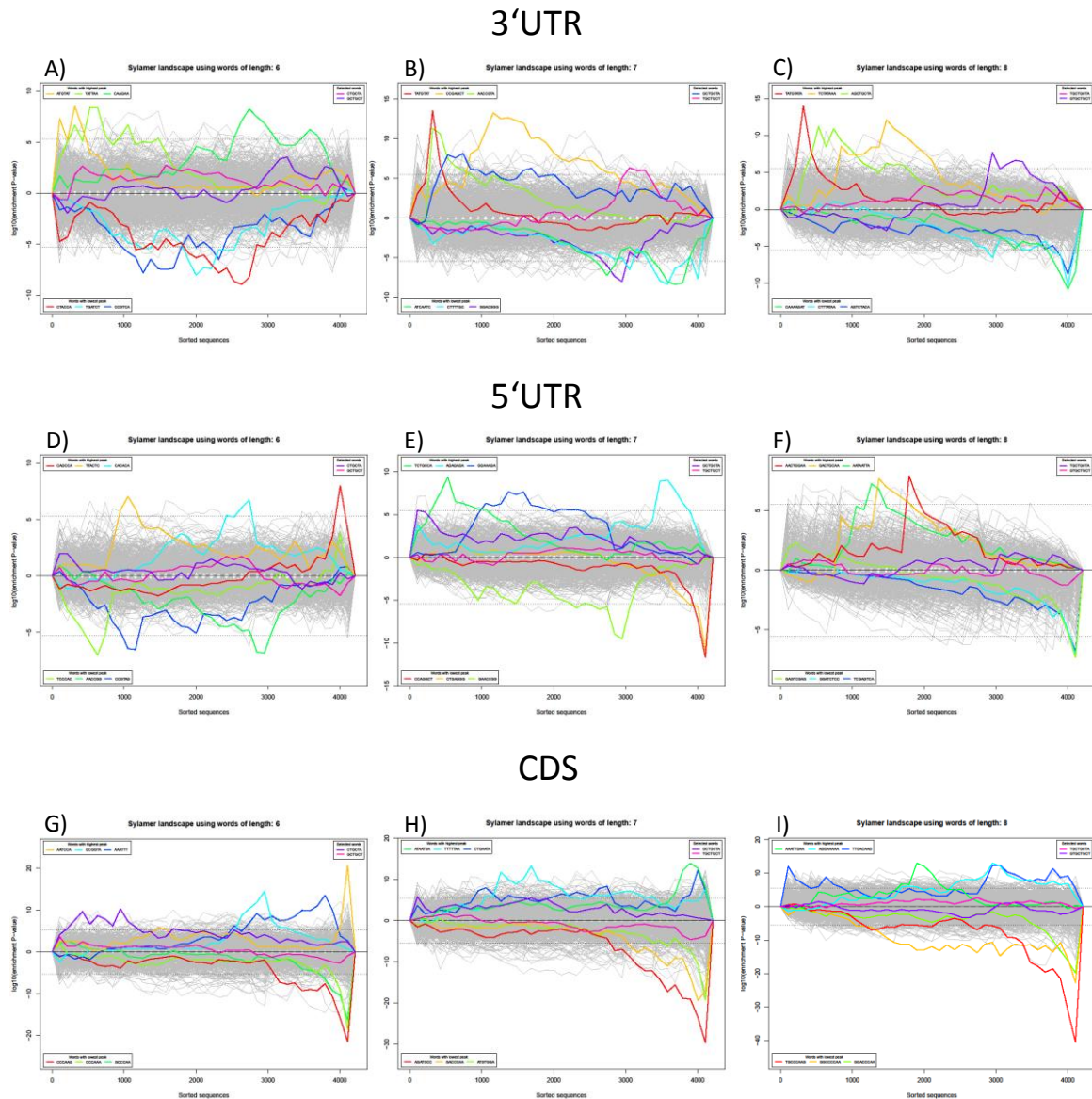


Abbildung 3-25: Sequenzmotiv-Anreicherung für miR-16-1 der nach Regulationsstärke sortierten Zielproteine mittels Syamer-Analyse: A) bis C) Verwendung von 3'UTR D) bis F) 5'UTR und G) bis I) CDS Sequenzen, sowie Berücksichtigung von 6mer (A, D, G)), 7mer (B, E, H)) und 8mer (C, F, I)) Sequenzmotiven; x-Achse: sortierte Liste nach Regulationsstärke; y-Achse: Anreicherungsfaktor

Wie bereits in 3.3.5.3 für miR-155 gezeigt, konnte auch für miR-15a und miR-16-1 keine Anreicherung für ein Sequenzmotiv unter den am stärksten regulierten Proteinen gefunden werden.

3.4.7 Vergleich der Proteomik-Daten aus den SILAC-Analysen für miR-15a und miR-16-1 mit Transkriptomik-Daten aus Microarray-Analysen

Zum Vergleich der aus den SILAC-Analysen für miR-15a und miR-16-1 gewonnenen Protein-Expressionsdaten mit den durch die Gruppe Dr. Armin Pscherer zur Verfügung gestellten mRNA-Expressionsdaten (siehe 2.2.9) wurden diese anhand ihrer HGNC Symbole mittels BRM (Shah et al, 2007) einander zugeordnet. 1406 Datenpunkte aus den vier Experimenten (SILAC: miR-15a und miR-16-1 sowie Microarray: miR-15a und miR-16-1) konnten somit verglichen werden. Es ist anzumerken, dass für die SILAC-Analysen Granta-519 als Kontrolle gegenüber der Überexpression von miR-15a und miR-16-1 verwendet wurde, dagegen bei den mRNA Expression-Array Daten G71, der Selektionsklon von Granta-519, als Kontrolle diente.

Abbildung 3-26 A) stellt die komplette hierarchisch geclusterte *Heatmap* dar, in der zu erkennen ist, dass stärkere Regulationen auf Proteinebene als auf mRNA-Ebene auftreten (Erklärungen siehe Abbildung 3-26 B), SILAC: beide obere Zeilen). Des Weiteren zeigt Abbildung 3-26 in C) und E) Beispiele für herunterregulierte Gene bzw. Proteine und in D) für hochregulierte Gene bzw. Proteine, wobei die Regulationsstärken der Proteine und mRNAs ähnlich sind.

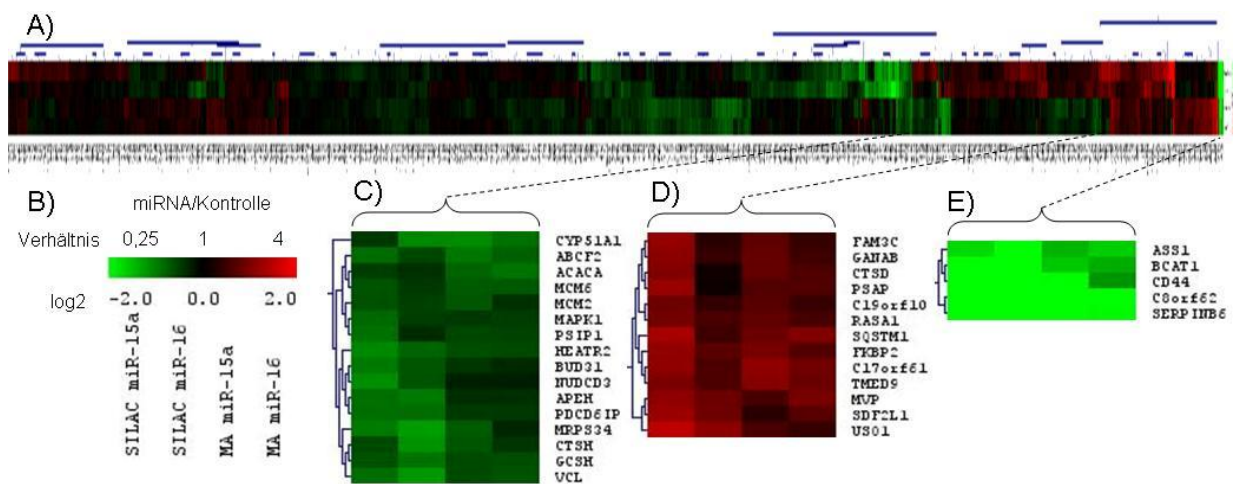


Abbildung 3-26: Hierarchisches Clustering der Transkriptomik-Daten (mRNA Microarray; MA) und Proteomik-Daten (SILAC-Analyse): A) komplette geclusterte *Heatmap*; B) Erklärung zu den einzelnen Spalten (Experiment, Farbkodierung); C) bis E) Beispiele für Regulationen sowohl auf mRNA-Ebene als auch Proteinebene; C) moderate Herunterregulation, D) moderate Hochregulation, E) starke Herunterregulation

Dagegen sind in Abbildung 3-27 in C) und D) Proteine bzw. Gene dargestellt, die nur auf Proteinebene (C) oder mRNA-Ebene (D)) herunterreguliert sind.

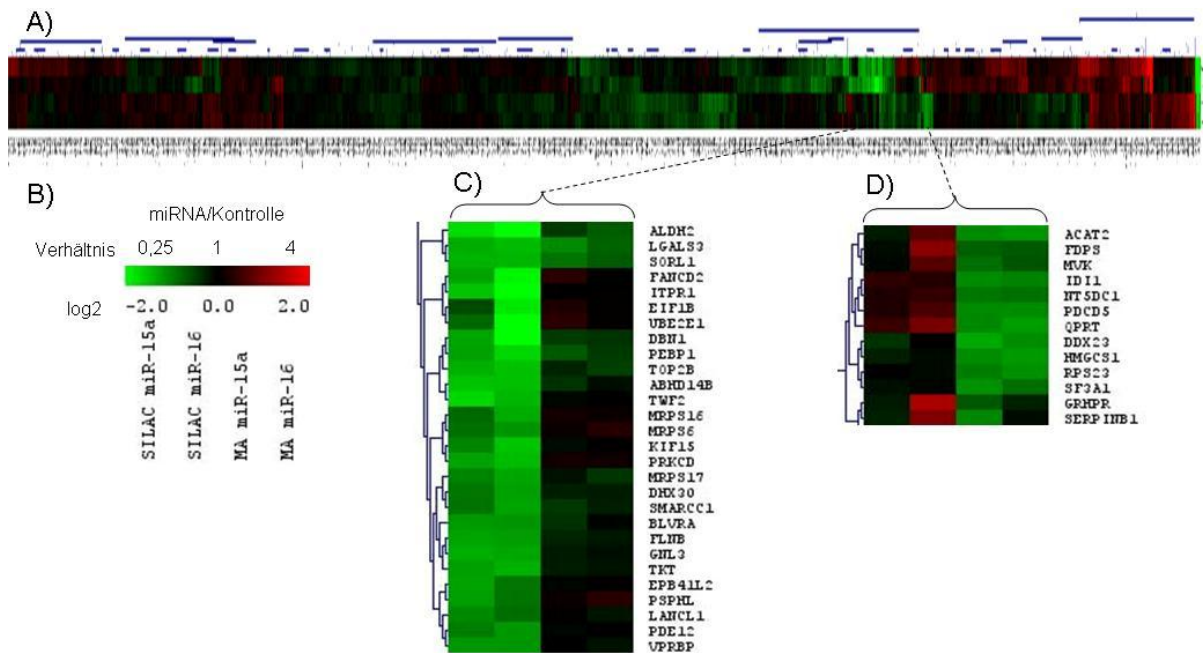


Abbildung 3-27: Hierarchisches Clustering der Transkriptomik-Daten (mRNA Microarray; MA) und Proteomik-Daten (SILAC-Analyse): A) komplette geclusterte Heatmap; B) Erklärung zu den einzelnen Spalten (Experiment, Farbkodierung); C) Beispiele für Herunterregulation nur auf Proteinniveau D) Beispiele für Herunterregulation nur auf mRNA-Niveau

Abbildung 3-28 präsentiert die ebenfalls nur auf Proteinebene (C) oder mRNA-Ebene (D)) regulierten Proteine bzw. Gene, wobei es sich diesmal um eine Hochregulation handelt.

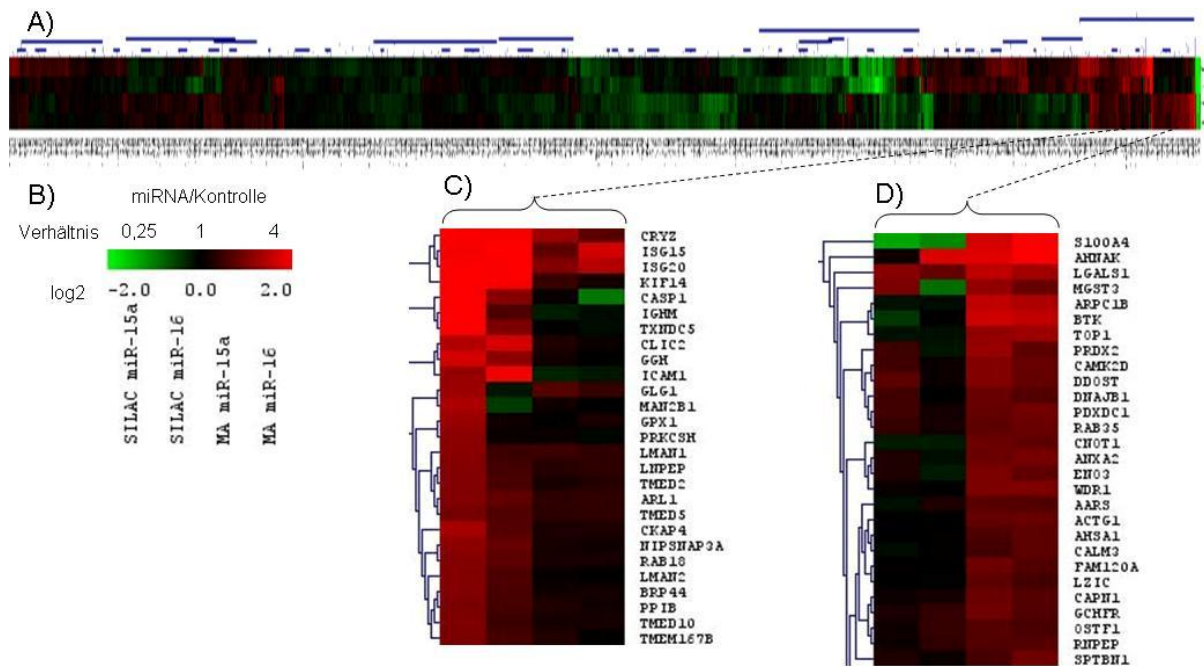


Abbildung 3-28: Hierarchisches Clustering der Transkriptomik-Daten (mRNA Microarray; MA) und Proteomik-Daten (SILAC-Analyse): A) komplette geclusterte *Heatmap*; B) Erklärung zu den einzelnen Spalten (Experiment, Farbkodierung); C) Beispiele für Hochregulation nur auf Proteinniveau D) Beispiele für Hochregulation nur auf mRNA-Niveau

In Abbildung 3-29 sind Proteine gezeigt, die nur durch eine der beiden miRNAs herunterreguliert sind. In C) sind die Proteine hauptsächlich durch miR-15a und in D) durch miR-16-1 herunterreguliert.

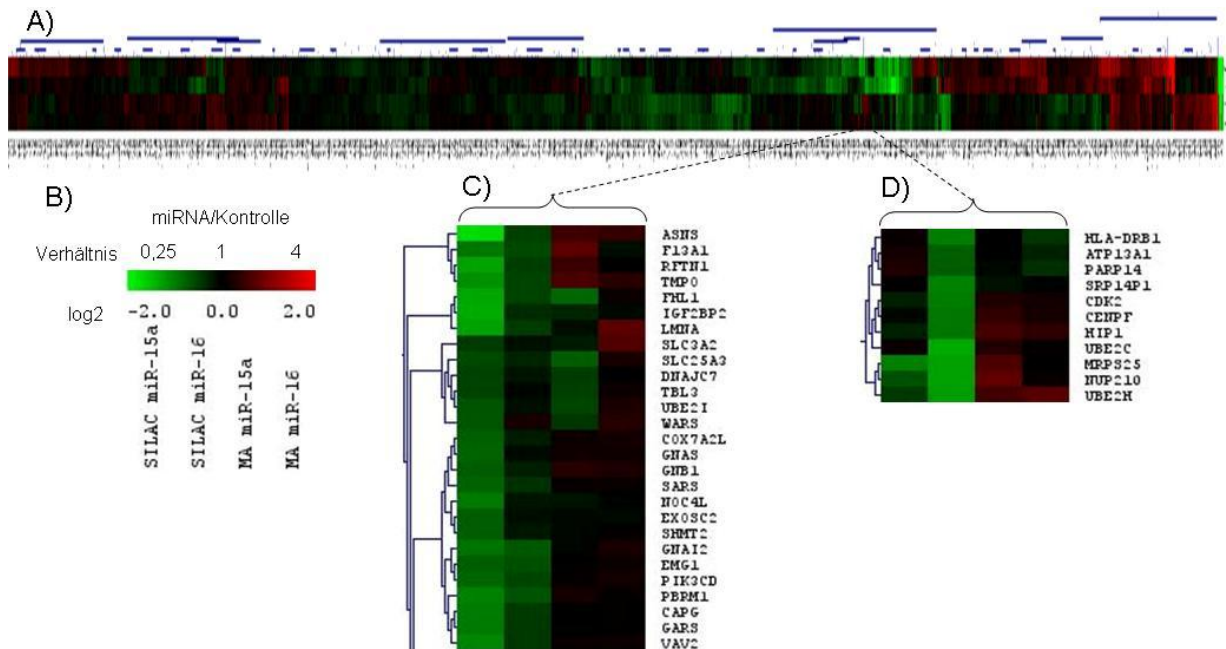


Abbildung 3-29: Hierarchisches Clustering der Transkriptomik-Daten (mRNA Microarray; MA) und Proteomik-Daten (SILAC-Analyse): A) komplette geclusterte Heatmap; B) Erklärung zu den einzelnen Spalten (Experiment, Farbkodierung); C) Beispiele für Herunterregulationen auf Proteinniveau nur durch miR-15a D) Beispiele für Herunterregulationen auf Proteinniveau nur durch miR-16-1

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Haupteffekt der untersuchten Proteine bzw. Gene verstärkt auf Proteinebene stattfindet und dabei miRNA spezifisch Proteine reguliert werden.

3.4.8 Beeinflusste biologische Prozesse und Signaltransduktionswege

miR-15a und miR-16-1 liegen auf einer gemeinsamen chromosomalen Region, die im Mantelzelllymphom deletiert ist, und zudem weisen sie eine hohe Sequenzähnlichkeit auf (siehe 1.4.2). Trotz ihrer in 3.4.4 gezeigten spezifisch regulierten Proteine werden für die funktionellen Untersuchungen die herunter- bzw. hochregulierten Proteine von beiden miRNAs gemeinsam betrachtet. Die bioinformatisch funktionellen Untersuchungen wurden mittels DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (Dennis et al, 2003; Huang da et al, 2009) anhand der 199 HGNC Symbole der herunterregulierten Proteine und den 201 HGNC Symbole für die hochregulierten Proteine durchgeführt. Dabei wurden sowohl biologische

Prozesse der *gene ontology* Annotation (www.geneontology.org) als auch Signaltransduktionswege aus der BIOCARTA- (www.biocarta.com) und KEGG-Datenbank (www.genome.jp) berücksichtigt.

3.4.8.1 Biologische Prozesse

Beim *Functional Annotation Clustering* werden den Proteinen die entsprechenden GO (*gene ontology*) Gruppen zugeordnet. Ähnliche GO-Gruppen werden geclustert und es wird statistisch überprüft, ob eine Anreicherung der regulierten Proteine gegenüber der Gesamtheit der HGNC Symbol Einträge vorliegt. Für die herunterregulierten Proteine ist das vollständige *Functional Annotation Clustering* in Tabelle 6-9 (siehe Anhang) gezeigt. Dabei sind vor allem die Cluster *Cell cycle*, *Death* und *Response to DNA damage stimulus* in diesem biologischen Zusammenhang von besonderem Interesse (siehe Tabelle 3-8, Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10).

Enrichment Score: 3.36	Count	p-value	Benjamini
cell cycle	31	7,7E-9	2,0E-5
cell cycle process	21	8,6E-5	4,4E-2
mitotic cell cycle	13	1,1E-4	5,2E-2
cell cycle phase	13	3,2E-4	1,2E-1
mitosis	10	5,7E-4	1,5E-1
M phase of mitotic cell cycle	10	6,1E-4	1,6E-1
M phase	11	7,8E-4	1,6E-1
interphase of mitotic cell cycle	6	2,6E-3	3,9E-1
interphase	6	3,4E-3	4,4E-1
regulation of progression through cell cycle	13	8,2E-3	6,4E-1
regulation of cell cycle	13	8,6E-3	6,5E-1
cell division	8	1,3E-2	7,5E-1

Tabelle 3-8: Cluster *Cell cycle* nach dem *Functional Annotation Clustering* für miR-15a oder miR-16a herunterregulierte Proteine in Granta-519. *Enrichment Score*: EASE Score Berechnung der Anreicherung, *Count*: Anzahl an Proteinen in diesem Cluster, *p-value*: statistischer Testwert, *Benjamini*: Benjamini-Hochberg Bestimmung von Falschpositiven

Enrichment Score: 1.39	Count	p-value	Benjamini
death	17	1,2E-2	7,3E-1
cell death	17	1,2E-2	7,3E-1
apoptosis	16	1,5E-2	7,8E-1
programmed cell death	16	1,6E-2	8,0E-1
cell development	21	3,1E-2	9,1E-1
regulation of apoptosis	11	5,1E-2	9,6E-1
regulation of programmed cell death	11	5,5E-2	9,7E-1
cellular developmental process	25	1,3E-1	1,0E0
cell differentiation	25	1,3E-1	1,0E0
developmental process	39	2,2E-1	1,0E0

Tabelle 3-9: Cluster *Death* nach dem *Functional Annotation Clustering* für miR-15a oder miR-16a herunterregulierte Proteine in Granta-519. *Enrichment Score*: EASE Score Berechnung der Anreicherung, *Count*: Anzahl an Proteinen in diesem Cluster, *p-value*: statistischer Testwert, *Benjamini*: Benjamini-Hochberg Bestimmung von Falschpositiven

Enrichment Score: 2.37	Count	p-value	Benjamini
response to DNA damage stimulus	12	5,3E-4	1,5E-1
response to endogenous stimulus	12	3,0E-3	4,1E-1
response to stress	22	3,6E-3	4,4E-1
DNA repair	7	5,8E-2	9,7E-1

Tabelle 3-10: Cluster *Response to DNA damage stimulus* nach dem *Functional Annotation Clustering* für miR-15a oder miR-16a herunterregulierten Proteine in Granta-519. *Enrichment Score*: EASE Score Berechnung der Anreicherung, *Count*: Anzahl an Proteinen in diesem Cluster, *p-value*: statistischer Testwert, *Benjamini*: Benjamini-Hochberg Bestimmung von Falschpositiven

In Abbildung 6-1, Abbildung 6-2 und Abbildung 6-3 (siehe Anhang) werden die in diesen drei Clustern *Cell cycle*, *Death* und *Response to DNA damage stimulus* involvierten herunterregulierten Proteine in Abhängigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Gruppen der Clusters gezeigt.

Durch diese Darstellung wird deutlich, welche Proteine beim Cluster *Cell cycle* in allen Prozessen involviert sind, wie z.B. CDC2, CENPF, CDK2 oder auch welche Proteine auf einige wenige Prozesse spezialisiert sind, wie z.B. LIG1 in *Cell cycle* und *Cell division* oder PDCD4 in *Cell cycle*, *Cell cycle progress*, *Regulation of progression through cell cycle* und *Regulation of cell cycle*. Auch beim Cluster *Death* kann zwischen den Proteinen, die in allen Prozessen eine Rolle spielen, wie z.B. MAPK1 und TOP2A, sowie spezialisierten Proteinen, wie z.B. TOP2B in *Developmental process*, *Cellular developmental process*, *Cell differentiation* und *Cell development* unterschieden werden.

Das *Functional Annotation Clustering* für die hochregulierten Proteine ist in Tabelle 6-10 (siehe Anhang) gezeigt. Dabei ist vor allem das Cluster *Regulation of apoptosis* interessant (siehe Tabelle 3-11), da es alle Gruppen des Clusters *Death* der herunterregulierten Proteine (siehe Tabelle 3-9) beinhaltet.

Enrichment Score: 1.68	Count	p-value	Benjamini
regulation of apoptosis	16	7,4E-4	1,2E-1
apoptosis	20	8,2E-4	1,2E-1
regulation of programmed cell death	16	8,3E-4	1,2E-1
programmed cell death	20	9,2E-4	1,3E-1
death	20	1,7E-3	2,0E-1
cell death	20	1,7E-3	2,0E-1
negative regulation of apoptosis	9	3,6E-3	3,4E-1
negative regulation of programmed cell death	9	3,9E-3	3,4E-1
anti-apoptosis	7	1,0E-2	6,0E-1
cell development	23	1,5E-2	7,0E-1
cell differentiation	26	1,3E-1	1,0E0
cellular developmental process	26	1,3E-1	1,0E0
negative regulation of biological process	18	1,4E-1	1,0E0
negative regulation of cellular process	16	2,4E-1	1,0E0
developmental process	39	3,3E-1	1,0E0
biological regulation	46	9,8E-1	1,0E0
regulation of biological process	38	1,0E0	1,0E0
regulation of cellular process	32	1,0E0	1,0E0

Tabelle 3-11: Cluster *Regulation of apoptosis* nach dem *Functional Annotation Clustering* für miR-15a oder miR-16a hochregulierte Proteine in Granta-519. *Enrichment Score*: EASE Score Berechnung der Anreicherung, *Count*: Anzahl an Proteinen in diesem Cluster, *p-value*: statistischer Testwert, *Benjamini*: Benjamini-Hochberg Bestimmung von Falschpositiven

Des Weiteren fällt auf, dass einige Prozesse, die durch die herunterregulierten Proteine positiv reguliert werden, wie z.B. *Apoptose* und *Programmed cell death* durch die hochregulierten Proteine negativ beeinflusst werden (*Anti-apoptose*, *Negative regulation of programmed cell death*, *Negative regulation of apoptosis*, *Negative regulation of biological process* und *Negative regulation of cellular process*).

In Abbildung 6-4 (siehe Anhang) werden die in dem Cluster *Regulation of apoptosis* involvierten hochregulierten Proteine in Abhängigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Gruppen gezeigt.

3.4.8.2 Signaltransduktionswege

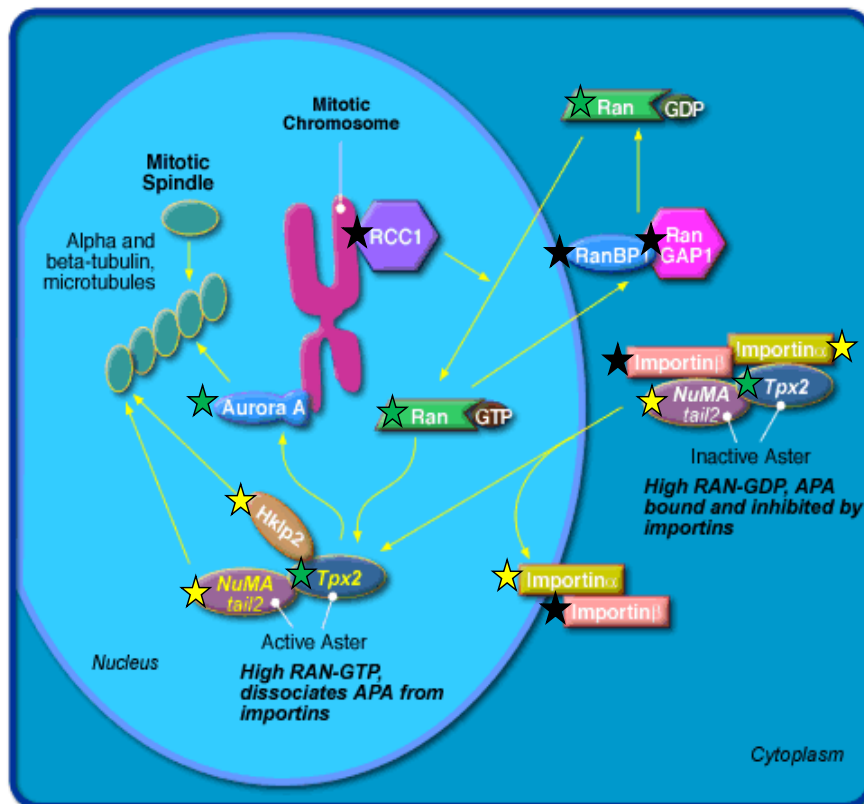
Die vorherigen Analysen (3.4.8.1) basierten auf den Annotationen nach *gene ontology*. Diese haben den Nachteil, dass die Annotationen nicht nur aufgrund von experimentellen Daten geschehen, sondern auch aufgrund von Sequenzähnlichkeiten. Um eine Auswertung basierend auf manuell annotierten Daten durchzuführen, wurden Analysen anhand der in KEGG (www.genome.jp) und BIOCARTA (www.biocarta.org) enthaltenen Signaltransduktionswege mittels DAVID2008 durchgeführt. In Tabelle 3-12 sind die für die

herunterregulierten Proteine statistisch signifikant beeinflussten Signaltransduktionswege in BIOCARTA aufgeführt.

Pathway	Count	Proteins (HGNC Symbol)	p-value
Role of Ran in mitotic spindle regulation	3	KPNA2, NUMA1, KIF15	2,25E-02
HIV-1 Nef: negative effector of Fas and TNF	5	NUMA1, CYCS, PARP1, LMNA, PRKCD	3,12E-02
Role of β-arrestins in the activation and targeting of MAP kinases	3	GNB1, MAPK1, GNAS	3,57E-02
Roles of β-arrestin-dependent Recruitment of Src Kinases in GPCR Signaling	3	GNB1, MAPK1, GNAS	5,69E-02
How Progesterone Initiates the Oocyte Maturation	3	GNB1, CDC2, GNAS	7,50E-02
Opposing roles of AIF in Apoptosis and Cell Survival	2	CYCS, PARP1	8,46E-02
CCR3 signaling in Eosinophils	3	GNB1, MAPK1, GNAS	9,47E-02
Caspase Cascade in Apoptosis	3	CYCS, PARP1, LMNA	9,47E-02

Tabelle 3-12: Rolle der herunterregulierten Proteine in BIOCARTA Pathways. Gefiltert nach einem p-value unter 0,1 und mindestens zwei involvierten Proteinen (Counts)

Der Signaltransduktionsweg *Role of Ran in mitotic spindle regulation* wurde zur weiteren Auswertung ausgewählt, da dieser den niedrigsten p-value aufzeigt und zudem die dort herunterregulierten Proteine wichtige Funktionen innerhalb des Signaltransduktionsweges einnehmen (siehe Abbildung 3-30).



★: herunterreguliert ★: nicht reguliert ☆: nicht quantifiziert

Abbildung 3-30: Rolle von Ran in der mitotischen Spindelregulation (BIOCARTA-Pathway). Die herunterregulierten, nicht regulierten und hochregulierten sowie die nicht quantifizierten Proteine sind gezeigt. Quelle: www.biocarta.com

Dieser Signaltransduktionsweg ist durch die Herunterregulation von KPNA2 (Importin α), NUMA1 (NuMA tail2) und KIF15 (Hklp2) durch miR-15a und miR-16-1 beeinflusst werden, wobei die Proteine RANGAP1 (RanGAP1), RCC1, RANBP1 (RanBP1) und KPNB1 (Importin β) unbeeinflusst bleiben. Zu denjenigen Proteinen, die nicht quantifiziert wurden (Tpx2 (TPX2), Ran (RAN) und Aurora A (AURKA)) kann keine Aussage über deren Einfluss auf diesen Signaltransduktionsweg getroffen werden.

In Tabelle 3-13 sind die KEGG Signaltransduktionswege gezeigt, die durch die herunterregulierten Proteine statistisch signifikant beeinflusst werden.

Pathway	Count	Protein (HGNC Symbol)	p-value
Cell cycle	9	MCM4, MCM5, CDK2, PCNA, CDC2, MCM2, MCM7, MCM3, MCM6	7,63E-04
Alanine and aspartate metabolism	5	GOT2, ASNS, DLD, ASS1, GPT2	2,44E-03
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	5	GARS, QARS, WARS, SARS, YARS	4,12E-03
Gap junction	6	ITPR1, MAPK1, CDC2, GNAS, GNAI2, TUBB2C	2,48E-02
Valine, leucine and isoleucine degradation	4	ALDH2, ACAA2, BCAT1, DLD	4,12E-02
Glycine, serine and threonine metabolism	4	GARS, SHMT2, SARS, DLD	4,36E-02
Carbon fixation	3	GOT2, GPT2, TKT	6,07E-02
Glutamate metabolism	3	GOT2, QARS, GPT2	9,66E-02

Tabelle 3-13: Rolle der herunterregulierten Proteine in KEGG Pathways. Gefiltert nach einem p-value unter 0,1 und mindestens zwei involvierten Proteinen (Counts)

Auch hierbei wurde der Signaltransduktionsweg mit dem niedrigsten p-value zur weiteren Analyse ausgewählt. Zudem sind im Cell cycle Pathway die meisten Proteine und darüber hinaus Schlüsselproteine reguliert (siehe Abbildung 3-31).

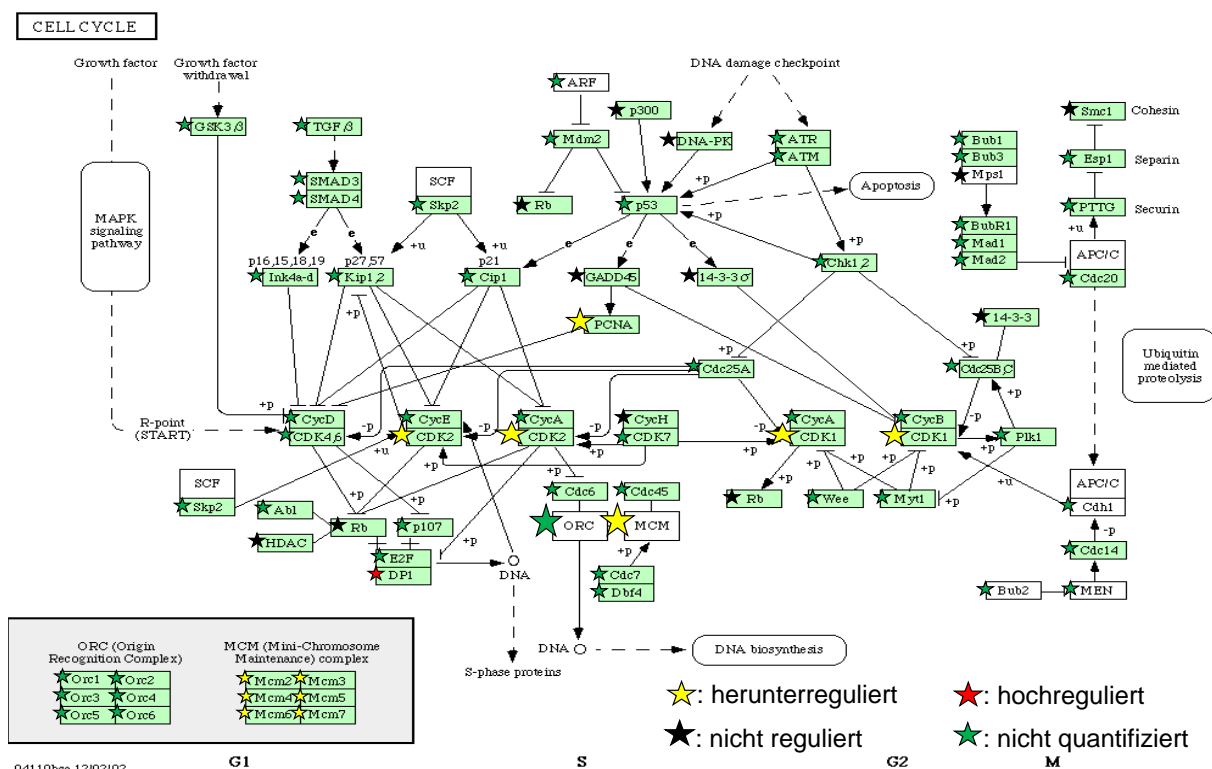


Abbildung 3-31: Cell cycle Pathway (KEGG). Die herunterregulierten, nicht regulierten und hochregulierten sowie die nicht quantifizierten Proteine sind gezeigt. Quelle: www.genome.jp

Der MCM (*mini-chromosome maintenance*) Komplex wird im Zellzyklus durch miR-15a und miR-16-1 in allen seinen Komponenten (MCM2 bis MCM7) herunterreguliert. Zudem sind

PCNA, CDK2 und CDK1 (CDC2) durch miR-15a und miR-16-1 beeinflusst. Diese drei Proteine stellen Schlüsselregulatoren im Zellzyklus dar. Andere Proteine sind teils nicht reguliert, wie z.B. RB1 (Rb) oder konnten nicht quantifiziert werden, wie z.B. TP53 (p53). REEP5 (DP1) wiederum zeigt eine Hochregulation durch den Einfluss von miR-15a und miR-16-1.

Für die hochregulierten Proteine sind nach der KEGG-Analyse hauptsächlich Signaltransduktionswege beeinflusst, die den Metabolismus und die Degradation betreffen (siehe Tabelle 3-14).

Pathway	Count	Proteins (HGNC Symbol)	p-value
Fatty acid metabolism	6	ACAT2, ACADM, ACAT1, HSD17B4, HADH, ACADVL	1,31E-03
Pyruvate metabolism	5	ACAT2, GRHPR, ACAT1, ACYP1, MDH2	7,13E-03
Valine, leucine and isoleucine degradation	5	ACAT2, ACADM, ACAT1, HSD17B4, HADH	8,42E-03
Lysine degradation	5	ACAT2, ACAT1, SPCS3, HSD17B4, HADH	1,23E-02
Benzoate degradation via CoA ligation	4	ACAT2, ACAT1, ACYP1, DHRS7	1,43E-02
Tryptophan metabolism	5	ACAT2, KYNU, ACAT1, HSD17B4, HADH	2,42E-02
Caprolactam degradation	3	PYCR1, HSD17B4, HADH	3,04E-02
Glutathione metabolism	4	MGST3, TXNDC12, GPX1, GPX4	3,46E-02
Butanoate metabolism	4	ACAT2, ACAT1, HSD17B4, HADH	4,97E-02
Biosynthesis of steroids	3	FDPS, LSS, MVK	7,18E-02
Geraniol degradation	2	HSD17B4, HADH	8,92E-02

Tabelle 3-14: Rolle der hochregulierten Proteine in KEGG *Pathways*. Gefiltert nach einem p-value unter 0,1 und mindestens zwei involvierten Proteinen (*Counts*)

Unter den BIOCARTA *Pathways* sind die hochregulierten Proteine in den in Tabelle 3-15 gezeigten Signaltransduktionswegen involviert.

Pathway	Count	Protein (HGNC Symbol)	p-value
Monocyte and its Surface Molecules	3	RASA1, ITGB1, ITGA4	3,64E-02
ER-associated degradation (ERAD) Pathway	3	CANX, GANAB, UGCGL1	2,83E-02

Tabelle 3-15: Rolle der hochregulierten Proteine in BIOCARTA *Pathways*. Gefiltert nach einem p-value unter 0,1 und mindestens zwei involvierten Proteinen (*Counts*)

Zusammenfassend konnte durch diese Untersuchungen gezeigt werden, dass durch miR-15a und miR-16-1 regulierte Proteine in einer Vielzahl von biologischen Prozessen und Signaltransduktionswegen involviert sind, die eine mögliche Relevanz in MCL haben könnten.

3.4.9 Vergleich mit anderen proteomischen Untersuchungen zu miR-15a bzw. miR-16-1 Zielproteinen

Es sind zurzeit zwei weitere Untersuchungen publiziert, in denen die Einflüsse von miR-15a bzw. miR-16-1 mittels quantitativer Proteomik analysiert wurden. In einem Experiment wurde mittels eines Vektorkonstruktes (pRS), in dem sich sowohl miR-15a als auch miR-16-1 befinden, beide miRNAs in MEG01 Zellen (Ogura et al, 1985) (megkaryoblastische Leukämie-Zelllinie) überexprimiert. Die quantitative proteomische Analyse erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (Coomassie-Färbung) (Calin et al, 2008). Die zweite Studie analysierte mittels pSILAC (siehe auch 3.3.7) die Überexpression von miR-16 (synthetische miRNAs) nach 32 Stunden in HeLa Zellen (Selbach et al, 2008). Zwischen den identifizierten Zielproteinen dieser beiden Experimente gibt es keine Übereinstimmungen. Allerdings gibt es zwischen den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen von miR-15a bzw. miR-16-1 in Granta-519 Übereinstimmungen mit den beiden anderen Untersuchungen, die in Abbildung 3-32 dargestellt sind.

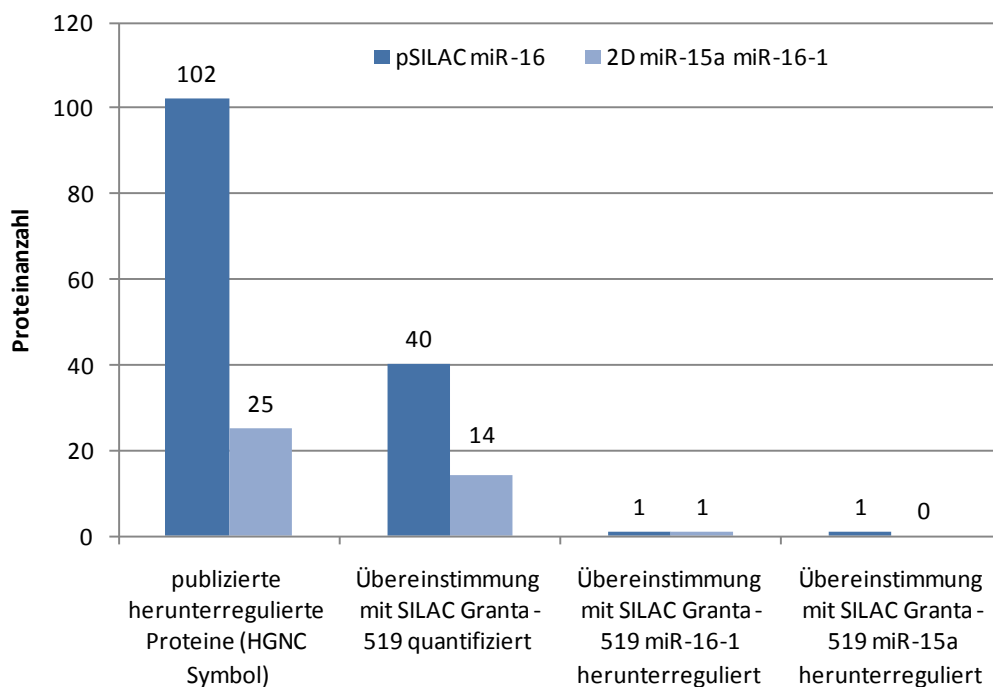


Abbildung 3-32: Vergleich der identifizierten Zielproteine von miR-15a und miR-16-1 in MEG01 Zellen mittels 2D (Calin et al, 2008) und von miR-16 in HeLa Zellen mittels pSILAC (Selbach et al, 2008) mit den miR-15a bzw. miR-16-1 herunterregulierten Proteine in Granta-519 (eigene SILAC-Analyse)

Von den insgesamt 102 bei der pSILAC-Studie bzw. 25 bei der 2D-Studie herunterregulierten Proteinen wurden 40 bzw. 14 Proteine in Granta-519 quantifiziert. Trotz dieser respektablen Übereinstimmung ist jeweils nur ein Protein (2D und pSILAC) ebenfalls durch miR-16-1

herunterreguliert und ein weiteres in pSILAC gefundenes Protein durch miR-15a in Granta-519 herunterreguliert (siehe auch Tabelle 3-16). Dies zeigt wiederum wie bereits in 3.3.7 gezeigt, dass miRNAs Zelllinien-spezifische Zielproteine haben.

3.4.10 Zusammenfassung

Tabelle 3-16 präsentiert eine Zusammenstellung der Auswertungen zu den miR-15a und miR-16-1 regulierten Proteinen. Neben der Regulation des entsprechenden Proteins durch miR-15a oder miR-16-1 mittels SILAC-Analyse (3.4.2 und 3.4.3) sind noch weitere übereinstimmende Ergebnisse aufgeführt, wie z.B. die Validierung auf Proteinebene durch Western-Blot Analyse (3.4.5), die Regulation auf mRNA-Ebene durch Microarray-Analyse oder die Übereinstimmung mit den Daten eines der Vorhersage-Algorithmen (3.4.6.1). Zusätzlich wurden verschiedene Proteine in weiteren Proteomik-Publikationen als herunterreguliert identifiziert (siehe 3.4.9), konnten mit MCL durch Publikationen in Verbindung gebracht werden oder die Proteine traten in einem der beiden relevanten Signaltransduktionswegen auf (siehe 3.4.8.2). Die *seed*-Sequenz Übereinstimmungen wurden nicht berücksichtigt, da wie in 3.4.6.2 gezeigt die Anzahl der Übereinstimmungen teilweise unrealistisch hoch ist.

Tabelle 3-16: Zusammenfassung der Ergebnisse und Auswertungen der durch Überexpression von miR-15a und miR-16-1 regulierten Proteine in Granta-519 Zellen. Die Einträge sind nach den log2 Werten der SILAC-Analyse für miR-15a sortiert. Ausnahme bilden die drei Gruppen: ANXA5 - hochreguliertes Protein, TCL1A bis KIAA1618 - miR-16-1 herunterreguliert, aber nicht durch miR-15a, und PDCD4 bis SLC3A2 - miR-15a herunterreguliert, aber nicht durch miR-16-1

^a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org)

^b: log2 Verhältnis miRNA Überexpression zur Kontrolle

^c: verwendete Vorhersage-Algorithmen: RNA22 CDS, 5'UTR, 3'UTR; miRanda, TargetScan, Pictar, DIANA microT, PITA

^d: pSILAC Daten miR-16 in HeLa (Selbach et al, 2008), bzw. 2D Daten miR-15a und miR-16-1 in MEG01 (Calin et al, 2008)

^e: Wiederfindung der Proteine bei den in 3.4.8.2 gezeigten Pathways

^f: Protein in der Literatur beschrieben als prognostischer Marker in MCL (prog. MCL): MCM6 ¹(Schrader et al, 2005), MKI67 ³(Raty et al, 2002; Sviatoha et al, 2000), in MCL hochreguliert: MCM2 ²(Obermann et al, 2005), CDK2 ⁴(Korz et al, 2002), TCL1A ⁷(Aggarwal et al, 2009) ⁸(Antonucci et al, 2003), auf Transkriptomebene als Zielgen gefunden: PDCD4, PDCD6IP ⁵(Calin et al, 2008) sowie CDK2 und CDC2 ⁹(Takeshita et al, 2009) oder Proteine aufgrund der 13q Deletion hochreguliert: TOP2A ⁶(Skawran et al, 2008)

HGNC Symbol ^a	Protein Name	Protein-Niveau				mRNA-Niveau		Vorhersage-Algorithmus ^c	Proteomik-Experiment ^d , Pathway ^e , Literatur ^f
		SILAC ^b		Western-Blot ^b		Microarray ^b			
		miR-15a	miR-16-1	miR-15a	miR-16-1	miR-15a	miR-16-1		
SERPINB6	cDNA, FLJ95410, highly similar to Homo sapiens serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B(ovalbumin), member 6 (SERPINB6), mRNA	-3,20	-2,77			-2,08	-1,96		
BCAT1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	-2,65	-2,63			-1,57	-1,38	RNA22 3'UTR	
CD44	CD44 antigen	-2,53	-2,05			-1,98	-1,17		
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B	-1,98	-3,56					RNA22 CDS (miR-16)	
ASNS	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	-1,74	-0,51					RNA22 CDS (miR-15a)	
ASS1	Argininosuccinate synthase	-1,71	-2,16			-1,43	-1,63		
TWF2	Twinfilin-2	-1,70	-1,44					RNA22 CDS	
ITPR1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	-1,55	-2,11					PicTar, PITA, RNA22 3'UTR (miR-15a), RNA22 CDS	
MAP4	Microtubule-associated protein 4	-1,51	-1,52					PITA	
TOP2B	DNA topoisomerase 2-beta	-1,40	-1,53					RNA22 CDS (miR-15a)	

FHL1	Four and a half LIM domains 1 variant	-1,31	-0,52			RNA22 5'UTR (miR-15a)	
S100A4	Protein S100-A4	-1,30	-1,07	1,69	2,38	miRanda (miR-16), RNA225'UTR (miR-16)	
PRKCD	Protein kinase C delta type	-1,30	-1,48			RNA22 CDS (miR-15a), miRanda (miR-16)	
FLNB	Filamin B	-1,29	-1,24			RNA22 CDS (miR-15a)	
FANCD2	Fanconi anemia group D2 protein	-1,28	-1,93			RNA22 CDS (miR-16)	
PSPHL	Phosphoserine phosphatase	-1,24	-0,92			miRanda (miR-16)	
VPRBP	Protein VPRBP	-1,19	-1,18			RNA22 CDS (miR-16)	
NUDCD3	NudC domain-containing protein 3	-1,11	-0,66			RNA22 5'UTR (miR-15a), RNA22 3'UTR (miR-16), RNA22 CDS	
HEATR2	HEAT repeat-containing protein 2	-1,08	-0,79			RNA22 CDS	
LANCL1	LanC-like protein 1	-1,07	-0,87			DIANA microT	
VAV2	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	-1,06	-0,45			TargetScan, RNA22 CDS (miR-15a), miRanda (miR- 16), RNA22 3'UTR (miR-16)	
KIF15	Kinesin-like protein KIF15	-1,05	-1,55			RNA22 CDS (miR-15a)	Role of Ran in mitotic spindle regulation
NOC4L	Nucleolar complex protein 4 homolog	-0,95	-0,17			RNA22 CDS	
DHX30	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	-0,95	-1,27			miRanda (miR-16)	
SMARCC1	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	-0,91	-1,29			RNA22 3'UTR (miR-15a)	
GNAI2	Galphai2 protein	-0,91	-0,69			RNA22 CDS	
MRPS6	28S ribosomal protein S6, mitochondrial	-0,88	-1,18			RNA22 CDS, RNA22 3'UTR (miR-16)	
PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	-0,88	-0,86	-0,56	-0,70	TargetScan, PITA	Transkriptom ⁵
ABCF2	Putative uncharacterized protein ABCF2 (ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2, isoform CRA_d)	-0,85	-0,56			PITA, RNA22 3'UTR (miR- 15a), miRanda (miR-16), RNA22 3'UTR (miR-16)	pSILAC (-0,72)
DYNC1LI1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	-0,83	-0,91			RNA22 CDS (miR-15a)	
UBE2E1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1	-0,82	-2,02			miRanda (miR-16), RNA225'UTR (miR-16)	
WDFY4	Uncharacterized protein C10orf64	-0,82	-0,26			RNA22 CDS	

PIK3CD	Phosphatidylinositol 3-kinase delta catalytic subunit	-0,81	-0,55		RNA22 CDS (miR-15a)	
ACSL1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	-0,80	-0,78		PicTar	
ATXN10	Ataxin-10	-0,77	-0,33		RNA22 CDS (miR-15a)	
EMG1	Probable ribosome biogenesis protein NEP1	-0,75	-0,63		miRanda (miR-16)	
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	-0,69	-0,50			Cell cycle
HIGD1A	cDNA, FLJ92076, Homo sapiens likely ortholog of mouse hypoxia induced gene 1(HIG1), mRNA	-0,68	-1,52		TargetScan, PicTar, PITA, RNA22 3'UTR, miRanda (miR-16)	
MCM6	DNA replication licensing factor MCM6	-0,65	-0,45			Cell cycle, prog. MCL ¹
GCSH	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	-0,64	-0,91		miRanda (miR-16)	
NUP210	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	-0,64	-1,27		TargetScan, RNA22 3'UTR, RNA 22 5'UTR (miR-15a), RNA22 CDS	
MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	-0,63	-0,51			Cell cycle, MCL ²
NAE1	Uncharacterized protein NAE1	-0,62	-0,74		RNA22 CDS	
MCM5	DNA replication licensing factor MCM5	-0,61	-0,45			Cell cycle
RIF1	Telomere-associated protein RIF1	-0,61	-0,76		RNA22 5'UTR (miR-15a), RNA22 CDS	
NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1	-0,60	-1,15			Role of Ran in mitotic spindle regulation
MCM4	DNA replication licensing factor MCM4	-0,57	-0,47			Cell cycle
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	-0,55	-0,60		miRanda (miR-16)	Cell cycle
SEPT9	cDNA FLJ55422, highly similar to Septin-9	-0,55	-0,99		RNA22 3'UTR	
LTA4H	Leukotriene A-4 hydrolase	-0,53	-0,98		miRanda (miR-16)	
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	-0,53	-0,27		RNA22 3'UTR	
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	-0,51	-0,47			Cell cycle
TUBB2C	Tubulin beta-2C chain	-0,48	-0,49		miRanda (miR-16)	
DLSD	cDNA FLJ50661, highly similar to Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.8.1.4)	-0,47	-0,35		RNA22 CDS, miRanda (miR-16)	
UBE2H	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H	-0,46	-1,24		miRanda (miR-16)	
OGFOD1	2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain-containing protein 1	-0,45	-0,70		RNA22 CDS (miR-16)	

PTGES3	cDNA FLJ40895 fis, clone UTERU2002294, highly similar to Prostaglandin E synthase 3 (Prostaglandin E synthase 3 (Cytosolic), isoform CRA_c)	-0,45	-0,18			RNA22 3'UTR (miR-15a)	
MKI67	Isoform Long of Antigen KI-67	-0,44	-0,95				prog. MCL ³
IMPDH2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	-0,42	-0,92			RNA22 CDS (miR-16)	
MATR3	Uncharacterized protein MATR3	-0,34	-0,78	-0,63	-0,75	RNA22 3'UTR (miR-16-1)	
FASN	Fatty acid synthase	-0,29	-0,53			TargetScan, DIANA microT, PITA, RNA22 CDS (miR-16)	
CHD4	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	-0,29	-0,45			RNA22 CDS (miR-16)	
CDK2	Cell division protein kinase 2	-0,26	-0,99				Cell cycle, MCL ⁴ , Transkriptom ⁹
SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	-0,47	-0,14			RNA22 CDS (miR-16)	
PSME3	Proteasome activator complex subunit 3	-0,51	-0,14			TargetScan, DIANA microT, PicTar	
UBE2I	Ubiquitin carrier protein	-0,65	-0,13			PITA, RNA22 3'UTR (miR-16)	
ACTN4	Alpha-actinin-4	-0,54	0,04			RNA22 CDS (miR-15a)	
MTHFD2	Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial	-0,63	0,07			RNA22 3'UTR (miR-15a)	
PDCD4	Programmed cell death protein 4	-0,59	0,41			TargetScan, DIANA microT, PicTar, PITA	Transkriptom ⁵
KIAA1618	Protein ALO17	-0,14	-0,86			RNA22 CDS (miR-15a)	
VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	-0,13	-0,71			TargetScan	
ACAA2	Uncharacterized protein ACAA2	-0,11	-0,61			RNA22 CDS	
CYCS	Cytochrome c	-0,04	-0,68			RNA22 3'UTR (miR-15a)	
CDC2	Cell division control protein 2 homolog	-0,04	-0,54				2D, Cell cycle, Transkriptom ⁹
FAM62A	Extended-synaptotagmin-1	-0,02	-0,84			RNA22 CDS	
TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha	0,00	-1,00				13q ⁶
FLNA	Filamin-A	0,01	-0,46			RNA22 CDS (miR-15a)	
SRP14P1	Signal recognition particle 14 kDa protein	0,06	-1,02			miRanda (miR-16)	

GOT2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	0,07	-0,48			miRanda (miR-16)	
RTN4	Reticulon-4	0,25	-0,78			RNA22 3'UTR (miR-15a), RNA22 CDS (miR-16)	pSILAC (-1,02)
KPNA2	Importin subunit alpha-2	0,30	-0,84	-1,09	-0,73		Role of Ran in mitotic spindle regulation
TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma protein 1A	0,61	-1,28			-1,44	MCL ^{7,8}
ANXA5	Annexin A5	0,70	0,63	0,44	-0,18	RNA22 CDS (miR-15a)	

Der Vergleich der beiden Methoden auf Proteinebene (SILAC und Western-Blot) deutet darauf hin, dass die Regulationen zwar ähnlichen sind, aber es auch einige Ausreißer gibt, die bereits in 3.4.5 beschrieben wurden. Es zeigt sich, dass die am stärksten herunterregulierten Proteine überwiegend auch auf mRNA-Ebene herunterreguliert sind. Bei S1004A ist im Gegensatz zu der Herunterregulation auf Proteinebene das mRNA-Niveau gesteigert. Bei TCL1A ist interessant, dass es nur durch miR-16-1 herunterreguliert wird und zwar sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene. Beim Vergleich Transkriptomik mit Proteomik ist anzumerken, dass bei SILAC und den Western-Blots Granta-519 als Kontrolle diente und bei den Microarray-Daten G71, der Selektionskassetten-Klon von Granta-519. Dies sollte aus den in 3.4.1 beschriebenen Gründen allerdings nicht zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Durch den Abgleich mit den Vorhersage-Algorithmen Daten kann keine Korrelation zur Regulationsstärke gezogen werden. Vielmehr sind die Vorhersagen über die Regulationsstärken hinweg verteilt. Einige Zielproteine sind nur durch einige wenige Vorhersagen abgedeckt und andere wie z.B. PDCD4, FASN, NUP210, HIGD1A, ABCF2, VAV2 und ITPR2 werden mit einer ganzen Reihe von Vorhersage-Algorithmen identifiziert. Für manche Proteinen, die nur durch eine miRNA reguliert werden, wie z.B. ATCN4 und MTHFD2 durch miR-15a und SRP14P1, GOT2 sowie RTN4 durch miR-16-1, zeigt sich die Regulation nur durch eine miRNA ebenfalls in den Daten der Vorhersage-Algorithmen.

Die Übereinstimmung mit den publizierten Proteomik-Experimenten für miR-15a bzw. miR-16-1 ist zwar gering (siehe 3.4.9), allerdings ist interessant zu sehen, dass z.B. für RTN4 bereits eine Herunterregulation in HeLa Zellen durch miR-16 gefunden wurde (Selbach et al, 2008) und auch bei den hier durchgeführten Experimenten nur miR-16-1 und nicht miR-15a diesen Effekt hervorruft. RTN4 wird zudem durch Vorhersage-Algorithmen als Zielprotein bestätigt. ABCF2, welches als miR-16 Zielprotein in HeLa publiziert wurde (Selbach et al, 2008) und in Granta-519 sowohl durch miR-15a als auch durch miR-16-1 herunterreguliert wird, bestätigt sich ebenfalls in den Daten der Vorhersage-Algorithmen. CDC2 ist als Zielprotein einer gemeinsamen Überexpression von miR-15a und miR-16-1 gefunden worden (Calin et al, 2008) und ist auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten herunterreguliert. Es kann allerdings nachgewiesen werden, dass dieser Effekt auf miR-16-1 und nicht auf miR-15a beruht. Zudem ist CDC2 dem Zellzyklus bei den Signaltransduktionsweg-Analysen zugeordnet worden (siehe 3.4.8.2).

Von den in den Signaltransduktionswegen zugeordneten Proteinen sind PCNA (Zellzyklus) und KIF15 (Rolle von Ran bei der mitotischen Spindelregulation) auch durch die Vorhersage-Algorithmen bestätigt. Zudem ist KPNA2, das beim Signaltransduktionsweg „Rolle von Ran bei der mitotischen Spindelregulation“ beteiligt ist, auch auf mRNA-Ebene reguliert.

PDCD4 ist in den Daten der Vorhersage-Algorithmen enthalten und dessen Regulation wurde auch auf mRNA-Ebene bereits beschrieben (Calin et al, 2008).

4 DISKUSSION

4.1 Optimierung und Validierung der SILAC-Analyse

4.1.1 Vermeidung der Arginin zu Prolin Konvertierung

Bei der relativen Quantifizierung mittels SILAC handelt es sich um eine 2002 erstmals beschriebene Methode (Ong et al, 2002). SILAC ist aufgrund der metabolischen *in-vivo* Markierung mit stabilen Isotopen die Methode der Wahl für eine möglichst akkurate Quantifizierung von Proteinen in Zellkulturen. Gerade aufgrund der begrenzten Anzahl von Zelllinien, die bis jetzt für SILAC verwendet wurden, ist es unerlässlich, dass die Effizienz der Markierung überprüft wird. Zwar stellte die vollständige Markierung in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (293T und Granta-519) kein Problem dar, allerdings konnten zusätzliche schwere Peptidisotopen-Muster detektiert werden, die auf einer metabolischen Konvertierung von Arginin zu Prolin beruhen (Blagoev & Mann, 2006). Bei diesem Phänomen wird schweres $^{13}\text{C}_6$ -Arginin (Massenunterschied schwer zu leicht von 6,02 Da) zu schwerem $^{13}\text{C}_5$ -Prolin (Massenunterschied schwer zu leicht von 5,02 Da) konvertiert (siehe 3.2.1). Dadurch tritt neben den schweren und leichten Peptidisotopen-Mustern noch ein weiteres Isotopen-Muster auf, in dem zusätzlich neben schwerem Arginin oder Lysin schweres Prolin enthalten ist und somit dieses Peptidmuster um weitere 5,02 Da differiert. Die Aminosäuren Arginin und Lysin werden für die SILAC Markierung verwendet, da sie beim Verdau durch Trypsin als Spaltstelle dienen und essentielle Aminosäuren sind. Für Arginin konnte gezeigt werden, dass es sowohl zu Prolin als auch zu Glutaminsäure umgewandelt werden kann (Morris, 2007). Es galt also die Konvertierung von Arginin zu Prolin zu beweisen und einen Umbau zu Glutaminsäure auszuschließen. Falls eine solche Konvertierung von Prolin vorlag, sollte versucht werden, diese zu vermeiden oder zu kompensieren. Abbildung 3-6 zeigt eine Abnahme des Verhältnisses des schweren zu leichten Peptidmusters in Abhängigkeit von der Anzahl an Prolinen in den Peptiden. Dagegen konnte eine Abhängigkeit zu der Anzahl der in einem Peptid enthaltenen Glutaminsäureresten nicht festgestellt werden. Dies zeigt, dass die Konvertierung von Arginin zu Prolin tatsächlich auftritt und deshalb entweder kompensiert oder besser vermieden werden muss. Ein Ansatz ist, bei der bioinformatischen Auswertung die Intensitäten der zusätzlichen Prolin Peptidmuster zu den schweren Peptidmustern zu addieren. Diese Vorgehensweise wurde in die Auswertungs-Software Census implementiert (Park et al, 2009), wobei von Nachteil ist, dass dieser Ansatz nur mit der Software Census (Park et al, 2008) möglich ist. Da nur beim ersten schweren Prolin Peptidmuster ein hinreichendes Signal zu Rausch Verhältnis besteht, wird nur dieses berücksichtigt. Wie in Abbildung 3-6 gezeigt wurde, tragen allerdings auch Peptide mit mehr als einem Prolin zu veränderten Verhältnissen zwischen schweren und leichten Peptidmustern bei und dies wird durch diesen Ansatz nicht berücksichtigt. Anders verhält es

sich bei einem zweiten Ansatz, der in der bioinformatischen Auswertung die Arginin zu Prolin Konvertierung zu berücksichtigen versucht. Beim Programm StatQuant (van Breukelen et al, 2009) können die Verhältnisse von Peptiden mit mehr als einem Prolin kompensiert werden. Dies geschieht nicht durch die Addition der berechneten Intensitäten der Prolin Peptidmuster, sondern durch Berücksichtigung eines Koeffizienten für Prolin-haltige Peptide. Problematisch ist dabei allerdings, dass dieser Koeffizient statisch ist und somit nicht zwischen der Anzahl an enthaltenen Prolinen unterscheiden kann. In Abbildung 3-6 wurde allerdings gezeigt, dass mit der steigenden Anzahl an Prolinen pro Peptid sich die Verhältnisse nicht proportional verhalten, da die Wahrscheinlichkeit für den kompletten Ersatz von leichten mit schweren Prolinen mit der Anzahl an Prolinen pro Peptid abnimmt. Dies führt somit zu einer Überkompensierung und einer erneuten Verschlechterung der Quantifizierungsgenauigkeit. Ein Vorteil von StatQuant ist, dass es für verschiedene Quantifizierungsprogramme verwendet werden kann, also auch für MSQuant (Andersen et al, 2003; Schulze & Mann, 2004) und MaxQuant (Cox & Mann, 2008; Cox et al, 2009).

Auf der experimentellen Seite ist ein möglicher Ansatz die Verwendung von ebenfalls mit stabilen Isotopen markierten leichten Aminosäuren (Van Hoof et al, 2007). Dies führt nicht nur bei den schweren sondern auch bei den leichten Peptidmustern zu zusätzlichen Prolinkonvertierungs-Peptidmustern und damit zu den gleichen Effekten. Neben den höheren Kosten für die leichten Aminosäuren und der geringeren Möglichkeit, mehrere Markierungen zwecks Multiplexing (Molina et al, 2009) zu verwenden, bleibt bei allen drei bis jetzt beschriebenen Ansätzen das Problem bestehen, dass viele zusätzliche Peptidmuster auftreten. Dies hat den Nachteil, dass sie zu einer Verringerung des eigentlichen Peptidsignals führen, wodurch die Identifizierung mittels MS/MS sowie die Quantifizierung anhand des MS-Signals verschlechtert wird. Zudem führen die schweren Prolin Peptidmuster zu einer unnötigen Erhöhung der Anzahl an Signalen in der MS-Spur, wodurch die Identifizierung von verschiedenen Peptiden verringert wird, da diese mit den schweren Prolin Peptidmustern bei der Auswahl zur MS/MS Generierung konkurrieren. Nur zwei Methoden vermeiden die Konvertierung von Arginin zu Prolin, in dem entweder die Arginin-Konzentration auf ein Optimum titriert wird (Blagoev & Mann, 2006) oder nicht markiertes Prolin hinzugefügt wird (Bendall et al, 2008). Die Bestimmung der optimalen Arginin-Konzentration ist kein einfacher Prozess, da bei einem Überschuss von Arginin dieses wie oben beschrieben zu Prolin konvertiert wird und es bei einer zu geringen Konzentration von Arginin passieren kann, dass die Markierung durch schweres Arginin nicht komplett ist. Aus diesen Gründen muss für jede Zelllinie die optimale Arginin-Konzentration bestimmt werden. Beim Hinzufügen von nicht markiertem Prolin wird die Konvertierung von Arginin zu Prolin dadurch verhindert, dass genügend Prolin vorhanden ist und keine Konvertierung nötig ist. Die verwendete Konzentration von nicht markiertem Prolin ist dabei relativ unbedenklich (Bendall et al, 2008). Diese Optimierung konnte in dieser Arbeit erfolgreich angewendet werden und wurde anhand der 293T Zellen verifiziert. In Abbildung 3-5 ist gezeigt, welche Verbesserungen die Verwendung von nicht markiertem Prolin ergibt. Dabei nähert sich sowohl die Verteilung der Peptid- als auch die der Protein-Verhältnisse an die

erwartete Gauß-Verteilung bei gleich behandelten Proben an. Zudem verringert sich die Varianz bei der Protein-Quantifizierung um die Hälfte, was für eine akkurate Quantifizierung gerade bei nur geringen zu erwartenden Regulationen essentiell ist, da die Varianz und damit die Standard-Abweichung in der Bestimmung der Regulationsgrenzen berücksichtigt wird.

Durch die Evaluierung der am besten geeigneten Methode zur Vermeidung bzw. Kompensation der Arginin zu Prolin Konvertierung konnte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse der SILAC-Analyse eine höchst mögliche Qualität in Hinblick auf eine akkurate Quantifizierung gewährleisten.

4.1.2 Reproduzierbarkeit und Validierung der SILAC-Technik

Die Wiederfindungsrate von Protein-Identifikationen von technischen Replikaten bei MS-Analysen liegt bei etwa 70% (eigene Auswertungen und (Elias et al, 2005)). Dies hat zur Folge, dass bei einer möglichst hohen Proteomabdeckung es nur bedingt möglich ist, biologische Replikate zu berücksichtigen. Bei den dieser Arbeit zugrunde liegenden Analysen wurden zwei biologischen Replikaten berücksichtigt, die wechselseitig markiert waren (siehe 2.2.8). Für die Quantifizierung eines Proteins wurde mindestens drei Messpunkte in einem der beiden Replikate oder in beiden Replikaten zusammen benötigt. Es konnte allerdings zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit zwischen beiden Messungen der Pearson-Korrelationsfaktor berechnet werden, um ein Maß dafür zu erhalten, ob die Reproduzierbarkeit hinreichend ist. Für miR-15a und miR-16-1 in 3.4.2 und 3.4.3 konnte mit Korrelationsfaktoren von 0,9 (miR-15a) und sogar 0,94 (miR-16-1) eine sehr gute Korrelation und somit eine gute Reproduzierbarkeit zwischen den wechselseitig markierten biologischen Replikaten festgestellt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass bei der SILAC-Analyse die Ergebnisse zwischen den wechselseitigen Markierungen und den biologischen Replikaten hoch reproduzierbar sind.

Die Validierung der mit SILAC erhaltenen Ergebnisse wurde mit einer orthogonalen (unabhängigen) Methode, nämlich der Western-Blot Analyse durchgeführt (siehe 3.3.3 und 3.4.5). Die Western-Blot Ergebnisse zeigten, dass die SILAC Ergebnisse in mehreren biologischen Replikaten (vier für miR-155 in 293T Zellen und drei bei miR-15a bzw. miR-16-1 in Granta-519) bestätigt werden konnten. Der Großteil der Western-Blot Validierungen zeigt eine Übereinstimmung mit den SILAC-Ergebnissen, aber es kommt auch zu einigen wenigen Ausreißern. So zeigen z.B. die Western-Blots in 3.3.3 eine teils geringere Regulation als mit SILAC bestimmt und in 3.4.5 sind nicht immer die Regulationen für beide miRNAs in Übereinstimmung mit den SILAC-Werten. Insgesamt sind allerdings keine größeren Widersprüche zu erkennen und die gefundenen Unterschiede lassen sich durch die verschiedenen Detektionssysteme erklären. So kann es z.B. sein, dass sich solche Unterschiede durch Isoformen der Proteine und post-translationale Modifikationen ergeben.

Durch die Western-Blot Validierung konnte gezeigt werden, dass die durch SILAC gewonnenen Ergebnisse durch mehrere biologische Replikate validiert werden können und zudem unabhängig vom verwendeten SILAC-Medium sind. Gerade die Validierung von geringen Regulationen wird unzureichend in Publikationen durch eine orthogonale Methode überprüft und konnte durch die Verwendung des ECLplex Systems (siehe 2.2.6) für Western-Blots ermöglicht werden.

4.2 Quantitative Proteomik-Techniken zur Identifizierung von mikroRNA Zielproteinen

Quantitative Proteomik zur Identifizierung von miRNA Zielproteinen wird angewendet, da der mikroRNA Hauptwirkmechanismus in der Inhibierung der Translation und nicht in der Degradation der mRNAs liegt (Bartel, 2004). Die beiden quantitativen Proteomik-Techniken, zweidimensionale Gelelektrophorese und massenspektrometrische Quantifizierung mittels stabiler Isotopen, wurden dabei bis jetzt erfolgreich angewendet. Bei 2D GE wurde entweder mittels Coomassie-Färbung (Calin et al, 2008) oder 2D DIGE (Nakahara et al, 2005; Tian et al, 2008; Zhu et al, 2007) quantifiziert. Bei der massenspektrometrischen Quantifizierung wurde entweder die metabolische Markierung mittels SILAC (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008; Vinther et al, 2006) oder die chemische Markierung mittels iTRAQ angewendet (Yang et al, 2009). In dieser Arbeit wurden die beiden technisch vielversprechendsten Techniken, 2D DIGE und SILAC, eingesetzt, um eine Aussage über ihre Anwendungsmöglichkeiten im Vergleich zueinander bei der miRNA Zielprotein Identifizierung zu treffen.

4.2.1 2D DIGE

Die 2D DIGE Methode wurde in dieser Arbeit angewendet, da sie als Vorteil gegenüber der klassischen zweidimensionalen Gelelektrophorese die Vermeidung der Gel-zu-Gel Variationen durch die Verwendung eines internen Standards und die höhere Sensitivität durch Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen hat. In den durchgeführten 2D DIGE Experimenten wurden die pH-Bereiche von 4 bis 7 und 6 bis 9 in der ersten Dimension (IEF) abgedeckt; die Auflösungsstrecke war in beiden Dimensionen ca. 24 cm, um eine größtmögliche Proteomabdeckung zu erzielen. Durch die Verwendung von vier (miR-155 in 293T Zellen) bzw. sechs (miR-15a und miR-16-1 in 293T Zellen) biologischen Replikaten sollte sichergestellt werden, dass selbst die durch miRNAs bedingten geringen Regulationen statistisch signifikant analysiert werden konnten.

Beim ersten Versuchsansatz zur Identifizierung von miR-155 Zielproteinen in 293T Zellen wurde miR-155 durch ein Vektorkonstrukt überexprimiert und mit dem endogenen miR-155 Niveau in 293T Zellen verglichen. Allerdings stellten sich dabei nur fünf Proteine als reguliert

heraus, darunter vier als potentielle herunterregulierte Zielproteine, wobei die Regulationen das 1,4 fache nicht überschritten. Bei den drei anderen Publikationen, in denen 2D DIGE angewendet wurde, um miRNA Zielproteine zu identifizieren, lassen sich die Ergebnisse von Nakahara et al und Tian et al nicht mit den Experimenten in dieser Arbeit vergleichen. Nakahara et al untersuchten miRNA Zielproteine mittels Dicer *knock-out* Mutanten von *Drosophila* Oozyten (Nakahara et al, 2005), wobei daraus nicht geschlossen werden kann, ob auch die Effekte von einzelnen miRNAs mittels 2D DIGE detektiert werden können. Tian et al konnten ebenfalls nur indirekt miRNA Zielproteine nachweisen, indem die Proteomprofile mit den miRNA-Profilen zweier verschiedener Gewebe verglichen und daraus mittels Daten der Vorhersage-Algorithmen die regulierten miRNAs den entsprechend regulierten Proteinen zugeordnet werden konnten (Tian et al, 2008). Die Detektion von Zielproteinen einzelner miRNAs mittels 2D DIGE konnte nur in der Untersuchung von miR-21 Effekten in der Brustzelllinie MCF-7 durch Zhu et al gezeigt werden. Dabei wurden MCF-7 Zellen in Nacktmäuse injiziert und mit Antagomirs, die gegen die entsprechende miRNA antagonistisch wirken, behandelt (Zhu et al, 2007). Sowohl die Regulationsstärke, die bei Zhu et al bei einer Regulation ab dem 2fachen berücksichtigt wurde, als auch die Anzahl der regulierten Proteinen (24 bei Zhu et al) sind mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen nicht vergleichbar (siehe 3.1.1). Diese Unterschiede scheinen in der Verwendung des Tumormodells bzw. der Zelllinie, der verwendeten Transfektionsmethode (Antagomirs anstatt Vektor-bedingte Überexpression) bzw. der untersuchten miRNAs begründet zu sein.

Um Unterschiede durch die Überexpressionsmethode (Vektor oder synthetische miRNAs) und Effekte durch unterschiedliche miRNAs auszuschließen, wurden die Effekte von miR-15a und miR-16-1, die bereits mittels klassischer 2D GE zu Zielprotein Identifizierungen geführt haben (Calin et al, 2008), untersucht. Dazu wurden die mikroRNAs miR-15a und miR-16-1 je in einem eigenen Vektor kotransfiziert und mittels 2D DIGE die Überexpression der miRNAs gegenüber ihres endogenen Gehalts in der 293T Zelllinie verglichen (siehe 3.1.2). Dabei sind im Vergleich zu miR-155 etwa gleich viele Proteine reguliert (vier im Vergleich zu fünf bei miR-155) und die Regulationsstärken überschreiten auch hier nicht das 1,5fache. Im Vergleich dazu wurden in den Untersuchungen von Calin et al mit den gleichen miRNAs, die allerdings von nur einem Vektorkonstrukt überexprimiert wurden, in der MEG01 Zelllinie (megkaryoblastische Leukämie Zelllinie) (Ogura et al, 1985) 27 Proteine ab einer 4fachen Regulation gefunden (Calin et al, 2008). Die Anzahl der regulierten Proteine ist auch deshalb interessant, da die Proteomabdeckung in den Untersuchungen von Calin et al um ein vielfaches geringer ist als in den Untersuchungen in dieser Arbeit. Im Vergleich der eigenen miR-15a und miR-16-1 Untersuchungen mit denen von Calin et al ist sicherlich eine mögliche Erklärung die geringe Überexpression der beiden miRNAs aufgrund der Kotransfektion, aber auch die Zelllinie könnte einen Einfluss haben und den gravierenden Unterschied erklären.

Im Vergleich der Transfektion von miR-155 zur Kotransfektion von miR-15a und miR-16-1 ist festzustellen, dass ein möglicher kombinatorischer Effekt (Ivanovska & Cleary, 2008) von miR-15a und miR-16-1 nicht festzustellen ist. Insgesamt ist die Anzahl der durch 2D DIGE detektierten regulierten Proteine geringer als aufgrund des globalen Einflusses von miRNAs

vermutet wird (Bartel, 2009). Trotz Verwendung der zurzeit besten zweidimensionalen Gelelektrophorese-Techniken konnten nur im unzureichenden Maße miRNA Zielproteine identifiziert werden.

4.2.2 SILAC

In den in 3.3.2 gezeigten Ergebnissen zu miR-155 regulierten Proteinen in 293T Zellen konnten 33 herunterregulierte Protein und somit potentielle miR-155 Zielproteine identifiziert werden. Bei der Überexpression von miR-15a und miR-16-1 in Granta-519 (siehe 3.4.2 und 3.4.3) konnten über 100 potentielle miRNA Zielproteine identifiziert werden. Die Anzahl der für miR-155 gefunden Zielproteine ist unter Berücksichtigung der Proteomabdeckung vergleichbar mit den anderen SILAC-Experimenten (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008; Vinther et al, 2006) und auch die Regulationsstärken sind in einem ähnlichen Bereich anzuordnen, wobei die Untersuchungen von Selbach et al deshalb eine Sonderstellung einnehmen, da durch pSILAC speziell nur die *de-novo* Synthese von Proteinen quantifiziert wird und somit größere Regulationen auftreten. Die höhere Anzahl an regulierten Proteinen und die größeren Effekte für miR-15a und miR-16-1 sind nicht mit bereits publizierten Ergebnissen vergleichbar, da bislang keine stabilen Zellklone sondern nur Kurzzeit-Effekte von miRNAs bis zu 96 Stunden (Yang et al, 2009) untersucht wurden. Die massenspektrometrische Quantifizierung mittels SILAC konnte bis jetzt erfolgreich für eine größere Anzahl einzelner miRNAs untersucht werden (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008; Vinther et al, 2006). Dabei wurden Zielproteine für miR-1 (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008; Vinther et al, 2006), miR-155, miR-16, miR-30a und let-7b (Selbach et al, 2008) sowie miR-124 und miR-181 (Baek et al, 2008) jeweils durch Transfektion von synthetischen miRNAs in HeLa untersucht. Zudem wurde für let-7b gezeigt, dass die Überexpression übereinstimmende Daten mit dem *knock-out* liefert (Selbach et al, 2008) und es konnten in *in-vivo* mittels neutrophiler Granulozyten der Maus miR-223 Zielproteine durch *knock-out* identifiziert werden (Baek et al, 2008).

4.2.3 Vergleich von SILAC mit 2D DIGE

In den in dieser Arbeit durchgeführten SILAC und 2D DIGE Untersuchungen zur Identifizierung von miRNA-Zielproteinen konnte anhand von miR-155 überexprimierenden 293T Zellen gezeigt werden, dass die SILAC Methode der 2D DIGE-Analyse in diesem Aspekt überlegen ist. Dies äußert sich darin, dass zwar in beiden Versuchen regulierte Proteine identifiziert wurden, allerdings die Anzahl bei 2D DIGE im Gegensatz zu SILAC viel geringer ist und die regulierten Proteine nicht durch Western-Blot validierbar waren (siehe 3.1.1). Dies kann an zwei möglichen Gründen liegen. Zum Ersten handelt es sich bei der 2D DIGE

Methode um eine *in-vitro* Markierungsmethode und dies kann im Gegensatz zur *in-vivo* Markierungsmethode SILAC zu artifiziellen Differenzen aufgrund der vorhergehenden Zellyse und der Markierungsreaktion führen. Zweitens könnte es sich bei den durch 2D DIGE als reguliert detektierten Proteinspots um Isoformen bzw. post-translational modifizierte Proteine handeln, wobei andere Isoformen bzw. post-translational Modifikationen dieser Proteine nicht reguliert sind. Diese beiden Punkte sind allerdings bei der Identifizierung von miRNA-Zielproteinen nicht von primärem Interesse. Durch die höhere Proteomabdeckung bei SILAC (ca. 4fach höher) können mehr Proteine quantifiziert werden. Auch ist zu erwarten, dass miRNAs Proteine beeinflussen, die in Signaltransduktionswegen involviert sind, geringer abundant sind und somit ebenfalls durch SILAC besser abgedeckt werden. Insgesamt erwies sich die SILAC-Methode in dieser Arbeit als Methode der Wahl. Dies wird ebenfalls durch die größere Anzahl der durch SILAC untersuchten miRNAs in aktuellen Publikationen bestätigt.

4.3 Vergleich von Proteomik und Transkriptomik zur Identifizierung von mikroRNA Zielproteinen bzw. Zielgenen

Der Hauptmechanismus der post-transkriptionalen Wirkung von mikroRNAs ist die translationale Inhibition (Bartel, 2004). Dabei wird der Effekt in einer schnellen Inhibitionswirkung der Translation gesehen mit einem anschließenden Abbau und/oder Delokalisation der miRNAs in sogenannte *P-Bodies* (Chan & Slack, 2006; Eulalio et al, 2007; Liu et al, 2005). Allerdings wurden bislang hauptsächlich Expressions-Microarrays in Kombination mit Vorhersage-Algorithmen zur Identifizierung von miRNA Zielgenen eingesetzt (Lim et al, 2005; Linsley et al, 2007).

In dieser Arbeit konnte bei der transienten Überexpression von miR-155 in 293T Zellen (siehe 3.3.6) durch Vergleich mit qRT-PCR Untersuchungen gezeigt werden, dass die miRNA Effekte wie beschrieben hauptsächlich auf einer translationalen Inhibition beruhen. Zudem konnte durch die stabile Überexpression von miR-15a und miR-16-1 in Granta-519 (siehe 3.4.7) beim Vergleich der durch SILAC gewonnen Proteomik-Daten mit den durch Microarray-Analyse gewonnen Transkriptomik-Daten gezeigt werden, dass der Haupteffekt auch bei Langzeitwirkung von miRNAs auf Proteinebene zu finden ist. Dies beinhaltet sowohl die Regulationsstärke als auch die Anzahl an regulierten Proteinen. Da bis jetzt nur die Effekte von mikroRNAs über 48 Stunden im Vergleich von Proteomik mit Transkriptomik analysiert wurden (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008) und mittels Proteomik nur eine maximal 96 Stunden andauernde Wirkung von miRNAs untersucht wurde (Yang et al, 2009), eröffnet diese Arbeit neue Einblicke in den Wirkmechanismus von miRNAs. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der Effekt von miRNAs auf einer viel geringeren und auch nicht zeitlich versetzten Degradation der mRNA beruht und deshalb die meisten regulierten Ziele (Gene oder Proteine) auf Proteomebene detektiert werden können.

4.4 Bindung der mikroRNAs an die Zielsequenzen der identifizierten Zielproteine

Um zu untersuchen, ob die mittels SILAC-Analyse identifizierten Zielproteine primäre miRNA Ziele sein können, wurden verschiedene bioinformatische Untersuchungen zur Bindung von miRNAs mit mRNAs durchgeführt (siehe 4.4.1). Zudem wurde untersucht, ob es eine Präferenz für die Bindung der miRNAs in einem der mRNA-Bereiche (5'UTR, CDS, 3'UTR) gibt (siehe 4.4.2). Da sowohl Daten zu stabil als auch zu transienten miRNA Überexpressionen in dieser Arbeit generiert wurden, konnte auch verglichen werden, ob dies einen Einfluss auf die Übereinstimmungen in den Vorhersage-Algorithmen bzw. mit den *seed*-Sequenzen hat (siehe 4.4.3). Durch die Überexpression einer miRNA kann die Biogenese von endogenen miRNAs beeinträchtigt werden, um dies auszuschließen, wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt (siehe 4.4.4). Bei diesen Untersuchungen wurden nur die herunterregulierten Proteine als potentielle Zielproteine angesehen, wobei auch hochregulierte Proteine mögliche primäre miRNA Effekte sein können, obwohl dies erst vereinzelt nachgewiesen wurde (Orom et al, 2008).

4.4.1 miRNA Bindungsdetektion mittels Vorhersage-Algorithmen, *seed*-Sequenzen und Sylamer-Analyse

Dabei wurde untersucht, ob es eine Anreicherung von vorhergesagten Genen innerhalb der durch die miRNA regulierten Proteine gibt (siehe 3.3.5.1 für miR-155 und 3.4.6.1 für miR-15a bzw. miR-16-1). Die beste Identifikationsrate der Vorhersage-Algorithmen unter den herunterregulierten Proteinen zeigt RNA22 CDS mit Werten von ca. 20% Übereinstimmung bei miR-15a (miR-155: 16%, miR-16-1: ca. 12%) und vor allem einer guten Diskriminierung gegenüber den hochregulierten bzw. nicht regulierten Proteinen bei miR-155. Die anderen Vorhersage-Algorithmen zeigen meistens nur Übereinstimmungen von bis zu 5% auf und auch größtenteils keine Diskriminierung gegenüber den hochregulierten bzw. nicht regulierten Proteinen. RNA22 CDS zeigt in den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen die Fähigkeit, die höchste Anzahl an Zielproteinen vorherzusagen. Dieses Programm wurde in den anderen Proteomikstudien (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008; Vinther et al, 2006; Yang et al, 2009) nicht verwendet. Bei Baek et al konnte für PicTar und TargetScan die größte durchschnittliche Herunterregulation der Proteine gezeigt werden, die gefundenen Zielgene innerhalb der Gesamtmenge an herunterregulierten Proteinen bleibt aber auch eher gering. Dies ist im Gegensatz zu Selbach et al, wo über 50% der herunterregulierten Proteine durch die Vorhersage-Programme bestätigt werden konnten, wobei DIANA microT, TargetScan und PicTar die meisten Zielproteine vorhersagten. Die Daten geben allerdings leider keine Aussage über die Diskriminierung zu den hochregulierten Proteinen bzw. über die Spezifität. Bei Vinther et al zeigen 50% der Zielproteine eine Übereinstimmung mit einem der Vorsage-

Algorithmen (PicTar, TargetScan, miRanda). Die einzelnen Algorithmen haben dabei schlechtere Werte und zudem fehlt eine Aussage über die Spezifität der Algorithmen. Außerdem ist es kritisch, diese Daten zu bewerten, da nur ein kleiner Datensatz von insgesamt zwölf Zielproteinen zur Analyse diente. Bei Yang et al konnte keine Übereinstimmung mit den herangezogenen Vorhersage-Algorithmen beobachtet werden, weshalb genauso wie bei den Publikationen unter Verwendung von 2D Gelen (Calin et al, 2008; Zhu et al, 2007) nicht darauf eingegangen wurde. Es zeigt sich also, dass es zwar zu Übereinstimmungen von vorhergesagten Zielgenen mit den experimentell bestimmten Zielproteinen kommt, diese allerdings meistens gering sind und die Vorhersage-Algorithmen keine hohe Spezifität aufzeigen. Dies ist auch in Übereinstimmung mit Expression-Array Experimenten zu sehen, in denen es keine statistisch signifikanten Anreicherungen von vorhergesagten Genen gibt (Linsley et al, 2007). Keine Übereinstimmung eines Zielproteins mit einem der Vorhersage-Algorithmen bedeutet nicht, dass es sich um kein primäres Ziel handelt. Deshalb ist ein anderer Ansatz, die verschiedenen *seed*-Sequenzen (siehe 1.1.2) auf mögliche Anreicherungen unter den regulierten Proteinen zu untersuchen. Dies zeigte sich in allen Proteomik-Experimenten als beste Untersuchung der miRNA Bindung (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008; Vinther et al, 2006; Yang et al, 2009). Dabei zeigen die verschiedenen Sequenzen (7mer-A1 oder 7mer-m8 oder 8mer) unterschiedliche Charakteristika. In dieser Arbeit zeigt die 7mer-A1 Sequenz im 3'UTR-Bereich die höchste Sensitivität und die 8mer Sequenz die höchste Spezifität (siehe Abbildung 3-11). Die *seed*-Sequenz Übereinstimmung zeigt sich als bessere Validierung der primären miRNA Effekte als die Vorhersage-Algorithmen (Yang et al, 2009), wobei die Fehlerrate in Form von Falschpositiven unverändert hoch ist. Durch das Einbeziehen des *passenger* Stranges (miRNA*) in die *seed*-Sequenz Analyse für miR-15a und miR-16-1 unter 3.4.6.2 konnten keine Erkenntnisse gewonnen werden, in wie weit dieser Strang zur Regulation der Zielproteine beiträgt (Ro et al, 2007). Auch durch die Sylamer-Analyse konnte keine Anreicherung eines entsprechenden miRNA Sequenzmotives gezeigt werden. Dies scheint auch nur schwer möglich zu sein, da sich beim Vergleich von vorhergesagten Zielgenen und Zielproteinen mit *seed*-Sequenz Übereinstimmung keine Korrelation zur Regulationsstärke feststellen lässt, dies aber eine Voraussetzung für die Sylamer-Analyse ist (van Dongen et al, 2008). Ein weiterer Grund für die nicht statistisch signifikante Anreicherung von vorhergesagten Zielgenen mit *seed*-Sequenz ist, dass für miR-155 der Satz an regulierten Proteinen vermutlich zu gering ist und sich bei miR-15a und miR-16-1 zu viele potentielle sekundäre Effekte unter den herunterregulierten Proteinen befinden.

4.4.2 Übereinstimmungen der miRNA Zielsequenzen in den verschiedenen mRNA-Bereichen (5'UTR, CDS und 3'UTR)

Die 3'UTR Region gilt als die klassische Bindungsstelle von mikroRNAs und viele Publikationen konzentrieren sich auf diesen Bereich (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008). In dieser Arbeit konnte durch den Vergleich mit den Kandidatenlisten der Vorhersage-Algorithmen bei RNA22 CDS und den *seed*-Sequenz Analysen gezeigt werden, dass es auch potentielle funktionelle Bindungsstellen in der CDS und 5'UTR Region geben kann. Die Bindungsstellen in der CDS sind bereits mehrfach funktionell nachgewiesen worden (Duursma et al, 2008; Forman et al, 2008; Shen et al, 2008; Tay et al, 2008). Dagegen gibt es für die 5'UTR nur vereinzelte funktionelle Nachweise (Orom et al, 2008). Durch Bindungsstudien ist ebenfalls gezeigt worden, dass die bevorzugte Bindungsstelle der 3'UTR Bereich ist, aber auch viele Bindungen in der CDS stattfinden (Beitzinger et al, 2007; Chi et al, 2009; Tan et al, 2009). Durch diese Arbeit konnten damit weitere Indizien gesammelt werden, dass die 5'UTR und CDS Region als Bindungsstellen eine größere Rolle einnehmen könnten als vielfach angenommen. Da allerdings nicht zwischen primären und sekundären Zielproteinen unterschieden werden kann, ist eine Aussage über die Verhältnisse der Bindungen in den verschiedenen mRNA-Bereichen nicht möglich.

4.4.3 Unterschiede zwischen der stabilen und transienten miRNA Überexpression

Beim Vergleich der stabilen Überexpression von miRNAs anhand von miR-15a und miR-16-1 gegenüber der transienten Überexpression von miR-155 zeigte sich, dass es bei der transienten Transfektion vergleichsweise mehr primäre Zielproteine gibt (Verhältnis Hoch- zu Herunterregulationen, Vorhersage-Algorithmus Übereinstimmungen und Detektion von *seed*-Sequenzen) (siehe 3.3.5), wobei die Regulationen selbst geringer sind und insgesamt weniger regulierte Proteine detektiert werden konnten. Dagegen zeigten sich bei miR-15a und miR-16-1 stärkere und mehr Regulationen, aber keine so hohe relative Übereinstimmung mit den Vorhersagen bzw. *seed*-Sequenzen (3.4.6). Durch die stärkeren Regulationen kommt es auch zu einer Verschiebung der als signifikant geltenden Regulationsgrenzen, wodurch ebenfalls primäre Effekte verdeckt werden könnten. Es ist also festzustellen, dass durch die transiente Transfektion mehr primäre Zielproteine gefunden werden, wobei globale Veränderungen besser durch die stabile Überexpression detektiert werden können.

4.4.4 Ausschluss von möglichen unspezifischen Effekten der miRNA Überexpression

Durch die Überexpression von einzelnen miRNAs kann es zu einer Blockierung der Biogenese der endogen vorkommenden miRNAs kommen, was zur Folge hätte, dass das miRNA Profil einer Zelle verändert wird (Khan et al, 2009; van Dongen et al, 2008). Um solche Effekte auszuschließen, wurde die Sylamer-Analyse durchgeführt. Falls es zu einer Blockierung der endogenen miRNA Biogenese kommen würde, müssten die Zielproteine der am häufigsten vorkommenden miRNAs hochreguliert werden, da diese miRNAs ihre Wirkung nicht mehr ausüben könnten. Die Sequenzmotive dieser miRNAs wären also in der Sylamer-Analyse als negative Korrelation dargestellt. Da dies für alle drei miRNA Überexpressionen nicht festzustellen war (siehe 3.3.5.3 und 3.4.6.3), kann ein solcher Blockierungseffekt ausgeschlossen werden. Diese Analyse lässt allerdings keine Rückschlüsse auf mögliche andere Effekte der nicht physiologischen Überexpression der miRNAs zu.

4.5 Zelllinien-Spezifität von mikroRNA Zielproteinen

Durch das Vorliegen verschiedener proteomischer Untersuchungen zur Identifizierung von miRNA Zielproteinen ist es von Interesse zu überprüfen, inwieweit es dabei zu Übereinstimmungen kommt. Zuerst einmal muss ausgeschlossen werden, dass Unterschiede auf technischen Varianzen beruhen. Dazu wurden die drei Untersuchungen zu miR-1 Zielproteinen mittels pSILAC (Selbach et al, 2008) und SILAC (Baek et al, 2008; Vinther et al, 2006) jeweils in HeLa Zellen verglichen. Durch Baek et al wurden 103, durch Selbach et al 96 und durch Vinther et al 12 Proteine als herunterreguliert gefunden. Dabei ist anzumerken, dass bei Vinther et al nur ca. 500 Proteine quantifiziert wurden, was 1/5 der quantifizierten Proteine in Baek et al und Selbach et al entspricht. Dadurch lässt sich die vergleichsweise geringe Anzahl von herunterregulierten Proteinen bei Vinther et al erklären. Zudem wurden bei allen drei Experimenten verschiedene Programme zur Quantifizierung (Selbach et al: MaxQuant, Baek et al: VISTA, Vinther et al: MSQuant) und damit auch unterschiedliche Regulationsgrenzen bzw. Kriterien verwendet. Ausgehend von den Ergebnissen von Vinther et al ist die Übereinstimmung zu Selbach et al 50% (sechs Proteine) und zu Baek et al 25% (drei Proteine). Die Übereinstimmung zwischen Baek et al und Selbach et al beträgt 18% (18 Proteine). Dies zeigt, dass trotz der unterschiedlichen Auswerteprogramme und auch der unterschiedlichen SILAC-Analyse Technik in den Untersuchungen von Selbach et al (pSILAC: Quantifizierung von *de-novo* synthetisierten Proteinen) es bei der gleichen miRNA (miR-1) und in der gleichen Zelllinie (HeLa) erhebliche Übereinstimmungen der potentiellen miRNA Zielproteine gibt.

Mithilfe des Vergleichs von miR-155 Zielproteinen in 293T Zellen (diese Arbeit) mit denen in HeLa Zellen (Selbach et al, 2008) konnte gezeigt werden, dass miRNAs Zelllinien-spezifische

Zielproteine haben (siehe 3.3.7). 26 primäre Zielproteine konnten für miR-155 durch Luciferase-Reporter-Assay belegt werden (Faraoni et al, 2009). Drei davon konnten in dieser Arbeit als nicht in 293T Zellen reguliert festgestellt werden und es zeigte sich, dass alle drei primäre Zielproteine in anderen Zelllinien als 293T Zellen sind (PICALM in Raw 264.7 Zellen (O'Connell et al, 2008), RHOA in NMuMG Zellen (Kong et al, 2008) und FADD in MCF7 Zellen (Tili et al, 2007)).

Dies wurde ebenfalls durch die Vergleiche von miR-16-1 Zielproteinen in Granta-519 mit denen in HeLa (Selbach et al, 2008) sowie von miR-15a und miR-16-1 Zielproteinen in Granta-519 mit denen in MEG01 Zellen (Calin et al, 2008) verdeutlicht. Dabei zeigt sich zwar eine Übereinstimmung von zwei Proteinen zu Selbach et al und einem Protein zu Calin et al, allerdings ist diese Übereinstimmung durch die größere Anzahl an miRNA Zielproteinen mit einem bzw. zwei Prozent sehr gering (siehe 3.4.9). Bei den für miR-15a bzw. miR-16-1 mittels Luciferase-Reporter-Assay validierten Zielproteinen konnte BCL2 als Zielprotein sowohl in verschiedenen Prostatakrebszelllinien (RWPE-1, RWPE-2, LNCaP) (Bonci et al, 2008) als auch in MEG01 Zellen gezeigt werden (Cimmino et al, 2005), wobei in Granta-519 BCL2 durch diese Arbeit als nicht reguliert festgestellt wurde. CAPRN1 und HMGA1 sind zwei weitere Beispiele für Proteine, die in Granta-519 nicht reguliert sind, aber sowohl in HeLa als auch in MCF-7 Zellen als Zielproteine von miR-16 identifiziert wurden (Kaddar et al, 2009).

Bei Selbach et al wurden synthetische miRNAs zur Überexpression verwendet, was unter Umständen zu anderen Zielproteinprofilen führen könnte, da große Teile der Biogenese und damit auch der Regulation umgangen werden (Bellare & Sontheimer, 2007). Diese Erklärung kann zumindest teilweise ausgeschlossen werden, da in den Untersuchungen von Calin et al ebenfalls ein Vektorkonstrukt zur Überexpression Verwendung fand. Die Zelllinien-Spezifität von miRNAs wurde für einzelne Zielproteine bereits untersucht (Inomata et al, 2009). Was allerdings bislang fehlte, war eine Bestätigung mit größeren Datensätzen, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit möglich war. Wie lässt sich diese Spezifität von miRNA Zielproteinen bzw. Zielgenen aber nun erklären? Eine mögliche Erklärung ist die Theorie der *pseudotargets*, wonach es von Bedeutung ist, welche mRNAs in einer Zelle exprimiert sind. Sind z.B. in einer Zelle viele mRNAs exprimiert bzw. einige sehr hoch, die einer miRNA als Ziele dienen, dann wird deren Funktion abgepuffert (Seitz, 2009). Eine andere Erklärung ist, dass miRNAs eine synergetische bzw. kombinatorische Funktion haben, d.h. um die Translation von einer mRNA effektiv zu inhibieren, werden mehrere miRNAs benötigt. Wenn neben der überexprimierten miRNA die kombinatorische miRNA in einer Zelllinie ebenfalls höher endogen exprimiert wird, findet die Inhibition statt. In einer anderen Zelllinie findet die Inhibition allerdings nicht statt, da die kombinatorische miRNA nicht in ausreichender Stärke exprimiert wird (Ivanovska & Cleary, 2008). Aus diesen Gründen ist es wichtig, für eine biologische Aussage von mikroRNA Zielproteinen ein möglichst relevantes System zu untersuchen.

4.6 Funktionen der mikroRNA Zielproteine und ihre biologische Relevanz

4.6.1 miR-155

miR-155 ist in verschiedenen Krankheiten darunter Krebs und Lymphome im Speziellen reguliert (siehe 1.4.1). Bei der Analyse der Funktion der durch miR-155 regulierten Proteine zeigt sich, dass die herunterregulierten und somit potentiellen miR-155 Zielproteine in der Zellteilung und im Zellzyklus beteiligt sind (siehe 3.3.4), was häufig involvierte Prozesse beim Krebs sind (Johansson & Persson, 2008). Die Beeinflussung von mehreren Komponenten eines Prozesses ist dabei eine logische Konsequenz, da einzelne Proteine durch miRNAs nur feinregulatorisch, als sogenannte Rheostats, beeinflusst werden (Bartel, 2009). Nachfolgend wird die Funktion von einzelnen Proteinen, die durch eine weitere Methode verifiziert werden konnten, bei der Zellteilung und im Zellzyklus erläutert. CENPF, welches auch durch den Vorhersage-Algorithmus miRanda bestätigt wird, ist essentiell für das Chromosomenalignment und dessen Reduzierung äußert sich in einer Chromosomendekondensation gefolgt von Apoptose (Yang et al, 2005). CKAP5, das zusätzlich durch Western-Blot Analyse verifiziert wurde, durch die Algorithmen TargetScan, DIANA microT und RNA22 vorhergesagt wird und eine 8mer *seed*-Sequenz Übereinstimmung im 3'UTR hat, spielt eine Rolle in der Spindelpolintegrität und wird durch Aurora-A (AURKA) kontrolliert (De Luca et al, 2008). KIF11 wurde im Western-Blot validiert, hat eine 7mer-A1 *seed*-Sequenz Übereinstimmung in der CDS und scheint in den biologischen Prozessen der Zellteilung, der Anordnung der Kinetochoren, der Mikrotubuli basierenden Bewegung und im Zellzyklus involviert zu sein (siehe Tabelle 3-3). In der Literatur ist beschrieben, dass die Abnahme von KIF11 zu einer Inhibierung der Proliferation, Zunahme der Apoptose und zu einer veränderten Expression der Zellzyklus-Proteine wie Survivin (BIRC5) und Aurora-A (AURKA) führt (Koller et al, 2006). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass KIF11 den Abbau von Cyclin A und B inhibiert, Zellen in der M-Phase arretiert und den Beginn der Anaphase durch die Verhinderung der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse der Proteine blockiert, die für die Schwesterchromatid-Trennung verantwortlich sind (Townesley et al, 1997). PCM1, welches eine 7mer-m8 *seed*-Sequenz Übereinstimmung in der CDS hat, ist mit dem zentrosomalen Komplex während der G1- und S-Phase assoziiert und dissoziiert in der G2-Phase, wobei die Herunterregulation von PCM1 den Eintritt in die S-Phase verhindert. (Balczon et al, 1994; Balczon et al, 1995). KPNA2, das durch Western-Blot verifiziert wurde, vermittelt den nukleären Import von Chk2 (CHEK2), das die Checkpoint Arretierung in verschiedenen Zellzyklus-Phasen hervorruft (Zannini et al, 2003). Zudem ist KPNA2 wichtig für die nukleäre Lokalisation des MRN-Komplexes (MRE11-RAD50-NBS1), wobei NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome*) Funktionen eines Tumorsuppressors besitzt (Tseng et al, 2005).

Neben der funktionellen Bedeutung einzelner Proteine konnte ebenfalls für einige Proteine gezeigt werden, dass ihre Regulation durch miR-155 mit physiologischen Gegebenheiten

korreliert. FAM3C, das durch RNA22-CDS vorhergesagt ist und *seed*-Sequenz Übereinstimmungen der 7mer-A1 im 3'UTR-Bereich und CDS hat, ist im Sekretom bei Bauchspeicheldrüsenkrebs herunterreguliert (Gronborg et al, 2006). Durch die Überexpression von miR-155 bei Bauchspeicheldrüsenkrebs (Greither et al, 2009) kann durch diese Arbeit die Herunterregulation von FAM3C durch miR-155 beim Bauchspeicheldrüsenkrebs in Verbindung gebracht werden. Ein weiteres Beispiel ist die miR-155 Herunterregulation in Brustkrebs (Iorio et al, 2005; Yan et al, 2008) und die Verknüpfung der Daten aus dieser Arbeit mit der Hochregulation von KPNA2 in Brustkrebs (Dahl et al, 2006).

Eine weitere Verbindung zwischen miRNA Regulation und Zielproteinen ist die miR-155 Hochregulation durch TGFbeta (Kong et al, 2008) und die Herunterregulation von KPNA2 durch TGFbeta (Umegaki et al, 2007).

Die Beteiligung von TGFbeta und RANGAP1 bei der Lokalisation von SMAD3 (Kurisaki et al, 2006) ist eine weitere interessante Korrelation. Dabei induziert TGFbeta die Phosphorylierung von SMAD3 und bedingt dadurch den Import in den Nukleus. Auf der anderen Seite erhöht TGFbeta das miR-155 Niveau (Kong et al, 2008), was, durch die SILAC-Analyse und durch Western-Blot bestätigt, in einer Herunterregulation von RANGAP1 resultiert. RANGAP1 wiederum fördert den Export von SMAD3 aus dem Nukleus und die Herunterregulation von RANGAP1 vermindert dies. Damit konnte gezeigt werden, wie TGFbeta direkt durch Phosphorylierung von SMAD3 und die Erhöhung des miR-155 Niveaus die nukleäre Lokalisation von SMAD3 fördert.

Die angeführten Beispiele geben Hinweise auf die Verknüpfung der in dieser Arbeit identifizierten miR-155 Zielproteine im physiologischen Kontext. Dabei ist anzumerken, dass die Zielproteine von miR-155 als primäre Ziele nur bioinformatisch und nicht experimentell bestimmt wurden (siehe 3.3.5). Auch wenn es sich möglicherweise nicht um primäre, sondern um sekundäre Effekte handeln sollte, haben sie trotzdem eine Relevanz für die Funktion von miR-155 und könnten auf *down-stream* Effekte begründet sein. Wie in Abschnitt 4.5 gezeigt, scheinen die miRNA Zielproteine für die Zelllinien spezifisch zu sein. Dies erklärt auch, warum keine MCL-spezifischen Funktionen für miR-155 gezeigt werden konnten.

4.6.2 miR-15a und miR-16-1 im Mantelzelllymphom

Wie in Abschnitt 4.5 gezeigt, weisen miRNAs Zelllinien-spezifische Zielprotein-Profile auf. Deshalb wurde, um Mantelzelllymphom-spezifische Effekte für miR-15a und miR-16-1 zu detektieren, die Überexpression von miR-15a bzw. miR-16-1 in der Mantelzelllymphom-Zelllinie Granta-519 untersucht. Der Locus für miR-15a und miR-16-1 ist in MCL Patienten häufig deletiert (siehe 1.3.2), weshalb eine Überexpression von Proteinen in MCL mit

herunterregulierten Proteinen aus dieser Arbeit korreliert werden können. Da miR-15a und miR-16-1 auf der gleichen chromosomalen Region lokalisiert sind (siehe 1.4.2) und ca. 60% der beeinflussten Proteine durch beide miRNAs hervorgerufen werden (siehe 3.4.4), wurden in 3.4.8 die durch mindestens eine der beiden miRNAs beeinflussten Proteine für die Analysen der Bedeutung in biologischen Prozessen und Signaltransduktionswege herangezogen.

Die durch miR-15a und miR-16-1 herunterregulierten Proteine spielen in den drei biologischen Prozessen Zellzyklus, Zelltod und bei der DNA-Reparatur nach *Gene Ontology* eine Rolle (siehe 3.4.8.1). Die Beteiligung von miR-15a und miR-16-1 in der Zellzyklus Regulation wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen (Bandi et al, 2009; Lerner et al, 2009; Linsley et al, 2007; Liu et al, 2008) und die Verwendung von quantitativer Proteomik in dieser Arbeit erweitert die Liste der dabei beteiligten Proteine. Es wurden ebenfalls diese beiden miRNAs mit einer Beteiligung in der Apoptose beschrieben (Bonci et al, 2008; Cimmino et al, 2005). Interessanterweise zeigen dabei die hochregulierten Proteine den gegenteiligen Effekt, das heißt, sie haben anti-apoptotische Wirkung. So ist das herunterregulierte Protein PDCD6IP als Interaktionspartner von PDCD6 als pro-apoptotisches Protein wirksam (Odorizzi, 2006). PDCD6IP dient dabei als potentiell primäres Zielprotein von miR-15a und miR-16-1, da es nicht nur auf Proteinebene (SILAC und Western-Blot) herunterreguliert wird, sondern auch durch die Vorhersage-Algorithmen TargetScan und PITA detektiert wird und bereits auf mRNA-Ebene publiziert wurde (Calin et al, 2008). Dagegen zeigt ANXA5, welches durch miR-15a und miR-16-1 auf Proteinebene hochreguliert wird, eine anti-apoptotische Wirkung (Gidon-Jeangirard et al, 1999). Es zeigt sich also, wie durch das Zusammenspiel von Hoch- und Herunterregulation verschiedener Proteine die gleiche Wirkung, nämlich eine Verhinderung der Apoptose erreicht wird. Die DNA-Reparatur ist ebenfalls ein Prozess, bei dem eine Beteiligung von miR-16 und zwar bei der UV-induzierten DNA-Reparatur gezeigt werden konnte (Pothof et al, 2009). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass miR-16-1 und nicht miR-15a TOP2A herunterreguliert und dies mit der 13q Deletion korreliert (Skawran et al, 2008).

Problematisch ist bei den Annotationen nach *Gene Ontology*, dass die Daten nicht immer auf experimentellen Untersuchungen basieren. Deshalb wird für die nachfolgende Diskussion auf die im Zellzyklus nach KEGG annotierten, durch miR-15a und miR-16-1 regulierten Proteine im Mantelzelllymphom eingegangen. Dabei spielen neben PCNA, CDK2 und CDK1 (CDC2) noch die Proteine des MCM (*mini-chromosome maintenance*) Komplex (MCM2 bis MCM7) als herunterregulierte Proteine eine Rolle (siehe 3.4.8.2). Die sechs MCM-Komplex Proteine wirken als DNA-Helikasen und regulieren die DNA-Replikation im Zellzyklus (Lei, 2005). MCM-Proteine sind in Tumoren überexprimiert und für MCM6 konnte beim Mantelzelllymphom gezeigt werden, dass eine Überexpression von MCM6 eine Reduktion der Überlebenszeit zur Folge hat (Schrader et al, 2005). Ein weiteres Protein des MCM-Komplexes MCM2 zeigt ebenfalls eine Überexpression in MCL (Obermann et al, 2005). CDC2 wurde bereits als Zielprotein von miR-15a und miR-16-1 (Calin et al, 2008) sowie als Zielgen von miR-16 (Takeshita et al, 2009) identifiziert. In dieser Arbeit ist gezeigt, dass CDC2 durch

miR-16-1 und nicht durch miR-15a herunterreguliert wird. CDK2 ist ebenfalls als Zielgen von miR-16 identifiziert worden (Takeshita et al, 2009) und in MCL Patienten auf mRNA Ebene hochreguliert (Korz et al, 2002). PCNA stellt ein potentiell primäres Zielprotein dar, da es durch den Algorithmus miRanda vorhergesagt wurde. PCNA, das ein Kofaktor der DNA Polymerase Delta ist und beim Voranschreiten der DNA Replikation hilft (Naryzhny, 2008), ist sowohl im Zellzyklus als auch bei der DNA-Reparatur beteiligt.

Ein weiteres Protein, das in MCL reguliert gefunden wurde, ist TCL1A. TCL1A (T-cell leukemia/lymphoma 1A) ist sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nur durch miR-16-1 herunterreguliert und konnte in MCL Patienten auf Protein- ebenso wie auf mRNA-Ebene hochreguliert gefunden werden (Aggarwal et al, 2009; Antonucci et al, 2003). MKI67 kann als prognostischer Marker bei MCL verwendet werden, da dessen Überexpression eine kürzere Überlebenszeit zur Folge hat (Raty et al, 2002; Sviatoha et al, 2000) und wird durch miR-15a und miR-16-1 in Granta-519 herunterreguliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Überexpression von miR-15a und miR-16-1 in Granta-519 deren Einfluss auf die Prozesse im Mantelzelllymphom gezeigt werden konnte. So beeinflussen die Zielproteine dieser miRNAs den Zellzyklus, die Apoptose und die DNA-Reparatur. Diese Prozesse tragen bei MCL in Verbindung mit der chromosomalen Deletion des miR-15a und miR-16-1 Locus zur Pathogenität bei. Für einige Proteine konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie entsprechend der miRNA-Expression in MCL-Patienten reguliert sind. Interessanterweise sind unter den von miR-15a und miR-16-1 regulierten Proteine einige dabei, die spezifisch nur durch eine miRNA reguliert werden.

4.7 Aussichten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass quantitative Proteomik die Methode der Wahl für die Identifizierung von miRNA Zielproteinen ist. Zurzeit erscheint dabei die metabolische Markierung mittels SILAC die größten Vorteile zu haben. Dabei zeigt sich im Vergleich von SILAC mit pSILAC, dass durch pSILAC (Selbach et al, 2008) aufgrund der Detektion der *de-novo* Proteinsynthese mehr primäre Zielproteine gefunden werden (siehe 4.4.1). Aber auch chemische Markierungen wie z.B. die Dimethyl-Markierung (Hsu et al, 2003) bzw. markierungsfreie (Old et al, 2005) Quantifizierungstechniken werden die Identifizierung von miRNA Zielproteinen in Tierexperimenten, wie z.B. bei miRNA *Knock-out* Mäusen, erweitern. Effekte von miRNAs im entsprechenden Organismus sind deshalb von Interesse, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass miRNAs Zelllinien-spezifisch sind (siehe 3.3.7 und 3.4.7) und daher für den Organismus spezifische Zielproteine liefern könnten. Kritisch zu bewerten ist, in wieweit die markierungsfreien Quantifizierungstechniken und chemischen Markierungstechniken die Genauigkeit besitzen bzw. erlangen können, um die geringen durch miRNAs hervorgerufenen Unterschiede verlässlich und umfassend zu detektieren.

Die Isolierung des Komplexes bestehend aus Argonaut-Proteinen, miRNA und mRNA (siehe 1.1.1) mit der anschließenden Identifizierung der miRNAs und mRNAs hat ebenfalls zu ersten Erfolgen bei der mikroRNA Zielgen Identifizierung geführt (Beitzinger et al, 2007; Chi et al, 2009; Tan et al, 2009). Wenn die Isolierung von Ago2 Komplexen auf alle Argonaut-Proteine, die bei der miRNA Funktion beteiligt sind (Ago1 bis Ago4 (Meister et al, 2004)), erweitert werden kann und nachgewiesen wird, dass eine Bindung von miRNA mit mRNA zur Degradation oder translationalen Inhibition führt, kann diese Methode zur Identifizierung von miRNA Zielproteinen bzw. Zielgenen angewendet werden.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich das Zielproteinprofil im zeitlichen Verlauf von primären zu verstärkt sekundären Effekten verändert (siehe 4.4.3). Da bis jetzt der zeitliche Verlauf der Zielproteinprofile nur mit wenigen Zeitpunkten untersucht wurde (Yang et al, 2009), werden sicherlich weitere Untersuchungen in dieser Hinsicht stattfinden. Zudem ist die Art der miRNA Manipulation zurzeit durch verschiedene Methoden in der Entwicklung (Horwich & Zamore, 2008). Deren Evaluation findet aber momentan nur auf mRNA-Ebene statt, und um alle Effekte zu untersuchen, müssten auch Untersuchungen dazu auf Proteinebene durchgeführt werden.

Ein wesentlicher Nachteil der quantitativen Proteomik ist die geringere Abdeckung des Proteoms im Vergleich zur Transkriptom-Abdeckung durch Microarrays. Zur Verbesserung der Proteomabdeckung werden intensive Anstrengungen unternommen, um durch bessere Probenvorbereitungs- (Wisniewski et al, 2009) und Fraktionierungsmethoden (Hubner et al, 2008) sowie tiefergehender Analyse der Proben bei der massenspektrometrischen Analyse mehr Proteine quantifizieren zu können. Vermutlich wird durch die angewendete *Shotgun*-Proteomikmethode eine vollständige Proteomabdeckung inklusive der Berücksichtigung von Isoformen in naher Zukunft nicht möglich sein. Wie bei der Analyse des Zellzyklus-

Signaltransduktionsweges (siehe Abbildung 3-31) gezeigt, können somit nicht alle Proteine eines *Pathways* quantifiziert werden. Um dies zu ermöglichen und auch, um eine Auswahl an Proteinen in mehreren biologischen Proben wie z.B. Patientenseren quantifizieren zu können, müssen SRM (*selected reaction monitoring*) Methoden angewendet werden (Schiess et al, 2009). Diese massenspektrometrische Methode kann reproduzierbar und sensitiv eine vorgegebene Auswahl an bekannten Proteinen quantifizieren. So wäre es z.B. möglich, Proteine, speziell solche, für die keine Antikörper verfügbar sind, auf Regulationen innerhalb der Signaltransduktionswege bzw. in Patientenproben zu analysieren.

Die Untersuchungen zu den miR-15a und miR-16-1 Zielproteinen in einer MCL-Zelllinie haben gezeigt, dass diese Zielproteine mit der Regulation der miRNAs in Patienten, entsprechend der häufigen Deletion des Lokus für miR-15a und miR-16-1, korrelieren (siehe 4.6.2). Es ist allerdings bisher nicht gelungen, wie bei CLL (Calin et al, 2002) die Deletion des Lokus auch mit einer Herunterregulation von miR-15a und miR-16-1 zu hinterlegen. Eine mögliche Erklärung für die heterozygote Deletion des chromosomalen Lokus ohne eine Herunterregulation der miRNAs könnte eine Kompensation durch das Schwesterchromosom oder die homologen miRNAs miR-15b und miR-16-2 auf Chromosom 3 sein.

Desweiteren konnten zwar durch die Vorhersage-Algorithmen und die *seed*-Sequenz Übereinstimmungen einige Zielproteine als mögliche primäre Effektoren identifiziert werden, allerdings ist ein direkter experimenteller Nachweis bislang nur durch Luciferase-Reporter-Assays möglich (Marques & Esteves da Silva, 2009). Bei diesen Versuchen ist die Luciferase-Expression unter der Kontrolle der Bindungsstelle der miRNA innerhalb des mRNA-Bereichs. Dies bedeutet, dass die Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA eine Reduktion des Luciferase-Signals hervorruft. Diese Versuche sind für die ca. 300 identifizierten Zielproteine und deren entsprechenden Bereiche durchzuführen, um eine definitive Aussage über primäre Zielproteine zu treffen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Aggarwal M, Villuendas R, Gomez G, Rodriguez-Pinilla SM, Sanchez-Beato M, Alvarez D, Martinez N, Rodriguez A, Castillo ME, Camacho FI, Montes-Moreno S, Garcia-Marco JA, Kimby E, Pisano DG, Piris MA (2009) TCL1A expression delineates biological and clinical variability in B-cell lymphoma. *Mod Pathol* **22**(2): 206-215

Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M (2003) Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**(6966): 570-574

Anderson NL, Anderson NG (1998) Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**(11): 1853-1861

Antonucci F, Chilosi M, Parolini C, Hamdan M, Astner H, Righetti PG (2003) Two-dimensional molecular profiling of mantle cell lymphoma. *Electrophoresis* **24**(14): 2376-2385

Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J (2007) The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* **318**(5851): 761-764

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**(1): 25-29

Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**(7209): 64-71

Balczon R, Bao L, Zimmer WE (1994) PCM-1, A 228-kD centrosome autoantigen with a distinct cell cycle distribution. *J Cell Biol* **124**(5): 783-793

Balczon R, Bao L, Zimmer WE, Brown K, Zinkowski RP, Brinkley BR (1995) Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* **130**(1): 105-115

Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, Hasan L, Kappeler A, Brunner T, Vassella E (2009) miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **69**(13): 5553-5559

Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B (2007) Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* **389**(4): 1017-1031

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2): 281-297

- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**(2): 215-233
- Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G (2007) Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* **4**(2): 76-84
- Bellare P, Sontheimer EJ (2007) A fork in the road for microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **14**(8): 684-686
- Bellon M, Lepelletier Y, Hermine O, Nicot C (2009) Deregulation of micro-RNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* **113**(20): 4914-4917
- Bendall SC, Hughes C, Stewart MH, Doble B, Bhatia M, Lajoie GA (2008) Prevention of amino acid conversion in SILAC experiments with embryonic stem cells. *Mol Cell Proteomics* **7**(9): 1587-1597
- Bertoni F, Rinaldi A, Zucca E, Cavalli F (2006) Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol* **24**(1): 22-27
- Beynon RJ, Doherty MK, Pratt JM, Gaskell SJ (2005) Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat Methods* **2**(8): 587-589
- Blagoev B, Kratchmarova I, Ong SE, Nielsen M, Foster LJ, Mann M (2003) A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat Biotechnol* **21**(3): 315-318
- Blagoev B, Mann M (2006) Quantitative proteomics to study mitogen-activated protein kinases. *Methods* **40**(3): 243-250
- Boehm M, Slack FJ (2006) MicroRNA control of lifespan and metabolism. *Cell Cycle* **5**(8): 837-840
- Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, D'Urso L, Pagliuca A, Biffoni M, Labbaye C, Bartucci M, Muto G, Peschle C, De Maria R (2008) The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* **14**(11): 1271-1277
- Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC (2005) miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* **204**(1): 280-285
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell* **113**(1): 25-36
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**(3): e85

- Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, Mendell J, Prchal JT (2007) Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp Hematol* **35**(11): 1657-1667
- Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2008) MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(13): 5166-5171
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15524-15529
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **353**(17): 1793-1801
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 2999-3004
- Carleton M, Cleary MA, Linsley PS (2007) MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle* **6**(17): 2127-2132
- Chan SP, Slack FJ (2006) microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA Biol* **3**(3): 97-100
- Chen RW, Bemis LT, Amato CM, Myint H, Tran H, Birks DK, Eckhardt SG, Robinson WA (2008) Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma. *Blood* **112**(3): 822-829
- Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB (2009) Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* **460**(7254): 479-486
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 13944-13949
- Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**(12): 1367-1372
- Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen JV, Mann M (2009) A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc* **4**(5): 698-705

Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Campioni D, Minotto C, Agostini P, Milani R, Bullrich F, Negrini M, Croce C, Castoldi G (1999) 13q14 deletion in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicopathologic features. *Haematologica* **84**(7): 589-593

Dahl E, Kristiansen G, Gottlob K, Klamann I, Ebner E, Hinzmann B, Hermann K, Pilarsky C, Durst M, Klinkhammer-Schalke M, Blaszyk H, Knuechel R, Hartmann A, Rosenthal A, Wild PJ (2006) Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* **12**(13): 3950-3960

De Luca M, Brunetto L, Asteriti IA, Giubettini M, Lavia P, Guarguaglini G (2008) Aurora-A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. *Oncogene* **27**(51): 6539-6549

Delahunty C, Yates JR, 3rd (2005) Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods* **35**(3): 248-255

Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* **4**(5): P3

DeSouza L, Diehl G, Rodrigues MJ, Guo J, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW (2005) Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* **4**(2): 377-386

Didiano D, Hobert O (2006) Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* **13**(9): 849-851

Doherty MK, Hammond DE, Clague MJ, Gaskell SJ, Beynon RJ (2009) Turnover of the human proteome: determination of protein intracellular stability by dynamic SILAC. *J Proteome Res* **8**(1): 104-112

Durinck S, Moreau Y, Kasprzyk A, Davis S, De Moor B, Brazma A, Huber W (2005) BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics* **21**(16): 3439-3440

Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R (2008) miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA* **14**(5): 872-877

Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE (2005) Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3627-3632

Elias JE, Gygi SP (2007) Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* **4**(3): 207-214

Elias JE, Haas W, Faherty BK, Gygi SP (2005) Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nat Methods* **2**(9): 667-675

- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* **5**(1): R1
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E (2007) P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* **27**(11): 3970-3981
- Eyre TA, Ducluzeau F, Sneddon TP, Povey S, Bruford EA, Lush MJ (2006) The HUGO Gene Nomenclature Database, 2006 updates. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D319-321
- Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E (2009) miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* **1792**(6): 497-505
- Flavin RJ, Smyth PC, Finn SP, Laios A, O'Toole SA, Barrett C, Ring M, Denning KM, Li J, Aherne ST, Aziz NA, Alhadi A, Sheppard BL, Loda M, Martin C, Sheils OM, O'Leary JJ (2008) Altered eIF6 and Dicer expression is associated with clinicopathological features in ovarian serous carcinoma patients. *Mod Pathol* **21**(6): 676-684
- Forman JJ, Legesse-Miller A, Collier HA (2008) A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 14879-14884
- Fountoulakis M, Tsangaris G, Oh JE, Maris A, Lubec G (2004) Protein profile of the HeLa cell line. *J Chromatogr A* **1038**(1-2): 247-265
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**(1): 92-105
- Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavolaro S, Castellano L, Magrelli A, Citarella F, Messina M, Maggio R, Peragine N, Santangelo S, Mauro FR, Landgraf P, Tuschl T, Weir DB, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Guarini A, Foa R, Macino G (2007) Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **109**(11): 4944-4951
- Garzon R, Calin GA, Croce CM (2009) MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* **60**: 167-179
- Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Liu CG, Schnittger S, Haferlach T, Liso A, Diverio D, Mancini M, Meloni G, Foa R, Martelli MF, Mecucci C, Croce CM, Falini B (2008) Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(10): 3945-3950
- Gibcus JH, Tan LP, Harms G, Schakel RN, de Jong D, Blokzijl T, Moller P, Poppema S, Kroesen BJ, van den Berg A (2009) Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. *Neoplasia* **11**(2): 167-176

Gidon-Jeangirard C, Solito E, Hofmann A, Russo-Marie F, Freyssinet JM, Martinez MC (1999) Annexin V counteracts apoptosis while inducing Ca(2+) influx in human lymphocytic T cells. *Biochem Biophys Res Commun* **265**(3): 709-715

Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Ohler U, Cullen BR (2007) A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* **450**(7172): 1096-1099

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **123**(4): 631-640

Greither T, Grochola L, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H (2009) Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumours associates with poorer survival. *Int J Cancer* [**Epub ahead of print**]

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* **36**(Database issue): D154-158

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**(1): 91-105

Gronborg M, Kristiansen TZ, Iwahori A, Chang R, Reddy R, Sato N, Molina H, Jensen ON, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A, Pandey A (2006) Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* **5**(1): 157-171

Gruhler A, Olsen JV, Mohammed S, Mortensen P, Faergeman NJ, Mann M, Jensen ON (2005a) Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol Cell Proteomics* **4**(3): 310-327

Gruhler A, Schulze WX, Matthiesen R, Mann M, Jensen ON (2005b) Stable isotope labeling of *Arabidopsis thaliana* cells and quantitative proteomics by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **4**(11): 1697-1709

Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**(10): 994-999

Harfe BD (2005) MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* **15**(4): 410-415

Hodgkin (1832) On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chri Trans* **17**: 68-114

Horwich MD, Zamore PD (2008) Design and delivery of antisense oligonucleotides to block microRNA function in cultured *Drosophila* and human cells. *Nat Protoc* **3**(10): 1537-1549

Hsu JL, Huang SY, Chow NH, Chen SH (2003) Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal Chem* **75**(24): 6843-6852

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**(1): 44-57

Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Pure E, Agami R (2008) The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* **10**(2): 202-210

Hubner NC, Ren S, Mann M (2008) Peptide separation with immobilized pI strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis. *Proteomics* **8**(23-24): 4862-4872

Hutvagner G, Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**(5589): 2056-2060

Ibarrola N, Kalume DE, Gronborg M, Iwahori A, Pandey A (2003) A proteomic approach for quantitation of phosphorylation using stable isotope labeling in cell culture. *Anal Chem* **75**(22): 6043-6049

Inomata M, Tagawa H, Guo YM, Kameoka Y, Takahashi N, Sawada K (2009) MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* **113**(2): 396-402

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* **65**(16): 7065-7070

Ivanovska I, Cleary MA (2008) Combinatorial microRNAs: working together to make a difference. *Cell Cycle* **7**(20): 3137-3142

Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer PJ, Lens D, Bartek J, Dyer MJ, Kruger AR, Catovsky D (1997) Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). *Leukemia* **11**(1): 64-72

Jin P, Alisch RS, Warren ST (2004) RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* **6**(11): 1048-1053

Johansson M, Persson JL (2008) Cancer therapy: targeting cell cycle regulators. *Anticancer Agents Med Chem* **8**(7): 723-731

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**(5): 635-647

Jung M, Mollenkopf HJ, Grimm C, Wagner I, Albrecht M, Waller T, Pilarsky C, Johannsen M, Stephan C, Lehrach H, Nietfeld W, Rudel T, Jung K, Kristiansen G (2009) MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med* [Epub ahead of print]

Kaddar T, Rouault JP, Chien WW, Chebel A, Gadoux M, Salles G, Ffrench M, Magaud JP (2009) Two new miR-16 targets: caprin-1 and HMGA1, proteins implicated in cell proliferation. *Biol Cell* **101**(9): 511-524

Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* **39**(10): 1278-1284

Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander C, Leslie CS, Marks DS (2009) Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* **27**(6): 549-555

Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(5): 376-385

Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**(3): 231-243

Kluiver J, Haralambieva E, de Jong D, Blokzijl T, Jacobs S, Kroesen BJ, Poppema S, van den Berg A (2006) Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **45**(2): 147-153

Kluiver J, van den Berg A, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Bouwman E, Jacobs S, Poppema S, Kroesen BJ (2007) Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene* **26**(26): 3769-3776

Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, Barth TF, Moller P, Ott G, Kalla J, Radlwimmer B, Pscherer A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P, Bentz M (2004) Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* **104**(3): 795-801

Kok KH, Ng MH, Ching YP, Jin DY (2007) Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with Dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem* **282**(24): 17649-17657

Koller E, Propp S, Zhang H, Zhao C, Xiao X, Chang M, Hirsch SA, Shepard PJ, Koo S, Murphy C, Glazer RI, Dean NM (2006) Use of a chemically modified antisense oligonucleotide library to identify and validate Eg5 (kinesin-like 1) as a target for antineoplastic drug development. *Cancer Res* **66**(4): 2059-2066

Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, Dalton WS, Cheng JQ (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* **28**(22): 6773-6784

Korbel S, Schumann M, Bittorf T, Krause E (2005) Relative quantification of erythropoietin receptor-dependent phosphoproteins using in-gel ¹⁸O-labeling and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**(16): 2259-2271

Korz C, Pscherer A, Benner A, Mertens D, Schaffner C, Leupolt E, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P (2002) Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* **99**(12): 4554-4561

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* **37**(5): 495-500

Kruger M, Moser M, Ussar S, Thievensen I, Lubber CA, Forner F, Schmidt S, Zanivan S, Fassler R, Mann M (2008) SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* **134**(2): 353-364

Kurisaki A, Kurisaki K, Kowanz M, Sugino H, Yoneda Y, Heldin CH, Moustakas A (2006) The mechanism of nuclear export of Smad3 involves exportin 4 and Ran. *Mol Cell Biol* **26**(4): 1318-1332

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**(5543): 853-858

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**(9): 735-739

Lall S, Grun D, Krek A, Chen K, Wang YL, Dewey CN, Sood P, Colombo T, Bray N, Macmenamin P, Kao HL, Gunsalus KC, Pachter L, Piano F, Rajewsky N (2006) A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Curr Biol* **16**(5): 460-471

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**(5543): 858-862

Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CD, Palazzo S, Paterson JC, Cattan H, Enver T, Mager R, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS (2007) MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer* **121**(5): 1156-1161

Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**(5543): 862-864

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**(5): 843-854

Lei M (2005) The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **5**(5): 365-380

Leivonen SK, Makela R, Ostling P, Kohonen P, Haapa-Paananen S, Kleivi K, Enerly E, Aakula A, Hellstrom K, Sahlberg N, Kristensen VN, Borresen-Dale AL, Saviranta P, Perala M, Kallioniemi O (2009) Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. *Oncogene* [Epub ahead of print]

Lerner M, Harada M, Loven J, Castro J, Davis Z, Oscier D, Henriksson M, Sangfelt O, Grander D, Corcoran MM (2009) DLEU2, frequently deleted in malignancy, functions as a critical host gene of the cell cycle inhibitory microRNAs miR-15a and miR-16-1. *Exp Cell Res* **315**(17): 2941-2952

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**(1): 15-20

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**(7027): 769-773

Linsley PS, Schelter J, Burchard J, Kibukawa M, Martin MM, Bartz SR, Johnson JM, Cummins JM, Raymond CK, Dai H, Chau N, Cleary M, Jackson AL, Carleton M, Lim L (2007) Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **27**(6): 2240-2252

Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* **7**(7): 719-723

Liu Q, Fu H, Sun F, Zhang H, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X (2008) miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res* **36**(16): 5391-5404

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**(7043): 834-838

Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* **449**(7163): 682-688

Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, Vergoulis T, Koziris N, Sellis T, Tsanakas P, Hatzigeorgiou AG (2009) DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* **37**(Web Server issue): W273-276

Marques SM, Esteves da Silva JC (2009) Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* **61**(1): 6-17

Martin MM, Lee EJ, Buckenberger JA, Schmittgen TD, Elton TS (2006) MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J Biol Chem* **281**(27): 18277-18284

Marton S, Garcia MR, Robello C, Persson H, Trajtenberg F, Pritsch O, Rovira C, Naya H, Dighiero G, Cayota A (2008) Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia* **22**(2): 330-338

Masaki S, Ohtsuka R, Abe Y, Muta K, Umemura T (2007) Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun* **364**(3): 509-514

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **317**(5845): 1764-1767

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15**(2): 185-197

Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A (2004) High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **39**(2): 167-169

Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang Y-S, Tam W-L, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2006) A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes. *Cell* **126**(6): 1203-1217

Mittler G, Butter F, Mann M (2009) A SILAC-based DNA protein interaction screen that identifies candidate binding proteins to functional DNA elements. *Genome Res* **19**(2): 284-293

Molina H, Yang Y, Ruch T, Kim JW, Mortensen P, Otto T, Nalli A, Tang QQ, Lane MD, Chaerkady R, Pandey A (2009) Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. *J Proteome Res* **8**(1): 48-58

Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H, Knuutila S (1998) Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **21**(4): 298-307

Morris SM, Jr. (2007) Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J Nutr* **137**(6 Suppl 2): 1602S-1609S

Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* **16**(6): 720-728

Nakahara K, Kim K, Sciulli C, Dowd SR, Minden JS, Carthew RW (2005) Targets of microRNA regulation in the Drosophila oocyte proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12023-12028

Naryzhny SN (2008) Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci* **65**(23): 3789-3808

Navarro A, Bea S, Fernandez V, Prieto M, Salaverria I, Jares P, Hartmann E, Mozos A, Lopez-Guillermo A, Villamor N, Colomer D, Puig X, Ott G, Sole F, Serrano S, Rosenwald A, Campo E, Hernandez L (2009) MicroRNA Expression, Chromosomal Alterations, and Immunoglobulin Variable Heavy Chain Hypermutations in Mantle Cell Lymphomas. *Cancer Res* **69**(17): 7071-7078

O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J, Paquette RL, Baltimore D (2008) Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* **205**(3): 585-594

O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**(10): 4007-4021

Obermann EC, Eward KL, Dogan A, Paul EA, Loddo M, Munson P, Williams GH, Stoeber K (2005) DNA replication licensing in peripheral B-cell lymphoma. *J Pathol* **205**(3): 318-328

Odorizzi G (2006) The multiple personalities of Alix. *J Cell Sci* **119**(Pt 15): 3025-3032

Ogura M, Morishima Y, Ohno R, Kato Y, Hirabayashi N, Nagura H, Saito H (1985) Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **66**(6): 1384-1392

Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, Resing KA, Ahn NG (2005) Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* **4**(10): 1487-1502

Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**(5): 376-386

Ong SE, Mann M (2006) A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc* **1**(6): 2650-2660

Ong SE, Mittler G, Mann M (2004) Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat Methods* **1**(2): 119-126

Orom UA, Nielsen FC, Lund AH (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* **30**(4): 460-471

Panayiotidis P, Ganeshaguru K, Rowntree C, Jabbar SA, Hoffbrand VA, Foroni L (1997) Lack of clonal BCRA2 gene deletion on chromosome 13 in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **97**(4): 844-847

Park SK, Liao L, Kim JY, Yates JR, 3rd (2009) A computational approach to correct arginine-to-proline conversion in quantitative proteomics. *Nat Methods* **6**(3): 184-185

Park SK, Venable JD, Xu T, Yates JR, 3rd (2008) A quantitative analysis software tool for mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods* **5**(4): 319-322

Parry-Jones N, Matutes E, Morilla R, Brito-Babapulle V, Wotherspoon A, Swansbury GJ, Catovsky D (2007) Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH. *Br J Haematol* **137**(2): 117-124

Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK (2008) Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* **10**(4): R101

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**(18): 3551-3567

Perlson E, Medzihradzky KF, Darula Z, Munno DW, Syed NI, Burlingame AL, Fainzilber M (2004) Differential proteomics reveals multiple components in retrogradely transported axoplasm after nerve injury. *Mol Cell Proteomics* **3**(5): 510-520

Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* **21**(4): 533-542

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**(5740): 1573-1576

Pothof J, Verkaik NS, van IW, Wiemer EA, Ta VT, van der Horst GT, Jaspers NG, van Gent DC, Hoeijmakers JH, Persengiev SP (2009) MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *EMBO J* **28**(14): 2090-2099

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M (2004) A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* **432**(7014): 226-230

Project TN-HsLC (1997) A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* **89**(11): 3909-3918

Rai D, Karanti S, Jung I, Dahia PL, Aguiar RC (2008) Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* **181**(1): 8-15

Raty R, Franssila K, Joensuu H, Teerenhovi L, Elonen E (2002) Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* **69**(1): 11-20

Reinhart BJ, Bartel DP (2002) Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* **297**(5588): 1831

Rinaldi A, Kwee I, Taborelli M, Largo C, Uccella S, Martin V, Poretti G, Gaidano G, Calabrese G, Martinelli G, Baldini L, Pruneri G, Capella C, Zucca E, Cotter FE, Cigudosa JC, Catapano CV, Tibiletti MG, Bertonni F (2006) Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* **132**(3): 303-316

Ritchie W, Flamant S, Rasko JE (2009) Predicting microRNA targets and functions: traps for the unwary. *Nat Methods* **6**(6): 397-398

Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W (2007) Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* **35**(17): 5944-5953

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**(10A): 1902-1910

Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetriche D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* **316**(5824): 608-611

Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martin-Subero JI, Nielander I, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Terol MJ, Pinkel D, Martinez-Climent JA (2005) Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* **105**(11): 4445-4454

Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* **9**(6): 435-443

Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, Campo E (2006) Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica* **91**(1): 11-16

Sander S, Bullinger L, Leupolt E, Benner A, Kienle D, Katzenberger T, Kalla J, Ott G, Muller-Hermelink HK, Barth TF, Moller P, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S (2008) Genomic aberrations in mantle cell lymphoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization. Incidence and clinicopathological correlations. *Haematologica* **93**(5): 680-687

Scheler C, Lamer S, Pan Z, Li XP, Salnikow J, Jungblut P (1998) Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). *Electrophoresis* **19**(6): 918-927

Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R (2009) Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol* **3**(1): 33-44

Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F (2005) A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **5**(1): 4-15

Schnolzer M, Jedrzejewski P, Lehmann WD (1996) Protease-catalyzed incorporation of ¹⁸O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* **17**(5): 945-953

Schrader C, Janssen D, Klapper W, Siebmann JU, Meusers P, Brittinger G, Kneba M, Tiemann M, Parwaresch R (2005) Minichromosome maintenance protein 6, a proliferation marker superior to Ki-67 and independent predictor of survival in patients with mantle cell lymphoma. *Br J Cancer* **93**(8): 939-945

Schraders M, Pfundt R, Straatman HM, Janssen IM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, van Krieken JH, Groenen PJ (2005) Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* **105**(4): 1686-1693

Schulze WX, Mann M (2004) A novel proteomic screen for peptide-protein interactions. *J Biol Chem* **279**(11): 10756-10764

Seitz H (2009) Redefining MicroRNA Targets. *Curr Biol* **19**(10): 870-873

Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**(7209): 58-63

Shah AR, Singhal M, Klicker KR, Stephan EG, Wiley HS, Waters KM (2007) Enabling high-throughput data management for systems biology: the Bioinformatics Resource Manager. *Bioinformatics* **23**(7): 906-909

Shen WF, Hu YL, Uttarwar L, Passegue E, Largman C (2008) MicroRNA-126 regulates HOXA9 by binding to the homeobox. *Mol Cell Biol* **28**(14): 4609-4619

Siomi H, Siomi MC (2009) On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* **457**(7228): 396-404

Skalsky RL, Samols MA, Plaisance KB, Boss IW, Riva A, Lopez MC, Baker HV, Renne R (2007) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol* **81**(23): 12836-12845

Skawran B, Steinemann D, Becker T, Buurman R, Flik J, Wiese B, Flemming P, Kreipe H, Schlegelberger B, Wilkens L (2008) Loss of 13q is associated with genes involved in cell cycle and proliferation in dedifferentiated hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* **21**(12): 1479-1489

Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D (2008) Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **58**(4): 1001-1009

Stocklin R, Vu L, Vadas L, Cerini F, Kippen AD, Offord RE, Rose K (1997) A stable isotope dilution assay for the in vivo determination of insulin levels in humans by mass spectrometry. *Diabetes* **46**(1): 44-50

Sviatoha V, Tani E, Rassidakis G, Tribukait B, Kleina R, Skoog L (2000) Analysis of proliferating cell fraction determined by monoclonal antibody to M1-subunit ribonucleotide reductase and Ki-67 in relation to p53 protein expression in fine-needle aspirates from non-Hodgkin's lymphomas. *Cytopathology* **11**(5): 290-301

Szajli E, Feher T, Medzihradzsky KF (2008) Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS. *Mol Cell Proteomics* **7**(12): 2410-2418

Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A, Morishima Y, Nakamura S, Seto M (2005) Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* **24**(8): 1348-1358

Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, Kawamata M, Kelnar K, Bader AG, Brown D, Ochiya T (2009) Systemic Delivery of Synthetic MicroRNA-16 Inhibits the Growth of Metastatic Prostate Tumors via Downregulation of Multiple Cell-cycle Genes. *Mol Ther* [**Epub ahead of print**]

Tan LP, Seinen E, Duns G, de Jong D, Sibon OC, Poppema S, Kroesen BJ, Kok K, van den Berg A (2009) A high throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells. *Nucleic Acids Res* [**Epub ahead of print**]

Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455**(7216): 1124-1128

Thermann R, Hentze MW (2007) Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* **447**(7146): 875-878

Tian Z, Greene AS, Pietrusz JL, Matus IR, Liang M (2008) MicroRNA-target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis. *Genome Res* **18**(3): 404-411

Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM (2007) Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* **179**(8): 5082-5089

Townsley FM, Aristarkhov A, Beck S, Hershko A, Ruderman JV (1997) Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2362-2367

Tseng SF, Chang CY, Wu KJ, Teng SC (2005) Importin KPNA2 is required for proper nuclear localization and multiple functions of NBS1. *J Biol Chem* **280**(47): 39594-39600

- Umegaki N, Tamai K, Nakano H, Moritsugu R, Yamazaki T, Hanada K, Katayama I, Kaneda Y (2007) Differential regulation of karyopherin alpha 2 expression by TGF-beta1 and IFN-gamma in normal human epidermal keratinocytes: evident contribution of KPNA2 for nuclear translocation of IRF-1. *J Invest Dermatol* **127**(6): 1456-1464
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**(11): 2071-2077
- van Breukelen B, van den Toorn HW, Drugan MM, Heck AJ (2009) StatQuant: A post quantification analysis toolbox for improving quantitative mass spectrometry. *Bioinformatics* **25**(11): 1472-1473
- van Dongen S, Abreu-Goodger C, Enright AJ (2008) Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. *Nat Methods* **5**(12): 1023-1025
- Van Hoof D, Pinkse MW, Oostwaard DW, Mummery CL, Heck AJ, Krijgsveld J (2007) An experimental correction for arginine-to-proline conversion artifacts in SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Methods* **4**(9): 677-678
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**(5858): 1931-1934
- Vinther J, Hedegaard MM, Gardner PP, Andersen JS, Arctander P (2006) Identification of miRNA targets with stable isotope labeling by amino acids in cell culture. *Nucleic Acids Res* **34**(16): e107
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2257-2261
- Wang V, Wu W (2009) MicroRNA-based therapeutics for cancer. *BioDrugs* **23**(1): 15-23
- Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng ZM (2008) Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS ONE* **3**(7): e2557
- Washburn MP, Ulaszek R, Deciu C, Schieltz DM, Yates JR, 3rd (2002) Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. *Anal Chem* **74**(7): 1650-1657
- Wessel D, Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**(1): 141-143
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**(5): 855-862

- Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* **6**(5): 359-362
- Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C, Van Den Berghe H (1999) Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica* **84**(7): 594-599
- Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI (2008) Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res* **14**(9): 2588-2592
- Wu CC, MacCoss MJ (2002) Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther* **4**(3): 242-250
- Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K (2007) MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* **131**(1): 146-159
- Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY (2008) MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* **14**(11): 2348-2360
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* **9**(3): 189-198
- Yang Y, Chaerkady R, Beer MA, Mendell JT, Pandey A (2009) Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach. *Proteomics* **9**(5): 1374-1384
- Yang Z, Guo J, Chen Q, Ding C, Du J, Zhu X (2005) Silencing mitosis induces misaligned chromosomes, premature chromosome decondensation before anaphase onset, and mitotic cell death. *Mol Cell Biol* **25**(10): 4062-4074
- Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C (2001) Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal Chem* **73**(13): 2836-2842
- Yates JR, 3rd, Eng JK, McCormack AL (1995) Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases. *Anal Chem* **67**(18): 3202-3210
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**(24): 3011-3016
- Yin Q, McBride J, Fewell C, Lacey M, Wang X, Lin Z, Cameron J, Flemington EK (2008) MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *J Virol* **82**(11): 5295-5306

Zannini L, Lecis D, Lisanti S, Benetti R, Buscemi G, Schneider C, Delia D (2003) Karyopherin-alpha2 protein interacts with Chk2 and contributes to its nuclear import. *J Biol Chem* **278**(43): 42346-42351

Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY (2007) MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* **282**(19): 14328-14336

6 ANHANG

Tabelle 6-1: Durch Überexpression von miR-155 herunterregulierte Proteine in 293T Zellen (SILAC-Analyse). _a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org); _b: IPI Protein *Identifizier* (Id) (www.ebi.ac.uk); _c: Anzahl von *unique* (einmaligen) Peptiden, die diesem Protein zugeordnet werden; _d: Sequenzabdeckung des Proteins durch die identifizierten *unique* (einmaligen) und Razor-Peptide (Razor-Peptide: nicht-einmalige Peptide, die aber mit den meisten anderen Peptiden nach dem Ozzam's Prinzip zu diesem Protein zugeordnet werden können); _e: "Signifikanz B"-Wert (zeigt an, wie signifikant unterschiedlich das Verhältnis zur Gesamtverteilung der Proteinverhältnisse ist; diese Werte sind gruppiert nach Intensitäten); _f: Anzahl an Messpunkten (unterschiedliche Peptide, Modifikationen, Ladungen oder repetitive Messungen)

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenzabdeckung [%] _d	Verhältnis miR-155/pCMX	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
PCM1	IPI00001654	Pericentriolar material 1 protein	232,61	2	1	0,54	2,1E-3	3
CENPE	IPI00296365	Centromeric protein E	316,41	4	2,1	0,61	6,8E-6	6
METAP1	IPI00022239	Methionine aminopeptidase 1	43,22	3	13,5	0,66	148,7E-6	3
FAM115A	IPI00030542	Putative uncharacterized protein LOC389592	225,21	3	2,6	0,68	351,0E-6	3
KIF11	IPI00305289	Kinesin-like protein KIF11	119,16	6	8,3	0,69	6,2E-9	8
HMGCS1	IPI00008475	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	57,29	5	16,3	0,69	11,3E-9	4
RBM12	IPI00550308	RNA-binding protein 12	97,39	3	3,2	0,71	1,2E-3	3
FAM3C	IPI00334282	Protein FAM3C	24,68	3	18,1	0,72	1,6E-3	3
GNL2	IPI00015808	Nucleolar GTP-binding protein 2	83,65	5	9,3	0,74	3,8E-3	5
UBE2C	IPI00013002	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	19,65	4	44,7	0,74	30,4E-6	9
GEMIN7	IPI00003027	Gem-associated protein 7	14,54	2	22,9	0,74	4,2E-3	4
CCNC	IPI00877863	cDNA FLJ77471	35,42	2	9,3	0,75	5,0E-3	4
SEC24C	IPI00024661	Protein transport protein Sec24C	118,31	6	7,9	0,78	250,3E-6	7
UBL5	IPI00013241	Ubiquitin-like protein 5	8,55	3	24,7	0,80	802,2E-6	9
MRPL1	IPI00549381	39S ribosomal protein L1, mitochondrial	36,91	2	9,5	0,80	816,0E-6	4
CSDE1	IPI00844264	Putative uncharacterized protein DKFZp779B0247	90,60	4	5,3	0,81	378,9E-6	6
EIF1	IPI00015077	Eukaryotic translation initiation factor 1	12,73	5	46,9	0,81	434,7E-6	34
RANGAP1	IPI00294879	Ran GTPase-activating protein 1	63,54	10	24,7	0,83	205,2E-6	20
SRPR	IPI00385267	Signal recognition particle receptor subunit alpha	69,81	3	6,6	0,83	4,5E-3	4
TMEM70	IPI00106966	Transmembrane protein 70	28,97	2	11,5	0,83	1,6E-3	5

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-155/pCMX	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
ABCF2	IPI00068506	Putative uncharacterized protein ABCF2	72,44	5	9,6	0,84	2,3E-3	8
CENPF	IPI00855998	Centromere protein F	367,76	25	10	0,84	6,9E-3	33
KPNA2	IPI00002214	Importin subunit alpha-2	57,86	7	28,4	0,84	581,4E-6	13
-	IPI00893442	5 kDa protein	5,118	1	21,7	0,85	3,4E-3	6
EPPK1	IPI00010951	Epiplakin	555,61	10	12,8	0,85	9,1E-3	28
TMEM97	IPI00020004	Transmembrane protein 97	20,85	1	8,5	0,85	9,2E-3	3
CKAP5	IPI00028275	Cytoskeleton-associated protein 5	225,49	52	33,3	0,86	1,8E-3	77
CAPRIN1	IPI00783872	Caprin-1	78,37	5	10,6	0,86	6,2E-3	9
DNAJA1	IPI00012535	DnaJ homolog subfamily A member 1	44,87	4	18,1	0,87	2,8E-3	9
TXLNA	IPI00470779	Alpha-taxilin	61,89	3	9	0,87	9,1E-3	4
ARCN1	IPI00514053	Coatomer subunit delta	57,21	6	18,8	0,88	5,9E-3	10
CS	IPI00025366	Citrate synthase, mitochondrial	51,71	5	17,8	0,88	6,4E-3	13
SFXN1	IPI00009368	Sideroflexin-1	35,62	2	9	0,89	9,3E-3	5

Tabelle 6-2: Durch Überexpression von miR-155 hochregulierte Proteine in 293T Zellen (SILAC-Analyse). _a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org); _b: IPI Protein *Identifizier* (Id) (www.ebi.ac.uk); _c: Anzahl von *unique* (einmaligen) Peptiden, die diesem Protein zugeordnet werden; _d: Sequenzabdeckung des Proteins durch die identifizierten *unique* (einmaligen) und Razor-Peptide (Razor-Peptide: nicht-einmalige Peptide, die aber mit den meisten anderen Peptiden nach dem Ozzam's Prinzip zu diesem Protein zugeordnet werden können); _e: "Signifikanz B"-Wert (zeigt an, wie signifikant unterschiedlich das Verhältnis zur Gesamtverteilung der Proteinverhältnisse ist; diese Werte sind gruppiert nach Intensitäten); _f: Anzahl an Messpunkten (unterschiedliche Peptide, Modifikationen, Ladungen oder repetitive Messungen)

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenzabdeckung [%] _d	Verhältnis miR-155/pCMX	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
SMC1A	IPI00291939	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	143,23	19	20,2	1,20	9,7E-3	38
SDHB	IPI00294911	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	31,63	2	8,9	1,20	9,2E-3	4
PPA2	IPI00470502	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	39,64	8	30,1	1,21	6,6E-3	16
SHMT2	IPI00002520	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	55,99	8	26,8	1,21	6,4E-3	24
IARS	IPI00644127	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	144,96	18	21,9	1,21	5,7E-3	39
GARS	IPI00783097	Glycyl-tRNA synthetase	83,14	12	24,6	1,21	5,6E-3	26
NDUFB9	IPI00790064	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	26,59	2	12,7	1,23	7,0E-3	3
CLIC4	IPI00001960	Chloride intracellular channel protein 4	28,77	10	63,2	1,24	6,5E-3	16
DARS2	IPI00100460	Aspartyl-tRNA synthetase, mitochondrial	73,56	6	12,9	1,24	6,2E-3	8
LMNB2	IPI00009771	Lamin-B2	69,95	4	9,5	1,24	5,1E-3	7
CYP51A1	IPI00295772	Cytochrome P450 51A1	57,28	4	12,8	1,26	2,7E-3	6
LMNA	IPI00021405	Lamin-A/C	74,14	3	7,7	1,27	2,4E-3	5
DPYSL2	IPI00257508	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62,29	1	6,6	1,30	9,0E-3	4
ALDH7A1	IPI00221234	Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase	58,49	4	14,1	1,31	455,5E-6	6
IGF2BP3	IPI00658000	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	63,72	2	4,5	1,32	6,5E-3	3
NDUFS1	IPI00604664	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	81,00	4	9,3	1,32	323,8E-6	9
H1FX	IPI00021924	Histone H1x	22,49	2	14,1	1,43	546,2E-6	4
CTH	IPI00031557	Cystathionine gamma-lyase	44,51	2	5,9	1,43	469,4E-6	3
DHFR	IPI00887771	Dihydrofolate reductase	23,82	7	39,6	1,46	937,5E-9	20
XPNPEP1	IPI00793375	Xaa-Pro aminopeptidase 1	74,80	2	4,5	1,52	49,3E-6	3
CABC1	IPI00176469	Chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial	71,95	2	5,3	1,66	1,9E-3	3

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-155/pCMX	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
PCK2	IPI00797038	cDNA FLJ50710, highly similar to Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP), mitochondrial (EC 4.1.1.32)	70,73	3	6,4	1,71	171,7E-9	3

Tabelle 6-3: Durch Überexpression von miR-15a herunterregulierte Proteine in Granta-519 Zellen (SILAC-Analyse). _a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org); _b: IPI Protein *Identifier* (Id) (www.ebi.ac.uk); _c: Anzahl von *unique* (einmaligen) Peptiden, die diesem Protein zugeordnet werden; _d: Sequenzabdeckung des Proteins durch die identifizierten *unique* (einmaligen) und *Razor*-Peptide (*Razor*-Peptide: nicht-einmalige Peptide, die aber mit den meisten anderen Peptiden nach dem Ozzam's Prinzip zu diesem Protein zugeordnet werden können); _e: "Signifikanz B"-Wert (zeigt an, wie signifikant unterschiedlich das Verhältnis zur Gesamtverteilung der Proteinverhältnisse ist; diese Werte sind gruppiert nach Intensitäten); _f: Anzahl an Messpunkten (unterschiedliche Peptide, Modifikationen, Ladungen oder repetitive Messungen)

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenzabdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
BCAT1	IPI00382412	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	44,10	2	30,9	0,16	2,66E-16	12
CD44	IPI00305064	CD44 antigen	81,55	4	6,9	0,17	3,82E-10	6
	IPI00010951	Epiplakin	555,61	8	14,1	0,19	1,93E-08	8
SORD	IPI00216057	Sorbitol dehydrogenase	38,30	5	28,6	0,21	1,60E-07	6
S100A13	IPI00016179	Protein S100-A13	11,47	2	23,5	0,22	2,38E-04	5
MAP1B	IPI00008868	Microtubule-associated protein 1B	270,62	52	34,1	0,25	5,99E-10	57
ASNS	IPI00554777	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	64,37	14	49,6	0,30	6,43E-13	49
TWF2	IPI00550917	Twinfilin-2	39,55	7	37,5	0,31	8,57E-08	11
GPT2	IPI00152432	Alanine aminotransferase 2	57,90	3	7,6	0,33	1,25E-04	4
ABHD14B	IPI00063827	Abhydrolase domain-containing protein 14B	22,35	5	40,5	0,34	8,27E-07	16
ITPR1	IPI00333753	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	313,94	19	10	0,34	8,16E-05	17
	IPI00894235	Neurobeachin-like protein 2	302,51	25	14,9	0,38	5,79E-04	19
TOP2B	IPI00027280	DNA topoisomerase 2-beta	183,26	34	32,3	0,38	6,23E-09	51
IGF2BP3	IPI00658000	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	63,72	5	14,9	0,38	5,94E-04	7
GNL3	IPI00306380	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	62,00	12	30,1	0,39	1,13E-05	15
IGF2BP2	IPI00179713	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	66,12	1	2,3	0,39	8,45E-04	3
FHL1	IPI00014398	Four and a half LIM domains 1 variant	35,00	9	43	0,40	2,23E-05	12
S100A4	IPI00032313	Protein S100-A4	11,73	2	18,8	0,40	2,52E-05	14
C7orf50	IPI00031651	Uncharacterized protein C7orf50	22,08	1	11,3	0,41	1,23E-03	3
DBN1	IPI00794221	Uncharacterized protein DBN1	76,30	2	5	0,41	7,45E-04	3
PRKCD	IPI00329236	Protein kinase C delta type	77,50	6	13,2	0,41	7,55E-04	8
FLNB	IPI00900293	Filamin B	281,63	2	43,6	0,41	7,50E-08	120
RFTN1	IPI00749454	Raftlin	86,70	2	3,9	0,41	1,43E-03	3

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
LMNA	IPI00021405	Lamin-A/C	74,14	11	20,8	0,41	3,36E-05	17
FANCD2	IPI00075081	Fanconi anemia group D2 protein	166,46	6	6,3	0,41	1,45E-03	6
EPB41L2	IPI00015973	Band 4.1-like protein 2	112,59	14	21,7	0,41	8,89E-04	20
PEBP1	IPI00219446	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	21,06	8	59,4	0,41	1,02E-07	18
TKT	IPI00643920	Transketolase	68,74	20	53,1	0,42	1,75E-07	62
PSPHL	IPI00019178	Phosphoserine phosphatase	25,01	3	27,6	0,42	1,94E-03	3
BLVRA	IPI00294158	Biliverdin reductase A	33,43	7	33,4	0,43	1,56E-03	12
VPRBP	IPI00329528	Protein VPRBP	169,41	8	5,8	0,44	2,89E-03	9
TMPO	IPI00030131	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	50,67	3	6,8	0,45	2,74E-03	9
DCUN1D5	IPI00165361	DCN1-like protein 5	27,51	2	11,8	0,46	4,24E-02	3
NUDCD3	IPI00238209	NudC domain-containing protein 3	40,82	3	10,2	0,46	4,66E-03	3
HEATR2	IPI00242630	HEAT repeat-containing protein 2	93,53	6	9,1	0,47	6,19E-03	6
GLTSCR2	IPI00910443	cDNA FLJ61695, highly similar to Glioma tumor suppressor candidate region gene 2 protein	70,02	2	6,2	0,48	6,09E-03	3
LANCL1	IPI00005724	LanC-like protein 1	45,28	4	20,6	0,48	4,53E-03	9
VAV2	IPI00472451	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	101,29	5	10	0,48	6,77E-03	6
KIF15	IPI00024975	Kinesin-like protein KIF15	160,16	5	5,1	0,48	7,46E-03	3
MRPS17	IPI00925656	MRPS17 protein	25,72	4	25,8	0,49	5,53E-03	9
PBRM1	IPI00384176	Protein polybromo-1	192,95	12	10,4	0,49	6,14E-03	6
MRPS25	IPI00013167	28S ribosomal protein S25, mitochondrial	20,12	4	20,8	0,50	9,79E-03	4
NSUN5	IPI00910694	cDNA FLJ58598, highly similar to Homo sapiens NOL1/NOP2/Sun domain family, member 5 (NSUN5), transcript variant 1, mRNA	51,06	2	5,5	0,51	1,06E-02	5
SAMHD1	IPI00294739	SAM domain and HD domain-containing protein 1	72,20	10	20,8	0,51	8,07E-03	13
PDE12	IPI00174390	2',5'-phosphodiesterase 12	67,35	7	16,7	0,51	8,29E-03	8
CAPG	IPI00848090	cDNA, FLJ94534, highly similar to Homo sapiens capping protein (actin filament), gelsolin-like(CAPG), mRNA	38,50	6	26,4	0,51	1,10E-03	9
MRPS34	IPI00658155	28S ribosomal protein S34, mitochondrial	26,33	3	10,2	0,51	1,30E-02	4
NOC4L	IPI00031661	Nucleolar complex protein 4 homolog	58,47	6	21,5	0,52	9,68E-03	5

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
BUD31	IPI00922484	Protein BUD31 homolog	17,33	5	32,4	0,52	9,68E-03	11
GARS	IPI00783097	Glycyl-tRNA synthetase	83,14	21	39,4	0,52	5,64E-05	48
DHX30	IPI00926109	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	136,11	16	16,2	0,52	1,00E-02	13
F13A1	IPI00884176	cDNA, FLJ93141, highly similar to Homo sapiens coagulation factor XIII, A1 polypeptide (F13A1), mRNA	83,27	8	16	0,52	1,04E-02	18
OXR1	IPI00010080	Serine/threonine-protein kinase OSR1	58,02	4	10,1	0,52	1,06E-02	8
	IPI00258904		17,80	2	11,7	0,53	8,56E-05	16
SMARCC1	IPI00234252	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	122,87	9	14,2	0,53	1,27E-02	8
GNAI2	IPI00926935	Galphai2 protein;Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	41,55	7	33,9	0,53	1,22E-04	18
IRF5	IPI00220220	IRF5	57,77	3	7,6	0,54	1,72E-02	6
APEH	IPI00926648	Acylamino-acid-releasing enzyme	81,67	6	14,2	0,54	1,46E-02	5
MRPS21	IPI00014812	28S ribosomal protein S21, mitochondrial	10,74	2	29,9	0,54	1,96E-02	5
MRPS6	IPI00874144	28S ribosomal protein S6, mitochondrial	20,42	3	24,2	0,54	1,87E-02	6
LLPH	IPI00031615	UPF0446 protein C12orf31	15,23	3	23,3	0,54	1,87E-02	5
PSIP1	IPI00028122	PC4 and SFRS1-interacting protein	60,10	8	21,3	0,54	1,79E-04	37
PDCD6IP	IPI00246058	Programmed cell death 6-interacting protein	96,82	15	22,6	0,54	2,83E-03	29
POR	IPI00880028	cDNA, FLJ92914, highly similar to Homo sapiens P450 (cytochrome) oxidoreductase (POR), mRNA	84,60	4	7,1	0,55	2,01E-02	3
VCL	IPI00307162	Vinculin	123,80	19	23,8	0,55	2,98E-03	21
WIPF1	IPI00552369	WAS/WASL-interacting protein family member 1	52,00	3	10,6	0,55	2,11E-02	3
ABCF2	IPI00068506	Putative uncharacterized protein ABCF2 (ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2, isoform CRA_d)	72,44	4	7,6	0,55	1,86E-02	6
DYNC1LI1	IPI00007675	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	56,58	8	26,2	0,56	2,05E-02	8
MRPS16	IPI00032872	28S ribosomal protein S16, mitochondrial	15,35	4	44,5	0,56	2,08E-02	9
AKR1B1	IPI00413641	Aldose reductase	35,85	9	45,3	0,57	4,31E-04	26
UBE2E1	IPI00021346	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1	21,40	1	24,4	0,57	2,64E-02	7
WDFY4	IPI00887548	Uncharacterized protein C10orf64	353,61	24	10,6	0,57	2,23E-02	26
MAPK1	IPI00003479	Mitogen-activated protein kinase 1	41,39	3	18,9	0,57	2,26E-02	7

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
FKBP5	IPI00218775	FK506-binding protein 5	51,21	3	12,9	0,57	2,27E-02	7
PIK3CD	IPI00384817	Phosphatidylinositol 3-kinase delta catalytic subunit	122,00	7	8	0,57	2,77E-02	7
LGALS9B	IPI00472523	Galectin-9-like protein A	39,66	2	9	0,57	2,78E-02	5
S100A11P	IPI00013895	Protein S100-A11	11,74	3	34,3	0,57	2,34E-02	16
ACSL1	IPI00012728	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	77,94	5	9,5	0,57	2,92E-02	6
C10orf119	IPI00552546	UPF0557 protein C10orf119	72,75	3	5,8	0,58	3,26E-02	3
MPST	IPI00910977	cDNA FLJ31171 fis, clone KIDNE2000046, highly similar to 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	35,25	5	23,3	0,58	3,14E-02	4
RPL7P14	IPI00456940	60S ribosomal protein L7-like 1	28,66	6	27,2	0,58	2,69E-02	5
SMC6	IPI00816217	Structural maintenance of chromosomes protein 6	129,15	4	4,5	0,58	3,48E-02	5
GNAS	IPI00095891	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms Xlas	111,02	8	9,5	0,58	6,67E-03	11
ATXN10	IPI00001636	Ataxin-10	53,49	9	28,2	0,58	2,87E-02	12
SARS	IPI00514587	Seryl-tRNA synthetase	61,31	9	20,9	0,59	7,14E-03	12
RALA	IPI00556590	cDNA FLJ40085 fis, clone TESTI2002993	57,50	2	5,4	0,59	3,14E-02	8
COX7A2L	IPI00022421	Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein, mitochondrial;Cytochrome c oxidase subunit VIIa-related protein	12,62	3	48,2	0,59	3,64E-02	6
GNL2	IPI00015808	Nucleolar GTP-binding protein 2	83,65	7	13	0,59	3,67E-02	5
EMG1	IPI00025347	Probable ribosome biogenesis protein NEP1	26,72	4	24,6	0,60	3,35E-02	7
PI4KA	IPI00070943	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	231,32	5	3,3	0,60	4,38E-02	5
SHMT2	IPI00002520	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	55,99	5	40,5	0,60	1,49E-03	53
EXOSC2	IPI00015905	Exosome complex exonuclease RRP4	32,79	4	22,5	0,60	4,17E-02	5
EFHD2	IPI00060181	EF-hand domain-containing protein D2	26,70	2	8,8	0,60	4,21E-02	3
FANCI	IPI00306518	Fanconi anemia group I protein	149,32	15	15,8	0,60	4,24E-02	14
GNB1	IPI00026268	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	37,38	4	40,6	0,61	1,04E-02	15
YARS	IPI00007074	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	59,14	16	42,8	0,61	1,78E-03	23
TRNT1	IPI00289807	tRNA-nucleotidyltransferase 1, mitochondrial;Mitochondrial tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding	50,14	3	10,6	0,61	4,48E-02	5

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
GNB2	IPI00003348	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	37,33	3	20	0,61	4,17E-02	6
PTPN6	IPI00795221	70 kDa SHP-1L protein	70,13	16	34,1	0,62	2,64E-03	46
MCM7	IPI00299904	DNA replication licensing factor MCM7	81,31	19	35,6	0,62	2,66E-03	19
TMPO	IPI00216230	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha	75,49	8	32,7	0,62	2,70E-03	36
PES1	IPI00003768	Pescadillo homolog 1	68,00	6	11,6	0,62	4,51E-02	4
PDLIM1	IPI00010414	PDZ and LIM domain protein 1	36,07	9	41,6	0,63	1,58E-02	15
WARS	IPI00295400	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	53,17	18	56,5	0,63	3,47E-03	73
UBE2I	IPI00450472	Ubiquitin carrier protein	20,46	8	29,9	0,64	4,35E-03	30
MCM6	IPI00031517	DNA replication licensing factor MCM6	92,89	13	22,2	0,64	1,90E-02	20
NUP210	IPI00291755	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	205,11	22	20,6	0,64	1,98E-02	30
MTHFD2	IPI00011307	Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial	37,90	6	30,6	0,64	2,07E-02	19
MCM2	IPI00922181	DNA replication licensing factor MCM2	106,90	22	31,9	0,65	5,75E-03	33
QARS	IPI00026665	cDNA FLJ75085, highly similar to Homo sapiens glutaminyl-tRNA synthetase (QARS), mRNA	89,66	15	30,3	0,65	2,21E-02	15
MCM5	IPI00018350	DNA replication licensing factor MCM5;CDC46 homolog	82,29	14	22,3	0,66	2,50E-02	24
NUMA1	IPI00292771	Nuclear mitotic apparatus protein 1	238,26	1	28,9	0,66	7,79E-03	55
PFKM	IPI00743142	6-phosphofructokinase, muscle type;Phosphofructokinase 1	85,18	14	24,2	0,66	2,74E-02	21
PDCD4	IPI00290110	Programmed cell death protein 4	51,72	7	26,9	0,66	2,81E-02	21
SLC25A3	IPI00215777	Phosphate carrier protein, mitochondrial	39,96	8	39,6	0,67	9,44E-03	39
NIPSNAP1	IPI00304435	Protein NipSnap homolog 1	33,31	5	33,5	0,67	2,98E-02	13
MCM4	IPI00018349	DNA replication licensing factor MCM4	96,56	15	29,5	0,67	1,14E-02	27
	IPI00795769	Nuclear protein Hcc-1	51,78	3	23	0,68	3,31E-02	7
ELMO1	IPI00219532	Engulfment and cell motility protein 1	83,83	9	17,6	0,68	3,41E-02	13
PCNA	IPI00021700	Proliferating cell nuclear antigen	28,77	7	42,5	0,68	1,30E-02	32
SEPT9	IPI00784614	cDNA FLJ55422, highly similar to Septin-9	65,40	7	17,4	0,68	3,72E-02	10
ACTN4	IPI00013808	Alpha-actinin-4	104,85	11	28,9	0,69	4,01E-02	13

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
LTA4H	IPI00219077	Leukotriene A-4 hydrolase	69,28	16	39,3	0,69	1,68E-02	39
NAMPT	IPI00018873	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	55,52	18	50,1	0,69	1,75E-02	69
C12orf10	IPI00029444	UPF0160 protein MYG1	42,45	5	20,5	0,70	4,83E-02	7
PSME3	IPI00219445	Proteasome activator complex subunit 3	30,89	9	42,3	0,70	4,92E-02	23
MCM3	IPI00013214	DNA replication licensing factor MCM3	95,91	16	26,1	0,70	2,15E-02	19
TUBB2C	IPI00007752	Tubulin beta-2C chain	49,83	1	9,9	0,72	2,73E-02	17
DLD	IPI00909143	cDNA FLJ50661, highly similar to Dihydropyridol dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.8.1.4)	49,28	5	16,3	0,72	3,06E-02	18
SLC3A2	IPI00554481	4F2 cell-surface antigen heavy chain	71,12	12	19,1	0,72	3,07E-02	14
NASP	IPI00332499	Nuclear autoantigenic sperm protein	86,27	8	14,6	0,73	3,53E-02	17
PTGES3	IPI00789101	cDNA FLJ40895 fis, clone UTERU2002294, highly similar to Prostaglandin E synthase 3 (Prostaglandin E synthase 3 (Cytosolic), isoform CRA_c)	19,45	4	26,7	0,73	3,60E-02	18
FUS	IPI00260715	RNA-binding protein FUS	53,38	3	12,3	0,74	4,20E-02	13
IMPDH2	IPI00291510	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	55,80	8	41,6	0,75	4,61E-02	40
SET	IPI00072377	Protein SET	33,49	5	30,3	0,75	4,85E-02	13
EIF3B	IPI00719752	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	99,03	24	31,3	0,75	4,90E-02	47

Tabelle 6-4: Durch Überexpression von miR-16-1 herunterregulierte Proteine in Granta-519 Zellen (SILAC-Analyse). _a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org); _b: IPI Protein *Identifier* (Id) (www.ebi.ac.uk); _c: Anzahl von *unique* (einmaligen) Peptiden, die diesem Protein zugeordnet werden; _d: Sequenzabdeckung des Proteins durch die identifizierten *unique* (einmaligen) und *Razor*-Peptide (*Razor*-Peptide: nicht-einmalige Peptide, die aber mit den meisten anderen Peptiden nach dem Ozzam's Prinzip zu diesem Protein zugeordnet werden können); _e: "Signifikanz B"-Wert (zeigt an wie signifikant unterschiedlich das Verhältnis zur Gesamtverteilung der Proteinverhältnisse ist; diese Werte sind gruppiert nach Intensitäten); _f: Anzahl an Messpunkten (unterschiedliche Peptide, Modifikationen, Ladungen oder repetitive Messungen)

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenzabdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
SERPINB6	IPI00413451	cDNA, FLJ95410, highly similar to Homo sapiens serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B(ovalbumin), member 6 (SERPINB6), mRNA	46,37	6	20,8	0,15	4,62E-12	4
BCAT1	IPI00382412	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	44,10	2	30,9	0,16	2,59E-13	7
ALDH2	IPI00006663	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	56,38	5	13,3	0,21	1,73E-08	3
ASS1	IPI00020632	Argininosuccinate synthase	50,82	12	38,2	0,22	1,96E-16	15
C10orf57	IPI00296190	Uncharacterized protein C10orf58	25,76	4	20,5	0,22	1,26E-05	4
CD44	IPI00305064	CD44 antigen	81,55	4	6,9	0,24	2,77E-07	7
DBN1	IPI00794221	Uncharacterized protein DBN1	76,30	2	5	0,24	3,21E-07	6
FANCD2	IPI00075081	Fanconi anemia group D2 protein	166,46	6	6,3	0,26	8,30E-05	6
EIF1B	IPI00031489	Eukaryotic translation initiation factor 1b	12,82	3	31	0,28	1,88E-03	5
PEBP1	IPI00219446	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	21,06	8	59,4	0,31	8,30E-11	15
MPST	IPI00910977	cDNA FLJ31171 fis, clone KIDNE2000046, highly similar to 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	35,25	5	23,3	0,32	2,69E-05	7
RRM1	IPI00013871	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	90,07	4	8,3	0,32	4,66E-03	3
	IPI00894235	Neurobeachin-like protein 2	302,51	25	14,9	0,32	3,42E-05	25
KIF15	IPI00024975	Kinesin-like protein KIF15	160,16	5	5,1	0,34	7,80E-03	5
TP53I3	IPI00384643	Putative quinone oxidoreductase	35,54	4	20,2	0,34	8,96E-05	6
TOP2B	IPI00027280	DNA topoisomerase 2-beta	183,26	34	32,3	0,35	4,19E-09	107
MAP4	IPI00878314	Microtubule-associated protein 4	109,60	18	29,8	0,35	1,37E-05	26
HIGD1A	IPI00856008	cDNA, FLJ92076, Homo sapiens likely ortholog of mouse hypoxia induced gene 1(HIG1), mRNA	11,77	4	65,4	0,35	1,13E-04	8
ABHD14B	IPI00063827	Abhydrolase domain-containing protein 14B	22,35	5	40,5	0,35	1,59E-05	11
PRKCD	IPI00329236	Protein kinase C delta type	77,50	6	13,2	0,36	1,63E-04	4

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
LGALS3	IPI00465431	Galectin-3	26,15	4	16,8	0,36	1,76E-04	6
TKT	IPI00643920	Transketolase	68,74	20	53,1	0,38	7,60E-08	86
MRPS16	IPI00032872	28S ribosomal protein S16, mitochondrial	15,35	4	44,5	0,39	5,17E-04	8
UBE2C	IPI00013002	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	19,65	4	44,7	0,40	4,70E-03	3
GNL3	IPI00306380	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	62,00	12	30,1	0,40	1,45E-04	12
MRPS17	IPI00925656	MRPS17 protein	25,72	4	25,8	0,40	7,35E-04	4
CDK2AP1	IPI00022340	Cyclin-dependent kinase 2-associated protein 1	12,37	2	33,9	0,41	2,29E-02	4
SMARCC1	IPI00234252	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	122,87	9	14,2	0,41	8,90E-04	21
TCL1A	IPI00178749	T-cell leukemia/lymphoma protein 1A	13,46	3	28,9	0,41	2,46E-02	3
MRPS25	IPI00013167	28S ribosomal protein S25, mitochondrial	20,12	4	20,8	0,42	6,75E-03	4
FLNB	IPI00900293	Filamin B	281,63	2	43,6	0,42	1,45E-06	216
UBE2H	IPI00020965	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H	20,66	3	21,9	0,42	1,37E-03	3
MRPS34	IPI00658155	28S ribosomal protein S34, mitochondrial	26,33	3	10,2	0,42	7,70E-03	3
VCL	IPI00307162	Vinculin	123,80	19	23,8	0,44	4,98E-04	22
PDE12	IPI00174390	2',5'-phosphodiesterase 12	67,35	7	16,7	0,44	2,02E-03	6
VPRBP	IPI00329528	Protein VPRBP	169,41	8	5,8	0,44	1,06E-02	8
MRPS6	IPI00874144	28S ribosomal protein S6, mitochondrial	20,42	3	24,2	0,44	2,26E-03	5
BLVRA	IPI00294158	Biliverdin reductase A	33,43	7	33,4	0,45	2,52E-03	8
CTSH	IPI00297487	Cathepsin H	37,38	5	24,8	0,45	2,65E-03	8
NUMA1	IPI00292771	Nuclear mitotic apparatus protein 1	238,26	1	28,9	0,45	6,75E-06	110
MRPS22	IPI00013146	28S ribosomal protein S22, mitochondrial	41,28	4	20,3	0,47	4,01E-03	4
CYP51A1	IPI00295772	Cytochrome P450 51A1	57,28	5	15,3	0,47	1,46E-03	5
S100A4	IPI00032313	Protein S100-A4	11,73	2	18,8	0,48	1,61E-03	10
CISD1	IPI00020510	CDGSH iron sulfur domain-containing protein 1	12,20	2	25,9	0,48	5,32E-03	4
SRP14P1	IPI00293434	Signal recognition particle 14 kDa protein	14,57	3	25,7	0,49	7,12E-03	3
TOP2A	IPI00879004	DNA topoisomerase 2-alpha	182,68	30	28,6	0,50	8,68E-05	79
HLA-DRB1	IPI00472169	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-15 beta chain	29,97	4	34,6	0,50	3,07E-03	8
DNMT1	IPI00031519	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	189,56	25	19,5	0,50	3,24E-03	47
SEPT9	IPI00784614	cDNA FLJ55422, highly similar to Septin-9	65,40	7	17,4	0,51	3,27E-03	14

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
CDK2	IPI00031681	Cell division protein kinase 2	33,93	5	27,2	0,51	9,08E-03	4
LTA4H	IPI00219077	Leukotriene A-4 hydrolase	69,28	16	39,3	0,51	1,10E-04	49
FANCI	IPI00306518	Fanconi anemia group I protein	149,32	15	15,8	0,51	2,93E-02	14
HLA-DQB1	IPI00885045	HLA class II histocompatibility antigen, DQ(3) beta chain	30,62	2	28,3	0,51	1,39E-04	11
SAMHD1	IPI00294739	SAM domain and HD domain-containing protein 1	72,20	10	20,8	0,51	3,87E-03	13
MKI67	IPI00004233	Antigen KI-67	358,69	51	23,2	0,52	4,27E-03	58
APEH	IPI00926648	Acylamino-acid-releasing enzyme	81,67	6	14,2	0,52	4,36E-03	8
CENPF	IPI00855998	Centromere protein F	367,76	19	7,4	0,52	3,18E-02	13
HIP1	IPI00782965	Huntingtin-interacting protein 1	116,22	5	6,8	0,52	1,28E-02	6
EPB41L2	IPI00015973	Band 4.1-like protein 2	112,59	14	21,7	0,53	5,28E-03	15
IMPDH2	IPI00291510	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	55,80	8	41,6	0,53	2,56E-04	25
MRPS23	IPI00032881	28S ribosomal protein S23, mitochondrial	21,77	2	15,3	0,53	3,60E-02	3
AKR1B1	IPI00413641	Aldose reductase	35,85	9	45,3	0,53	2,76E-04	24
PSPHL	IPI00019178	Phosphoserine phosphatase	25,01	3	27,6	0,53	3,67E-02	3
UCK2	IPI00065671	Uridine-cytidine kinase 2	29,30	3	21,8	0,53	1,46E-02	3
SLC1A4	IPI00015476	Neutral amino acid transporter A	55,72	4	15	0,53	3,72E-02	6
DYNC1LI1	IPI00007675	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	56,58	8	26,2	0,53	1,47E-02	6
GCSH	IPI00011604	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	18,91	2	17,3	0,53	3,74E-02	4
LANCL1	IPI00005724	LanC-like protein 1	45,28	4	20,6	0,55	1,94E-02	4
PDCD6IP	IPI00246058	Programmed cell death 6-interacting protein	96,82	15	22,6	0,55	8,48E-03	37
KIAA1618	IPI00642126	Protein ALO17	575,87	10	25,8	0,55	8,78E-03	150
HK2P	IPI00102864	Hexokinase-2	102,38	11	20,8	0,55	9,04E-03	23
GNL2	IPI00015808	Nucleolar GTP-binding protein 2	83,65	7	13	0,56	2,19E-02	11
KIF4B	IPI00178150	Chromosome-associated kinesin KIF4A	139,88	4	4,1	0,56	4,94E-02	6
FAM62A	IPI00746655	Extended-synaptotagmin-1	124,00	15	20,9	0,56	1,00E-02	31
HIP1R	IPI00024417	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	119,39	3	3,4	0,56	5,00E-02	4
KPNA2	IPI00002214	Importin subunit alpha-2	57,86	7	22,7	0,56	1,04E-02	9
CD74	IPI00217775	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	26,40	6	30,6	0,56	8,72E-04	10
PTPN23	IPI00034006	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	178,97	9	8,1	0,57	2,81E-02	7

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
	IPI00909642	Filamin A	245,86	2	0,6	0,57	2,84E-02	6
NASP	IPI00332499	Nuclear autoantigenic sperm protein	86,27	8	14,6	0,58	1,58E-03	20
MATR3	IPI00789551	Uncharacterized protein MATR3	99,97	13	20,4	0,58	1,59E-03	42
RTN4	IPI00021766	Reticulon-4	129,93	2	2,3	0,58	1,60E-02	4
	IPI00258904		17,80	2	11,7	0,59	1,95E-03	14
VIM	IPI00418471	Vimentin	53,65	16	41,2	0,59	1,97E-03	57
RIF1	IPI00293845	Telomere-associated protein RIF1	274,46	18	10,8	0,59	3,53E-02	21
FAM49B	IPI00303318	Protein FAM49B	36,75	5	25,3	0,59	1,77E-02	8
TK1	IPI00791117	Thymidine kinase, cytosolic	28,59	5	21,3	0,59	3,63E-02	5
NAE1	IPI00646350	Uncharacterized protein NAE1	60,52	5	18,4	0,60	3,90E-02	3
CARHSP1	IPI00304409	Calcium-regulated heat stable protein 1	15,89	1	10,9	0,60	3,93E-02	3
SFXN1	IPI00009368	Sideroflexin-1	35,62	6	34,8	0,60	2,02E-02	8
LIG1	IPI00219841	DNA ligase 1	101,73	3	5,4	0,60	4,03E-02	7
QARS	IPI00026665	cDNA FLJ75085, highly similar to Homo sapiens glutaminyl-tRNA synthetase (QARS), mRNA	89,66	15	30,3	0,61	2,26E-02	18
	IPI00397191		29,64	1	5,9	0,61	4,50E-02	3
CBR1	IPI00295386	Carbonyl reductase [NADPH] 1	30,38	6	34,7	0,61	4,58E-02	7
VAPB	IPI00006211	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	27,23	3	22,6	0,61	4,80E-02	8
OGFOD1	IPI00170429	2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain-containing protein 1	63,25	2	6,8	0,62	4,96E-02	6
GNAI2	IPI00926935	Galphai2 protein	41,55	7	33,9	0,62	4,53E-03	14
CYCS	IPI00465315	Cytochrome c	11,75	6	42,9	0,63	5,45E-03	38
ARL8A	IPI00060031	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	21,42	3	46,8	0,64	3,49E-02	9
HLA-DQA1	IPI00736170	HLA class II histocompatibility antigen, DQ(W3) alpha chain	21,32	2	22,6	0,64	3,57E-02	12
DUT	IPI00013679	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	26,71	3	15,5	0,65	4,00E-02	12
PARP1	IPI00449049	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	113,08	40	48,9	0,65	9,16E-03	218
PPIA	IPI00887678	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	24,38	12	54,7	0,66	1,09E-02	131

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
ACAA2	IPI00873829	Uncharacterized protein ACAA2	41,93	7	32	0,66	1,13E-02	15
PCNA	IPI00021700	Proliferating cell nuclear antigen	28,77	7	42,5	0,66	1,24E-02	33
	IPI00289658	HLA class II histocompatibility antigen, DQ(5) alpha chain	28,00	1	18	0,67	1,50E-02	16
SET	IPI00072377	Protein SET	33,49	5	30,3	0,68	1,81E-02	20
PRDX6	IPI00220301	Peroxiredoxin-6	25,04	13	42	0,69	2,05E-02	46
CDC2	IPI00026689	Cell division control protein 2 homolog	34,78	12	56,1	0,69	2,14E-02	19
NUP205	IPI00783781	Nuclear pore complex protein Nup205	227,92	38	26,3	0,69	2,23E-02	89
FASN	IPI00026781	Fatty acid synthase	273,40	54	33,7	0,69	2,42E-02	303
MCM2	IPI00922181	DNA replication licensing factor MCM2	106,90	22	31,9	0,70	2,72E-02	31
ASNS	IPI00554777	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	64,37	14	49,6	0,70	2,73E-02	29
	IPI00005171	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	28,61	2	25,6	0,70	2,86E-02	27
MCM7	IPI00299904	DNA replication licensing factor MCM7	81,31	19	35,6	0,71	2,96E-02	31
PDLIM1	IPI00010414	PDZ and LIM domain protein 1	36,07	9	41,6	0,71	3,05E-02	17
TUBB2C	IPI00007752	Tubulin beta-2C chain	49,83	1	9,9	0,71	3,24E-02	10
TXN	IPI00216298	Thioredoxin	11,74	8	57,1	0,71	3,34E-02	36
PFKM	IPI00743142	6-phosphofructokinase, muscle type	85,18	14	24,2	0,72	3,49E-02	27
GOT2	IPI00018206	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	47,48	10	37,7	0,72	3,68E-02	16
MCM4	IPI00018349	DNA replication licensing factor MCM4	96,56	15	29,5	0,72	3,80E-02	32
MCM3	IPI00013214	DNA replication licensing factor MCM3	95,91	16	26,1	0,72	3,89E-02	52
FLNA	IPI00333541	Filamin-A	280,74	11	36,9	0,73	4,31E-02	277
CBX3	IPI00297579	Chromobox protein homolog 3	20,81	7	55,7	0,73	4,40E-02	49
PTPN6	IPI00795221	70 kDa SHP-1L protein	70,13	16	34,1	0,73	4,44E-02	64
GARS	IPI00783097	Glycyl-tRNA synthetase	83,14	21	39,4	0,73	4,45E-02	81
CHD4	IPI00455210	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	220,83	31	26,1	0,73	4,63E-02	166

Tabelle 6-5: Durch Überexpression von miR-15a hochregulierte Proteine in Granta-519 Zellen (SILAC-Analyse). _a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org); _b: IPI Protein *Identifizier* (Id) (www.ebi.ac.uk); _c: Anzahl von *unique* (einmaligen) Peptiden, die diesem Protein zugeordnet werden; _d: Sequenzabdeckung des Proteins durch die identifizierten *unique* (einmaligen) und Razor-Peptide (Razor-Peptide: nicht-einmalige Peptide, die aber mit den meisten anderen Peptiden nach dem Ozzam's Prinzip zu diesem Protein zugeordnet werden können); _e: "Signifikanz B"-Wert (zeigt an, wie signifikant unterschiedlich das Verhältnis zur Gesamtverteilung der Proteinverhältnisse ist; diese Werte sind gruppiert nach Intensitäten); _f: Anzahl an Messpunkten (unterschiedliche Peptide, Modifikationen, Ladungen oder repetitive Messungen)

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenzabdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
SERPINB9	IPI00032139	Serpin B9	42,40	8	30,9	1,55	5,00E-02	26
VDAC1	IPI00216308	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	30,77	11	52,3	1,56	4,76E-02	24
RPN2	IPI00028635	Ribophorin II (Ribophorin II, isoform CRA_d)	71,22	8	23,2	1,56	4,60E-02	24
VDAC2	IPI00216026	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	31,57	10	44,9	1,57	4,54E-02	17
COPG	IPI00783982	Coatomer subunit gamma	97,72	16	33,6	1,59	4,11E-02	45
ATP5F1	IPI00029133	ATP synthase subunit b, mitochondrial	28,91	10	45,3	1,59	4,08E-02	30
	IPI00006865	Vesicle-trafficking protein SEC22b	24,74	7	44,2	1,60	3,87E-02	18
COPA	IPI00646493	Coatomer subunit alpha	139,32	29	31,3	1,61	3,73E-02	43
MDH2	IPI00291006	Malate dehydrogenase, mitochondrial	35,50	13	63	1,61	3,63E-02	45
VDAC3	IPI00294779	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	30,79	6	21,8	1,62	3,51E-02	15
ALDOA	IPI00796333	Fructose-bisphosphate aldolase A	45,26	13	53,6	1,62	3,46E-02	64
ATP2A2	IPI00219078	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	114,76	13	20,8	1,62	3,44E-02	32
CHID1	IPI00306719	Chitinase domain-containing protein 1	51,05	6	20,7	1,63	4,91E-02	7
ACADVL	IPI00028031	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	75,21	3	6,7	1,63	4,87E-02	5
ANXA5	IPI00329801	Annexin A5	35,94	11	43,8	1,63	3,33E-02	35
GABARAP L2	IPI00026358	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	13,67	4	43,6	1,63	4,79E-02	9
CYC1	IPI00029264	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	35,39	4	17,5	1,63	4,72E-02	6
ACOT1	IPI00220906	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	53,24	3	11	1,64	4,67E-02	6

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
GBF1	IPI00021954	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1	206,44	14	10	1,64	4,60E-02	8
NANS	IPI00147874	Sialic acid synthase	40,31	5	22,3	1,70	3,56E-02	6
CANX	IPI00020984	Calnexin	71,50	15	22,3	1,70	2,33E-02	30
ATP5H	IPI00220487	ATP synthase subunit d, mitochondrial	18,49	9	72	1,71	2,22E-02	32
FAM82B	IPI00329696	Regulator of microtubule dynamics protein 1	35,81	8	28	1,71	3,30E-02	18
ERO1L	IPI00872773	Uncharacterized protein ERO1L	54,40	8	23,3	1,74	4,95E-02	21
GPD2	IPI00017895	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	80,83	8	18	1,74	4,92E-02	12
EEF1E1	IPI00003588	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	19,81	5	40,8	1,74	2,93E-02	10
FERMT3	IPI00397834	Fermitin family homolog 3	75,95	15	37,5	1,74	4,84E-02	21
TFRC	IPI00022462	Transferrin receptor protein 1	84,87	11	19,6	1,74	4,83E-02	14
RCN1	IPI00015842	Reticulocalbin-1	38,89	3	13,3	1,75	2,83E-02	8
PYCR1	IPI00550882	Pyrraline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial	35,98	5	16,8	1,75	4,71E-02	13
TXNDC12	IPI00026328	Thioredoxin domain-containing protein 12	19,21	4	30,8	1,78	2,49E-02	12
PDIA6	IPI00299571	Protein disulfide-isomerase A6	53,90	9	23,4	1,78	1,51E-02	28
RHOC	IPI00027434	Rho-related GTP-binding protein RhoC	22,01	1	6,2	1,79	4,63E-02	3
GALNT2	IPI00004669	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	64,73	3	7,5	1,79	4,60E-02	3
HDLBP	IPI00022228	Vigilin	141,45	2	20,8	1,79	4,02E-02	13
ALG5	IPI00002506	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	36,95	3	13	1,79	4,52E-02	7
SUB1	IPI00221222	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	14,40	5	37,8	1,80	1,41E-02	17
CALR	IPI00020599	Calreticulin	48,14	11	48	1,81	1,32E-02	53
CISD2	IPI00166865	CDGSH iron sulfur domain-containing protein 2	15,28	5	41,5	1,82	3,67E-02	11
SYNE2	IPI00239406	Nesprin-2	798,85	90	17,6	1,82	2,06E-02	86
CD9	IPI00215997	CD9 antigen	25,42	3	20,6	1,82	2,02E-02	6
C19orf10	IPI00056357	UPF0556 protein C19orf10	18,80	4	30,6	1,82	3,57E-02	7
HSPA5	IPI00003362	78 kDa glucose-regulated protein	72,42	21	33,1	1,83	1,21E-02	35
C21orf33	IPI00916546	ES1 protein homolog, mitochondrial	22,17	8	60	1,84	3,42E-02	15
NAGK	IPI00296526	N-acetyl-D-glucosamine kinase	42,04	5	21,5	1,84	3,41E-02	8
ADPRH	IPI00009258	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase	39,51	2	7,8	1,84	3,69E-02	3

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
GOLGB1	IPI00796891	Golgin B1	377,12	32	14,1	1,84	1,88E-02	22
STAT1	IPI00030781	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	87,33	7	11,9	1,84	3,31E-02	10
SEC11C	IPI00219436	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11C	21,54	4	32,3	1,84	3,30E-02	8
AKAP13	IPI00065931	A-kinase anchor protein 13	307,84	3	1,7	1,89	3,37E-02	3
ACAT1	IPI00030363	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	45,20	5	21,5	1,89	2,75E-02	12
RASA1	IPI00026262	Ras GTPase-activating protein 1	116,40	5	6,9	1,89	3,17E-02	4
ASAH1	IPI00013698	Acid ceramidase	44,65	5	19	1,89	3,16E-02	15
NNT	IPI00337541	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	113,89	11	16,7	1,90	8,36E-03	33
UGCG1	IPI00024466	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	177,19	27	29,6	1,90	8,14E-03	42
CLPTM1	IPI00107357	Cleft lip and palate transmembrane protein 1	77,96	2	3,6	1,91	2,85E-02	3
SPCS3	IPI00300299	Signal peptidase complex subunit 3	20,31	2	12,8	1,92	1,31E-02	4
TMED5	IPI00294472	Transmembrane emp24 domain-containing protein 5	26,01	4	24,5	1,92	2,90E-02	4
MPDU1	IPI00759799	HBeAg-binding protein 2 binding protein A	32,01	3	14	1,92	1,25E-02	7
CSRP1	IPI00442073	Cysteine and glycine-rich protein 1	20,57	6	50,3	1,93	2,41E-02	12
CDIPT	IPI00902843	cDNA FLJ16129 fis, clone BRACE2039823, highly similar to CDP-diacylglycerol--inositol3-phosphatidyltransferase	25,95	3	15,6	1,93	2,65E-02	3
KRTCAP2	IPI00167030	Keratinocytes-associated protein 2	17,60	1	10,5	1,94	2,66E-02	4
TMEM70	IPI00106966	Transmembrane protein 70	28,97	2	11,5	1,95	1,13E-02	3
THEM2	IPI00020530	Thioesterase superfamily member 2	14,96	4	37,9	1,95	2,17E-02	9
PPIB	IPI00646304	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	23,74	10	43,5	1,96	5,99E-03	44
TMEM167B	IPI00024521	Transmembrane protein 167B	8,29	2	21,6	1,96	2,73E-02	5
MGST3	IPI00639812	Microsomal glutathione S-transferase 3 variant	18,42	3	16,9	1,96	2,41E-02	3
FAM162A	IPI00023001	UPF0389 protein FAM162A	17,34	4	20,1	1,96	2,12E-02	12
GBE1	IPI00296635	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	80,46	14	28,9	1,97	5,67E-03	26
NOMO2	IPI00465432	Nodal modulator 2	139,44	15	16,8	1,97	2,02E-02	24
TMEM147	IPI00013293	Transmembrane protein 147	25,26	2	8,5	1,97	2,60E-02	4
TMED9	IPI00023542	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	27,28	2	21,3	1,98	1,97E-02	7

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
GPX4	IPI00884192	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	27,05	3	17,9	1,99	9,47E-03	8
SOD2	IPI00847322	cDNA, FLJ93564, highly similar to Homo sapiens superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), mRNA (Superoxide dismutase 2, mitochondrial, isoform CRA_b)	24,75	4	33,3	1,99	9,05E-03	8
	IPI00328170	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	91,92	6	12,8	2,00	2,18E-02	6
TMEM14C	IPI00009346	Transmembrane protein 14C	11,56	2	32,1	2,00	2,09E-02	23
DCXR	IPI00448095	L-xylulose reductase	25,91	5	35,7	2,01	8,56E-03	8
TMED10	IPI00028055	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	24,98	7	33,8	2,02	4,33E-03	19
SRCAP	IPI00444046	Helicase SRCAP	343,52	2	0,7	2,02	2,23E-02	3
ARL1	IPI00219518	ADP-ribosylation factor-like protein 1	20,42	5	44,8	2,03	7,69E-03	14
RER1	IPI00005728	Protein RER1	24,82	3	22,4	2,03	7,54E-03	8
LMAN2	IPI00009950	Vesicular integral-membrane protein VIP36	40,23	7	28,9	2,04	1,56E-02	13
STT3A	IPI00297492	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	80,53	5	8,7	2,04	7,29E-03	19
CTSC	IPI00022810	Dipeptidyl-peptidase 1	51,84	6	20,3	2,05	1,52E-02	24
SEC61B	IPI00220835	Protein transport protein Sec61 subunit beta	9,97	1	10,4	2,05	7,07E-03	6
LNPEP	IPI00307017	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	117,35	20	22,2	2,06	1,45E-02	21
NCLN	IPI00470649	Nicalin	62,97	4	11,2	2,06	1,74E-02	4
CTSD	IPI00011229	Cathepsin D	44,55	3	11,2	2,06	1,73E-02	5
SERPINH1	IPI00032140	Serpin H1	46,44	3	12,9	2,06	1,73E-02	5
RAB18	IPI00844361	RAB18 long isoform 1	26,41	5	30,2	2,06	1,43E-02	8
TMED2	IPI00016608	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	22,76	3	26,4	2,07	1,39E-02	19
TM9SF3	IPI00030847	Transmembrane 9 superfamily member 3	67,89	1	4,4	2,08	1,60E-02	3
BRP44	IPI00022832	Brain protein 44	14,28	5	37,8	2,08	1,33E-02	15
ERAP1	IPI00165949	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	107,84	16	20,4	2,09	1,29E-02	22
HSP90B1	IPI00027230	Endoplasmic	92,47	32	41,5	2,10	2,84E-03	71
LGALS1	IPI00219219	Galectin-1	14,72	6	67,4	2,14	2,31E-03	60
OSTC	IPI00183603	UPF0527 transmembrane protein	16,83	2	14,1	2,14	1,05E-02	8

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
LMAN1	IPI00026530	Protein ERGIC-53	57,55	9	31,2	2,15	2,15E-03	42
SEC24A	IPI00873472	Protein transport protein Sec24A	119,75	6	7,4	2,16	1,22E-02	9
MESDC2	IPI00399089	Mesoderm development candidate 2	26,08	2	13,2	2,16	4,23E-03	3
ITGB1	IPI00217561	Integrin beta-1	91,62	4	4,6	2,16	1,18E-02	4
PRKCSH	IPI00026154	Glucosidase 2 subunit beta	60,13	11	29	2,16	2,02E-03	14
GANAB	IPI00383581	Neutral alpha-glucosidase AB	112,92	17	23,8	2,19	1,77E-03	40
NIPSNAP3 A	IPI00871176	Protein NipSnap homolog 3A	32,28	4	22,3	2,19	1,06E-02	7
MVP	IPI00000105	Major vault protein	99,33	3	4,6	2,22	9,75E-03	5
C17orf61	IPI00166483	UPF0451 protein C17orf61	11,74	2	31,9	2,23	9,42E-03	6
HYOU1	IPI00000877	Hypoxia up-regulated protein 1	111,33	21	32,3	2,24	1,32E-03	49
FKBP2	IPI00002535	FK506-binding protein 2	15,65	5	49,3	2,26	2,64E-03	11
NUCB2	IPI00009123	Nucleobindin-2	50,20	3	10,7	2,28	7,70E-03	3
AGPAT1	IPI00019141	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	31,72	1	7,4	2,28	1,02E-02	3
ICAM1	IPI00008494	Intercellular adhesion molecule 1	57,83	5	12,4	2,29	5,79E-03	7
FAM3C	IPI00334282	Protein FAM3C	24,68	4	26,4	2,30	7,26E-03	11
PSAP	IPI00219825	Prosaposin (Variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)	61,69	11	22,5	2,33	1,85E-03	34
GLG1	IPI00414717	Golgi apparatus protein 1	137,22	9	12,1	2,34	4,87E-03	11
PIR	IPI00012575	Pirin	32,11	4	23,8	2,34	6,14E-03	6
GPX1	IPI00927606	Glutathione peroxidase 1	22,04	5	33,5	2,34	1,74E-03	6
BRP44L	IPI00412785	Brain protein 44-like protein	12,35	4	56,9	2,35	6,13E-03	3
P4HB	IPI00010796	Protein disulfide-isomerase	57,12	21	44,9	2,36	6,98E-04	102
SDF2L1	IPI00106642	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1	67,02	2	5,3	2,37	1,51E-03	5
ERP44	IPI00401264	Thioredoxin domain-containing protein 4	46,97	8	32,3	2,42	5,01E-04	6
SSR1	IPI00301021	Translocon-associated protein subunit alpha	32,24	4	17,8	2,44	1,08E-03	9
SEL1L	IPI00002790	Protein sel-1 homolog 1	88,75	4	11	2,45	4,13E-03	3
CKAP4	IPI00141318	Cytoskeleton-associated protein 4	66,02	11	22,3	2,51	2,49E-03	17
PRDX4	IPI00011937	Peroxiredoxin-4	30,54	8	29,5	2,52	2,81E-04	16
SQSTM1	IPI00179473	Sequestosome-1	47,69	3	11,8	2,53	7,25E-04	3

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
SSR4	IPI00019385	Translocon-associated protein subunit delta	20,21	3	19	2,54	2,66E-04	9
MAN2B1	IPI00012989	Lysosomal alpha-mannosidase	113,74	4	5,6	2,56	2,75E-03	5
C20orf3	IPI00031131	Adipocyte plasma membrane-associated protein	46,48	2	6,2	2,63	4,57E-04	4
IGLV4-69	IPI00478997	V5-6 protein	12,77	1	19,3	2,64	1,53E-04	5
CLIC2	IPI00221328	Chloride intracellular channel protein 2	28,36	5	30	2,67	3,72E-04	9
PGM3	IPI00030116	Phosphoacetylglucosamine mutase	62,91	4	8,1	2,70	1,69E-03	5
USO1	IPI00031583	General vesicular transport factor p115	109,19	12	20,3	2,85	6,56E-04	8
IGLV4-3	IPI00382938	V5-1 protein	25,98	1	28,8	2,85	4,80E-05	24
GYS1	IPI00303868	Glycogen [starch] synthase, muscle	83,79	4	10	3,08	4,79E-04	3
METTL7A	IPI00022300	Methyltransferase-like protein 7A	28,32	3	17,2	3,21	2,73E-04	5
GGH	IPI00023728	Gamma-glutamyl hydrolase	35,96	6	27,4	3,21	3,01E-05	16
C8orf82	IPI00166638	UPF0598 protein	23,89	3	23,6	3,53	1,10E-04	3
C2orf30	IPI00748151	XTP3-transactivated gene B protein	54,86	2	8,7	3,63	7,95E-05	3
ISG15	IPI00375631	Interferon-induced 17 kDa protein	17,89	3	24,2	3,83	3,21E-05	4
ATL3	IPI00550523	Atlastin-3	60,54	9	29,9	3,92	1,20E-05	15
CRYZ	IPI00000792	Quinone oxidoreductase	35,21	6	32,8	4,03	8,04E-06	10
TXNDC5	IPI00171438	Thioredoxin domain-containing protein 5	47,63	12	53,2	5,09	8,07E-10	22
ISG20	IPI00647246	Interferon-stimulated gene 20 kDa protein	20,36	4	30,4	5,32	4,88E-07	4
DST	IPI00642259	Dystonin	857,45	72	12,8	5,44	2,11E-07	63
CASP1	IPI00021800	Caspase-1	45,16	13	39,9	6,66	1,83E-09	20

Tabelle 6-6: Durch Überexpression von miR-16-1 hochregulierte Proteine in Granta-519 Zellen (SILAC-Analyse); _a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org); _b: IPI Protein *Identifier* (Id) (www.ebi.ac.uk); _c: Anzahl von *unique* (einmaligen) Peptiden, die diesem Protein zugeordnet werden; _d: Sequenzabdeckung des Proteins durch die identifizierten *unique* (einmaligen) und Razor-Peptide (Razor-Peptide: nicht-einmalige Peptide, die aber mit den meisten anderen Peptiden nach dem Ozzam's Prinzip zu diesem Protein zugeordnet werden können); _e: "Signifikanz B"-Wert (zeigt an, wie signifikant unterschiedlich das Verhältnis zur Gesamtverteilung der Proteinverhältnisse ist; diese Werte sind gruppiert nach Intensitäten); _f: Anzahl an Messpunkten (unterschiedliche Peptide, Modifikationen, Ladungen oder repetitive Messungen)

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenzabdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
COPB2	IPI00220219	Coatomer subunit beta'	102,49	12	19,4	1,39	4,97E-02	30
TMED10	IPI00028055	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	24,98	7	33,8	1,39	4,93E-02	18
	IPI00006865	Vesicle-trafficking protein SEC22b	24,74	7	44,2	1,40	4,85E-02	20
GCN1L1	IPI00001159	Translational activator GCN1	292,74	83	37,8	1,40	4,81E-02	359
PRDX4	IPI00011937	Peroxiredoxin-4	30,54	8	29,5	1,40	4,60E-02	15
PHB2	IPI00027252	Prohibitin-2	33,30	4	15,4	1,42	4,13E-02	4
H2AFZ	IPI00218448	Histone H2A.Z	13,55	4	46,9	1,42	3,98E-02	36
PRDX5	IPI00024915	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	22,03	11	56,1	1,43	3,78E-02	32
HADH	IPI00298406	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	42,12	6	35,1	1,43	3,75E-02	16
CANX	IPI00020984	Calnexin	71,50	15	22,3	1,43	3,66E-02	61
NAPA	IPI00009253	Alpha-soluble NSF attachment protein	33,23	11	62	1,46	3,07E-02	22
EZR	IPI00843975	Ezrin	69,41	11	31,2	1,46	3,01E-02	62
COPG	IPI00783982	Coatomer subunit gamma	97,72	16	33,6	1,46	2,95E-02	57
FAM82B	IPI00329696	Regulator of microtubule dynamics protein 1	35,81	8	28	1,47	4,76E-02	14
PPIB	IPI00646304	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	23,74	10	43,5	1,48	2,47E-02	35
NUCB2	IPI00009123	Nucleobindin-2	50,20	3	10,7	1,50	5,00E-02	3
SEL1L	IPI00002790	Protein sel-1 homolog 1	88,75	4	11	1,51	4,84E-02	6
BRP44	IPI00022832	Brain protein 44	14,28	5	37,8	1,51	3,83E-02	11
TMED2	IPI00016608	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	22,76	3	26,4	1,51	3,79E-02	11
SYNE2	IPI00239406	Nesprin-2	798,85	90	17,6	1,51	4,66E-02	75
DHRS7	IPI00006957	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	38,30	6	29,2	1,52	3,62E-02	8
XPNPEP1	IPI00793375	Xaa-Pro aminopeptidase 1	74,80	4	11,7	1,52	3,46E-02	12

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
CTPS	IPI00290142	CTP synthase 1	66,69	6	14,7	1,52	3,43E-02	6
LMAN2	IPI00009950	Vesicular integral-membrane protein VIP36	40,23	7	28,9	1,54	3,05E-02	13
ANXA5	IPI00329801	Annexin A5	35,94	11	43,8	1,54	1,54E-02	26
TMED9	IPI00023542	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	27,28	2	21,3	1,55	2,98E-02	4
GPD2	IPI00017895	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	80,83	8	18	1,55	2,96E-02	11
IGHM	IPI00549291	IGHM protein	66,18	13	33,7	1,55	1,48E-02	36
FAM114A2	IPI00828172	Protein FAM114A2	56,27	3	11,7	1,55	3,74E-02	4
HSPA5	IPI00003362	78 kDa glucose-regulated protein	72,42	21	33,1	1,56	1,33E-02	76
TMED5	IPI00294472	Transmembrane emp24 domain-containing protein 5	26,01	4	24,5	1,56	3,57E-02	6
DAK	IPI00551024	Dihydroxyacetone kinase	58,98	10	31	1,57	2,58E-02	10
SLC25A1	IPI00294159	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	34,01	6	34,1	1,58	2,46E-02	3
DARS	IPI00216951	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	57,14	9	25	1,58	1,15E-02	11
M6PRBP1	IPI00303882	Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1	47,05	3	12,9	1,58	3,18E-02	3
HSD17B4	IPI00019912	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	79,69	7	18,8	1,59	3,16E-02	9
CKAP4	IPI00141318	Cytoskeleton-associated protein 4	66,02	11	22,3	1,59	2,26E-02	20
ITPA	IPI00018783	Inosine triphosphate pyrophosphatase	21,45	4	35,1	1,60	2,10E-02	8
GOLGA3	IPI00305267	Golgin subfamily A member 3	167,35	8	7,6	1,61	2,78E-02	10
HYOU1	IPI00000877	Hypoxia up-regulated protein 1	111,33	21	32,3	1,62	8,50E-03	106
MVK	IPI00010717	Mevalonate kinase	42,45	4	13,4	1,62	2,65E-02	3
H1FX	IPI00021924	Histone H1x	22,49	2	14,1	1,62	2,65E-02	3
ACADM	IPI00513827	Putative uncharacterized protein DKFZp686M24262	50,27	6	13,9	1,62	2,59E-02	6
HINT2	IPI00000335	Histidine triad nucleotide-binding protein 2	17,16	2	21,5	1,63	1,77E-02	7
HDHD1A	IPI00913889	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 1A	27,57	5	35,5	1,63	2,52E-02	7
P4HB	IPI00010796	Protein disulfide-isomerase	57,12	21	44,9	1,63	7,67E-03	84
SUB1	IPI00221222	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	14,40	5	37,8	1,65	6,37E-03	14
FKBP2	IPI00002535	FK506-binding protein 2	15,65	5	49,3	1,65	1,50E-02	11
ACAT2	IPI00291419	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	44,64	5	26,8	1,65	6,34E-03	17

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
ERP44	IPI00401264	Thioredoxin domain-containing protein 4	46,97	8	32,3	1,65	6,27E-03	13
CLIC4	IPI00001960	Chloride intracellular channel protein 4	28,77	7	49,8	1,66	1,43E-02	15
RAB18	IPI00844361	RAB18 long isoform 1	26,41	5	30,2	1,67	1,35E-02	8
STAT1	IPI00030781	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	87,33	7	11,9	1,67	1,31E-02	13
CHID1	IPI00306719	Chitinase domain-containing protein 1	51,05	6	20,7	1,68	1,89E-02	6
ABHD11	IPI00171692	Abhydrolase domain-containing protein 11	34,69	3	15,6	1,69	4,61E-02	4
MARCKS	IPI00219301	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	31,55	3	17,2	1,69	1,12E-02	7
APIP	IPI00911064	cDNA FLJ58961, highly similar to APAF1-interacting protein	29,26	2	12	1,69	4,54E-02	3
GPX4	IPI00884192	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	27,05	3	17,9	1,70	1,68E-02	4
OSTC	IPI00183603	UPF0527 transmembrane protein	16,83	2	14,1	1,71	1,00E-02	8
ARL1	IPI00219518	ADP-ribosylation factor-like protein 1	20,42	5	44,8	1,71	9,70E-03	9
ARHGEF1	IPI00395605	Rho guanine nucleotide exchange factor 1	104,06	11	13,8	1,71	4,19E-02	11
DARS2	IPI00100460	Aspartyl-tRNA synthetase, mitochondrial	73,56	4	8,4	1,72	1,54E-02	5
PLCG2	IPI00329185	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2	147,87	22	25,4	1,72	3,53E-03	48
SF4	IPI00103419	Splicing factor 4	72,47	1	2	1,73	3,91E-02	3
SEC11C	IPI00219436	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11C	21,54	4	32,3	1,73	8,50E-03	4
LGALS1	IPI00219219	Galectin-1	14,72	6	67,4	1,74	3,07E-03	36
NIPSNAP3 A	IPI00871176	Protein NipSnap homolog 3A	32,28	4	22,3	1,74	3,79E-02	4
KYNU	IPI00003818	Kynureninase	52,35	3	7,1	1,76	3,45E-02	3
MYO1C	IPI00743335	Myosin-1c	121,72	8	9,9	1,77	3,41E-02	8
CSRP1	IPI00442073	Cysteine and glycine-rich protein 1	20,57	6	50,3	1,78	6,07E-03	17
SH3BP1	IPI00873875	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	77,83	4	9,8	1,81	2,89E-02	5
MVP	IPI00000105	Major vault protein	99,33	3	4,6	1,81	2,85E-02	5
SPR	IPI00017469	Sepiapterin reductase	28,05	4	21,5	1,82	2,76E-02	4
	IPI00102821	Proapoptotic caspase adapter protein	20,69	4	34,4	1,83	1,39E-03	12

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa] _d	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
SSR1	IPI00301021	Translocon-associated protein subunit alpha	32,24	4	17,8	1,83	8,27E-03	3
C21orf33	IPI00916546	ES1 protein homolog, mitochondrial	22,17	8	60	1,84	4,06E-03	14
SDF2L1	IPI00106642	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1	67,02	2	5,3	1,85	7,30E-03	5
GNG2	IPI00470619	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2	7,85	2	42,3	1,88	2,13E-02	5
GABARAP L2	IPI00026358	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	13,67	4	43,6	1,91	5,20E-03	7
	IPI00644969	Putative thiosulfate sulfurtransferase KAT	14,95	1	10,2	1,91	3,63E-02	4
SERPINB9	IPI00032139	Serpin B9	42,40	8	30,9	1,91	6,49E-04	22
UGDH	IPI00031420	UDP-glucose 6-dehydrogenase	55,02	3	8,7	1,95	1,63E-02	3
NAGK	IPI00296526	N-acetyl-D-glucosamine kinase	42,04	5	21,5	1,95	1,88E-03	10
QPRT	IPI00872692	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	33,69	4	26,5	1,95	1,87E-03	8
PYCR2	IPI00470610	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	33,64	7	30,3	1,96	1,77E-03	4
HSP90B1	IPI00027230	Endoplasmic	92,47	32	41,5	1,96	4,06E-04	108
CCL3	IPI00019426	C-C motif chemokine 3	10,09	3	43,5	1,96	3,10E-02	6
STARD9	IPI00514002	StAR-related lipid transfer protein 9	506,74	1	0,4	1,97	3,69E-03	3
SERPINB1	IPI00027444	Leukocyte elastase inhibitor	42,74	7	18,7	2,02	1,10E-03	10
NUDT2	IPI00221231	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase [asymmetrical]	16,83	4	42,9	2,03	1,17E-02	5
IFITM3	IPI00303726	Interferon-induced transmembrane protein 3	14,63	2	12,8	2,05	9,17E-04	10
ITGA4	IPI00009803	Integrin alpha-4	115,33	5	8,5	2,07	9,89E-03	7
PRKRA	IPI00021167	Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A	34,40	6	31,6	2,08	7,05E-04	10
PYCR1	IPI00550882	Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial	35,98	5	16,8	2,09	6,85E-04	4
ACYP1	IPI00221117	Acylphosphatase-1	11,26	3	32,3	2,11	2,10E-02	3
CASP1	IPI00021800	Caspase-1	45,16	13	39,9	2,13	5,05E-04	7
USO1	IPI00031583	General vesicular transport factor p115	109,19	12	20,3	2,18	3,55E-04	18
FDPS	IPI00914566	Farnesyl pyrophosphate synthetase	48,28	6	21,5	2,18	5,31E-05	5
CD9	IPI00215997	CD9 antigen	25,42	3	20,6	2,22	8,65E-04	4
LSS	IPI00009747	Lanosterol synthase	83,31	5	9,7	2,26	6,80E-04	10

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	Anzahl von Unique-Peptiden _c	Unique + Razor-Peptid Sequenz-abdeckung [%] _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _e	Anzahl Messpunkte _f
MAP3K4	IPI00386260	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	181,66	9	7,7	2,28	4,19E-03	8
IGJ	IPI00178926	Immunoglobulin J chain	18,10	2	15,7	2,32	3,52E-03	3
CXorf38	IPI00152089	Uncharacterized protein CXorf38	36,67	3	9,7	2,38	2,67E-03	3
SRGN	IPI00019372	Serglycin	17,62	3	22,8	2,42	2,25E-03	9
FERMT3	IPI00397834	Fermitin family homolog 3	75,95	15	37,5	2,55	2,31E-05	23
GRHPR	IPI00550682	GRHPR protein	36,82	4	20,2	2,56	2,15E-05	5
ATL3	IPI00550523	Atlastin-3	60,54	9	29,9	3,00	8,69E-07	10
CLIC2	IPI00221328	Chloride intracellular channel protein 2	28,36	5	30	3,29	1,77E-06	3
AHNAK	IPI00021812	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	629,09	169	57,4	3,35	1,05E-09	318
ICAM1	IPI00008494	Intercellular adhesion molecule 1	57,83	5	12,4	3,82	2,59E-09	15
CRYZ	IPI00000792	Quinone oxidoreductase	35,21	6	32,8	3,87	1,85E-09	8
DST	IPI00642259	Dystonin	857,45	72	12,8	4,02	3,20E-08	67
ISG20	IPI00647246	Interferon-stimulated gene 20 kDa protein	20,36	4	30,4	4,69	3,59E-07	7
ISG15	IPI00375631	Interferon-induced 17 kDa protein	17,89	3	24,2	7,00	2,17E-10	4

Tabelle 6-7: Nur durch Überexpression von miR-16-1 hoch- oder herunterregulierte Proteine in Granta-519 Zellen (SILAC-Analyse). Proteine bei miR-15a Überexpression quantifiziert, aber Verhältnis <0,9 oder >1,1; _a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org); _b: IPI Protein *Identifier* (Id) (www.ebi.ac.uk); _c: "Signifikanz B"-Wert (zeigt an, wie signifikant unterschiedlich das Verhältnis zur Gesamtverteilung der Proteinverhältnisse ist; dieser Wert ist gruppiert nach Intensitäten); _d: Anzahl an Messpunkten (unterschiedliche Peptide, Modifikationen, Ladungen und repetitive Messungen)

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	miR-15a			miR-16-1		
				Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d
UBE2C	IPI00013002	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	19,65	1,09	4,02E-01	5	0,40	4,70E-03	3
TCL1A	IPI00178749	T-cell leukemia/lymphoma protein 1A	13,46	1,53	1,05E-01	5	0,41	2,46E-02	3
CISD1	IPI00020510	CDGSH iron sulfur domain-containing protein 1	12,20	1,67	6,92E-02	7	0,48	5,32E-03	4
SRP14P1	IPI00293434	Signal recognition particle 14 kDa protein	14,57	1,04	4,57E-01	9	0,49	7,12E-03	3
TOP2A	IPI00879004	DNA topoisomerase 2-alpha	182,68	1,00	4,43E-01	28	0,50	8,68E-05	79
HLA-DRB1	IPI00472169	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-15 beta chain	29,97	1,06	4,61E-01	8	0,50	3,07E-03	8
HLA-DQB1	IPI00885045	HLA class II histocompatibility antigen, DQ(3) beta chain	30,62	0,91	2,95E-01	9	0,51	1,39E-04	11
CENPF	IPI00855998	Centromere protein F	367,76	0,95	4,40E-01	11	0,52	3,18E-02	13
KIAA1618	IPI00642126	Protein ALO17	575,87	0,91	2,86E-01	145	0,55	8,78E-03	150
HK2P	IPI00102864	Hexokinase-2	102,38	0,99	4,23E-01	18	0,55	9,04E-03	23
FAM62A	IPI00746655	Extended-synaptotagmin-1	124,00	0,99	4,25E-01	19	0,56	1,00E-02	31
KPNA2	IPI00002214	Importin subunit alpha-2	57,86	1,23	2,47E-01	11	0,56	1,04E-02	9
RTN4	IPI00021766	Reticulon-4	129,93	1,19	2,83E-01	6	0,58	1,60E-02	4
VIM	IPI00418471	Vimentin	53,65	1,01	4,77E-01	54	0,59	1,97E-03	57
TK1	IPI00791117	Thymidine kinase, cytosolic	28,59	1,37	1,91E-01	7	0,59	3,63E-02	5
CARHSP1	IPI00304409	Calcium-regulated heat stable protein 1	15,89	1,19	2,84E-01	5	0,60	3,93E-02	3
LIG1	IPI00219841	DNA ligase 1	101,73	0,94	3,83E-01	4	0,60	4,03E-02	7
CBR1	IPI00295386	Carbonyl reductase [NADPH] 1	30,38	1,18	2,97E-01	10	0,61	4,58E-02	7

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	miR-15a			miR-16-1		
				Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d
VAPB	IPI00006211	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	27,23	0,92	3,68E-01	6	0,61	4,80E-02	8
CYCS	IPI00465315	Cytochrome c	11,75	0,97	4,56E-01	37	0,63	5,45E-03	38
ARL8A	IPI00060031	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	21,42	1,09	4,26E-01	15	0,64	3,49E-02	9
HLA-DQA1	IPI00736170	HLA class II histocompatibility antigen, DQ(W3) alpha chain	21,32	0,99	4,38E-01	14	0,64	3,57E-02	12
ACAA2	IPI00873829	Uncharacterized protein ACAA2	41,93	0,92	3,38E-01	19	0,66	1,13E-02	15
	IPI00289658	HLA class II histocompatibility antigen, DQ(5) alpha chain	28,00	1,08	3,79E-01	21	0,67	1,50E-02	16
CDC2	IPI00026689	Cell division control protein 2 homolog	34,78	0,97	4,02E-01	21	0,69	2,14E-02	19
NUP205	IPI00783781	Nuclear pore complex protein Nup205	227,92	0,96	4,25E-01	41	0,69	2,23E-02	89
	IPI00005171	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	28,61	1,13	3,15E-01	44	0,70	2,86E-02	27
GOT2	IPI00018206	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	47,48	1,05	4,16E-01	24	0,72	3,68E-02	16
FLNA	IPI00333541	Filamin-A	280,74	1,01	4,77E-01	130	0,73	4,31E-02	277
NAPA	IPI00009253	Alpha-soluble NSF attachment protein	33,23	1,04	4,25E-01	18	1,46	3,07E-02	22
MVK	IPI00010717	Mevalonate kinase	42,45	0,95	4,20E-01	5	1,62	2,65E-02	3
H1FX	IPI00021924	Histone H1x	22,49	0,69	8,94E-02	7	1,62	2,65E-02	3
HDHD1A	IPI00913889	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 1A	27,57	0,95	4,15E-01	13	1,63	2,52E-02	7
ACAT2	IPI00291419	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	44,64	0,87	2,16E-01	16	1,65	6,34E-03	17
CLIC4	IPI00001960	Chloride intracellular channel protein 4	28,77	1,04	4,59E-01	9	1,66	1,43E-02	15

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	miR-15a			miR-16-1		
				Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d
ABHD11	IPI00171692	Abhydrolase domain-containing protein 11	34,69	0,99	4,85E-01	3	1,69	4,61E-02	4
MARCKS	IPI00219301	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	31,55	1,07	4,56E-01	6	1,69	1,12E-02	7
ARHGEF1	IPI00395605	Rho guanine nucleotide exchange factor 1	104,06	1,00	4,68E-01	7	1,71	4,19E-02	11
GNG2	IPI00470619	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2	7,85	0,85	3,00E-01	4	1,88	2,13E-02	5
SERPINB1	IPI00027444	Leukocyte elastase inhibitor	42,74	0,84	1,86E-01	9	2,02	1,10E-03	10
IFITM3	IPI00303726	Interferon-induced transmembrane protein 3	14,63	0,98	4,57E-01	13	2,05	9,17E-04	10
ACYP1	IPI00221117	Acylphosphatase-1	11,26	1,10	3,90E-01	4	2,11	2,10E-02	3
FDPS	IPI00914566	Farnesyl pyrophosphate synthetase	48,28	0,93	3,24E-01	15	2,18	5,31E-05	5
GRHPR	IPI00550682	GRHPR protein	36,82	0,87	2,27E-01	10	2,56	2,15E-05	5

Tabelle 6-8: Nur durch Überexpression von miR-15a hoch- oder herunterregulierte Proteine in Granta-519 Zellen (SILAC-Analyse). Proteine bei Überexpression von miR-16-1 quantifiziert, aber Verhältnis <0,9 oder >1,1; _a: HGNC *gene symbols* (www.genenames.org); _b: IPI Protein *Identifier* (Id) (www.ebi.ac.uk); _c: "Signifikanz B"-Wert (zeigt an, wie signifikant unterschiedlich das Verhältnis zur Gesamtverteilung der Proteinverhältnisse ist; dieser Wert ist gruppiert nach Intensitäten); _d: Anzahl an Messpunkten (unterschiedliche Peptide, Modifikationen, Ladungen und repetitive Messungen)

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	miR-15a			miR-16-1		
				Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d
GNAS	IPI00095891	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms X1as	111,02	0,58	6,67E-03	11	0,93	3,84E-01	7
EXOSC2	IPI00015905	Exosome complex exonuclease RRP4	32,79	0,60	4,17E-02	5	0,91	4,10E-01	4
YARS	IPI00007074	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	59,14	0,61	1,78E-03	23	1,07	3,74E-01	22
TMPO	IPI00216230	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alphaalpha	75,49	0,62	2,70E-03	36	1,00	4,95E-01	37
WARS	IPI00295400	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	53,17	0,63	3,47E-03	73	1,16	2,30E-01	69
UBE2I	IPI00450472	Ubiquitin carrier protein	20,46	0,64	4,35E-03	30	0,91	3,15E-01	19
MTHFD2	IPI00011307	Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial	37,90	0,64	2,07E-02	19	1,05	4,29E-01	11
PDCD4	IPI00290110	Programmed cell death protein 4	51,72	0,66	2,81E-02	21	1,33	7,99E-02	10
	IPI00795769	Nuclear protein Hcc-1	51,78	0,68	3,31E-02	7	0,91	3,45E-01	12
ACTN4	IPI00013808	Alpha-actinin-4	104,85	0,69	4,01E-02	13	1,03	4,59E-01	36
PSME3	IPI00219445	Proteasome activator complex subunit 3	30,89	0,70	4,92E-02	23	0,91	3,09E-01	20
SLC3A2	IPI00554481	4F2 cell-surface antigen heavy chain	71,12	0,72	3,07E-02	14	0,91	3,01E-01	35
ATP2A2	IPI00219078	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	114,76	1,62	3,44E-02	32	1,10	3,18E-01	42
CYC1	IPI00029264	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	35,39	1,63	4,72E-02	6	0,86	3,22E-01	4
ACOT1	IPI00220906	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	53,24	1,64	4,67E-02	6	1,01	4,44E-01	4
TXNDC12	IPI00026328	Thioredoxin domain-containing protein 12	19,21	1,78	2,49E-02	12	1,06	3,80E-01	8

HGNC Symbol _a	Protein Id _b	Protein Name	Molekulargewicht [kDa]	miR-15a			miR-16-1		
				Verhältnis miR-15a/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d	Verhältnis miR-16-1/Granta519	"Signifikanz B" Wert _c	Anzahl Messpunkte _d
CISD2	IPI00166865	CDGSH iron sulfur domain-containing protein 2	15,28	1,82	3,67E-02	11	0,93	3,87E-01	6
ACAT1	IPI00030363	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	45,20	1,89	2,75E-02	12	1,06	4,01E-01	8
ASAH1	IPI00013698	Acid ceramidase	44,65	1,89	3,16E-02	15	1,09	3,30E-01	15
CLPTM1	IPI00107357	Cleft lip and palate transmembrane protein 1	77,96	1,91	2,85E-02	3	0,75	3,14E-01	8
MGST3	IPI00639812	Microsomal glutathione S-transferase 3 variant	18,42	1,96	2,41E-02	3	0,54	1,02E-01	4
FAM162A	IPI00023001	UPF0389 protein FAM162A	17,34	1,96	2,12E-02	12	0,93	3,80E-01	7
GBE1	IPI00296635	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	80,46	1,97	5,67E-03	26	0,97	4,49E-01	25
RER1	IPI00005728	Protein RER1	24,82	2,03	7,54E-03	8	1,07	3,56E-01	8
SEC61B	IPI00220835	Protein transport protein Sec61 subunit beta	9,97	2,05	7,07E-03	6	1,08	3,77E-01	5
PRKCSH	IPI00026154	Glucosidase 2 subunit beta	60,13	2,16	2,02E-03	14	1,08	3,44E-01	25
GLG1	IPI00414717	Golgi apparatus protein 1	137,22	2,34	4,87E-03	11	0,88	3,04E-01	19
MAN2B1	IPI00012989	Lysosomal alpha-mannosidase	113,74	2,56	2,75E-03	5	0,72	1,82E-01	6
IGLV4-69	IPI00478997	V5-6 protein	12,77	2,64	1,53E-04	5	1,10	3,15E-01	7
IGLV4-3	IPI00382938	V5-1 protein	25,98	2,85	4,80E-05	24	1,06	3,75E-01	26
METTL7A	IPI00022300	Methyltransferase-like protein 7A	28,32	3,21	2,73E-04	5	1,04	4,00E-01	7

Tabelle 6-9: *Functional Annotation Clustering* für durch Überexpression von miR-15a und miR-16a herunterregulierte Proteine in Granta-519 Zellen. *Enrichment Score*: EASE score Berechnung der Anreicherung, *Count*: Anzahl an Proteinen in diesem Cluster, *p-Value*: statistischer Testwert, *Benjamini*: Benjamini-Hochberg Bestimmung von Falschpositiven

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 4.58	Count	p-Value	Benjamini
	DNA replication	17	6,3E-9	3,3E-5
	DNA replication initiation	6	1,5E-5	1,3E-2
	DNA-dependent DNA replication	9	1,8E-5	1,3E-2
	DNA unwinding during replication	4	4,4E-4	1,4E-1
	DNA geometric change	4	6,5E-4	1,6E-1
	DNA duplex unwinding	4	6,5E-4	1,6E-1
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 3.36	Count	p-Value	Benjamini
	cell cycle	31	7,7E-9	2,0E-5
	cell cycle process	21	8,6E-5	4,4E-2
	mitotic cell cycle	13	1,1E-4	5,2E-2
	cell cycle phase	13	3,2E-4	1,2E-1
	mitosis	10	5,7E-4	1,5E-1
	M phase of mitotic cell cycle	10	6,1E-4	1,6E-1
	M phase	11	7,8E-4	1,6E-1
	interphase of mitotic cell cycle	6	2,6E-3	3,9E-1
	interphase	6	3,4E-3	4,4E-1
	regulation of progression through cell cycle	13	8,2E-3	6,4E-1
	regulation of cell cycle	13	8,6E-3	6,5E-1
	cell division	8	1,3E-2	7,5E-1
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 2.97	Count	p-Value	Benjamini
	organic acid metabolic process	19	2,6E-5	1,7E-2
	carboxylic acid metabolic process	18	8,5E-5	4,8E-2
	biosynthetic process	30	8,9E-4	1,8E-1
	cellular biosynthetic process	24	1,7E-3	3,0E-1
	translation	15	5,5E-3	5,2E-1
	macromolecule biosynthetic process	15	8,8E-2	9,9E-1
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 2.66	Count	p-Value	Benjamini
	organic acid metabolic process	19	2,6E-5	1,7E-2
	carboxylic acid metabolic process	18	8,5E-5	4,8E-2
	amino acid metabolic process	12	3,3E-4	1,2E-1
	amino acid and derivative metabolic process	12	1,8E-3	3,0E-1
	amino acid biosynthetic process	5	2,4E-3	3,8E-1
	tRNA aminoacylation for protein translation	5	4,2E-3	4,7E-1
	amino acid activation	5	4,2E-3	4,7E-1
	tRNA aminoacylation	5	4,2E-3	4,7E-1
	nitrogen compound metabolic process	13	5,2E-3	5,3E-1
	amine metabolic process	12	7,9E-3	6,4E-1
	tRNA metabolic process	6	8,8E-3	6,5E-1
	amine biosynthetic process	5	1,1E-2	7,0E-1
	nitrogen compound biosynthetic process	5	2,6E-2	8,9E-1
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 2.58	Count	p-Value	Benjamini
	DNA metabolic process	30	1,3E-8	2,3E-5
	metabolic process	117	2,2E-4	9,2E-2
	primary metabolic process	104	2,7E-3	3,8E-1
	cellular metabolic process	100	1,5E-2	7,8E-1
	cellular process	144	1,8E-2	8,1E-1
	macromolecule metabolic process	87	3,6E-2	9,2E-1
	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	51	8,0E-2	9,9E-1

	biopolymer metabolic process	58	4,1E-1	1,0E0
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 2.57	Count	p-Value	Benjamini
	cytoskeleton organization and biogenesis	16	3,5E-4	1,2E-1
	actin cytoskeleton organization and biogenesis	8	6,2E-3	5,6E-1
	actin filament-based process	8	9,0E-3	6,5E-1
Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 2.37	Count	p-Value	Benjamini
	response to DNA damage stimulus	12	5,3E-4	1,5E-1
	response to endogenous stimulus	12	3,0E-3	4,1E-1
	response to stress	22	3,6E-3	4,4E-1
	DNA repair	7	5,8E-2	9,7E-1
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 1.56	Count	p-Value	Benjamini
	cellular component assembly	13	2,2E-2	8,6E-1
	macromolecular complex assembly	12	3,0E-2	9,1E-1
	protein complex assembly	8	3,3E-2	9,2E-1
Annotation Cluster 9	Enrichment Score: 1.42	Count	p-Value	Benjamini
	protein metabolic process	51	1,7E-2	8,1E-1
	macromolecule metabolic process	87	3,6E-2	9,2E-1
	cellular macromolecule metabolic process	47	4,4E-2	9,4E-1
	cellular protein metabolic process	45	7,4E-2	9,8E-1
Annotation Cluster 10	Enrichment Score: 1.39	Count	p-Value	Benjamini
	death	17	1,2E-2	7,3E-1
	cell death	17	1,2E-2	7,3E-1
	apoptosis	16	1,5E-2	7,8E-1
	programmed cell death	16	1,6E-2	8,0E-1
	cell development	21	3,1E-2	9,1E-1
	regulation of apoptosis	11	5,1E-2	9,6E-1
	regulation of programmed cell death	11	5,5E-2	9,7E-1
	cellular developmental process	25	1,3E-1	1,0E0
	cell differentiation	25	1,3E-1	1,0E0
	developmental process	39	2,2E-1	1,0E0

Abbildung 6-3: Beteiligung der Proteine in den verschiedenen Gruppen des *Functional Annotation Clusters Response to DNA damage stimulus*. blaue Felder: Proteine in dem entsprechendem biologischen Prozess beteiligt

	Response to stress	Response to DNA damage stimulus	Response to endogenous stimulus	DNA repair
PARP1				
TOP2A				
SMC6				
PCNA				
FANCI				
LIG1				
FANCD2				
RIF1				
MAPK1				
CDC2				
MCM7				
NAE1				
ACTN4				
AKR1B1				
F13A1				
PTPN6				
LTA4H				
PDLIM1				
OXSRI				
VAPB				
HIGD1A				
PRDX6				

Tabelle 6-10: *Functional Annotation Clustering* für miR-15a und miR-16a hochregulierte Proteine in Granta-519 Zellen. *Enrichment Score*: EASE score Berechnung der Anreicherung, *Count*: Anzahl an Proteinen in diesem Cluster, *p-Value*: statistischer Testwert, *Benjamini*: Benjamini-Hochberg Bestimmung von Falschpositiven

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 4.11	Count	p-Value	Benjamini
	Golgi vesicle transport	11	3,1E-7	1,6E-3
	establishment of cellular localization	26	8,7E-6	2,3E-2
	intracellular transport	23	9,0E-6	1,6E-2
	vesicle-mediated transport	19	1,0E-5	1,1E-2
	retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER	5	1,2E-5	1,1E-2
	cellular localization	26	1,4E-5	9,2E-3
	secretion by cell	14	1,5E-5	8,4E-3
	secretory pathway	12	5,8E-5	2,5E-2
	secretion	15	6,1E-5	2,4E-2
	intra-Golgi vesicle-mediated transport	5	6,8E-5	2,5E-2
	establishment of localization	51	1,1E-4	3,9E-2
	protein localization	22	1,2E-4	4,0E-2
	establishment of protein localization	21	1,6E-4	4,8E-2
	localization	55	2,0E-4	5,6E-2
	macromolecule localization	22	2,9E-4	6,9E-2
	transport	48	3,9E-4	7,8E-2
	protein transport	19	5,5E-4	9,4E-2
	ER to Golgi vesicle-mediated transport	6	6,3E-4	1,0E-1
	intracellular protein transport	13	1,5E-3	1,9E-1
	cellular component organization and biogenesis	42	1,4E-2	6,9E-1
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 2.84	Count	p-Value	Benjamini
	carboxylic acid metabolic process	20	1,4E-5	1,0E-2
	organic acid metabolic process	20	1,5E-5	7,7E-3
	nitrogen compound metabolic process	16	3,2E-4	6,8E-2
	amine metabolic process	15	4,7E-4	8,7E-2
	amino acid and derivative metabolic process	11	7,8E-3	5,4E-1
	glutamine family amino acid metabolic process	4	1,3E-2	6,7E-1
	amino acid metabolic process	9	1,8E-2	7,5E-1
	cellular biosynthetic process	15	3,7E-1	1,0E0
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 2.27	Count	p-Value	Benjamini
	cellular carbohydrate metabolic process	15	2,7E-5	1,3E-2
	alcohol metabolic process	13	2,0E-4	5,4E-2
	carbohydrate metabolic process	17	2,7E-4	6,8E-2
	glucose metabolic process	8	2,9E-4	6,5E-2
	hexose metabolic process	9	4,3E-4	8,3E-2
	monosaccharide metabolic process	9	5,2E-4	9,3E-2
	cellular carbohydrate catabolic process	6	6,8E-3	5,1E-1
	glucose catabolic process	5	7,7E-3	5,4E-1
	carbohydrate catabolic process	6	8,8E-3	5,6E-1
	hexose catabolic process	5	1,2E-2	6,7E-1
	monosaccharide catabolic process	5	1,3E-2	6,7E-1
	alcohol catabolic process	5	1,4E-2	6,9E-1
	cellular catabolic process	13	2,8E-2	8,7E-1
	glycolysis	4	2,9E-2	8,7E-1
	cellular macromolecule catabolic process	9	3,8E-2	9,1E-1

	catabolic process	14	6,1E-2	9,7E-1
	macromolecule catabolic process	9	1,1E-1	1,0E0
	biopolymer catabolic process	4	7,2E-1	1,0E0
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 2.12	Count	p-Value	Benjamini
	glycoprotein metabolic process	8	2,0E-3	2,3E-1
	protein amino acid glycosylation	7	2,9E-3	3,0E-1
	biopolymer glycosylation	7	3,1E-3	3,2E-1
	glycoprotein biosynthetic process	7	3,7E-3	3,5E-1
	protein amino acid N-linked glycosylation via asparagine	3	8,4E-3	5,5E-1
	peptidyl-asparagine modification	3	8,4E-3	5,5E-1
	peptidyl-amino acid modification	6	1,1E-2	6,3E-1
	protein amino acid N-linked glycosylation	4	1,3E-2	6,8E-1
	macromolecule biosynthetic process	15	1,2E-1	1,0E0
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 1.79	Count	p-Value	Benjamini
	Fatty acid metabolism	6	1,3E-3	2,3E-1
	Valine, leucine and isoleucine degradation	5	8,4E-3	4,3E-1
	monocarboxylic acid metabolic process	8	1,7E-2	7,3E-1
	fatty acid beta-oxidation	3	2,1E-2	7,9E-1
	Lipid metabolism	5	4,2E-2	9,7E-1
	fatty acid metabolic process	6	4,2E-2	9,2E-1
	fatty acid oxidation	3	4,4E-2	9,3E-1
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 1.78	Count	p-Value	Benjamini
	Fatty acid metabolism	6	1,3E-3	2,3E-1
	Valine, leucine and isoleucine degradation	5	8,4E-3	4,3E-1
	Lysine degradation	5	1,2E-2	4,6E-1
	Tryptophan metabolism	5	2,4E-2	5,6E-1
	Butanoate metabolism	4	5,0E-2	6,8E-1
	Propanoate metabolism	3	1,3E-1	9,2E-1
Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 1.68	Count	p-Value	Benjamini
	regulation of apoptosis	16	7,4E-4	1,2E-1
	apoptosis	20	8,2E-4	1,2E-1
	regulation of programmed cell death	16	8,3E-4	1,2E-1
	programmed cell death	20	9,2E-4	1,3E-1
	death	20	1,7E-3	2,0E-1
	cell death	20	1,7E-3	2,0E-1
	negative regulation of apoptosis	9	3,6E-3	3,4E-1
	negative regulation of programmed cell death	9	3,9E-3	3,4E-1
	anti-apoptosis	7	1,0E-2	6,0E-1
	cell development	23	1,5E-2	7,0E-1
	cell differentiation	26	1,3E-1	1,0E0
	cellular developmental process	26	1,3E-1	1,0E0
	negative regulation of biological process	18	1,4E-1	1,0E0
	negative regulation of cellular process	16	2,4E-1	1,0E0
	developmental process	39	3,3E-1	1,0E0
	biological regulation	46	9,8E-1	1,0E0
	regulation of biological process	38	1,0E0	1,0E0
	regulation of cellular process	32	1,0E0	1,0E0
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 1.68	Count	p-Value	Benjamini
	coenzyme metabolic process	10	2,9E-4	6,8E-2
	cofactor metabolic process	10	1,1E-3	1,5E-1
	nucleotide metabolic process	7	4,5E-2	9,3E-1

	nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic process	7	5,5E-2	9,6E-1
	nucleotide biosynthetic process	5	1,0E-1	9,9E-1
	coenzyme biosynthetic process	4	1,3E-1	1,0E0
	cofactor biosynthetic process	4	1,8E-1	1,0E0
Annotation Cluster 9	Enrichment Score: 1.44	Count	p-Value	Benjamini
	carbohydrate biosynthetic process	6	8,8E-3	5,6E-1
	cellular polysaccharide metabolic process	4	3,5E-2	9,0E-1
	polysaccharide metabolic process	4	3,7E-2	9,1E-1
	cellular polysaccharide biosynthetic process	3	3,9E-2	9,1E-1
	polysaccharide biosynthetic process	3	3,9E-2	9,1E-1
	biopolymer biosynthetic process	3	1,3E-1	1,0E0
Annotation Cluster 10	Enrichment Score: 1.32	Count	p-Value	Benjamini
	response to hydrogen peroxide	3	1,9E-2	7,7E-1
	response to reactive oxygen species	3	3,4E-2	9,0E-1
	response to oxidative stress	4	8,6E-2	9,9E-1
	oxygen and reactive oxygen species metabolic process	3	8,8E-2	9,9E-1

7 VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen (*international, peer-reviewed*)

Christopher Lößner, Uwe Warnken, Armin Pscherer, Martina Schnölzer; Mass spectrometric quantification by SILAC: Some practical aspects; eingereicht bei *Analytical and Bioanalytical Chemistry*

Zeitschriftenbeiträge

Lößner, Ch., Gloria-Maercker, E. (2007); Quantitative Proteomics zur Identifizierung von miRNA-Zielproteinen. *BIOspektrum* 5: 499-503

Poster-Präsentationen

Keystone symposia: microRNA and cancer, 2009 in Keystone, USA; Lößner C., Meier J., Warnken U., Lichter P., Pscherer A., Schnölzer M.; MicroRNA target protein identification in mantle cell lymphoma using quantitative proteomics

57th ASMS Conference 2009 in Philadelphia, USA; Lößner C., Meier J., Warnken U., Lichter P., Pscherer A., Schnölzer M.; Quantitative proteomics to identify microRNA target proteins in human neoplasias

Proteomic Forum 2009 in Berlin; Lößner C., Meier J., Warnken U., Lichter P., Pscherer A., Schnölzer M.; Integrative quantitative proteomics to identify microRNA target proteins

1st European Summer School on Proteomic Basics 2007, Brixen, Italy; Lößner Ch., Pscherer A., Schnölzer M.; Identification of miRNA target proteins in MCL cell lines using quantitative proteomics

Vorträge

1st Heidelberg Forum for Young Life Scientists 2009, Heidelberg; Christopher Lößner: Cancer-relevant microRNA target proteins identified by quantitative proteomics

2. internes Symposium des Programms „Proteinbiochemie/Proteomics“ der Landesstiftung Baden-Württemberg am 8.12.2008 in Stuttgart

Doktorandenkolloquium der Programme „Proteinbiochemie/Proteomics“ und „RNS/RNAi“ der Landesstiftung Baden-Württemberg am 8.5.2008 in Heidelberg

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Astrid Marx, die mich nicht nur moralisch unterstützte, sondern auch zum Gelingen dieser Arbeit mit Rat und Tat beigetragen hat. Meine Dankbarkeit gilt ebenso meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung während der Schulzeit, des Studiums und natürlich auch während der Doktorarbeit diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Mein Dankgefühl gilt zudem der ganzen Arbeitsgruppe Funktionelle Proteomanalyse. Besonders bei Dr. Martina Schnölzer bedanke ich mich für die Betreuung, Unterstützung und Ermöglichung dieser Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern Dr. Tore Kempf im Speziellen für die Einführung in die zweidimensionale Gelelektrophorese Technik, Dr. Uwe Warnken für die Hilfe bei den massenspektrometrischen Untersuchungen, Dr. Agnes Hotz-Wagenblatt für die bioinformatischen Hilfestellungen und Dr. Eva Gloria-Maercker. Bei meinen Doktoranden-Kolleginnen Elham Schokraie und Mahnaz Moradian sowie der ehemaligen Diplomandin Müzeyyen Sevim bedanke ich mich für die stets vorhandenen Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre im Büro. Bei den Laboranten, technischen Angestellten und Auszubildenden Sabine Fiedler, Kerstin Kammerer, Ramona Mayer, Sebastian Heß, Jasmin Lobeck und Stefan Rahn bedanke ich mich für die Unterstützung bei den praktischen Arbeiten. Bei den Gästen der Gruppe, Dr. Lisa Dietz, Dr. Maren Claus sowie Stefanie Margraf-Schönfeld um nur einige zu nennen, bedanke ich mich für das Verständnis, dass ich ihnen nicht immer helfen konnte und ihr Dank umso größer war, wenn ich sie unterstützte. Bei der Gruppe von Dr. Armin Pscherer innerhalb der Abteilung von Prof. Dr. Peter Lichter bedanke ich mich für die Kooperation innerhalb des Projektes bei dem diese Arbeit entstand. Bei Dr. Armin Pscherer, seinem Doktoranden Jan Meier und seinem Mitarbeiter sowie Nachfolger für das Projekt PD Dr. Michael Rogers bedanke ich mich für die jederzeitige Diskussionsbereitschaft und in Zusammenarbeit mit den technischen Angestellten Dagmar Magalej, Sandra Müller und Verena Gschwend für die praktischen Arbeiten, die innerhalb dieser Arbeit und für das Projekt durchgeführt wurden. Bei Dr. Thomas Ruppert und Armin Bosserhoff des Zentrums für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg bedanke ich mich für die kollegiale Zusammenarbeit und Unterstützung.

Vielen Dank an den Erstgutachter Prof. Dr. Stefan Frings und den Zweitgutachter Prof. Dr. Peter Lichter für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Ferner gilt mein Dank der Landesstiftung Baden-Württemberg und deren Mitarbeitern Dr. Martin Grauer und Dr. Anja Wiesenthal, nicht nur für die Finanzierung des Projektes innerhalb des Programmes „Proteinbiochemie/Proteomics“, sondern auch für die unbürokratische Herangehensweise.

Beim Deutschen Krebsforschungszentrum und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellte Infrastruktur, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.