

Aus dem Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der
Universität Greifswald, Abteilung Humangenetik.
Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Greifswald
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Ute Felbor

Thema:

**Wirkung der mikroRNAs miR-30a-5p und let-7f-2-3p auf die
Angiogenese *in vitro* durch Regulation von *CCM3***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades eines

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2019

vorgelegt von:

Annika Milena Eikenbusch:

geb. am 7. Juli 1994

in Soest

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Ute Felbor

2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Eva Klopocki

Ort, Raum: Greifswald, Zoom Meeting

Tag der Disputation: 19.04.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Zerebrale kavernöse Malformationen.....	1
1.2. Interaktionspartner und Signalwege des CCM3 Proteins.....	2
1.3. <i>In vitro</i> Angiogenese-Modellsysteme.....	5
1.4. Biogenese der miRNAs und ihre Rolle in der Angiogenese.....	6
1.5. <i>In silico</i> Identifizierung von miRNA-Bindungsstellen.....	8
1.6. Die miR-103 Familie.....	10
1.7. Die miR-30 Familie.....	12
1.8. Die let-7 Familie.....	13
1.9. Ziele der Arbeit.....	14
2. Material.....	15
2.1. Zelllinien.....	15
2.2. Chemikalien.....	15
2.3. Lösungen und Puffer.....	18
2.4. Kits.....	19
2.5. Plasmide.....	19
2.6. Oligonukleotide.....	20
2.6.1. Primer.....	20
2.7. Antikörper.....	21
2.8. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.9. Softwareprogramme.....	24
2.10. Online-Datenbanken und – Programme.....	25
3. Methoden.....	26
3.1. Zellbiologische Methoden.....	26
3.1.1. Kultivierung von HEK293T-Zellen und HUVECs.....	26
3.1.2. Transfektion von miRNA-Analoga und miRNA Inhibitoren in HUVECs.....	27
3.1.3. Sphäroid-basierter Sprossungs-Assay.....	27
3.1.4. Migrations-Assay.....	28
3.2. Luciferase-Reportergen-Assay.....	29
3.2.1. Transiente Co-Transfektion von miRNA-Analoga und Plasmiden.....	29
3.2.2. Messung der relativen Luciferaseaktivität.....	30
3.3. Molekularbiologische Methoden.....	30
3.3.1. RNA-Isolation.....	30
3.3.2. Quantitative Echtzeit-PCR zur Untersuchung der Transfektionseffizienz.....	31
3.3.3. cDNA-Synthese.....	32
3.3.4. Reverse Transkriptase-PCR zur Transkriptanalyse von <i>CCM3</i>	32
3.3.5. Digitale PCR zum Nachweis der Herunterregulation von <i>CCM3</i>	33
3.4. Proteinbiochemische Methoden.....	34
3.4.1. Proteinisolation.....	34
3.4.2. SDS-PAGE.....	35
3.4.3. Western Blot.....	35
3.5. Statistische Auswertung.....	36
4. Ergebnisse.....	37
4.1. <i>In silico</i> Identifizierung und Charakterisierung von putativ an <i>CCM3</i> bindenden miRNAs.....	37

4.2. Validierung der Bindungsstellen von miR-30a-5p und let-7f-2-3p in der 3'-UTR von <i>CCM3</i>	39
4.3. Analyse der in HUVECs exprimierten Transkript-Varianten von <i>CCM3</i>	41
4.4. Effizienz der Transfektion der miRNA-Analoga in HUVECs.....	42
4.5. Sprossverhalten von HUVECs nach miRNA-Analoga Behandlung.....	43
4.6. Einfluss der miRNA-Analoga auf die Migration von HUVECs.....	46
4.7. <i>CCM3</i> -Expression nach Transfektion der miRNA-Analoga.....	48
4.8. Effekt der miRNA-Analoga Transfektion auf die <i>CCM3</i> Proteinexpression.....	49
4.9. Auswirkungen der Inhibition von miR-30a-5p in HUVECs.....	50
5. Diskussion.....	54
5.1. Stellenwert der miRNAs im Kontext einer pathologischen Angiogenese.....	54
5.2. Limitationen der bioinformatischen Vorhersagen von miRNA-Bindungsstellen.....	55
5.3. Ansätze zur experimentellen Validierung von miRNA-Bindungsstellen.....	57
5.4. Herausforderungen der Transkript-Analyse von <i>CCM3</i>	58
5.5. miRNAs als mögliche Brücke zwischen Zellstress und Kavernomentstehung.....	60
5.6. miRNAs als Teil eines regulatorischen Netzwerkes.....	64
6. Zusammenfassung.....	67
7. Literaturverzeichnis.....	68
8. Anhang.....	81
8.1. Vektorkarten der pLightSwitch Plasmide.....	81
8.2. Optimierung der Transfektion in HEK293T-Zellen und HUVECs.....	82
8.3. Sphäroid-basierter Sprossungs-Assay.....	84
9. Abbildungsverzeichnis.....	87
10. Tabellenverzeichnis.....	88
11. Danksagung.....	89

Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3' untranslatierte Region
A	Adenin
A. bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
Ago	Argonaut Proteinfamilie
Ago2	Argonauten Protein 2
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
CCM	Zerebrale kavernöse Malformation
<i>CCM3</i>	<i>Cerebral cavernous malformations 3</i>
CCND1	Cyclin D1
cDNA	komplementäre DNA
DGCR8	<i>DiGeorge critical region 8 protein</i>
DLL4	<i>Delta like canonical notch ligand 4</i>
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dPCR	Digitale Polymerase-Kettenreaktion
ECBM	<i>Endothelial cell basal medium</i>
ECGM	<i>Endothelial cell growth medium</i>
EDTA	Ethyldiamtetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin Protein Familie
FAT-H	<i>Focal adhesion targeting</i> homologe Domäne
FBS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal bovine serum</i>)
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCK III	<i>Germinal centre kinase III</i>

GTP	Guanosintriphosphat
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen (<i>Human embryonic kidney cells</i>)
HeLa-Zellen	Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HIF α	Hypoxie-induzierter-Faktor α
HP1 γ	<i>Heterochromatin protein 1 homolog γ</i>
HUVEC	Humane Nabelschnurvenenendothelzellen (<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>)
kDa	Kilodalton
KLF4	<i>Krüppel like factor 4</i>
KRIT1	<i>Krev interaction trapped protein 1</i>
Let-7	<i>Lethal-7</i>
MARK4	<i>Microtubule affinity regulating kinase 4</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miRNA/miR/mikroRNA	microRNA
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>Messenger RNA</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
ORF	Offener Leserahmen (<i>Open reading frame</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCDH- γ	Protocadherin- γ
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCD10	<i>Programmed cell death 10</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3C2B	<i>Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta</i>
PIP2/3	Phosphatidylinositol Di- und Triphosphate
Poly(A)	Polyadenin
PP2A	Proteinphosphatase 2A

pre-miRNA	Vorläufer-miRNA (<i>Precursor miRNA</i>)
pri-miRNA	Primäre miRNA (<i>Primary miRNA</i>)
PTPN2 bzw. 13	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2</i> bzw. 13
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
Rho-A	<i>Ras homolog family member A</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNASeq	RNA-Sequenzierung
RNU6-2	<i>RNA, U6 small nuclear</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEPT7	Septin 7
Snai1	<i>Snail family transcriptional repressor 1</i>
STK24-26	Serin/Threoninkinase 24-26
STRIPAK	<i>Striatin-interacting phosphatase and kinase</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFDP2	<i>Transcription factor Dp-2</i>
TGS	Tris-Glycin-SDS
TRBP	<i>HIV-1 TAR RNA binding protein</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
UNC13B- bzw. D	Unc-13 B bzw. D Homolog (<i>C. elegans</i>)
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFR2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>

1. Einleitung

1.1. Zerebrale kavernöse Malformationen

Zerebrale kavernöse Malformationen (Kavernome, CCMs; *Cerebral cavernous malformations*, OMIM 116860, 603284, 603285) sind vaskuläre Fehlbildungen des zentralen Nervensystems, die zu rezidivierenden Kopfschmerzen, epileptischen Anfällen, neurologischen Defiziten und hämorrhagischen Schlaganfällen führen können (Batra et al. 2009; Labauge et al. 1998; Spiegler et al. 2018).

Kavernome sind maulbeerartig erweiterte endotheliale Kanäle, die in ihrer Größe zwischen wenigen Millimetern bis zu mehreren Zentimetern im Durchmesser betragen können (Baumann et al. 2007). Die dilatierten Gefäßabschnitte sind durch Fehlen von intervenierendem Hirnparenchym und einer Dysfunktion der Blut-Hirnschranke gekennzeichnet. Durch den langsamen Blutfluss in den Läsionen kann es zu einer Thrombusbildung oder Kalzifikation kommen (Clatterbuck et al. 2001; Fischer et al. 2013). Ultrastrukturelle Veränderungen in den CCMs betreffen Zell-Zell-Kontakte wie die Schlussleisten (*Tight junctions*), die zu einer erhöhten Endothelpermeabilität führen. Zusätzlich sind Hämosiderinablagerungen im umgebenden Hirngewebe zu finden, die auf chronische Blutungen hindeuten (Wong et al. 2000).

Symptomatisch erbliche Kavernome treten mit einer Prävalenz von 1:5400-1:6200 auf (Spiegler et al. 2018). Während der Erkrankungsgipfel hier zwischen der dritten und vierten Lebensdekade liegt (Robinson et al. 1993; Felbor et al. 2006), tritt etwa ein Viertel der Fälle im Kindesalter auf (Herter et al. 1988; Spiegler et al. 2014). Dabei wurden bereits schwere Krankheitsverläufe im Kindesalter beschrieben (Fauth et al. 2015).

Die Kavernomatose kann sporadisch oder hereditär mit autosomal-dominantem Vererbungsmuster auftreten, wobei eine variable Expressivität und unvollständige Penetranz der Erkrankung beobachtet werden. Charakteristisch für sporadische Fälle ist das Auftreten einer solitären Läsion. Bei der familiären Form hingegen liegen oft multiple Läsionen vor und die Erkrankung manifestiert sich häufig bereits in jüngerem Lebensalter (Labauge et al. 1998; Zabramski et al. 1994). Bisher sind Veränderungen in drei Genen mit der Kavernomatose assoziiert: *CCM1* (*KRIT1*,

Chromosom 7q21.2, (Laberge-le Couteulx et al. 1999)), *CCM2* (Chromosom 7p13, (Liquori et al. 2003; Denier et al. 2004)), und *CCM3* (*PDCD10*, Chromosom 3q26.1, (Bergametti et al. 2005)). Die nachgewiesenen pathogenen Varianten in den *CCM*-Genen umfassen hauptsächlich Stopp-Mutationen, kleine Insertionen oder Deletionen, die zum Einbau eines vorzeitigen Stoppkodons führen. Daneben sind wenige Aminosäureaustausche in funktionell bedeutenden Bereichen möglich. Auch komplette oder zumindest Exon-übergreifende Deletionen der Gene sind ebenfalls bereits beschrieben worden (Fisher et al. 2015; Denier et al. 2004; Bergametti et al. 2005; Gaetzner et al. 2007).

In der Standarddiagnostik werden etwa 60 % der detektierten Mutationen in *CCM1*, 18 % in *CCM2* und 22 % in *CCM3* nachgewiesen (Spiegler et al. 2014). Es wird von einer lokusspezifischen Penetranz von 63 %, 55 % und 68 % ausgegangen (Denier et al. 2006).

Pathogene Varianten im *CCM3*-Gen zeichnen sich durch einen schwerwiegenderen Phänotyp als *CCM1*- oder *CCM2*-Mutationen aus, mit jüngerem Erkrankungsalter, früherem Einsetzen von hämorrhagischen Schlaganfällen, vermehrtem Auftreten von Läsionen und einem insgesamt höheren Blutungsrisiko (Denier et al. 2006; Shenkar et al. 2015). Darüber hinaus wird diskutiert, dass *CCM3* besonders anfällig für *de novo* Mutationen ist (Rath et al. 2016).

Die Magnetresonanztomographie (MRT) mit suszeptibilitäts-gewichteten und Gradientenechosequenzen gilt als Goldstandard für die Diagnose der CCM (Frischer et al. 2012; Dammann et al. 2016). Bisher gibt es noch keinen kausalen Therapieansatz zur Behandlung der Kavernomatose. Eine chirurgische Resektion kann, je nach Lage und Symptomatik der Läsion, als Therapiemöglichkeit in Betracht gezogen werden. Bei der familiären Form der Kavernomatose, bei der mit einer Progredienz und zunehmender Anzahl der CCM-Läsionen gerechnet werden kann, wird die Indikation zur Operation zurückhaltender gestellt (Batra et al. 2009).

1.2. Interaktionspartner und Signalwege des CCM3 Proteins

CCM3 kodiert für das 25 kDa große Protein CCM3/PDCD10 (Labauge et al. 2007), das aus 212 Aminosäuren besteht. Dieses wird ubiquitär exprimiert und beinhaltet N-terminal eine Dimerisierungsdomäne sowie eine Serin/Threoninkinase Bindungs- und

Phosphorylierungsdomäne. C-terminal findet sich zudem eine FAT-homologe Domäne (FAT-H; *Focal adhesion targeting*) (Li et al. 2011; Kean et al. 2011).

Die CCM-Proteine weisen keine strukturellen Ähnlichkeiten oder Sequenzhomologien auf (Fischer et al. 2013). Die Beteiligung an ähnlichen oder gemeinsamen Signalwegen wird jedoch angenommen (Stahl et al. 2008; Pagenstecher et al. 2009; Gore et al. 2008). Daneben werden für CCM3 jedoch auch zelluläre Funktionen unabhängig von den anderen CCM-Proteinen angenommen (Chan et al. 2011; Zhu et al. 2010).

Das CCM3-Protein ist eine Komponente des CCM1/CCM2/CCM3-Komplexes und interagiert hier mit CCM2, wobei die Funktion des Komplexes noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Voss et al. 2007; Hilder et al. 2007; Fisher et al. 2014). CCM3 kann in der Zelle mit verschiedenen Proteinen interagieren, darunter Proteine der GCKIII-Familie (*Germinal centre kinase III*) wie STK24, STK25 und STK26 (Serin/Threoninkinasen 24-26) (Fidalgo et al. 2010; Xu et al. 2013). Die Interaktionen mit Proteinen der GCKIII Familie sind die am besten untersuchten im Bezug auf CCM3 (Draheim et al. 2014). Diese Proteine sind beteiligt an der Regulation von Apoptose, Zellproliferation und -migration (Preisinger et al. 2004; Lu et al. 2006; Nogueira et al. 2008). CCM3 interagiert beispielsweise mit STK26 und reguliert so über den ERK Signalweg die Zellproliferation (Ma et al. 2007). Die Interaktion mit STK25 ist zudem von Bedeutung für intakte endotheliale Zell-Zell-Kontakte (Zheng et al. 2010). STK26 aktiviert Ezrin, STK24 und STK25 aktivieren Moesin. Beides sind Proteine aus der Ezrin-Radixin-Moesin Familie, die Rho-A inhibieren (Zheng et al. 2010; ten Klooster et al. 2009). Die GCK III Kinasen werden darüber hinaus für die Polarisierung des Golgi-Apparates benötigt und sind Teil des STRIPAK Komplexes (*Striatin-interacting phosphatase and kinase*), der mit den Proteinphosphatasen 2A interagiert. CCM3 bindet hier an die regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, die Striatin genannt wird (Goudreault et al. 2009; Fidalgo et al. 2010; Kean et al. 2011). Zusätzlich bindet CCM3 UNC13B- und D (Unc-13 Homolog B und D (C. Elegans)) und bildet mit STK24 zusammen einen Komplex in Endothelzellen, der die Liganden-stimulierte Exozytose beeinflusst und zur Integrität von endothelialen Zell-Zell-Kontakten beiträgt (Zhou et al. 2016; Zhang et al. 2013). Die Phosphatase PTPN13 (FAP-1, *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13*) dephosphoryliert CCM3, dies könnte zu einer negativen Regulation führen (Voss et al. 2007). Die Bindung von CCM3 mit dem Gerüstprotein Paxillin beeinflusst die

Adhäsion und Migration von Zellen (Jamieson et al. 2005; Hu et al. 2014). Durch die Stabilisierung von VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*) greift CCM3 in den VEGF Signalweg (*Vascular endothelial growth factor*) ein (He et al. 2010). Über die Bindung zu Protocadherin- γ scheint CCM3 außerdem die Apoptose von Neuronen zu beeinflussen (Lin et al. 2010). Es wird ebenfalls angenommen, dass CCM3 den PI3K-Akt Signalweg über seine Bindung zu Phosphatidylinositol Di- und Triphosphaten moduliert und somit in Prozesse der Angiogenese eingreift (Dibble et al. 2010; Jiang et al. 2000).

Ein weiterer Signalweg, den CCM3 moduliert, ist der DLL4-Notch Signalweg (*Delta like canonical notch ligand 4*). Dieser ist beteiligt an der vaskulären Morphogenese und inhibiert unter anderem das Sprossverhalten und die Proliferation von Endothelzellen (s. Abbildung 1) (Hellström et al. 2007; Leslie et al. 2007; You et al. 2013).

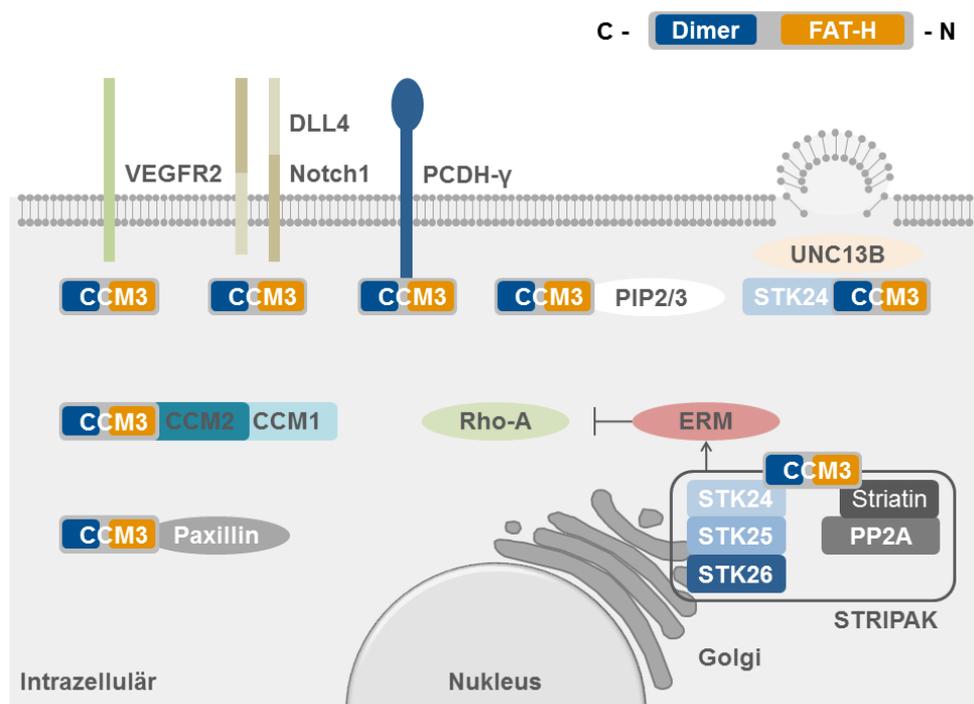


Abbildung 1. Interaktionen von CCM3 in der Zelle. VEGFR2, *Vascular endothelial growth factor 2*; DLL4, *Delta like canonical notch ligand 4*; PCDH- γ , Protocadherin- γ ; UNC13B, Unc-13 Homolog; PIP2/3, Phosphatidylinositol Di- und Triphosphate; Rho-A, *Ras homolog family member A*; ERM, Ezrin-Radixin-Moesin Protein Familie; STK24-25 Serin/Threoninkinasen 24-26; PP2a, Proteinphosphatase 2A; STRIPAK, *Striatin-interacting phosphatase and kinase*; Golgi, Golgi-Apparat.

1.3. *In vitro* Angiogenese-Modellsysteme

Der Prozess der Angiogenese beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße aus vorbestehenden Gefäßen (Risau 1997). Die CCM-Proteine sind an der Regulation der Angiogenese wesentlich beteiligt. Eine pathologische Angiogenese ist hier bereits mit der Entstehung der Kavernomatose in Verbindung gebracht worden (Fischer et al. 2013). Die Ausbildung neuer Blutgefäße gliedert sich in drei Abschnitte:

Zuerst beginnen die sogenannten endothelialen *Tip cells*, Endothelzellen an der Spitze neuer Gefäße, mit einer Invasion und Migration, stimuliert durch den proangiogenen Wachstumsfaktor VEGF-A (Tahergorabi et al. 2012). Dieser Prozess wird unter anderem reguliert vom DLL4-Notch Signalweg (Sainson et al. 2005).

In der zweiten Phase der Angiogenese kommt es zur Migration, Proliferation und Bildung kapillarähnlicher Strukturen (*Tube formation*) der Endothelzellen. Hier ist die Interaktion von VEGF-A mit seinem Rezeptor VEGFR-2 von besonderer Bedeutung (Gerhardt et al. 2003).

Zuletzt wird ein Reifungsprozess der neu entstandenen Gefäße eingeleitet, indem unter anderem die Proliferation gehemmt wird (Jain 2003).

Verschiedene *in vitro* Assays ermöglichen die Charakterisierung angiogenetischer Parameter. Die Beurteilung der endothelialen Differenzierung und des Sprossverhaltens ermöglicht ein Sphäroid-basierter Sprossungs-Assay. In einer zweidimensionalen Zellschicht sind endotheliale Zellen häufig niedrig differenziert und proliferieren (Fina et al. 1990). Die Kultivierung der endothelialen Zellen in dreidimensionalen Sphäroiden führt hier zu einem besser differenzierten Phänotyp. Die oberflächliche Zellschicht der Sphäroide proliferiert dabei nicht, während im Kern der Sphäroide hauptsächlich nicht-proliferierende oder apoptotische Zellen vorliegen (Korff et al. 1998). Die Sphäroide bilden Sprosse aus, an deren Spitze sich *Tip cells* befinden. Die Sprosse verfügen über ein Lumen und sind kapillarähnlich (Heiss et al. 2015). Zur Erfassung der Migration kann das sogenannte *Scratch-wound-Assay* herangezogen werden. Hier wird eine freie Fläche in eine adhärente Zellschicht geschabt und danach über die Zeit gemessen, wie weit die Zellen in die freie Fläche hinein migrieren (Wong et al. 1984). Der Verschluss dieser zellfreien Fläche ähnelt in Teilen der Migration von Zellen *in vivo* (Haudenschild et al. 1979; Liang et al. 2007). Eine zusätzliche Rolle beim Zuwachsen dieser Fläche spielt weiterhin die

Proliferation der Zellen (Coomber et al. 1990).

Zu *in vitro* Untersuchungen angiogenetischer Prozesse eignen sich humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs, *Human umbilical vein endothelial cells*). Anhand des *in vitro* Modellorganismus der HUVECs konnten bereits funktionelle Zusammenhänge und Signaltransduktionswege der Kavernomatose aufgeklärt werden (s. Abbildung 2). So konnte gezeigt werden, dass ein akuter Verlust von CCM3 zu einer Induktion von Stress-Fasern und einer erhöhten Endothelpermeabilität führt (Shenkar et al. 2015). Eine Überexpression von CCM3 in HUVECs führte zu einer Hemmung der Zellmigration, Proliferation und *Tube formation*, während eine Hemmung von CCM3 gegenteilige Effekte bewirkte (Schleider et al. 2011). Nach einem experimentellen akuten Knock-down von *CCM3* konnte ebenfalls eine vermehrte Sprossung von in Sphäroiden kultivierten HUVECs festgestellt werden (You et al. 2013).

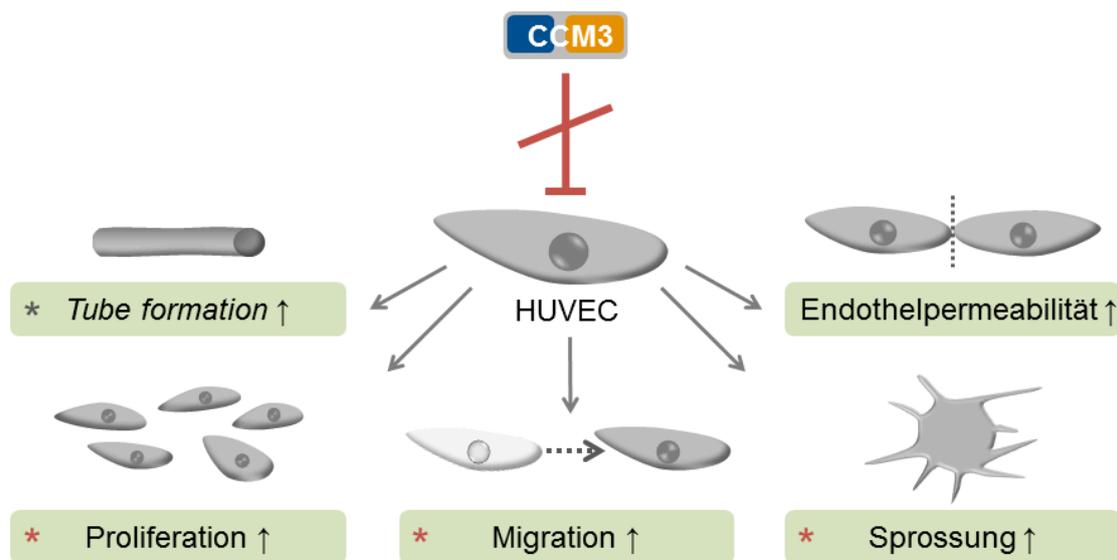


Abbildung 2. Eine akute Inaktivierung von CCM3 führt zu einer Steigerung der Angiogenese. Die rot markierten Aspekte der Angiogenese können durch das *Scratch-wound*-Assay und das Sphäroid-basierte Sprossungs-Assay untersucht werden. Auch die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen (*Tube formation*) kann zum Teil durch das Sprossungs-Assay erfasst werden (grau markiert).

1.4. Biogenese der miRNAs und ihre Rolle in der Angiogenese

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, etwa 20-23 Nukleotide lange, einzelsträngige RNA-Moleküle, die selber nicht für Proteine kodieren. Sie sind jedoch entscheidend an der

Modulation der Genexpression beteiligt. Eine miRNA kann dabei bis zu Hunderte von Zielgenen regulieren (Selbach et al. 2008; Friedman et al. 2009). Diese Regulation wird vor allem posttranskriptional durch einen Abbau der entsprechenden Boten-RNA (*Messenger RNA*, mRNA) oder durch eine Translationshemmung vermittelt. Man geht davon aus, dass etwa die Hälfte des humanen Transkriptoms einer miRNA-vermittelten Regulation unterliegt (Afonso-Grunz et al. 2015).

Die miRNAs werden im Zellkern durch die RNA-Polymerasen II und III zu sogenannten *primary* miRNAs (pri-miRNA, primäre miRNA) transkribiert. Diese verfügen über eine 5'-Kappe und sind 3'-polyadenyliert (Lee et al. 2004; Borchert et al. 2006). Die pri-miRNAs werden im Kern weiterverarbeitet durch das Enzym Drosha, einer RNase III, und das DGCR8-Protein (*DiGeorge critical region 8 protein*) zu *precursor* miRNAs (pre-miRNA, Vorläufer miRNA) (Lee et al. 2003). Diese sind 70 Nukleotide lang und werden durch Exportin-5 Ran-GTP (*Ras-related nuclear protein*, Guanosintriphosphat) abhängig aus dem Kern transportiert (Yi et al. 2003). Im Zytosol werden die pre-miRNAs durch die RNase III Dicer zu zwei jeweils 22 Nukleotide langen, einzelsträngigen miRNAs prozessiert (Bernstein et al. 2001). Der sogenannte Leitstrang wird in einen Ribonukleoproteinkomplex integriert, den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Der andere Strang (Passagierstrang, *passenger strand*) wird zumeist abgebaut (Hammond et al. 2000; Schwarz et al. 2003). Der RISC besteht aus Dicer, dem TRBP-Protein (*HIV-1 TAR RNA binding protein*) und Eiweißen der Argonaut-Familie (Ago), hauptsächlich Ago2 (Gregory et al. 2005). Dieser Ribonukleoproteinkomplex ist für die posttranskriptionale Herunterregulation von Genen verantwortlich (Liu et al. 2004; Pillai et al. 2004). Dabei kommt es bei einer hohen Bindungsspezifität der miRNA an die mRNA zu deren Degradation und Deadenylierung, bei niedriger Spezifität zur Translationshemmung (s. Abbildung 3) (Hutvágner et al. 2002; Eulalio et al. 2009).

Endothelspezifische miRNAs sind Gegenstand aktueller Forschung. MiRNAs regulieren unter anderem Zielgene, die für die Angiogenese und eine Aufrechterhaltung der normalen Endothelfunktion eine Rolle spielen. MiRNAs können durch Hemmung ihrer Zielgene sowohl proangiogen als auch antiangiogen wirken, wobei ihre Funktion zellspezifisch ist (Poliseno et al. 2006; Anand et al. 2010; Liu et al. 2012).

Die Feinregulation der Angiogenese durch miRNAs unterliegt dabei einer strengen Kontrolle. Extrazelluläre Faktoren wie VEGF können intrazelluläre miRNA-Spiegel

modulieren, Hypoxie kann zu einer Induktion von miRNAs führen (Würdinger et al. 2008; Fasanaro et al. 2008). Die miRNA-Biogenese kann durch Transkriptionsfaktoren oder durch Regulation von Dicer nach Zellstress beeinflusst werden (Fazi et al. 2005; O'Donnell et al. 2005; Wiesen et al. 2009). Darüber hinaus wird der Abbau und die zelluläre Lokalisation der miRNAs reguliert, und damit indirekt ihre Interaktion mit Zielgenen (Zhang et al. 2012; Marzi et al. 2016; Liu et al. 2005). Damit können miRNAs als vielschichtige Modulatoren der Angiogenese verstanden werden.

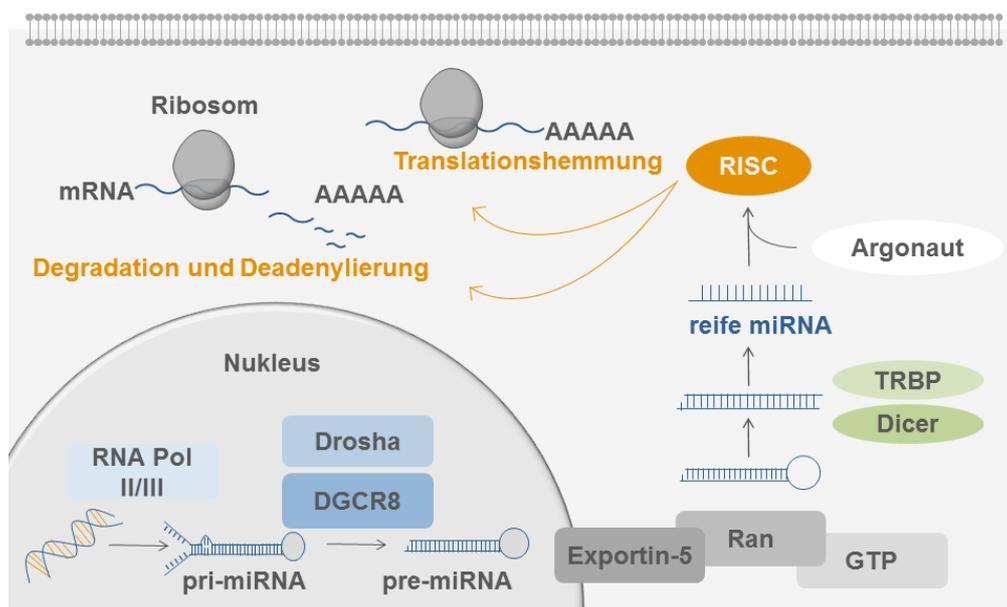


Abbildung 3. Biogenese der miRNAs. RNA pol II/III, RNA-Polymerase II/III; pri-miRNA, *primary-miRNA*, DGCR8, *DiGeorge critical reagon 8 protein*; pre-miRNA, *precursor miRNA*; GTP, Guanosintriphosphat; Ran, *Ras-related nuclear protein*; TRBP, *HIV-1 TAR RNA binding protein*; RISC, *RNA-induced silencing complex* (adaptiert nach (Winter et al. 2009)).

1.5. *In silico* Identifizierung von miRNA-Bindungsstellen

Das Bindungsverhalten einer miRNA an ihre Zielgene wird durch unterschiedliche Parameter bestimmt. Ein wesentlicher Einflussfaktor ist beispielsweise die Komplementarität der miRNA-Seed-Sequenz zur 3'-UTR (3' untranslatierte Region) des Zielgens. Die *Seed*-Region beschreibt hierbei einen konservierten Bereich in der Position der Nukleotide 2-7 am 5'-Ende der miRNA (Lewis et al. 2003). Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten für den Grad der Komplementarität und damit der

theoretischen Bindungseffizienz einer miRNA-Zielgen-Interaktion. Diese werden in absteigender Reihenfolge der Bindungseffizienz u. a. als 8mer, 7mer-m8, oder als 7mer-A1 bezeichnet (Bartel 2009). Eine als 8mer bindend klassifizierte miRNA bindet in Position 2-8 der miRNA mit einem zusätzlich gegenüberliegenden Adenin (A), eine 7mer-m8 miRNA an Position 2-8, eine 7mer-A1 miRNA an Position 2-7 mit einem gegenüberliegenden Adenin (Brennecke et al. 2005; Lewis et al. 2005) (s. Abbildung 4). Ein weiterer Parameter, der für die Vorhersage des Bindungsverhaltens herangezogen wird, ist der Grad der Konservierung der Bindungsstellen. Hier werden orthologe Sequenzen zwischen dem Menschen und evolutionär weiter entfernten Arten wie der Maus verglichen. Unter der Annahme, dass für die Regulation durch miRNAs benötigte Bindungsstellen in den 3'-UTRs unter Selektionsdruck stehen, sind daher konservierte Bindungsstellen als wahrscheinlich effizienter einzuschätzen (Lewis et al. 2003; Witkos et al. 2011; Friedman et al. 2009; Lewis et al. 2005).

Neben der Komplementarität und dem Grad der Konservierung einer Bindungsstelle tragen noch andere Faktoren zur Bindung bei (Grimson et al. 2007). Begünstigt wird dabei die Bindung durch eine zusätzliche Bindung der Nukleotide 13-16 der miRNA, einen hohen Adenin/Uracil-Anteil der flankierenden 3'-UTR-Bereiche, eine Entfernung von mindestens 15 Nukleotiden zum Stoppkodon und eine Position nahe



Abbildung 4. Klassifikation von miRNA-Bindungsstellen entsprechend der theoretischen Bindungseffizienz (adaptiert nach (Bartel 2009)). ORF, offener Leserahmen; A, Adenin; N, Nukleotid; Poly(A), Polyadenin; die *Seed*-Sequenz ist in orange, die komplementäre Sequenz in der 3'-UTR ist in blau dargestellt. Die Zahlen deuten die Position der Nukleotide am 5'-Ende der miRNA an.

zum offenen Leserahmen (ORF) oder Poly(A)-Schwanz. Liegen zwei mögliche Bindungsstellen für eine miRNA in der 3'-UTR des Zielgens etwa 8 bis 40 Nukleotide auseinander, kann es hierdurch zu einem synergistischen Effekt kommen (Grimson et al. 2007). Für die Vorhersage der Bindungsstellen bzw. der Bindungswahrscheinlichkeiten zwischen miRNA und ihren Zielgenen gibt es mehrere *in silico* Algorithmen, welche die genannten Einflussgrößen berücksichtigen, z.B. TargetScan, DIANA-microT-CDS oder miRmap. Bei den unterschiedlichen Algorithmen können jedoch verschiedene Kriterien im Vordergrund stehen: Der TargetScan Context++ Score setzt sich beispielsweise aus 14 unterschiedlichen Kriterien zusammen. Hierzu zählen unter anderem die Komplementarität der *Seed*-Sequenz, der Adenin/Uracil-Anteil der benachbarten Bereiche, die Länge der 3'-UTR oder das Vorhandensein eines 5' Guanosins in der mRNA (Agarwal et al. 2015). Der DIANA miTG Score setzt sich hauptsächlich aus der *Seed*-Komplementarität, der Konservierung der *miRNA recognition elements* (miRNA-Erkennungselemente) und der freien Bindungsenergie zwischen der miRNA und diesen zusammen (Reczko et al. 2012). Der miRmap Algorithmus berücksichtigt 11 Kriterien. Dazu gehören u.a. die freie Bindungsenergie, der Grad der Konservierung, aber auch der Adenin/Uracil-Gehalt und der Abstand zur 3'-UTR (Vejnar et al. 2012). Eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Vorhersageprogramme ist aufgrund der beschriebenen Unterschiede in den zugrundeliegenden Algorithmen nur eingeschränkt möglich.

1.6. Die miR-103 Familie

Die miR-103a gehört zur miR-15/107 Gruppe, die an ihrem 5'-Ende über eine AGCAGC-Sequenz verfügt. Die miR-103a ist dabei in Vertebraten hoch konserviert (Finnerty et al. 2010). MiR-103a spielt eine Rolle in unterschiedlichsten zellulären Vorgängen wie der Zellalterung, Metastasierung von Tumorzellen, neurologischen und metabolischen Prozessen ebenso wie in der Angiogenese. Zielgene der miR-103a sind unter anderem Gene, die den Zellzyklus regulieren und zu einem Zell-Arrest in der G₀-Phase führen können (Linsley et al. 2007). Für miR-103a ist auch eine Depletion in alternden Zellen beschrieben worden (Noren Hooten et al. 2010). Bei verschiedenen Krebsarten wurde bereits eine Dysregulation von miR-103a beobachtet, beispielsweise beim kolorektalen Karzinom. Hier reguliert miR-103a-3p

die Zielgene *DAPK* (*Death-associated protein kinase*) und *KLF4* (*Krüppel like factor 4*) herunter und führt zu einer verstärkten Metastasierung und verschlechterten Prognose (Chen et al. 2012). Auch beim Brustkrebs wurden erhöhte Spiegel an miR-103a und ihre Regulation von Dicer mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Martello et al. 2010). In humanem Magenkarziomgewebe und Metastasen hingegen war miR-103a niedrig exprimiert. *In vitro* Experimente zeigten hier eine Verminderung der Proliferation, Migration und Invasion durch Regulation von *c-Myb* (Liang et al. 2015). Ein weiteres Zielgen ist der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (*NCX1*). Durch Hemmung von miR-103a und sukzessives Heraufregulieren von *NCX1* konnten neuroprotektive Effekte in ischämischem Hirngewebe beobachtet werden (Vinciguerra et al. 2014). Cofilin, ein Protein, das mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht wird, ist durch miR-103a reguliert. Dies deutet auf eine Rolle von miR-103a in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit hin (Yao et al. 2010).

Die miR-103a kann ebenfalls in metabolische Signalkaskaden eingreifen. Untersuchungen im Mausmodell konnten zeigen, dass miR-103a an der Regulation des PI3K-Akt-mTOR Signalweges beteiligt ist und über das Zielgen Caveolin-1 die Insulin-Sensitivität negativ reguliert (Vinnikov et al. 2014; Trajkovski et al. 2011).

Bei miRNAs der miR-15/107 Gruppe konnte ein Einfluss auf die Angiogenese durch Regulation von VEGF nachgewiesen werden (Karaa Zi et al. 2009). Auch miR-103a wurde bereits im angiogenetischen Kontext untersucht. Dabei zeigte miR-103a eine proangiogene Wirkung in HUVECs durch eine vermehrte Bildung kapillarähnlicher Strukturen *in vitro* und einer Zunahme der Angiogenese *in vivo* im Mausmodell. Unter hypoxischen Bedingungen erfolgte eine Heraufregulation von miR-103a, die über ihr Zielgen Ago1, ein Protein der Argonaut-Familie, zu einer translationalen Desuppression von VEGF führte (Chen et al. 2013). Im Zusammenhang des Themas dieser Arbeit ist insbesondere die in der Literatur beschriebene Bindung an *CCM3* hervorzuheben. In Prostatakarzinomzelllinien konnte eine Herunterregulation von *CCM3*-mRNA und *CCM3* Protein gezeigt werden. Dies führte zu einer Verminderung der Zellproliferation und Invasion, ebenso wie zu einer Regulation des Zellzyklus und vermehrter Apoptose *in vitro* (Fu et al. 2016).

1.7. Die miR-30 Familie

Die miR-30a-5p gehört zur miR-30 Familie, die eine identische *Seed*-Sequenz (CAAAUG) teilt und daher oft gemeinsame Zielgene hat (Bridge et al. 2012; Lewis et al. 2003). Die miR-30a ist bis hin zum Zebrafisch konserviert (Kiezun et al. 2012). Die miR-30 Familie ist unter anderem an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Hervorzuheben ist insbesondere eine Funktion in der Regulation der Angiogenese.

Als Zielgen von miR-30a konnte bereits der Transkriptionsfaktor *RUNX2* (*Runt related transcription factor 2*) ermittelt werden, über den miR-30a regulierend in die Adipogenese eingreift (Zaragosi et al. 2011). Auch Prozesse der Krebsentstehung werden durch die miR-30 Familie beeinflusst. Im Hinblick darauf wurde gezeigt, dass miR-30 das Protoonkogen *MYBL2* (*MYB proto-oncogene like 2*) herunterreguliert und die Seneszenz von Zellen begünstigt (Martinez et al. 2011). Ein weiteres durch die miR-30 reguliertes Protoonkogen ist *LIN28* (*Lin-28 Homolog (C. elegans)*) (Zhong et al. 2010). Neben Protoonkogenen hemmt die miR-30 Familie auch das Zielgen *Smad1* (*Smad family member 1*) und reguliert so den Differenzierungsprozess von Osteoblasten (Wu et al. 2012). Auch eine Beteiligung der miR-30 Familie an der Organentwicklung der Niere über das Gen *Lhx1* (*LIM homeobox 1*) und an der Entwicklung der Leber wird diskutiert (Agrawal et al. 2009; Hand et al. 2009). Darüber hinaus wird die miR-30 Familie mit kardiovaskulären Erkrankungen wie der Linksherzhypertrophie assoziiert. So wurde eine niedrige Expression der miR-30 Familie in pathologischem Herzgewebe und eine damit einhergehende erhöhte Expression des profibrotischen Gens *CTGF* (*Connective tissue growth factor*) beobachtet (Duisters et al. 2009). Zusätzlich konnte im Tiermodell nachgewiesen werden, dass die Überexpression von miR-30c zu einer dilatativen Kardiomyopathie führen kann (Wijnen et al. 2014).

Funktionen der miR-30 Familie in der Angiogenese wurden ebenfalls bereits beschrieben. In menschlichen Endothelzellen gehört die miR-30 Familie zu den am höchsten exprimierten miRNAs und macht etwa 2,6 % aller detektierbaren miRNAs aus (Jiang et al. 2013). Sowohl durch *in vivo* Experimente in Zebrafischen als auch durch *in vitro* Experimente in HUVECs wurde eine proangiogene Wirkung der miR-30 Familie gezeigt. Hier führte eine Gabe von miR-30a Analoga zu einer vermehrten

Verzweigung der Gefäße von Zebrafischembryos und zu einer vermehrten Sprossung von HUVECs im Sphäroid-basierten Sprossungs-Assay, während die Inhibition von miR-30a keine eindeutig signifikanten Auswirkungen zeigte (Jiang et al. 2013). Ähnliche Effekte waren auch nach Gabe von miR-30b und miR-30c Analoga zu beobachten (Bridge et al. 2012). Beide Studien konnten *DLL4* als ein Zielgen der miR-30 Familie identifizieren und eine Hemmung des antiangiogenen DLL4-Notch Signalweges nachweisen.

1.8. Die let-7 Familie

Die miRNA let-7f-2-3p ist Teil der let-7 (*lethal-7*) Familie. Zu dieser hochkonservierten Familie gehören im Menschen 10 reife miRNAs, und 13 Vorläufer-miRNAs (Roush et al. 2008; Reinhart et al. 2000). Die miRNA let-7 gehört zu den ersten entdeckten miRNAs und wurde im Zusammenhang mit der larvalen Entwicklung von *C. elegans* erforscht (Reinhart et al. 2000). Seitdem konnte für die let-7 Familie unter anderem eine Beteiligung an der Differenzierung und Proliferation von Zellen, der Tumorentstehung und der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen gezeigt werden. Eine Überexpression von let-7 führt beispielsweise zu einer verminderten Proliferation von Zellen und einem Zellzyklusarrest in menschlichen Zellen. Dieser Effekt wird unter anderem über die Gene *CDK6* (*Cyclin dependent kinase 6*) und *CDC25A* (*Cell division cycle 25A*) vermittelt, die den Zellzyklus regulieren (Johnson et al. 2007). Im Rahmen der Tumorgenese gilt die let-7 Familie als Tumorsuppressor, der in mehreren Krebsentitäten wie dem Lungenkarzinom oder Ovarialkarzinom niedrig exprimiert ist (Takamizawa et al. 2004; Dahiya et al. 2008). Für einzelne miRNAs der Familie wie let-7a-3 ist jedoch auch eine Heraufregulation in Tumorgewebe belegt (Brueckner et al. 2007).

Besonders im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen spielt die let-7 Familie eine bedeutende Rolle. Hier konnte nachgewiesen werden, dass die miRNA Familie sowohl in Gefäßmuskulzellen, als auch in Kardiomyozyten und Endothelzellen exprimiert wird (McCall et al. 2011; Satoh et al. 2011; Ding et al. 2013). Bei der Herzhypertrophie nimmt die let-7 Familie eine protektive Funktion ein, während bei atherosklerotischen Prozessen eine Heraufregulation dieser miRNA Familie festgestellt werden konnte (Yang, Ago, et al. 2011; Kin et al. 2012). Im Kontext der

Angiogenese kann die let-7 Familie als eher proangiogen eingeordnet werden (Kuehbacher et al. 2007). Über die Interaktion mit dem Zielgen *Ago1* (*Argonaute 1*) konnte bereits eine translationale Desuppression von VEGF und damit eine Steigerung der Angiogenese beobachtet werden (Chen et al. 2013).

1.9. Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, erstmals die Regulation von *CCM3* durch miRNAs im Kontext der CCM-Pathogenese zu untersuchen. Ausgehend von *in silico* Analysen wurden drei Kandidaten miRNAs (miR-103a-3p; miR-30a-5p; let-7f-2-3p) ausgewählt, und hinsichtlich der von ihnen vermittelten Regulation der *CCM3*-Expression charakterisiert. Da eine pathologische Angiogenese bei der Entwicklung der CCMs eine Rolle spielt, sollte ebenfalls die mögliche proangiogene Wirkung der miRNAs in humanen Nabelschnurvenenendothelzellen *in vitro* untersucht werden.

2. Material

2.1. Zelllinien

Als *in vitro* Modellorganismus für nachfolgende Experimente dienten Humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs, *Human umbilical vein endothelial cells*), die von der Firma PromoCell (Heidelberg, Deutschland) bezogen wurden (Katalognummer: C-12253). HEK293T-Zellen (Humane embryonale Nierenzellen, *Human embryonic kidney cells*) sind eine menschliche immortalisierte embryonale Nierenzelllinie, die als besonders gut zu transfizieren gilt (Thomas et al. 2005) und daher für einige Experimente ausgewählt wurde.

2.2. Chemikalien

Produkt	Hersteller
100bp DNA Leiter	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
AccuTarget™ Fluorescein-labeled miRNA Mimic I	<i>Bioneer, Daejeon, Südkorea</i>
Agarose	<i>Bio&Sell, Feucht bei Nürnberg, Deutschland</i>
Ambion® Nuklease-freies Wasser	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Aqua bidestillata (A. bidest.)	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Borsäure	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Cryo-SFM; Medium zur Kryokonservierung	<i>PromoCell, Heidelberg, Deutschland</i>
Cy® 3 Transfection Control dsiRNA	<i>Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA</i>
Dimethylformamid	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>

Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium (DMEM; HPA)	<i>Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	<i>PromoCell, Heidelberg, Deutschland</i>
Endothelial cell basal medium (ECBM)	<i>PromoCell, Heidelberg, Deutschland</i>
Endothelial cell growth medium (ECGM) supplement pack	<i>PromoCell, Heidelberg, Deutschland</i>
Essigsäure (100 %)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Ethanol (70 %, vergällt, 99,8 % vergällt, 99,5 %)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Ethidiumbromidlösung	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Ethylendiamtetraessigsäure (EDTA)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Fetales Kälberserum (FBS)	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Fibroblast growth factor 2 (FGF-2)	<i>PromoCell, Heidelberg, Deutschland</i>
GeneRuler 1kb Plus Leiter	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Glycin	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
Guanidinhydrochlorid (0,3 M in 99,5 % Ethanol)	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
Isopropanol	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Tris-EDTA Puffer, pH 8	<i>Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA</i>
Kollagen Typ I	<i>Ibidi, Martinsried, Deutschland</i>
Ladepuffer für die Gelelektrophorese	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Lipofectamine [®] 2000	<i>Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA</i>
Lipofectamine [®] RNAiMAX	<i>Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA</i>
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	<i>Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA</i>
Medium 199 (10x)	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
Methanol (99,9 %)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Methylzellulose, 4000 Centipoise	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
Milchpulver	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Serva, Heidelberg, Deutschland</i>

Natrimchlorid (NaCl)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Opti [®] -MEM reduced serum medium	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
OneTaq [®] DNA Polymerase	<i>New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA</i>
OneTaq [®] Standard Reaction Buffer Pack	<i>New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA</i>
PAGE Ruler [™] Plus Prestained Protein	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Paraformaldehyd	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
PerfeCTa SYBR Green SuperMix (2x)	<i>Quanta Biosciences, Beverly, Massachusetts, USA</i>
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
ROTIPURAN [®] ≥ 99 % Chloroform	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Precision Plus Protein [™] Unstained Protein Standard	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Probenpuffer (Laemmli) (4x)	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
ProLong [®] Diamond Antifade Mountant with DAPI	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
Thio-Urea	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
Tris Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Trypanblau	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Trypsin-EDTA (0,25 % mit Phenolrot)	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Urea	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Vascular endothelial growth factor A ₁₆₅ (VEGF-A)	<i>PromoCell, Heidelberg, Deutschland</i>

2.3. Lösungen und Puffer

Lösung oder Puffer	Material	Menge
5x Alkalische Phosphatase (AP) Puffer	1 M MgCl ₂	26,32 g
	NaCl	14,6 g
	Tris Base	30,25 g
	A. bidest.	ad 500 ml; pH 9,5
AP-Substrat	BCIP Stammlösung	33 µl
	NBT Stammlösung	66 µl
	AP Puffer	ad 10 ml
BCIP Stammlösung	BCIP	0,5 g
	Dimethylformamid	10 ml
Blotto	Milchpulver	10 g
	10x TBS	20 ml
	A. bidest.	ad 200 ml
Methocel	Methylzellulose	6 g
	ECBM	ad 500 ml
NBT Stammlösung	NBT	0,5 g
	70 %	10 ml
	Dimethylformamid	
Paraformaldehyd-Lösung	Paraformaldehyd	80 g
	PBS	ad 1 l
10x Transferpuffer	Glycin	144 g
	Tris Base	30,2 g
	Methanol	100 ml
	SDS	0,5 %
	A. bidest.	ad. 1 l
10x Tris-Bor-EDTA Puffer (TBE)	Tris Base	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	7,5 g
	A. bidest.	ad 1 l
10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	NaCl	90 g
	Tris Base	60 g
	A. bidest.	ad 1 l; pH 7,6
10x Tris-Glycin-SDS Puffer (TGS)	Tris Base	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	SDS	10 g
	A. bidest.	ad 1 l

2.4. Kits

Produkt	Hersteller
Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus	<i>ZYMO Research Europe, Freiburg, Deutschland</i>
First Strand cDNA Synthesis Kit	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
LightSwitch™ Luciferase Assay Reagent	<i>SwitchGear Genomics, Menlo Park, CA, USA</i>
peqGOLD TriFast™	<i>VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA</i>
qScript™ microRNA cDNA Synthesis Kit	<i>Quanta Biosciences, Beverly, Massachusetts, USA</i>
QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Qubit® Protein Assay Kit	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Qubit® RNA HS Assay Kit	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
TaqMan® Gene Expression Assays, Assay ID <i>CCM3</i> : Hs00200578_m1 Assay ID <i>TBP</i> : Hs00427620_m1	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10 %	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>

2.5. Plasmide

Plasmidbezeichnung; Identifikationsnr.	Hersteller
pLightSwitch_EMPTY_3UTR; #S890005	<i>SwitchGear Genomics, Menlo Park, Kalifornien, USA</i>
pLightSwitch_GAPDH_3UTR; #S801378	<i>SwitchGear Genomics, Menlo Park, Kalifornien, USA</i>
pLightSwitch_PDCCD10_3UTR; #S803904	<i>SwitchGear Genomics, Menlo Park, Kalifornien, USA</i>

Vektorkarten der pLightSwitch Plasmide s. Anhang.

Das Plasmid pmCherry-C1 wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Lars Jensen, Funktionelle Genomforschung, Universitätsmedizin Greifswald.

2.6. Oligonukleotide

Tabelle 1. In den Versuchen verwendete miRNAs. Die miRNA-Analoga (miR Non-targeting_1, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-30a-5p und let-7f-2-3p) wurden von SwitchGear Genomics (Menlo Park, Kalifornien, USA), die miRNA Inhibitoren (NC1-Inhibitor, hsa-miR-30a-5p Inhibitor) von Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA) bezogen.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→ 3')
miR Non-targeting_1	UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA
hsa-miR-103a-3p (MIMAT0000101)	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-30a-5p (MIMAT0000087)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
hsa-let-7f-2-3p (MIMAT0004487)	CUAUACAGUCUACUGUCUUUCC
NC1 miR-Inhibitor	GCGUAUUUAUAGCCGAUUAACG
hsa-30a-5p Inhibitor	CUUCCAGUCGAGGAUGUUUAC

2.6.1. Primer

Tabelle 2. Primer für die qPCR der Kandidaten-miRNAs. Der Primer für let-7f-2-3p wurde mittels der miRprimer Software selbst entworfen. Für miR-103a-3p und miR-30a-5p wurden PerfeCTa microRNA verwendet. Alle Primer wurden von Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA) bezogen. F – Vorwärtsprimer. Als Rückwärtsprimer diente bei allen miRNAs der unspezifische PerfectA Universal PCR Primer, der im qScript™ microRNA cDNA Synthesis Kit enthalten war.

Amplikon	Sequenz (5'→ 3')
let-7f-2-3p-F	GCAGCTATACAGTCTACTGTCT
miR-103a-3p-F	CAGCATTGTACAGGGCTATGAA
miR-30a-5p-F	TCACATTGTGCTACTGTCTGCAAA
RNU6-2 (NR_002752.1)	GCAAATTCGTGAAGCGTTCC

Tabelle 3. Primerpaare zur Transkriptanalyse von CCM3. Es wurden Primerpaare gebildet zwischen dem Vorwärtsprimer CCM3-Ex7_F und den jeweiligen Rückwärtsprimern. F – Vorwärtsprimer, R – Rückwärtsprimer.

Amplikon	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
	CCM3_Ex7_F	CCAGATGAGATCAATGACAGA
CCM3 3'-UTR I	CCM3_cDNA_R2	CCTTCAGGAGGGACTGATA
CCM3 3'-UTR II	CCM3 3'-UTR R3	TGATAAACTGCTGATAAGCTCCC
CCM3 3'-UTR III	CCM3 3'-UTR R4	GAAACCACTTAACATGAACACTT

2.7. Antikörper

Antigen; Identifikationsnr.	Klonalität; Wirtsspezies	Hersteller
Primärer Antikörper		
CCM3; IG-626	Polyklonal; Kaninchen	<i>Immunoglobule, Himmelstadt, Deutschland</i>
β-Tubulin; #PA5-16863	Polyklonal; Kaninchen	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
β-Aktin; #MA5-15739	Monoklonal; Maus	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Sekundärer Antikörper		
Anti-Kaninchen, Alkalische Phosphatase; D0487	Polyklonal; Ziege	<i>Dako Denmark, Glostrup, Dänemark</i>
Anti-Maus, Alkalische Phosphatase; sc-2047	Polyklonal; Ziege	<i>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA</i>

2.8. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Brutschrank: Serie CB CO ₂ -Inkubator	<i>Binder, Tuttlingen, Deutschland</i>
Deckgläschen	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>

Einmalpipettenspitzen Sur Phob SafeSeal-Tips®	<i>Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland</i>
Falcons 15 ml	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
Falcons 50 ml	<i>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</i>
Glasflaschen 200, 500, 1000 und 2000 ml	<i>Schott AG, Mainz</i>
Geldokumentationsgerät Gel Doc EZ System	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Heizplatte, Thermoplatte S	<i>Desaga, Wiesloch, Deutschland</i>
Immun-Blot® PVDF-Membran	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Infinite 200® Pro Microplate Reader	<i>Tecan, Männedorf, Schweiz</i>
LightCycler® 480 PCR-Analysesystem	<i>Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz</i>
Mikroskope	
Axiovert 25, inverses Mikroskop	<i>Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland</i>
Nikon Eclipse TE2000-U, inverses Mikroskop	<i>Minato, Tokio, Japan</i>
Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis Cell	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Mini-PROTEAN® Short Plates	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Mini-PROTEAN® Spacer Plates; 0,75 mm; 1,0 mm; 1,5 mm	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stand und Clamps	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Mini-PROTEAN® Käämme; jeweils 10-Well bzw. 15-Well; 0,75 mm; 1,0 mm; 1,5 mm	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Multipipettenspitzen Combitips™ plus	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
NanoPhotometer®	<i>Implen, München, Deutschland</i>
Neubauer-improved Zählkammer	<i>Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland</i>
Objektträger „Elka“	<i>Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Deutschland</i>
PCR-Platte mit Deckel	<i>Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland</i>
PCR-Streifen mit Deckel	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
PCR-Thermocycler	

C1000 Touch™ und S1000™	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
GeneAmp™ PCR System 9700	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Pipettierhilfe „Pipetus“	<i>Heidelberg, Deutschland</i>
Protein Lobind Reaktionsgefäß, 2 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
QuantStudio™ 3D Digital PCR System	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Qubit® Fluorometer 2.0	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml und 2,0 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Schüttler	
Reax 2000	<i>Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland</i>
Vortex Mixer Lab Dancer	<i>VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA</i>
Vortex Schüttler MS 3	<i>IKA, Staufen, Deutschland</i>
Serologische Pipetten, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
Sterilbänke	
Herasafe™ KS 12	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Herasafe™ KS 15	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Stromversorgungsgerät PowerPac™ Basic und PowerPac™ 300	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Thermomixer® C und compact	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Wasserbad W6	<i>GK Sondermaschinenbau GmbH - Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland</i>
Whatman® Blotting Papers	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
Zentrifugen	
Centrifuge 5702	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Centrifuge 5804 R	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Galaxy Mini und Mini Star	<i>VWR International, Radnor,</i>

	<i>Pennsylvania, USA</i>
MiniSpin®	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Zellkulturgefäße	
CELLSTAR® Tissue Culture Plates, 6-Well-Platten	<i>Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich</i>
24-Well-Platten	<i>TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz</i>
96-Well-Platten	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
CELLSTAR® Tissue Culture Plates, 96-Well-Platten (weiß)	<i>Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich</i>
CELLSTAR® Sterile Cell Culture Flask, T25-Flaschen	<i>Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich</i>
T75-Flaschen	<i>TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz</i>
Cryo-Röhrchen CryoPure	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>

2.9. Softwareprogramme

Softwareprogramm	Hersteller
Endnote X7.4	<i>Thomson Reuters, New York City, USA und Toronto, Kanada</i>
Gimp 2.8	https://www.gimp.org/
GraphPad Prism 6	<i>GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA</i>
i-control™ Microplate Reader Software	<i>Tecan, Männedorf, Schweiz</i>
ImageJ 1.5	https://imagej.nih.gov/ij/
ImageLab 5.1	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA</i>
Integrative Genomics Viewer (IGV)	<i>Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA</i>
miRprimer	https://sourceforge.net/projects/mirprimer/
Spot Advanced	<i>Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, USA</i>
XPlasMap 0.99	http://www.iayork.com/XPlasMap/index.shtml

2.10. Online-Datenbanken und – Programme

Datenbank oder Programm	Link oder Hersteller; Zugriffsdatum
DIANA Tools – microT-CDS	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index ; 04/2016
DIANA Tools – TarBase v7.0	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index ; 04/2016
Ensembl Genome Browser (v85)	http://www.ensembl.org ; 2016
Mirbase 21	http://mirmap.ezlab.org/ ; 04/2016
miRGator v3.0	http://mirgator.kobic.re.kr/index.html ; 04/2016
miRmap	http://mirmap.ezlab.org/ ; 04/2016
miRWalk 2.0	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/ ; 04/2016
National Center for Biotechnology Information	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ; 03/2016
OligoAnalyzer 3.1	https://eu.idtdna.com/calc/analyzer ; 12/2016
QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i> ; 09/2016
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html ; 12/2016
Targetscan 7.1	http://www.targetscan.org/vert_71/ ; 06/2016
The Human Protein Atlas 16.1	PDCD10; http://www.proteinatlas.org/ENSG00000114209-PDCD10/tissue ; 02/2017
Tools4miRs	https://tools4mirs.org/ ; 02/2017
UCSC Genome Bioinformatics (Genome Browser und In Silico PCR)	https://genome.ucsc.edu/ ; 12/2016

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung von HEK293T-Zellen und HUVECs

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293T-Zellen) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) in Form einer adhärenen Zellschicht kultiviert.

HUVECs wurden zwischen Passage vier und sechs für die Experimente verwendet und bei 37 °C und 5% CO₂ ebenfalls als adhärenente Zellschicht kultiviert. Für die Kultivierung der HUVECs wurde *Endothelial cell growth medium* (ECGM) verwendet, das nach Herstellerangaben aus *Endothelial cell basal medium* (ECBM) und *Endothelial cell growth supplements* zusammengesetzt wurde.

Mit HEK293T-Zellen und HUVECs wurde auf gleiche Weise verfahren. Zum Passagieren wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung nach dreiminütiger Inkubation bei 37 °C vom Kulturgefäß abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde das jeweilige Kulturmedium hinzugefügt und nachfolgend bei 300 g für 3,5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. HEK293T-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20, HUVECs in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:4 aufgeteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde mit einer Zählkammer (Neubauer *improved*) und einer Vitalfärbung mittels Trypanblau gearbeitet.

Zum Auftauen wurden die vorher in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt, anschließend in Kulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche gegeben. Es erfolgte ein Mediumwechsel nach 24 Stunden. Die Zellen wurden 72 Stunden nach dem Auftauen für nachfolgende Experimente weiterverwendet.

3.1.2. Transfektion von miRNA-Analoga und miRNA Inhibitoren in HUVECs

In experimentellen Vorarbeiten wurden die Transfektionsbedingungen optimiert (s. 8.2). Alle nachfolgenden Versuche wurden unter den ermittelten optimalen Bedingungen durchgeführt. Die Transfektion fand 24 Stunden nach Aussaat der Zellen in 24-, bzw. 6-Well-Zellkulturplatten bei einer Konfluenz von 80 % statt. 100 nM synthetisch hergestellter miRNA-Analoga für die reifen miRNAs miR-103a-3p, miR-30a-5p und let-7f-2-3p bzw. 200 nM miRNA Inhibitoren wurden in HUVECs durch eine Lipofektion eingeschleust. Ein gleichartiges Oligonukleotid ohne Bindungssequenzen im menschlichen Genom (nicht-bindendes miRNA-Analogon bzw. nicht-bindender miRNA-Inhibitor) diente bei den nachfolgenden Experimenten als Negativkontrolle.

Für den Transfektionsansatz wurden im 24- bzw. 6-Well Format 1 µl bzw. 5 µl Lipofectamine® RNAiMAX mit 49 µl bzw. 245 µl Opti-MEM vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden die miRNA-Analoga bzw. Inhibitoren mit Opti-MEM zu einem Gesamtvolumen von 50 µl im 24-Well-Format und 250 µl im 6-Well-Format gegeben. Danach wurden die beiden Ansätze vermischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und 400 µl bzw. 1500 µl frisches ECGM mit 10 % FBS hinzugefügt. Im Anschluss wurde zu den Zellen jeweils der fertige Transfektionsansatz hinzugegeben. Schließlich wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.1.3. Sphäroid-basierter Sprossungs-Assay

Um das Sprossverhalten von HUVECs beurteilen zu können, wurden vereinzelte Zellen in viskosem Medium unter nicht-adhäsiven Bedingungen als hängende Tropfen (*Hanging drops*) kultiviert. So bilden sich dreidimensionale Sphäroide, die in eine Kollagenmatrix eingebettet werden können.

HUVECs wurden in einer 24-Well Platte ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % mit miRNA-Analoga oder miRNA Inhibitoren transfiziert (s. 3.1.2). Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst, gezählt und 80.000 HUVECs in 4 ml ECGM mit 10 % FBS aufgenommen. Es wurde 1 ml Methocel hinzugefügt, gemischt und 25 µl in eine Kulturschale pipettiert, die anschließend zur Generierung der

Hanging drops kopfüber für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurde. In den Tropfen bilden die HUVECs ein einzelnes Sphäroid. Die Sphäroide wurden mit 15 ml PBS vorsichtig abgelöst, bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und in eine Kollagenmatrix eingebettet. Diese setzte sich aus 2 ml nach Herstellerangaben angesetztem Kollagen, 0,25 ml Medium M199, und 2 ml Methocel mit 20 % FBS zusammen. Der pH-Wert wurde durch tropfenweise Zugabe von 0,2 M NaOH eingestellt. Die Sphäroide wurden für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, bis das Kollagen polymerisiert war, und dann kultiviert oder mit 250 ng/ml VEGF-A bzw. 250 ng/ml FGF stimuliert. Zusätzlich erfolgte ein Versuch mit gleichem Aufbau und Stimulation mit jeweils 25 ng/ml. Es folgte eine Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellen mit 1 ml 8 %igem Paraformaldehyd für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Dieses wurde im Anschluss von den Zellen abgenommen und das Wachstum der Sphäroide lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Länge und Anzahl der Sprosse pro Sphäroid wurde mit der ImageJ Software ausgewertet.

3.1.4. Migrations-Assay

In dem gewählten *Scratch-wound* Ansatz wird die Migration von Zellen erfasst, indem in eine adhärente Zellschicht eine freie Fläche geschabt und der Verschluss dieser Fläche über die Zeit beobachtet wird. Die von den Zellen zugewachsene Fläche über die Zeit gibt Aufschluss über ihre Migrationsrate.

Zur Erfassung der Auswirkungen von miR-103a-3p, miR-30a-5p und let-7f-2-3p auf das Migrationsverhalten von HUVECs wurden miRNA-Analoga transfiziert (s. 3.1.2). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit ECGM mit 10 % FBS vorgenommen. Das *Scratch-wound*-Assay wird in der Literatur häufig mit Medium mit reduziertem FBS-Gehalt durchgeführt, um die Proliferation von Zellen zu vermindern und ausschließlich die Migration der Zellen beobachten zu können. Da aber eine Verringerung des FBS-Gehaltes zu einem Anstieg von CCM3 in endothelialen Zellen führt (Chen et al. 2009), wurde in diesem Versuchsaufbau darauf verzichtet.

48 Stunden nach der Transfektion wurde mit einer 200 µl-Pipette in jedem Well jeweils zweimal eine freie Fläche in die Zellschicht geschabt, danach wurden die Zellen zweimal mit 500 µl ECGM mit 10 % FBS gewaschen, um Zelltrümmer zu

entfernen. Es wurden 500 µl ECGM mit 10 % FBS zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Effekte mit jeweils zwei Bildern pro Well direkt und 7 Stunden nach Schaben der freien Fläche dokumentiert. Die Ausmaße dieser zellfreien Fläche wurden mit der ImageJ Software gemessen.

3.2. Luciferase-Reportergen-Assay

3.2.1. Transiente Co-Transfektion von miRNA-Analoga und Plasmiden

Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens der miRNA-Analoga an die 3'-UTR des *CCM3*-Gens wurde ein transfektionsfertiges Reporterplasmid der Firma SwitchGear Genomics bezogen, welches ein Fusionskonstrukt aus dem Luciferase-Gen und der 3'-UTR von *CCM3* enthielt (pLightSwitch_PDCCD10_3UTR). Jeweils ein Plasmid ohne eine entsprechende 3'-UTR (pLightSwitch_EMPTY_3UTR) sowie ein Plasmid mit einem Fusionskonstrukt aus der 3'-UTR des *GAPDH*-Gens (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und dem Luciferase-Gen (pLightSwitch_GAPDH_3UTR) dienten als Kontrollen (Vektorkarten s. 8.1). Für die Analyse der Auswirkung der zu untersuchenden miRNAs auf die Luciferaseaktivität wurden miRNA-Analoga für die miRNAs miR-30a-5p, let7f-2-3p und miR-103a-3p transfiziert, ein nicht-bindendes Analogon diente als Negativkontrolle. Zur Analyse der Luciferaseaktivität wurden zunächst jeweils 22.500 HEK293T-Zellen pro Well einer weißen 96-Well-Platte in ein Kulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte bei einer Konfluenz von mindestens 80 % die Transfektion der Zellen mit 50 ng des jeweiligen Plasmids und 50 nM des zu untersuchenden miRNA-Analogons. Hierfür wurden 0,15 µl Lipofectamine[®] 2000 in 24,85 µl Opti-MEM gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden zudem 1 µl des jeweiligen miRNA-Analogons und 1,67 µl des entsprechenden Plasmids in 22 µl Opti-MEM gemischt. Im Anschluss erfolgte die Vereinigung beider Ansätze sowie für 20 Minuten eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur. Währenddessen wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und 50 µl frisches Kulturmedium hinzugefügt. Am Ende der Inkubationszeit wurden 50 µl des fertigen Transfektionsansatzes zu den Zellen gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 %

CO₂ inkubiert. Zur Verstärkung der Zellyse wurden die 96-Well-Platten anschließend bei -80 °C eingefroren.

3.2.2. Messung der relativen Luciferaseaktivität

Das Luciferase-Enzym der Koralle *Renilla reniformis* katalysiert ATP-unabhängig eine Oxidationsreaktion, bei der es zu einer messbaren Biolumineszenz kommt. Zur Auswertung der relativen Luciferaseaktivität unter den unterschiedlichen experimentellen Konditionen wurden die im Vorfeld lysierten Zellen auf Raumtemperatur gebracht und mit 100 µl des laut Herstellerangaben rekonstituierten Luciferase-Assay-Substrates versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten in Dunkelheit wurde die Lumineszenz in *Counts per second* bei einer Integrationszeit von 2000 ms auf dem Infinite 200[®] Pro Luminometer gemessen.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. RNA-Isolation

Zur Zellernte für anschließende RNA- bzw. Protein-Analysen wurde peqGold TriFast[™] genutzt, eine optimierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode zur gleichzeitigen Extraktion von RNA und Proteinen.

Die Zellen wurden mit peqGold TriFast[™] geerntet, wobei die Zellen durch mehrfaches Pipettieren lysiert wurden. Im 6-Well Format wurden dabei 0,8 ml, im 24-Well Format 0,2 ml peqGold TriFast[™] eingesetzt. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei -80 °C gelagert.

Zur RNA-Isolation wurde das Kit Direct-zol[™] RNA MiniPrep Plus genutzt, da dieses sowohl eine Isolation von mRNA als auch miRNAs ermöglicht, und nach Herstellerangaben vorgegangen. Als Volumen zum Eluieren der RNA wurden jedoch, abweichend vom Herstellerprotokoll, 75 µl Nuklease-freies Wasser eingesetzt, um eine höhere Konzentration der RNA zu erreichen.

Zum Messen der RNA-Konzentration wurde eine Arbeitslösung angesetzt, die Qubit RNA Reagenz und Qubit RNA Puffer in einem Verhältnis von 1:200 enthielt. 198 µl

der Arbeitslösung wurden mit 2 µl der RNA-Proben gemischt, für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach am Qubit® Fluorometer gemessen.

Zur Qualitätsanalyse der RNA wurden die Proben gelektrophoretisch aufgetrennt, um Kontaminationen mit DNA (Desoxyribonukleinsäure) oder Degradation der RNA ausschließen zu können. Die Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm wurden mittels Nanophotometer® ermittelt.

3.3.2. Quantitative Echtzeit-PCR zur Untersuchung der Transfektionseffizienz

Versuche zur funktionellen und biologischen Relevanz der miRNA Überexpression wurden in HUVECs durchgeführt, die als *in vitro* Modellorganismus dienen. Da die Validierung der Bindung mittels Luciferase-Ansatz aber in HEK293T-Zellen stattfand, die aufgrund ihrer leichten Transfizierbarkeit ausgewählt worden waren, wurde die Transfektionseffizienz separat in HUVECs durch eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) nachgewiesen.

Um die Transfektionseffizienz der miRNA-Analoga bzw. miRNA Inhibitoren beurteilen zu können, wurden diese in HUVECs transfiziert (s. 3.1.2) und komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Dafür wurde das qScript™ microRNA cDNA Synthesis Kit genutzt. Hier werden die miRNAs zuerst polyadenyliert und anschließend unspezifisch in cDNA umgeschrieben. Die Polyadenylierung und cDNA-Synthese erfolgten nach Herstellervorgaben, es wurden 250 ng RNA pro Polyadenylierungs-Reaktion eingesetzt. Zur Bestimmung des Gehaltes von miR-103a-3p, miR-30a-5p und let-7f-2-3p relativ zu einer nicht-bindenden Negativkontrolle wurde eine qPCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green durchgeführt.

Für die qPCR wurden 12,5 µl PerfeCTa SYBR Green SuperMix (2x) und 1 µl der 1:1,6 verdünnten MicroRNA cDNA eingesetzt. Es wurden 0,5 µl der 10 µM spezifischen PerfeCTa microRNA Assay Primer für miR-103a-3p und miR-30a-5p ebenso wie ein mit der miRprimer Software (Busk 2014) entworfenen spezifischer Primer für let-7f-2-3p verwendet. Nuklease-freies Wasser wurde zu einem Gesamtvolumen von 25 µl hinzugefügt. Es erfolgte eine PCR nach Vorgaben des Herstellers auf dem LightCycler® 480 PCR-Analysesystem.

Dabei diene RNU6-2 (*RNA, U6 small nuclear*) bei der Reaktion als endogene Kontrolle (Demolli et al. 2015). Die PCR-Effizienzen der Primer für miR-103a, miR-

30a-5p, let-7f-2-3p und RNU6-2 wurden durch eine Verdünnungsreihe ermittelt. Die relative Expression wurde mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet (Pfaffl 2001).

3.3.3. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 250 ng RNA eingesetzt, ein unspezifischer Hexamerprimer hinzugefügt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 11 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Es folgte eine Denaturierung für 5 Minuten bei 65 °C, die Proben wurden direkt im Anschluss auf Eis gelagert. Danach wurden 4 μl 5x Reaktionspuffer, 2 μl 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate, 2 μl M-MuLV Reverse Transkriptase und 1 μl RiboLock RNase Inhibitor, der den Verdau durch RNasen verhindern sollte, hinzugefügt. Die folgende Inkubation lief für 5 Minuten bei 25 °C, für 60 Minuten bei 37 °C und für 5 Minuten bei 70 °C.

3.3.4. Reverse Transkriptase-PCR zur Transkriptanalyse von *CCM3*

Um die Länge der in HUVECs vorhandenen Transkripte von *CCM3* zu überprüfen, wurde zuerst cDNA aus HUVEC, HEK293T- und HeLA Zellen synthetisiert (s. 3.3.3.) Es folgte eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der jeweiligen Amplikons (Amplikon I-III) und schließlich eine Auftrennung per Gelelektrophorese.

Für die PCR wurde die OneTaq[®] DNA-Polymerase verwendet. Die PCR wurde nach Herstellervorgaben angesetzt, es wurden 2,5 μl der bereits synthetisierten cDNA eingesetzt. Zur Amplifikation wurde das in Tabelle 4 beschriebene Programm auf dem Thermocycler C1000 Touch[™] durchgeführt. Die in der Reaktion verwendeten

Tabelle 4. PCR-Programm zur Vervielfältigung von Amplikon I, II und III, Abweichungen im PCR-Programm für Amplikon III sind in fetter Schrift hervorgehoben.

Prozess	Temperatur in °C	Zeit in s	Zyklus-Anzahl
Initiale Denaturierung	94	240	
Denaturierung	94	20	40/35
Primer-Annealing	52/61	45	
Extension	68	80	
Finale Extension	68	300	

Oligonukleotide zur Vervielfältigung von Amplikon I-III sind unter Punkt 2.6.1 beschrieben.

3.3.5. Digitale PCR zum Nachweis der Herunterregulation von *CCM3*

Im Anschluss an die cDNA-Synthese von *CCM3* (s. 3.3.3) folgte die Quantifizierung der *CCM3*-Expression durch eine digitale PCR (dPCR). In der digitalen PCR werden die cDNA-Moleküle vereinzelt und in parallelen Reaktionen amplifiziert. Die verwendeten TaqMan Sonden sind sequenzspezifisch und ermöglichen die Messung einer Reporter-Fluoreszenz. Die TaqMan Sonden für *CCM3* und ein Referenzgen, *TBP* (*TATA-box binding protein*), waren mit Fluorophoren, FAM[™] respektive VIC[™] markiert. Es wurden 1,8 µl cDNA eingesetzt, 9 µl Digital PCR MasterMix, jeweils 0,9 µl FAM bzw. VIC Sonden und 5,4 µl Nuklease-freies Wasser. Die Chips für die dPCR wurden mit 14,5 µl des fertigen Ansatzes nach Herstellerangaben beladen. Die anschließende PCR erfolgte nach dem in Tabelle 5 dargestellten Programm. Die Chips wurden anschließend mit dem QuantStudio[™] 3D Digital PCR System ausgelesen und über die QuantStudio[™] 3D AnalysisSuite Cloud Software ausgewertet.

Tabelle 5. PCR-Programm zur Amplifikation von *CCM3*.

Prozess	Temperatur in °C	Zeit in s	Zyklus-Anzahl
Initiale Denaturierung	96	600	
Primer-Annealing	60	120	39
Denaturierung	98	30	
Finale Extension	60	120	

3.4. Proteinbiochemische Methoden

3.4.1. Proteinisolation

Die zuvor in Trizol geernteten (s. 3.3.1) und bei -80 °C eingefrorenen Proben wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden pro Probe jeweils 0,2 ml Chloroform hinzugefügt und die Proben für 15 Sekunden geschüttelt. Es folgte eine dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12.000 g.

Dabei bilden sich drei Phasen: Eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose Phase und eine zwischengelagerte Interphase. Die in der Phenol- und Interphase befindlichen Proteine wurden abgenommen, mit 0,3 ml 99,5 %igem Ethanol gemischt, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein LoBind Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 1 ml Isopropanol wurde hinzugegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend für 10 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Sediment zweimal in 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid gewaschen, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und jeweils 5 Minuten bei 7.500 g und 4 °C zentrifugiert. Dann wurde auf gleiche Weise mit 2 ml 99,5 %igem Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das Sediment in 100 µl 8 M Urea/2 M Thio-Urea gelöst.

Zur Konzentrationsmessung mittels des Qubit[®] Protein Assays wurde eine Arbeitslösung angesetzt, die Qubit Protein Reagenz und Qubit Protein Puffer in einem Verhältnis von 1:200 enthielt. Es wurde eine Standardreihe erstellt, indem 10 µl dreier Proteinstandards (0 ng/µl, 200 ng/µl und 400 ng/µl) mit je 190 µl der Arbeitslösung gemischt wurden.

Zur Messung der Konzentration der Proben wurden 2 µl der Proben mit 198 µl der Arbeitslösung gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend am Qubit[®] Fluorometer gemessen.

3.4.2. SDS-PAGE

Um die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse zu ermöglichen, wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dafür wurden 10 %ige TGX Stain-Free™ FastCast™ Gele nach Herstellerangaben gegossen. Für die SDS-PAGE wurden 20 µg Protein mit 4x Probenpuffer (Laemmli) gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die polymerisierten Gele wurden in einen Gelträger eingespannt, anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit 1x TGS Puffer aufgefüllt. Dann wurden die Proben und jeweils 5 µl Marker (PAGE Ruler™ Plus Prestained Protein; Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard) auf das Gel aufgetragen und für etwa 30 Minuten bei 250 V aufgetrennt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 1 Minute mit UV-Licht aktiviert. Die Komponenten der Gele reagieren dabei mit der Aminosäure Tryptophan und induzieren so Fluorophore, die kovalent an die Proteine gebunden sind. Dies ermöglicht eine spätere Messung der Fluoreszenz der Proteine und so eine Beurteilung des Proteintransfers im Western Blot.

3.4.3. Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen nach Transfer auf eine Trägermembran.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele für 15 Minuten in 1 x Transferpuffer äquilibriert. Es wurden drei Whatman-Papiere in 1 x Transferpuffer für 10 Minuten eingeweicht. Zur Aktivierung der PVDF-Membran wurde diese für 45 s in Methanol geschwenkt und anschließend für 2 Minuten in 1 x Transferpuffer gewaschen.

Der Aufbau des Blots bestand, von der Anode aus gesehen, in folgender Anordnung: ein Whatman-Papier, die PVDF-Membran, das Gel sowie dann zwei weitere Whatman-Papiere. Nach Entfernung möglicher Luftblasen wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung von 15 V für 45 Minuten vom Gel auf die Membran übertragen.

Zur Überprüfung des Transfers wurden sowohl das Gel als auch die Membran auf dem Gel Doc EZ System analysiert. Hier ermöglicht der Einsatz der aktivierten TGX

Stain-Free™ Gele eine Detektion des Gesamtproteins ohne Einfärben der Membran oder des Gels mit beispielsweise der Ponceau S bzw. Coomassie-Färbung. Die Membranen wurden dann für 60 Minuten in Blotto geschwenkt und mit primärem Antikörper (1:30.000 β -Aktin, 1:300 CCM3) in Blotto für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Blots zwei Mal für 5 Minuten in Blotto gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit sekundärem Antikörper (1:1000 Anti-Kaninchen, 1:2000 Anti-Maus in Blotto) inkubiert. Darauf folgte das Waschen in Blotto für 15 Minuten und zwei Mal 5 Minuten in A. bidest.

Die Entwicklung der Blots erfolgte nach Schütteln in 1 x AP-Puffer für 15 Minuten in frischem AP-Substrat für ca. 2 Stunden.

3.5. Statistische Auswertung

Die bei den unterschiedlichen Experimenten erhobenen Daten wurden im Hinblick auf signifikante Unterschiede analysiert. Sollte jeweils eine Kondition mit einem vorgegebenen Wert (der Negativkontrolle) verglichen werden, wurde der Einstichproben-t-Test (*one sample t-test*) genutzt. Bei mehr als zwei Konditionen wurde mittels einer Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) geprüft, ob signifikante Unterschiede der Mittelwerte vorlagen. Als Post-hoc-Test wurde der *Least significant difference* Test gewählt, der angibt, welche Mittelwerte sich signifikant voneinander unterscheiden.

Soweit nicht anders angegeben, sind alle Daten als Mittelwert und mit Standardabweichung (SD) dargestellt.

Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ erachtet, die mit einem * in Abbildungen gekennzeichnet werden. Hochsignifikante p-Werte $< 0,01$ werden mit **, höchstsignifikante p-Werte $< 0,001$ werden mit *** dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. *In silico* Identifizierung und Charakterisierung von putativ an *CCM3* bindenden miRNAs

Um die vermutete Regulation von *CCM3* durch miRNAs zu untersuchen, wurden zunächst putativ an die 3'-UTR von *CCM3* bindende miRNA-Kandidaten mittels *in silico* Vorhersageprogrammen identifiziert, die in einem weiteren Schritt auf Grundlage der Ergebnisse von Literatur- und Datenbankrecherchen priorisiert wurden. Zusätzlich vorhergesagte miRNA-Bindungsstellen und Expressionsprofile der miRNAs wurden hier bei der Auswahl berücksichtigt. Zur Berechnung der jeweiligen Bindungswahrscheinlichkeiten dienten die *in silico* Suchalgorithmen TargetScan 7.1, DIANA-microT-CDS und miRmap. Hierbei gehörten miR-30a-5p und let-7f-2-3p zu den am wahrscheinlichsten an *CCM3* bindenden miRNAs. Von den Suchalgorithmen wurde zusätzlich eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit für miR-103a-3p angegeben. Die Bindung dieser miRNA an die 3'-UTR von *CCM3* wurde bereits im Rahmen von Untersuchungen in Prostatakarzinomzelllinien nachgewiesen (Fu et al. 2016) und diente daher in den folgenden Experimenten als Positivkontrolle. Die genannten Suchalgorithmen geben die Bindungswahrscheinlichkeiten als Zahlenwert einer Punkteskala (Score) an, die sich aufgrund der jeweils unterschiedlichen Bewertungskriterien und Berechnungsstrategien unterscheidet. So sagt im TargetScan Context++ Score ein möglichst niedriger Wert eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit voraus, im DIANA miTG Score liegt der Höchstwert bei 1 und im miRmap Score bei 100. Die hohen Werte im DIANA miTG Score und miRmap Score geben eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit an (s. Tabelle 6).

Tabelle 6. *In silico* Berechnungen zur Bindungswahrscheinlichkeit der Kandidaten-miRNAs an die 3'-UTR von *CCM3*.

	miR-103a-3p	miR-30a-5p	let-7f-2-3p
TargetScan Context Score ++	- 0,65	- 0,31	- 0,49
DIANA miTG Score	0,84	0,73	0,99
miRmap Score	91,87	74,88	90,8

Zusätzlich wurden wesentliche Kriterien zur Beurteilung der Bindungswahrscheinlichkeit wie die Komplementarität zwischen der miRNA und ihrem Zielgen sowie der Grad der Konservierung bestimmt. Für alle Kandidaten-miRNAs wurde die Komplementarität zu ihren jeweiligen Zielsequenzen in der 3'-UTR von *CCM3* als hoch eingestuft. Die Bindungsstelle von miR-103a-3p und let-7f-2-3p wurde dabei als eine 8mer-, die von miR-30a-5p als eine 7mer-A1-Bindungsstelle klassifiziert. In Abbildung 5 sind die Bindungsstellen der miRNAs in *CCM3*-Sequenzen verschiedener Spezies dargestellt.

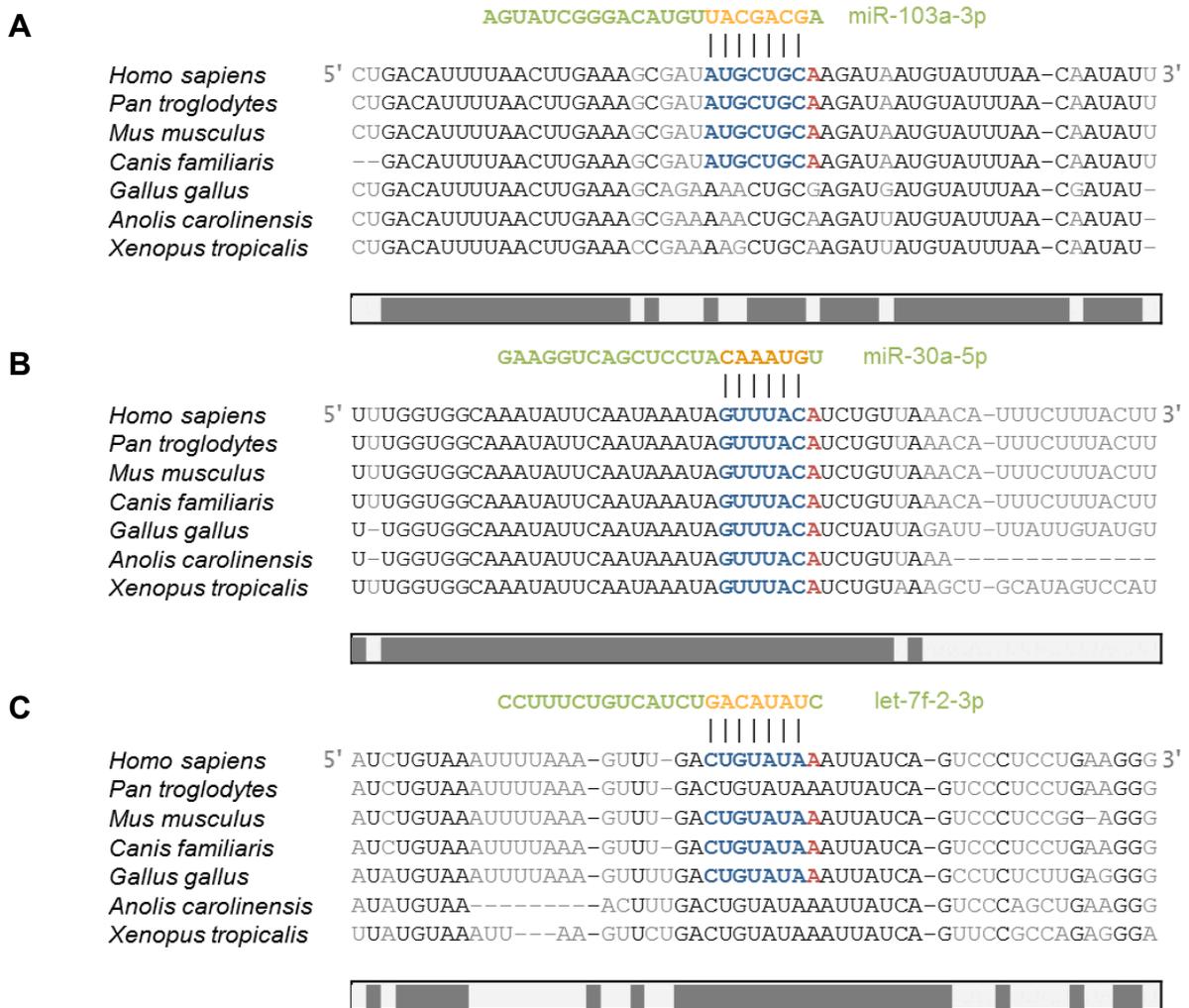


Abbildung 5. Klassifizierung der Bindungsstellen der Kandidaten-miRNAs in der 3'-UTR von *CCM3*. Die Bindungsstellen der miRNAs (**A**) miR-103a-3p, (**B**) miR-30a-5p und (**C**) let-7f-2-3p in der 3'-UTR von *CCM3* sind schematisch dargestellt. Die Bindungsstelle in der *CCM3*-Sequenz ist blau, die jeweiligen miRNAs sind in grün dargestellt. Das Adenin, das zu den Eigenschaften der 8mer- bzw. 7mer-A1-Bindungsstelle gehört, ist rot markiert, während die *Seed*-Sequenz der miRNAs in orange hervorgehoben ist. Die Konservierung zwischen ausgewählten Spezies ist gezeigt. Die zwischen den Spezies konservierten Sequenzbereiche werden durch dunkelgraue Balken verdeutlicht. Die Bindungsstellen von miR-103a-3p und miR-30a-5p in der 3'-UTR von *CCM3* gelten als hoch konserviert, die Bindungsstelle von let-7f-2-3p als weniger konserviert. Die Darstellung ist adaptiert nach TargetScan 7.1 und Lewis et al. (2005).

Alle ausgewählten miRNAs zeigten hier einen hohen Konservierungsgrad, die Bindungsstelle von miR-30a-5p wies die höchste Konservierung unter den ausgewählten Vertebraten auf. Eine weitere Möglichkeit zur Einstufung der Konservierung ist der Branch Length Score, der den Konservierungsgrad als Zahlenwert angibt (Friedman et al. 2009). Hier gelten für 8mer-Bindungsstellen Werte über 1,8 als hoch konserviert (miR-103a-3p: 3,47; let-7f-2-3p: 0,91), für 7mer-A1-Bindungsstellen liegt der Grenzwert bei 3,6 (miR-30a-5p: 4,99). Die Bindungsstellen für miR-103a-3p und miR-30a-5p konnten somit als hochkonserviert charakterisiert werden, während die Bindungsstelle für let-7f-2-3p als weniger konserviert gilt.

4.2. Validierung der Bindungsstellen von miR-30a-5p und let-7f-2-3p in der 3'-UTR von *CCM3*

Um die bioinformatisch vorhergesagte Bindung der miRNAs miR-30a-5p und let-7f-2-3p an die 3'-UTR von *CCM3* experimentell zu bestätigen, wurde ein Luciferase-Reportergen-Ansatz gewählt. Zum Nachweis der Interaktion diente hierbei ein Reporterplasmid, das neben einem *Renilla*-Luciferase-Reportergen auch die 3'-UTR von *CCM3* enthielt (s. Abbildung 6).

Die in der Literatur in einem anderen Luciferase-System bereits beschriebene Bindung von miR-103a-3p an die 3'-UTR von *CCM3* konnte in dem hier gezeigten

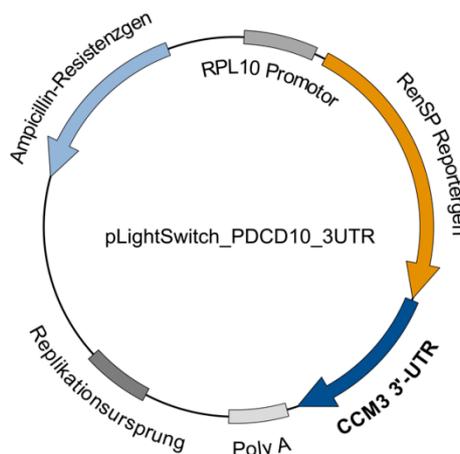


Abbildung 6. Schematische Darstellung des *CCM3* 3'-UTR-Reporterplasmids. Das RenSP (*Renilla*) Reportergen kodiert für ein Luciferase-Enzym, das stromabwärts eines Promotors für das Haushaltsgen *RPL10* (*Ribosomal protein L10*) eingefügt ist. Die in der Luciferase-Reaktion freiwerdende Biolumineszenz kann mit einem Luminometer gemessen werden und gibt Aufschluss über die Expression des Reporter-Fusionsgens.

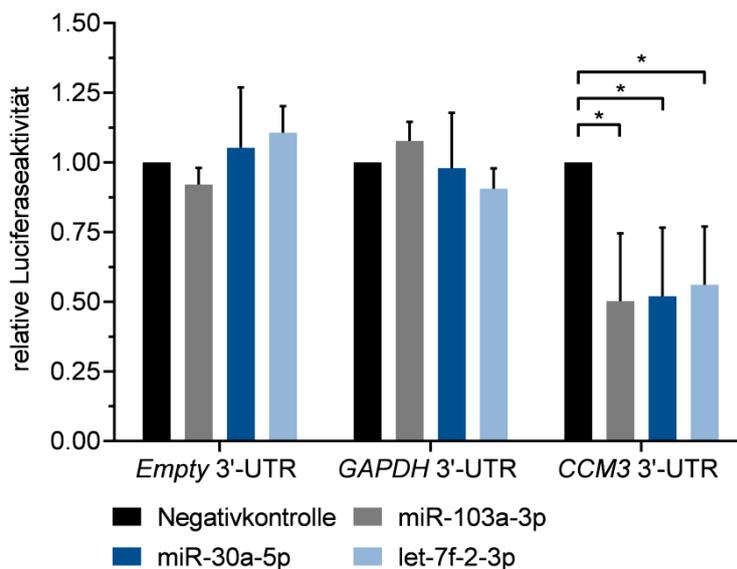


Abbildung 7. Die miR-30a-5p und let-7f-2-3p binden an die 3'-UTR von *CCM3*. Die relative Luciferaseaktivität wurde nach Co-Transfektion des jeweiligen miRNA-Analogons mit einem *CCM3* 3'-UTR-Reporterplasmid oder mit zur Normalisierung mitgeführten Kontrollplasmiden (3'-UTR *Empty* bzw. *GAPDH*) ausgewertet. Die Co-Transfektion der miRNA-Analoga und der Kontrollplasmide führte zu keiner signifikanten Veränderung. Es sind Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, * $p < 0,05$. Das Experiment wurde in 4 unabhängigen Ansätzen wiederholt ($n = 4$).

Luciferase-Reportergen-Ansatz bestätigt werden (s. Abbildung 7).

Nach Transfektion des *CCM3* 3'-UTR-Reporterplasmids und der Positivkontrolle miR-103a-3p wurde die relative Luciferaseaktivität des *CCM3* 3'-UTR-Reporterplasmids erwartungsgemäß signifikant um 50 % (SD = 24 %; $p = 0,03$) verringert, die relative Luciferaseaktivität nach Transfektion der beiden Kontrollplasmide *Empty* 3'-UTR und *GAPDH* 3'-UTR wurde durch die Co-Transfektion des miR-103a-3p-Analogons nicht signifikant beeinflusst ($p > 0,05$).

Nach jeweiliger Co-Transfektion des miR-30a-5p oder let-7f-2-3p-Analogons mit dem *CCM3* 3'-UTR-Reporterplasmid wurde eine signifikante Herunterregulation der relativen Luciferaseaktivität auf etwa die Hälfte gemessen. Bei Transfektion des miR-30a-5p-Analogons sank diese auf 52 % (SD = 25 %; $p = 0,03$), bei let-7f-2-3p auf 56 % (SD = 21 %; $p = 0,02$). Die relative Luciferaseaktivität der beiden Kontrollplasmide wurde durch die Co-Transfektion der jeweiligen miRNAs nicht verändert ($p > 0,05$). Die Bindung der miR-30a-5p und let-7f-2-3p an die 3'-UTR von *CCM3* konnte somit bestätigt werden.

4.3. Analyse der in HUVECs exprimierten Transkript-Varianten von *CCM3*

Für *CCM3* sind multiple, wahrscheinlich gewebsspezifische exprimierte Transkript-Varianten beschrieben, die sich unter anderem in der Länge ihrer 3'-UTRs unterscheiden. Nach Literaturrecherchen und Abgleich mit öffentlich zugänglichen Daten aus RNA-Sequenzierungen (RNASeq) für verschiedene Zelllinien konnte im Vorfeld der dargestellten Untersuchungen keine sichere Aussage über das *CCM3*-Haupttranskript und die entsprechende Länge der 3'-UTR von *CCM3* in HUVECs gemacht werden, da hier in einigen Fällen längere, in anderen bisher ausschließlich kürzere *CCM3*-Transkripte nachgewiesen wurden.

Da die vorhergesagten Bindungsstellen von miR-103a-3p, miR-30a-5p und let-7f-2-3p relativ weit distal des Stoppkodons liegen, ist eine Regulation der *CCM3*-Expression über die jeweiligen miRNAs wahrscheinlich nur für längere Transkript-Varianten anzunehmen, nicht jedoch für kürzere Transkripte, in denen die Bindungsstellen in der 3'-UTR nicht mehr vorliegen. Um die Expression der Zieltranskripte in den in nachfolgenden Experimenten verwendeten HUVECs aufzuklären, wurde deshalb zunächst eine *CCM3*-Transkriptanalyse durchgeführt. HEK293T- und HeLa-Zellen sollten nach RNASeq-Daten erwartungsgemäß die langen Transkripte von *CCM3* exprimieren, in denen die Bindungsstellen der Kandidaten-miRNAs liegen. Daher dienten diese Zelllinien als Positivkontrollen.

Für die Überprüfung der Transkriptlänge wurde aus allen Zellen RNA isoliert und aus dieser cDNA synthetisiert, die dann in einer PCR-Reaktion spezifisch für *CCM3* amplifiziert wurde. Dabei wurde die Lokalisation der Primer so ausgewählt, dass sich drei Amplikons ergaben, von denen die Amplikons II und III alle Bindungsstellen der Kandidaten-miRNAs beinhalteten (s. Abbildung 8 A). In HUVECs, wie auch in HEK293T- und HeLa-Zellen konnten Transkripte nachgewiesen werden, die alle Bindungsstellen der zu untersuchenden miRNAs enthielten (s. Abbildung 8 B).

Kontroll-miRNA transfizierten Zellen zu überprüfen. Die Expression der kleinen RNA RNU6-2 wurde hier zur Normalisierung der Werte genutzt. Bei der Berechnung der relativen Expression wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nach Pfaffl (2001) angewendet.

Nach Transfektion der miRNA-Analoga stieg die jeweilige relative miRNA-Expression stark an. Nach Transfektion des miR-103a-3p Analogons war sie auf das etwa 4200-Fache erhöht (SD = 469,5; $p < 0,004$). Bei miR-30a-5p stieg sie auf das etwa 1000-Fache (SD = 299,9; $p = 0,03$), bei let-7f-2-3p auf das etwa 800-Fache (SD = 91,6; $p = 0,005$) (s. Abbildung 9).

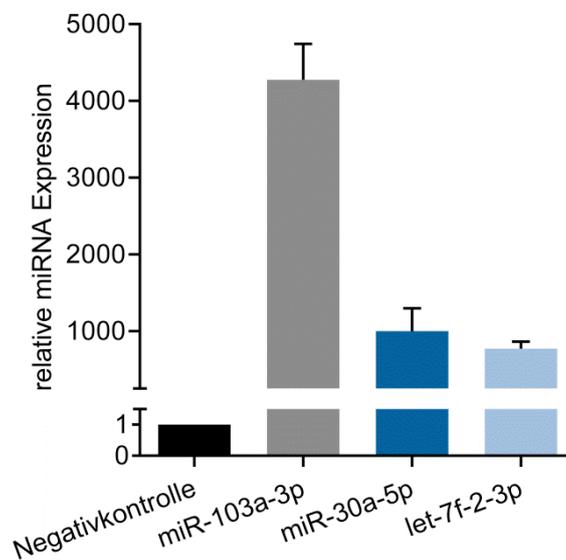


Abbildung 9. HUVECs konnten erfolgreich mit miRNA-Analoga transfiziert werden. Die Expression von miR-103a-3p, miR-30a-5p und let-7f-2-3p nach Transfektion der jeweiligen miRNA-Analoga ist relativ zur Negativkontrolle dargestellt. Zur Normalisierung diente die Expression der kleinen RNA RNU6-2 (NR_002752.1). Es sind Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Das Experiment wurde in 3 unabhängigen Ansätzen durchgeführt ($n = 3$).

4.5. Sprossverhalten von HUVECs nach miRNA-Analoga Behandlung

Zur Untersuchung der Auswirkungen der miRNA-Analoga auf die Angiogenese wurden HUVECs in Sphäroiden kultiviert, in einer Collagenmatrix eingebettet und unterschiedlichen Wachstumsstimuli (VEGF-A und FGF-2) ausgesetzt. In dem gewählten Sphäroid-basierten Sprossungs-Experiment sind sowohl das Sprossverhalten, als auch teilweise Migration, Proliferation und die Bildung kapillarähnlicher Strukturen durch Ausmessung der Sprosse pro Sphäroid zu

beurteilen. Abbildung 10 zeigt eine exemplarische Darstellung aus einem Experiment. Die Sprossanzahl und mittlere Sprosslänge pro Sphäroid nach Transfektion der miRNA-Analoga wurde mit der Negativkontrolle unter den jeweiligen Stimulationsbedingungen verglichen.

Für die miR-103a-3p konnte ein Einfluss der Analoga-Transfektion nicht unter allen Konditionen statistisch abgesichert werden. Unter Basalstimulation waren im Vergleich zur Negativkontrolle 43,6 % mehr Sprosse pro Sphäroid (Negativkontrolle: 3,67 vs. miR-103a-3p: 5,27; $p = 0,02$) messbar. Nach Stimulation mit VEGF-A war die Sprossanzahl um 21,5 % (8,87 vs. 10,77; $P = 0,09$), nach FGF-2 Stimulation um 37 % (9,23 vs. 12,63; $p = 0,03$) erhöht. Die mittlere Sprosslänge pro Sphäroid waren um 61,4 % (94,6 μm vs. 152,7 μm ; $p = 0,1$), 79,3 % (192,4 μm vs. 344,9 μm ; $p = 0,06$) beziehungsweise 64,38 % (291,6 μm vs. 479,3 μm ; $p = 0,0502$) unter den

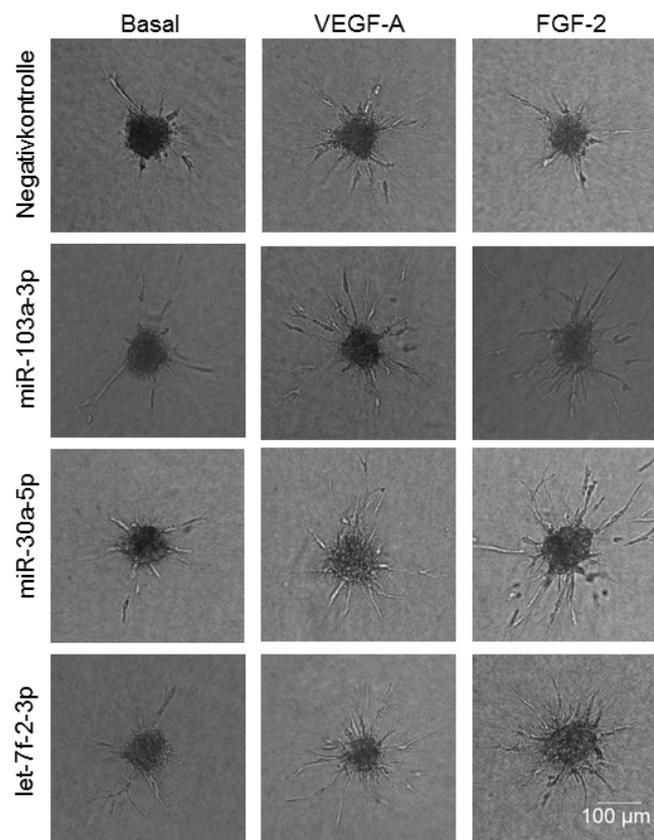


Abbildung 10. Lichtmikroskopische Aufnahmen der in Sphäroiden kultivierten HUVECs. HUVECs wurden mit miR-103a-3p, miR-30a-5p, let-7f-2-3p Analoga oder einer nicht-bindenden miRNA transfiziert und in Sphäroiden kultiviert. Die Anzahl und Länge der Sprosse pro Sphäroid wurde unter den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen gemessen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm , die Bilder wurden in 10x Vergrößerung aufgenommen.

jeweiligen Stimulationsbedingungen erhöht. Signifikante Werte erreichte hier ausschließlich die Steigerung der Sprossanzahl unter basalen Kulturbedingungen und unter Stimulation mit FGF-2. Die anderen Stimulationsbedingungen waren nicht signifikant (hohe Werte bei Standardabweichungen).

Die mit miR-30a-5p transfizierten HUVECs zeigten übereinstimmend sowohl eine signifikant erhöhte Anzahl an Sprossen als auch eine signifikante Zunahme der mittleren Sprosslänge pro Sphäroid. Die Sprossanzahl pro Sphäroid war bereits unter Basalstimulation um 65,4 % im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht (Negativkontrolle: 3,67 vs. miR-30a-5p: 6,07; $p = 0,002$). Auch unter VEGF-A Gabe zeigte sich eine um 35,7 % höhere Sprossanzahl (8,87 vs. 12,03; $p = 0,012$). Unter der FGF-2 Stimulation erfolgte eine Erhöhung um 51,6 % (9,23 vs. 14; $p = 0,006$). In Übereinstimmung mit der vermuteten Proangiogenität von miR-30a-5p war auch die mittlere Sprosslänge pro Sphäroid nach Transfektion des Analogons unter den jeweiligen Bedingungen um jeweils 97,1 % (94,6 μm vs. 186,5 μm ; $p = 0,02$), 98,5 % (192,4 μm vs. 382 μm ; $p = 0,03$) und 64,8 % (291,6 μm vs. 480,6 μm ; $p = 0,049$) im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht. Alle beschriebenen Parameter erreichten in den statistischen Betrachtungen ein Signifikanzniveau.

Ein ähnliches, jedoch überwiegend nicht signifikantes Bild zeigte sich auch nach Transfektion mit dem synthetischen Analogon von let-7f-2-3p. Sphäroide der transfizierten HUVECs wiesen unter basalen Kulturbedingungen eine Steigerung der Sprossanzahl pro Sphäroid um 44,5 % (Negativkontrolle: 3,67 vs. let-7f-2-3p: 5,3; $p = 0,02$) auf. Unter Stimulation mit VEGF-A bzw. FGF-2 war eine Zunahme um 14,7 % (8,87 vs. 10,17; $p = 0,2$) bzw. um 19,5 % (9,23 vs. 11,03; $p = 0,2$) zu verzeichnen.

Die Länge der Sprosse pro Sphäroid stieg unter den jeweiligen Stimulationsbedingungen um 67 % (94,6 μm vs. 158 μm ; $p = 0,08$), um 69,1 % (192,4 μm vs. 325,4 μm ; $p = 0,09$) bzw. um 43,9 % (291,6 μm vs. 419,7 μm ; $p = 0,15$) an. Einen signifikanten Anstieg der Länge erreichte hierbei ausschließlich die Steigerung der Sprossanzahl unter basalen Kulturbedingungen (s. Abbildung 11), bei anderen Bedingungen waren die Steigerungen wegen der zu hohen Werte bei Standardabweichungen nicht signifikant.

Das Experiment wurde auch bei einer Wachstumsfaktorkonzentration von jeweils 25 ng/ml durchgeführt, die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (s. 8.3)

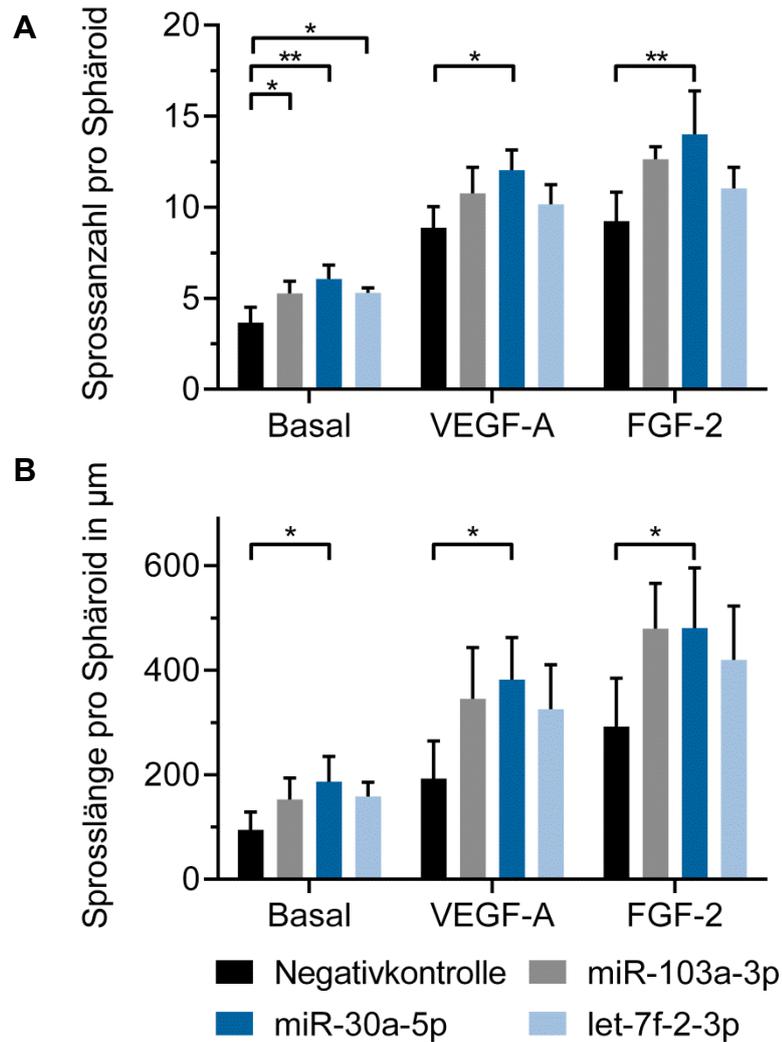


Abbildung 11. (A) Sprossanzahl und **(B)** mittlere Sprosslänge von HUVEC-Sphäroiden nach Transfektion von miR-103a, miR-30a-5p oder let-7f-2-3p Analoga. MiR-30a-5p zeigte den stärksten Einfluss auf das Sprossverhalten und erhöhte die erhobenen Parameter unter allen Stimuli signifikant bis hochsignifikant. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Das Experiment wurde in 3 unabhängigen Versuchen wiederholt ($n = 3$).

4.6. Einfluss der miRNA-Analoga auf die Migration von HUVECs

Um die Auswirkungen einer Überexpression der miRNAs auf die Migration von HUVECs zu untersuchen, wurde ein sogenannter *Scratch-wound*-Versuch durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer nicht-bindenden Kontroll-miRNA oder dem jeweiligen miRNA-Analoga transfiziert und eine freie Fläche in den Zellrasen geschabt. Das Zuwachsen der freien Fläche ist exemplarisch dargestellt in Abbildung 12.

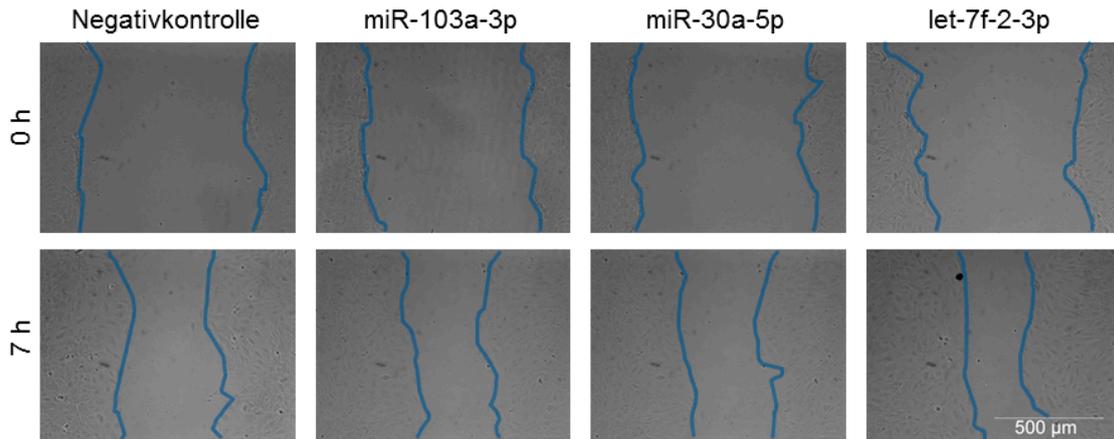


Abbildung 12. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Migration von HUVECs nach miRNA-Analoga Transfektion. Das Zuwachsen der freien Fläche in der adhären Zellschicht wurde direkt (0 h) und 7 Stunden (7 h) nach dem Freischaben lichtmikroskopisch dokumentiert. Die Migrationsfront der HUVECs ist durch eine blaue Linie hervorgehoben. Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm, die Bilder wurden mit einer 10x Vergrößerung aufgenommen

Sowohl miR-103a-3p als auch miR-30a-5p zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle eine geringfügig aber signifikant erhöhte Migration der HUVECs. Die Transfektion mit miR-103a-3p-Analogen erhöhte die Migration der Zellen um 10,7 % (SD = 7 %; $p = 0,047$). Mit miR-30a-5p-Analogen transfizierte HUVECs wiesen eine um 10,2 % (SD = 6 %; $p = 0,04$) gesteigerte Migration auf. Nach Transfektion mit dem let-7f-2-3p-Analogen konnte keine signifikant schnellere Migration gemessen werden (Mittelwert = 12,1 %; SD = 9 %; $p = 0,08$) (s. Abbildung 13).

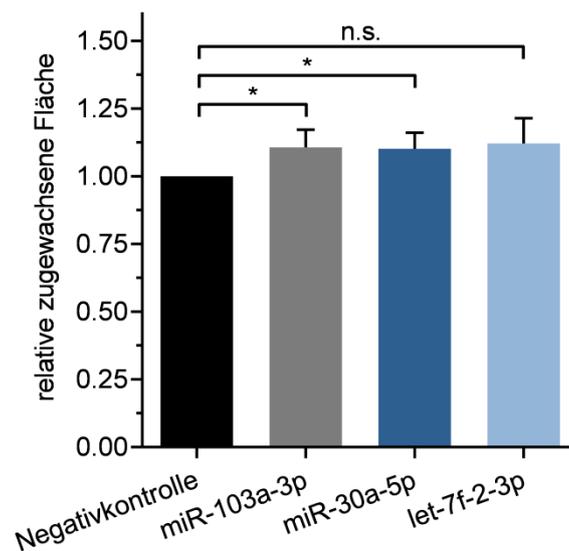


Abbildung 13. Die Transfektion der miRNA-Analoga führte zu einer erhöhten Migration von HUVECs. Eine um etwa 10 % vermehrte Migration nach miRNA-Analoga Transfektion im Vergleich zur Negativkontrolle ist zu beobachten. Die Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt, * $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant. Das Experiment wurde in 4 unabhängigen Ansätzen wiederholt ($n = 4$).

4.7. CCM3-Expression nach Transfektion der miRNA-Analoga

Nach dem Nachweis der Fähigkeit von miR-30a-5p und let-7f-2-3p an die 3'-UTR von CCM3 zu binden, sollten die Auswirkungen der Transfektion der jeweiligen miRNA-Analoga auf die Expression von CCM3 auf Ebene der mRNA in HUVECs untersucht werden.

Die Expression von CCM3 wurde in mit Kontroll-miRNA oder mit miRNA-Analoga transfizierten Zellen mittels einer dPCR gemessen und verglichen. Die miR-103a-3p führte zu einer signifikanten, aber insgesamt eher geringfügigen Herunterregulation auf 74 % (SD = 15 %; $p = 0,04$). Nach Transfektion des let-7f-2-3p-Analogons sank die relative Expression von CCM3 auf 82 % (SD = 7 %; $p = 0,015$). Die relative CCM3-Expression wurde durch miR-30a-5p nicht signifikant verändert (Mittelwert = 79 %; SD = 16 %; $p = 0,09$) (s. Abbildung 14).

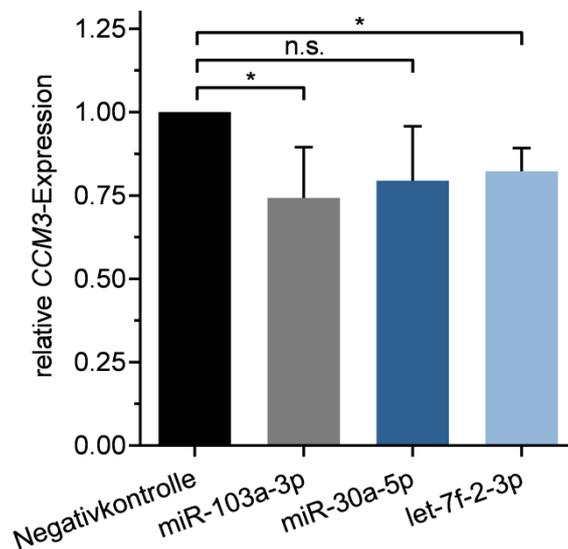


Abbildung 14. Relative CCM3-Expression nach Transfektion von miR-103a-3p, miR-30a-5p und let-7f-2-3p Analoga. Die CCM3-Expression der mit miRNA-Analoga transfizierten HUVECs ist relativ zur Negativkontrolle dargestellt. TBP diente als Referenzgen zur internen Normalisierung. Es sind Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, * $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant. Das Experiment wurde in 4 unabhängigen Ansätzen wiederholt ($n = 4$).

4.8. Effekt der miRNA-Analoga Transfektion auf die CCM3 Proteinexpression

Um auch den Einfluss der Kandidaten-miRNAs auf die Protein-Expression von CCM3 untersuchen zu können, wurde zum Proteinnachweis ein Western Blot durchgeführt. Nach Transfektion der miRNA-Analoga wurde die CCM3-Proteinexpression relativ zum Gesamtprotein ermittelt und mit einer nicht-bindenden Kontroll-miRNA verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Proteinexpression nach Transfektion des miR-103a-3p Analogons signifikant auf 64,8 % (SD = 17,3 %; $p = 0,03$), nach Transfektion von let-7f-2-3p höchstsignifikant auf 48,4 % (SD = 9,3 %; $p = 0,0016$) abfiel. Nach Transfektion des miR-30a-5p Analogons konnte keine signifikante Reduktion des CCM3 Proteins festgestellt werden (Mittelwert = 64,7 %; SD = 34,1 %; $p = 0,12$) (s. Abbildung 15).

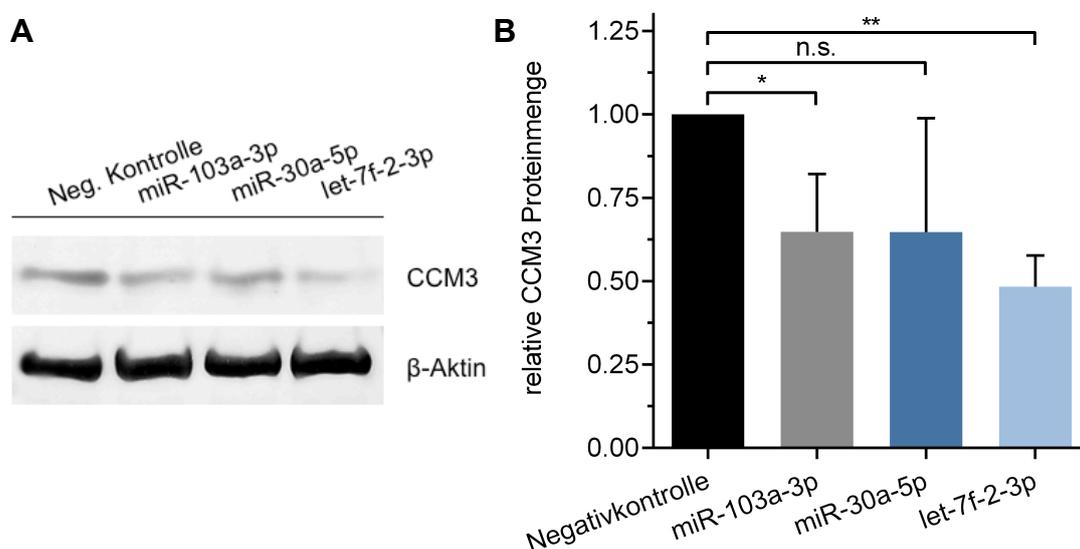


Abbildung 15. (A) Exemplarische Darstellung des durchgeführten Western Blots. Gezeigt sind die Banden des CCM3 Proteins und β -Aktin, das als Ladekontrolle diente. **(B)** Die relative Proteinmenge nach Transfektion der miRNA-Analoga. Die Proteinmenge sank nach Transfektion der miR-103a-3p und let-7f-2-3p Analoga signifikant, nach Transfektion der miR-30a-5p tendenziell. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s. nicht signifikant. Das Experiment wurde in 4 unabhängigen Ansätzen durchgeführt ($n = 4$).

4.9. Auswirkungen der Inhibition von miR-30a-5p in HUVECs

Da für die miR-30a-5p bereits ein hoher Expressionsgrad in HUVECs beschrieben wurde (Heusschen et al. 2010; Suarez et al. 2007), ergab sich die Möglichkeit, diese miRNA spezifisch durch einen Inhibitor zu hemmen. Dadurch konnten Effekte für eine vermutete Regulation von *CCM3* durch miR-30a-5p auf mRNA- und Proteinebene in einem unabhängigen Ansatz analysiert werden. Die miRNA let-7f-2-3p war für eine Inhibitor-Versuchsreihe hingegen nicht geeignet, da sie in HUVECs nur sehr gering exprimiert wird. Zur Hemmung von miR-30a-5p wurde ein Inhibitor verwendet, der als modifiziertes Oligonukleotid einen Komplex mit der reifen miR-30a-5p bildet und so deren Interaktion mit ihrem Zielgen verhindert (Lennox et al. 2013). Wie bei den vorhergegangenen Versuchen mit miRNA-Analoga wurde zuerst die Transfektionseffizienz des miR-30a-5p Inhibitors untersucht. Die Überprüfung der Transfektionseffizienz erfolgte mittels einer qPCR. Die relative Expression von miR-30a-5p wurde nach Transfektion des miR-30a-5p Inhibitors mit der Negativkontrolle verglichen. Die relative miR-30a-5p Transkriptmenge konnte durch den miR-30a-5p-Inhibitor um 34,4 % (SD = 14 %; $p = 0,048$) verringert werden (s. Abbildung 16).

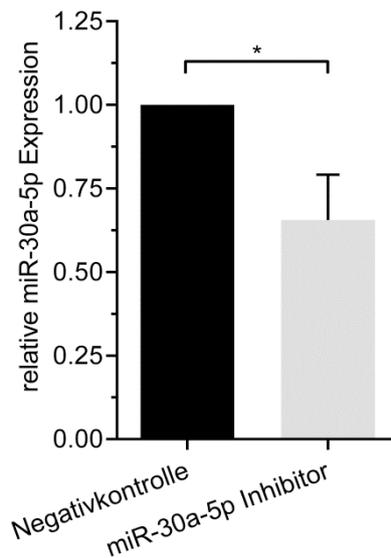


Abbildung 16. HUVECs wurden erfolgreich mit miR-30a-5p Inhibitor transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels einer qPCR überprüft. HUVECS wurden mit dem miR-30a-5p Inhibitor transfiziert, und die relative miR-30a-5p Transkriptmenge mit einer Negativkontrolle verglichen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung, * $p < 0,05$. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt ($n = 3$).

Um die Auswirkung der Inhibition von miR-30a-5p auf die Angiogenese zu untersuchen, wurde das Sprossverhalten von in Sphäroiden kultivierten HUVECs untersucht. Abbildung 17 zeigt beispielhaft HUVEC-Sphäroide, die unter basalen, VEGF-A oder FGF-2 Stimulationsbedingungen mit dem miR-30a-5p Inhibitor behandelt wurden. Die Transfektion des miR-30a-5p Inhibitors führte sowohl zu einer signifikanten Verringerung der Sprossanzahl als auch der mittleren Sprosslänge pro Sphäroid (s. Abbildung 18 A und B). Die Sprossanzahl pro Sphäroid war unter basalen Kulturbedingungen hochsignifikant auf 61 % (Negativkontrolle: 2,9 vs. miR-30a-5p Inhibitor: 1,77; $p = 0,009$) gesunken. Nach Stimulation mit VEGF-A verringerte sich die Sprossanzahl pro Sphäroid höchstsignifikant auf 50,2 % (7 vs. 3,5; $p = 0,0007$). Unter FGF-2 Stimulation war eine hochsignifikante Reduktion der Sprossanzahl pro Sphäroid auf 55,3 % (8,2 vs. 4,5; $p = 0,007$) zu verzeichnen. Die mittlere Sprosslänge pro Sphäroid zeigte unter basalen Konditionen eine hochsignifikante Verringerung auf 52,7 % (66,1 μm vs. 34 μm ; $p = 0,002$) und unter VEGF-A Stimulation ein höchstsignifikantes Absinken auf 44,4 % (168 μm vs. 74,67 μm ; $p = 0,0004$). Nach Stimulation mit FGF-2 sank die mittlere Sprosslänge pro Sphäroid auf 44,5 % (243,1 μm vs. 108,1 μm ; $p = 0,02$). Das Sprossverhalten nach Stimulation mit einer Wachstumsfaktorkonzentration von 25 ng/ml wird im Anhang dargestellt (s. 8.3).

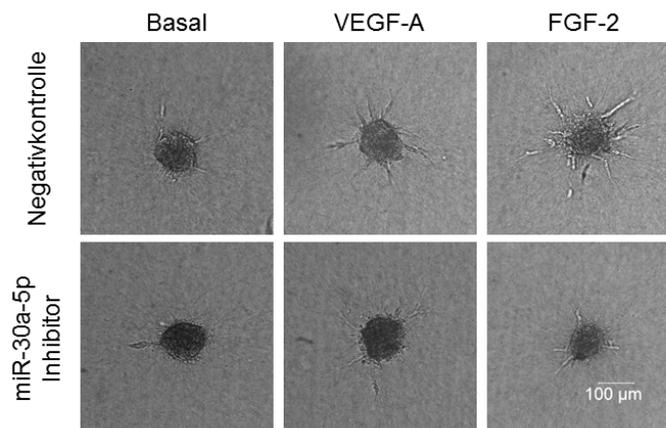


Abbildung 17. Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit dem miR-30a-5p Inhibitor oder nicht-bindendem Inhibitor behandelten HUVECs. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm , die Bilder wurden mit einer 10x Vergrößerung aufgenommen.

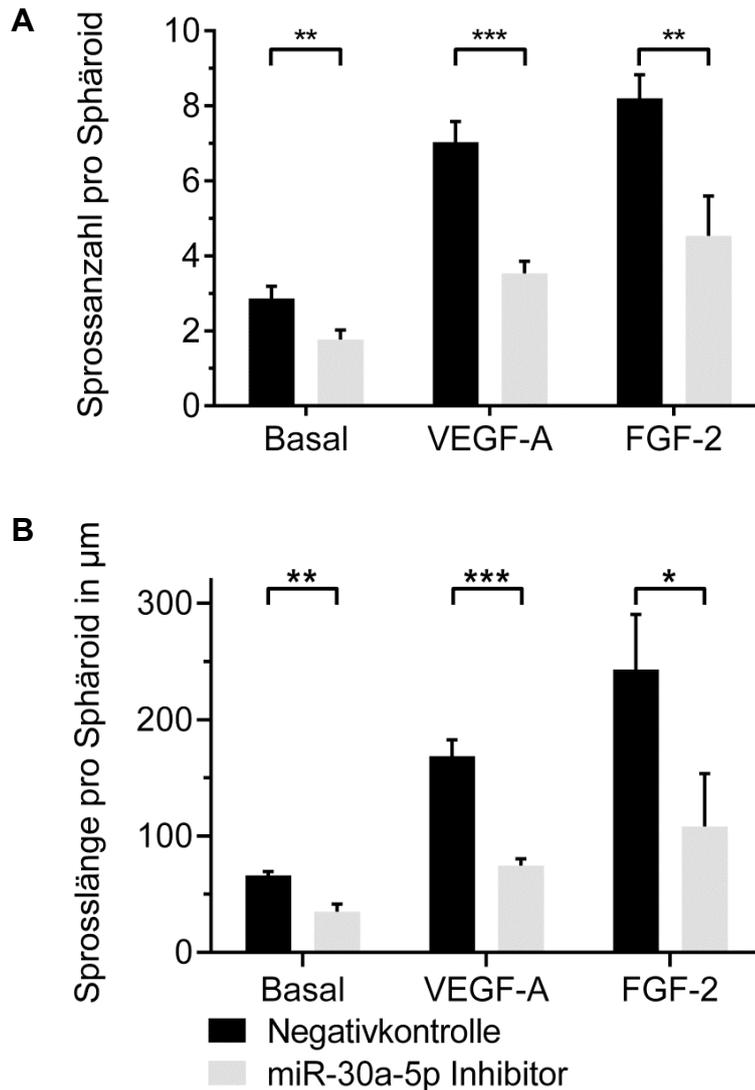


Abbildung 18. (A) Sprossanzahl und (B) mittlere Sprosslänge von HUVEC-Sphäroiden waren nach Transfektion des miR-30a-5p Inhibitors verringert. Die mit dem miR-30a-5p Inhibitor transfizierten HUVECs zeigten eine deutlich reduzierte Anzahl und Länge der Sprosse pro Sphäroid. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Durchgängen wiederholt ($n = 3$).

Die Analyse der Auswirkungen der Transfektion des miR-30a-5p Inhibitors auf die relative *CCM3*-Expression erfolgte durch eine dPCR. Dabei konnte durch den miR-30a-5p Inhibitor keine Veränderung der relativen *CCM3*-Expression beobachtet werden. Nach Transfektion des Inhibitors lag die relative *CCM3*-Transkriptmenge bei einem Mittelwert von 95,9 % (SD = 11,4 %; $p = 0,59$) verglichen mit einem nicht-bindenden Inhibitor (s. Abbildung 19 A). Auf Proteinebene führte die Transfektion des miR-30a-5p Inhibitors zu einer Steigerung von *CCM3*. Dabei stieg die relative Proteinmenge von *CCM3* auf etwa das Dreifache (Mittelwert = 2,8; SD = 1,46; $p = 0,026$) an, verglichen mit der Negativkontrolle (s. Abbildung 19 B und C).

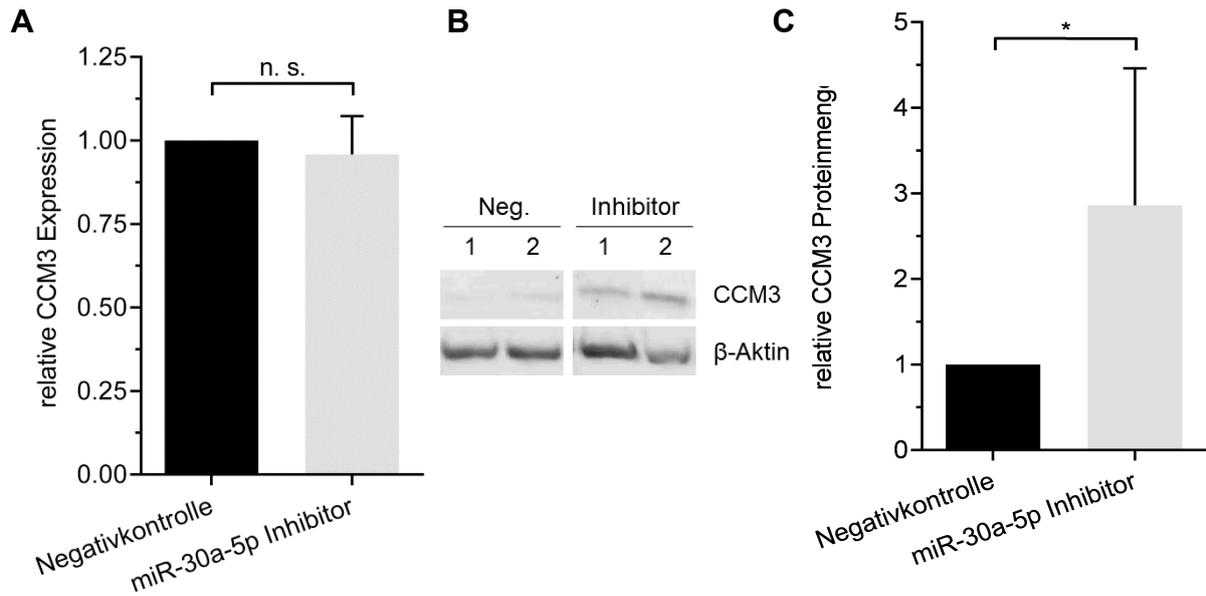


Abbildung 19. (A) Relative Expression von *CCM3* nach Transfektion mit miR-30a-5p Inhibitor. Die Expression von *CCM3* nach Transfektion mit dem miR-30a-5p Inhibitor ist relativ zur Negativkontrolle dargestellt. Nach Transfektion des Inhibitors ist kein Expressionsunterschied von *CCM3* zu sehen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung, n.s. nicht signifikant. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt (n = 3). **(B)** Relative Proteinmenge nach Transfektion von HUVECs mit einem miR-30a-5p Inhibitor. Eine exemplarische Darstellung von zwei unabhängigen Transfektionen ist zu sehen. Gezeigt sind die jeweilige Negativkontrolle (Neg.) und der miR-30a-5p Inhibitor. β-Aktin diente als Ladekontrolle. **(C)** Nach Transfektion des miR-30a-5p Inhibitors ist die relative *CCM3* Proteinmenge erhöht. Der Mittelwert und die Standardabweichung sind dargestellt, * p < 0,05. Das Experiment wurde in insgesamt 6 unabhängigen Versuchen wiederholt (n = 6).

5. Diskussion

5.1. Stellenwert der miRNAs im Kontext einer pathologischen Angiogenese

CCM3 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das unter anderem die Angiogenese reguliert (Schleider et al. 2011; Uhlen et al. 2015). Eine Dysregulation der Angiogenese trägt zur Kavernomentstehung bei und ist so von besonderer Relevanz für diese Erkrankung (Fischer et al. 2013). Auch im Rahmen der Tumorbildung wird angenommen, dass eine pathologische Angiogenese eine wesentliche Rolle spielt (Rouhi et al. 2010). Obwohl die Beteiligung von CCM3 an mehreren Signalwegen bereits bekannt ist (s. 1.2) machen das jüngere Erkrankungsalter, die höhere Blutungsrate der Kavernome bei *CCM3*-Mutationsträgern und das Fehlen einer kausalen Therapie die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen dieses Gens deutlich. Dabei ist unter anderem die posttranskriptionale Regulation des Gens von Interesse. Diese kann durch miRNAs erfolgen. Die Regulation einer Vielzahl von Genen durch miRNAs ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Wie bereits in der Einleitung aufgeführt (s. 1.6-1.8), beeinflussen miRNAs sowohl die Karzinogenese, Angiogenese als auch die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. Seit ihrer Entdeckung 1993 sind bis heute 2588 miRNAs im Menschen identifiziert worden (Lee et al. 1993; Kozomara et al. 2014). Über die Hälfte der menschlichen proteinkodierenden Gene scheint dabei Zielsequenzen zur Bindung von miRNAs zu enthalten (Friedman et al. 2009). Für *CCM3* konnte bereits eine Regulation durch miRNAs gezeigt werden. Die miR-425-5p beispielsweise hemmt *CCM3* und führt in Zellen des kolorektalen Karzinoms zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Zhang et al. 2016). Zusätzlich führt eine Regulation von *CCM3* durch miR-425-5p in HUVECs zu einer erhöhten Proliferation, Migration und zu einer vermehrten Bildung kapillarähnlicher Strukturen. Diese proangiogenen Effekte werden teilweise durch eine Hemmung des Notch Signalweges und durch eine Steigerung des VEGF Signalweges vermittelt (Gao et al. 2016). Welchen Stellenwert miRNAs für die Angiogenese im Zusammenhang mit der Kavernomentstehung haben, wurde bisher nicht untersucht.

5.2. Limitationen der bioinformatischen Vorhersagen von miRNA-Bindungsstellen

Ein einzelnes Zielgen kann durch eine Vielzahl von unterschiedlichen miRNAs reguliert werden (Wu et al. 2010). Um putativ an die 3'-UTR von *CCM3* bindende miRNAs zu finden, wurden Kandidaten-miRNAs mittels *in silico* Vorhersageprogrammen identifiziert. Die von den beiden Algorithmen TargetScan und DIANA-microT-CDS errechnete Bindungswahrscheinlichkeit wurde mit einem weiteren bioinformatischen Vorhersageprogramm, miRmap, überprüft. Der in der Literatur empfohlene Vergleich der Berechnungen verschiedener Algorithmen sollte zu einer Reduktion falsch positiver Ergebnisse führen (Zheng et al. 2013). Obwohl die verwendeten Vorhersageprogramme zu den zuverlässigsten Algorithmen gehören (Baek et al. 2008; Agarwal et al. 2015), weist die *in silico* Identifizierung von putativ bindenden miRNAs wesentliche Limitationen auf. Alexiou et al. (2009) konnten zeigen, dass TargetScan und DIANA-microT-CDS nur 51 % bzw. 48 % der miRNA-Zielgen Interaktionen erfolgreich vorhersagten. Auch Jiang et al. (2009) konnten nur 5 von 45 durch TargetScan und andere Algorithmen vorhergesagte Bindungsstellen verifizieren. Für miRmap wird eine höhere Aussagekraft angenommen, aber auch hier liegt die Sensitivität bei 74 % und die Spezifität bei 44 % (Lukasik et al. 2016; Vejnar et al. 2012). Diese eingeschränkte Aussagekraft der Vorhersagen beruht zum Teil darauf, dass auch nichtkonservierte Zielsequenzen in den 3'-UTRs gebunden und gewebsspezifische Bindungen nicht berechnet werden können (Peterson et al. 2014; Farh et al. 2005). Die Limitationen der bioinformatischen Vorhersageprogramme unterstreichen die Notwendigkeit einer weiteren Priorisierung und einer experimentellen Validierung.

Um eine Priorisierung geeigneter miRNAs zu erreichen, wurde eine Datenbankrecherche nach in der Literatur vorgeschlagenen Kriterien vorgenommen (Witkos et al. 2011). Da eine akute Hemmung von *CCM3* zu einer Steigerung der Angiogenese *in vitro* führt (You et al. 2013), wurde ein besonderer Fokus auf mögliche proangiogene Eigenschaften der Kandidaten gelegt. Darüber hinaus wurden die miRNAs auf ihre gewebsspezifische Expression untersucht. Dafür wurden einzelne Studien, ebenso wie öffentlich zugängliche Daten der Tiefensequenzierung herangezogen. Durch die häufig vorliegende inverse Korrelation der Expression der miRNAs und ihrer Zielgene können diese Daten zur

Priorisierung beitragen, wobei sie aber nur als schwacher Hinweis auf eine Regulation durch miRNAs gewertet werden können (Wang und Li 2009). Darüber hinaus wurde die Vorhersage von zusätzlichen, möglicherweise synergistisch wirkenden Bindungsstellen berücksichtigt (Sætrum et al. 2007) (s. Abbildung 20). Auf diese Weise konnten die miRNAs miR-30a-5p und let-7f-2-3p als vielversprechende Kandidaten identifiziert werden.

Die miR-30a-5p zeigte eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit in allen genutzten bioinformatischen Vorhersageprogrammen. In den *in silico* Vorhersagen zeichnete sich die miR-30a-5p ebenfalls durch eine hohen Konservierungsgrad der Zielsequenz in der 3'-UTR von *CCM3* und eine hohe Komplementarität zur Zielsequenz aus. Zusätzlich ist die miR-30a-5p in einigen Tumorgeweben wie dem kolorektalen Karzinom und dem Lungenkarzinom herunterreguliert, während *CCM3* hochreguliert ist (Tang et al. 2015; Barrier et al. 2005; Arndt et al. 2009; Chen et al. 2007). Besonders hervorzuheben ist die bereits beobachtete Proangiogenität der miR-30a-5p (Jiang et al. 2013).

Auch für eine weitere Kandidaten-miRNA, let-7f-2-3p, waren die Bindungswahrscheinlichkeit und Komplementarität zur Zielsequenz als hoch einzuschätzen. Die Zielsequenz der let-7f-2-3p in der 3'-UTR von *CCM3* gilt als weniger hoch konserviert, im Gegensatz zur miR-30a-5p verfügt die let-7f-2-3p jedoch über eine zusätzlich vorhergesagte Bindungsstelle. Ein Vergleich des

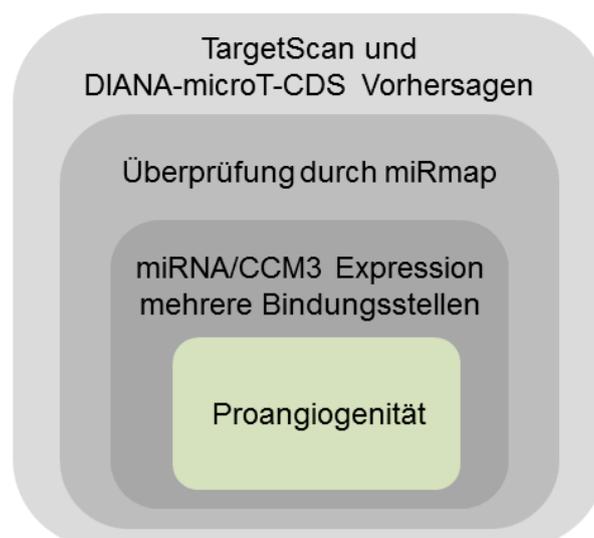


Abbildung 20. Kriterien zur Auswahl der Kandidaten miRNAs. Die durch mehrere Algorithmen vorhergesagten miRNAs wurden auf eine inverse Korrelation zwischen ihrer Expression und der *CCM3*-Expression überprüft. Zusätzlich vorhergesagte Bindungsstellen wurden berücksichtigt und proangiogen wirkende miRNAs priorisiert.

Expressionsprofils von miRNA und Zielgenen war in diesem Fall erschwert, da in den meisten Zellen und Geweben fast ausschließlich der Leitstrang let-7f-5p exprimiert wird. Let-7f-2-3p gilt hier als Passagierstrang und ist deutlich niedriger exprimiert als der Leitstrang (Kozomara et al. 2014). Dennoch konnten Tiefensequenzierungsdaten eine inverse Korrelation zwischen der Expression von let-7f-2-3p und *CCM3* im Blasenkarzinom, Kolonkarzinom und klarzelligem Nierenzellkarzinom belegen (Cho et al. 2013), was auf eine Regulation von *CCM3* durch let-7f-2-3p hindeuten könnte. Nach gängiger Auffassung vermittelt nur der Leitstrang als Teil des RISC die Hemmung von Zielgenen, während der Passagierstrang abgebaut wird (Wang, Li, et al. 2009). Zunehmend wird jedoch die Funktion des Passagierstranges diskutiert. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Passagierstränge evolutionär hoch konserviert sind, Zielgene herunterregulieren und an regulatorischen Netzwerken in der Zelle teilhaben können, wenn auch wahrscheinlich in geringerem Maße als die miRNA-Leitstränge (Yang, Phillips, et al. 2011). Insbesondere für Passagierstränge der let-7b und let-7e konnte bereits eine Dysregulation im malignen Mesotheliom nachgewiesen werden, die auf eine zelluläre Funktion der Passagierstränge hindeutet (Winter et al. 2013; Guled et al. 2009). Für den Leitstrang let-7f-5p wurden in der Literatur bereits proangiogene Eigenschaften beschrieben, die Rolle des Passagierstranges let-7f-2-3p in der Angiogenese ist jedoch nicht bekannt (Kuehbacher et al. 2007).

Durch die *in silico* Vorhersagen und Literaturrecherchen konnten Kandidaten-miRNAs miR-30a-5p und let-7f-2-3p identifiziert werden. Sie ermöglichten so Untersuchungen der Regulation von *CCM3* durch eine proangiogen beschriebene miRNA beziehungsweise einen miRNA-Passagierstrang.

5.3. Ansätze zur experimentellen Validierung von miRNA-Bindungsstellen

Aufgrund der genannten Limitationen der *in silico* Vorhersagen von miRNA-Bindungsstellen kommt ihrer experimentellen Validierung eine besondere Bedeutung zu. Die Bindungsstellen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten miRNAs wurden mittels eines Luciferase-Reportergen-Assays überprüft. Im Gegensatz zu ebenfalls in der Literatur angewandten Methoden wie den Microarrays oder Proteomanalysen

sind Luciferase-Assays weniger abhängig von zellphysiologischen Vorgängen, sensitiver und einfacher durchzuführen. Insgesamt stellen sie ein Viertel aller experimentellen Ansätze zur Validierung von miRNA-Zielgen Interaktionen (Witkos et al. 2011; Papadopoulos et al. 2009). In der Literatur findet sich häufig ein dualer Luciferase-Ansatz, in dem zwei Plasmide co-transfiziert werden. Das experimentelle Plasmid kodiert hier für eine Leuchtkäfer-Luciferase, das Kontrollplasmid oft für eine *Renilla*-Luciferase. Die Messung beider Luciferaseaktivitäten ermöglicht die Normalisierung variabler Transfektionseffizienzen (Painter et al. 2016; Sherf et al. 1996; Miranda et al. 2006). Ein Nachteil dieses Ansatzes ist, dass co-transfizierte Plasmide miteinander interagieren und somit die Ergebnisse verfälschen können (Nejepinska et al. 2012). Zusätzlich erschwert wird die Normalisierung durch diverse Hemmstoffe, die das Luciferase-Signal sowohl der *Renilla*-Luciferase als auch der Leuchtkäfer-Luciferase individuell beeinflussen können (Auld et al. 2008; Ghazawi et al. 2005). Im Gegensatz dazu kodierten die im Rahmen dieser Arbeit transfizierten Plasmide ausschließlich für das Enzym der *Renilla*-Luciferase. Die separat transfizierten Kontrollplasmide enthielten die 3'-UTR des Haushaltsgens *GAPDH* oder keine 3'-UTR, was eine Normalisierung unspezifischer Effekte der miRNAs erlaubte. Durch ähnliche Ansätze, in denen auf eine Co-Transfektion von experimentellen Plasmiden und Kontrollplasmiden verzichtet wurde, konnte unter anderem die Bindung der miR-515-5p an die 3'-UTR von *NRAS*, *MARK4* und *PIK3C2B* gezeigt werden. Weitere durch dieses Verfahren validierte miRNA-Bindungsstellen sind die Bindung von miR-155 an die 3'-UTR von *PTPN2* oder die Interaktion der miR-107 mit der 3'-UTR von *CCND1*. Nachfolgende Analysen der Herunterregulation der Zielgene auf Transkript- oder Proteinebene konnten die miRNA-Zielgen Interaktionen bestätigen und die Robustheit der Methode belegen (Molina-Pinelo et al. 2014; Ji et al. 2015; Pardo et al. 2016).

5.4. Herausforderungen der Transkript-Analyse von *CCM3*

Viele Gene exprimieren diverse Transkript-Varianten, die sich zwischen Zelllinien und Geweben unterscheiden können (Djebali et al. 2012). González et al. (2013) konnten zeigen, dass in Zellen zu etwa 85 % ein Haupttranskript vorliegt, während andere Transkript-Varianten in untergeordnetem Maße exprimiert werden. Auch für

CCM3 sind bereits mehrere Transkript-Varianten beschrieben, die über unterschiedlich lange 3'-UTRs verfügen (Aken et al. 2016). Da keine einheitlichen Aussagen zu den vorliegenden Transkript-Varianten in HUVECs im Vorfeld der Arbeit möglich waren, wurden Varianten, die die Bindungsstellen der miRNAs enthielten mittels einer RT-PCR amplifiziert. So konnten Transkript-Varianten in HUVECs nachgewiesen werden, die die Bindungsstellen aller untersuchten miRNAs in der 3'-UTR enthielten. Eine Regulation von *CCM3* durch miRNAs in HUVECs erschien demnach plausibel.

Der gewählte Ansatz lässt hier allerdings keine quantitativen Aussagen zu. Die Quantifizierung von Transkript-Varianten stellt eine erhebliche methodische Herausforderung dar und ist mittels einer klassischen PCR nicht möglich. Eine Untersuchung der *CCM3*-Isoformen könnte am besten durch Ansätze wie den Northern Blot oder eine RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends PCR*) erfolgen.

Da in dieser Arbeit aber die Regulation von *CCM3* durch die Kandidaten-miRNAs untersucht werden sollte, stand hier der Nachweis von regulierbaren Transkript-Varianten und nicht deren Quantifizierung im Vordergrund. Allerdings könnte auch eine quantitative Bestimmung der *CCM3* Transkript-Isoformen hinsichtlich der Länge ihrer 3'-UTRs in chirurgisch gewonnenem Kavernomgewebe von Interesse sein. Hollerer et al. (2016) konnten nachweisen, dass Zellstress tendenziell zur Expression längerer 3'-UTRs führt. Die längeren 3'-UTR-Varianten können hier miRNA-Bindungsstellen beinhalten, die zu einer Herunterregulation des Zielgens führen. Da Zellstress eine Rolle bei der Entstehung der Kavernomatose spielt (Retta et al. 2016), wäre im Kavernom-Zusammenhang die stressbedingte Expression einer längeren 3'-UTR denkbar, die einer Herunterregulation von miRNAs in besonderem Maße ausgesetzt ist und zu einer verringerten *CCM3*-Expression führt. Da Gewebeproben aus Kavernomen jedoch oft thrombotisch oder kalzifiziert sind, ist eine RNA-Isolation erschwert. Zusätzlich erschwerend kommt hinzu, dass oft nur wenige alterierte Endothelzellen im Gewebe vorliegen (Pagenstecher et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit war deshalb eine Untersuchung von Kavernomgewebe nicht möglich.

5.5. miRNAs als mögliche Brücke zwischen Zellstress und Kavernomentstehung

Da bei hereditären Fällen der Kavernomatose mit zunehmendem Alter häufig multiple Kavernome auftreten, wird die Knudson'sche Zweittrefferhypothese als Entstehungsmechanismus der Krankheit diskutiert (Gault et al. 2005; Pagenstecher et al. 2009). Dabei wird angenommen, dass in Endothelzellen zusätzlich zu einer bereits vorliegenden *CCM*-Keimbahnmutation noch eine somatische Mutation als zweiter Treffer auftritt und so die Entstehung von Kavernomen begünstigt. Jedoch konnte nur in wenigen Untersuchungen eine derartige biallelische Mutation in *CCM3* nachgewiesen werden (Akers et al. 2009; Pagenstecher et al. 2009). Zusätzlich variieren das Auftreten und die Schwere der klinischen Symptome zwischen Familienmitgliedern, die die gleiche pathologische Variante tragen, deutlich. Bei der Pathogenese der Kavernomatose werden daher auch interindividuelle lokale Auslöser wie Zellstress als möglicher zweiter Treffer in Betracht gezogen (Trapani et al. 2015). Dabei konnte schon eine Dysregulation von inflammatorischen Signalwegen in Kavernomgewebe und eine Funktion von *CCM3* in der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress belegt werden (Shenkar et al. 2007; Fidalgo et al. 2012). Des Weiteren scheint Stress in Form einer Hypoxie bei der Kavernomentstehung eine Rolle zu spielen, da der Hypoxie-induzierte-Faktor 1α (HIF-1 α) in etwa der Hälfte der Fälle im Kavernomgewebe erhöht ist (Sure et al. 2005). Zusätzlich weisen aus Kavernomgewebe gewonnene Endothelzellen *in vitro* eine gesteigerte Wachstumsrate unter hypoxischen Bedingungen auf (Zhu et al. 2011).

MiRNAs haben eine besondere Bedeutung bei der Modulation von verschiedenen Stresssignalwegen in der Zelle. So konnten van Rooij et al. (2006) nachweisen, dass Stress-induzierte miRNAs zu einem pathologischen myokardialen Remodeling führen können. Ferner wiesen Studien an Tieren auf eine besondere Bedeutung von miRNAs in der Stressregulation hin. Während miR-143/145 Knockout-Mäuse unter normalen Bedingungen keine abnormale Vaskulogenese zeigten, war die Bildung einer Neointima stressbedingt nach Gefäßverletzungen stark verringert (Xin et al. 2009). Auch für *CCM3* ist ebenfalls eine stressabhängige Regulation durch miRNAs bekannt. Hier wird die miR-181b unter hypoxischen Bedingungen heraufreguliert und hemmt nachfolgend das Zielgen *CCM3*. Dies induziert die gesteigerte Bildung

kapillarähnlicher Strukturen von HUVECs (Xu et al. 2015). Chen et al. (2013) konnten zeigen, dass die in dieser Arbeit untersuchten miRNAs miR-103a-3p und der Leitstrang von let-7f-2-3p bei Hypoxie in HUVECs heraufreguliert werden. Da der miRNA Leit- und Passagierstrang als gemeinsame Vorläufer-miRNA exprimiert werden, ist bei Heraufregulation des Leitstranges ebenso eine vermehrte Expression des Passagierstranges let-7f-2-3p zu erwarten. Für die miR-30a-5p ist eine ähnliche HIF-1 α abhängige Heraufregulation bei Hypoxie in Karzinomgewebe bekannt (Shen et al. 2013). Da die Heraufregulation der Kandidaten-miRNAs unter Zellstress bereits nachgewiesen werden konnte, war es möglich, diese Erkenntnis in dieser Arbeit aufzugreifen und nachfolgend die Auswirkung der gewählten miRNAs zu untersuchen.

Wie in der Einleitung erwähnt (s. 1.6-1.8), sind sowohl für den Leitstrang der let-7f-2-3-p als auch für die miR-103a-3p und miR-30a-5p bereits proangiogene Eigenschaften nachgewiesen worden. Da in der Literatur aber teilweise andere Methoden bzw. Auswertungsstrategien zur Beurteilung der Effekte der Kandidaten-miRNAs auf die Angiogenese genutzt wurden, ist kein direkter Vergleich zwischen den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen und den Ergebnissen in dieser Arbeit möglich. Es ist zudem nicht ausgeschlossen, dass miRNAs nur bestimmte Parameter der Angiogenese beeinflussen. So konnte für die antiangiogene miR-146a gezeigt werden, dass sie zwar die Proliferation in HUVECs hemmt und die Apoptose begünstigt, aber keinen Einfluss auf die Zellmigration oder die Bildung Kapillarähnlicher Strukturen hat (Halkein et al. 2013). Für die in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendete miR-103a-3p war im Vorfeld bereits bekannt, dass in einem *Tube-Formation-Assay in vitro* und *in vivo* im Mausmodell proangiogene Effekte nachgewiesen werden konnten (Chen et al. 2013). Ergebnisse der eigenen Arbeit weisen ebenfalls auf eine proangiogene Wirkung dieser miRNA hin, wobei der untersuchte Einfluss auf die Migration und das Sprossverhalten von HUVECs als eher gering einzuschätzen ist.

Für die miRNA let-7f-2-3p lagen im Vorfeld der Arbeit keine Daten über mögliche Zielgene vor. Die proangiogene Wirkung des Leitstranges let-7f-5p war jedoch schon bekannt (Kuehbacher et al. 2007). Da auch niedrig exprimierte miRNAs Auswirkungen auf das Verhalten von Zellen haben können (Johnston et al. 2003), erschien eine Regulation der Angiogenese durch den Passagierstrang let-7f-2-3p

möglich. Die Auswirkungen auf das Verhalten von HUVECs nach Transfektion der miRNA wurde untersucht, es konnte jedoch keine signifikante Auswirkung der let-7f-2-3p auf angiogenetische Parameter festgestellt werden. Die Repression von Zielgenen durch Passagierstränge ist häufig, wenn auch nicht immer, schwächer als die Herunterregulation von Zielgenen des Leitstranges (Yang, Phillips, et al. 2011). Daher ist für den Passagierstrang let-7f-2-3p eine untergeordnete Rolle in der Angiogenese anzunehmen, während der Leitstrang let-7f-5p möglicherweise die wesentlichen biologischen Funktionen übernimmt.

Für die miR-30a-5p sind bereits proangiogene Wirkungen gezeigt worden. Nach Transfektion von miR-30a-5p konnten Jiang et al. (2013) eine vermehrte Aussprossung von HUVECs beobachten. Zu beachten ist hier jedoch, dass die Arbeitsgruppe eine andere Methode zur Quantifizierung des Sprossverhaltens nutzt, die von der in dieser Arbeit verwendeten abweicht. Bei Jiang et al. (2013) wurde die Anzahl der HUVECs, die sich in den Sprossen befanden, gezählt und die Aussprossung auf diese Weise gemessen. Ferner wurde die Sprossung ausschließlich unter Stimulationsbedingungen mit VEGF-A untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden die mittlere Sprosslänge und die Sprossanzahl pro HUVEC-Sphäroid unter Basal-, VEGFA- und FGF-2 Stimulation quantifiziert. Dies war bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen.

Die miR-30a-5p zeigte unter allen Stimulationsbedingungen eine gesteigerte mittlere Sprosslänge und Sprossanzahl pro Sphäroid. Des Weiteren war auch die Migration von HUVECs nach Transfektion der miR-30a-5p geringfügig gesteigert. Die Ergebnisse der Inhibition von miR-30a-5p können als weiterer Hinweis auf proangiogene Eigenschaften dieser miRNA gewertet werden.

Dabei ist zu beachten, dass die proangiogenen Eigenschaften der miR-30a-5p am ehesten unter hohen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren VEGF-A und FGF-2 zu beobachten waren. Unter geringeren, physiologisch realistischeren Konzentrationen konnten nur noch signifikante Effekte der Transfektion auf die mittlere Sprosslänge pro Sphäroid, nicht jedoch auf die Anzahl der Sprosse pro Sphäroid gezeigt werden. Die Transfektion des Inhibitors der miR-30a-5p zeigte eine tendenzielle, aber nicht signifikante Verringerung beider Parameter. Der Effekt der prinzipiell proangiogenen miR-30a-5p unter physiologischen Bedingungen ist somit als eingeschränkt zu betrachten.

Während Jiang et al. (2013) keinen eindeutig antiangiogenen Einfluss eines miR-30a-5p Inhibitors nachweisen konnten, konnte in dieser Arbeit eine Hemmung des Sprossverhaltens nach Transfektion des miR-30a-5p Inhibitors gezeigt werden.

Die miR-30a-5p zeigte somit unter den ausgewählten Kandidaten-miRNAs den stärksten Effekt auf die Angiogenese.

Es ist jedoch zu beachten, dass die durch die Transfektion induzierte Überexpression der miRNAs in der Zelle wahrscheinlich weit über dem endogenen Niveau der miRNA-Expression liegt. Die mittels der qPCR gemessenen Werte sagen dabei nichts über die zelluläre Lokalisation der miRNAs aus. Da jedoch miRNA-Analoga in der Zelle häufig nicht an Proteine der Argonaut-Familie gebunden sind, sondern in lysosomalen Vesikeln vorliegen, wird angenommen, dass der Großteil der miRNA-Analoga keine aktive Funktion in der Zelle einnimmt. So konnten Thomson et al. (2013) zeigen, dass nach Transfektion der miR-200a die durch die qPCR ermittelte Expression etwa 1000-Fach gesteigert war, während der an Ago-Proteine gebundene und damit biologisch aktive Anteil der miRNA im Rahmen einer physiologischen Expression lag. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass sich die endogene miRNA-Expression von HUVECs in Kultur von der *in vivo* unterscheiden kann, möglicherweise durch eine niedrigere Differenzierung der Endothelzellen in einer zweidimensionalen Zellkultur (Shi et al. 2013). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen mit Endothelzellen auf eine Situation *in vivo* ist daher prinzipiell eingeschränkt. Hier ergibt sich durch Anwendung des Sphäroid-basierten Sprossungs-Assays ein methodischer Vorteil, da HUVECs in Form dreidimensionaler Sphäroide eine höhere Differenzierung aufweisen als in einer adhärennten Zellschicht (Korff et al. 1998).

Darüber hinaus stellt sich die Frage, inwiefern die Regulation von *CCM3* durch die Kandidaten-miRNAs im Tumorkontext von Bedeutung ist. In der Literatur gibt es bereits Hinweise auf eine Interaktion der miRNAs miR-425-5p, miR-181b und miR-200c mit *CCM3*, die unter anderem Aspekte wie die Chemoresistenz, Tumorangio-genese und Tumorentstehung regulieren können (Zhang et al. 2016; Feng et al. 2015; Xu et al. 2015). Die Wirkungen der miRNAs sind jedoch zellspezifisch und können zwischen normalem Endothel und dem Tumorendothel variieren (Anand et al. 2010). In diesem Kontext kann also keine sichere Aussage über die Funktion der untersuchten miRNAs im Tumorendothel getroffen werden, da

die Arbeit vorrangig die Regulation von *CCM3* durch miRNAs in Hinblick auf die Pathogenese der Kavernomatose untersuchte. Versuche im Tumorendothel waren deshalb nicht Teil der Arbeit.

5.6. miRNAs als Teil eines regulatorischen Netzwerkes

Nach Berechnungen der *in silico* Suchalgorithmen miRmap und DIANA-microT-CDS stellt *CCM3* das putative Zielgen von etwa 400 miRNAs dar. Für *CCM3* ist die Regulation durch verschiedenste miRNAs bereits nachgewiesen, zusätzlich zu den bereits genannten ist ebenfalls eine Herunterregulation dieses Gens durch die miR-107 und miR-613 bekannt (Wu et al. 2016; Kim et al. 2012). Es ist daher anzunehmen, dass *CCM3* durch eine Vielzahl von miRNAs reguliert wird. Zusätzlich können einzelne miRNAs hunderte von Zielgenen regulieren. Die miR-182-5p beispielsweise interagiert mit über 1000 Zielgenen und greift über die Regulation multipler Gene in Vorgänge der DNA-Reparatur ein (Krishnan et al. 2013). Die Kandidaten-miRNAs miR-103a-3p, let-7f-2-3p und miR-30a-5p können nach Berechnung des Vorhersageprogramms TargetScan möglicherweise ebenfalls über 1000 Zielgene regulieren. Hervorzuheben ist hier, dass miRNA-Passagierstränge über weniger ausgedehnte Zielgen-Netzwerke als miRNA-Leitstränge verfügen (Okamura et al. 2008).

Als möglicher Erklärungsansatz für die mangelnde Auswirkung der miRNA let-7f-2-3p auf die Angiogenese trotz nachgewiesener Bindung an *CCM3* könnte daher ein unzureichend ausgedehntes Zielgen-Netzwerk in Betracht gezogen werden. Im Umkehrschluss erscheint es daher wahrscheinlich, dass die Auswirkungen der miR-103a-3p und miR-30a-5p auf die Angiogenese über mehrere Zielgene vermittelt werden können. Bereits in diesem Zusammenhang bekannte Zielgene der beiden miRNAs umfassen hier *Ago1* und *DLL4* (Chen et al. 2013; Jiang et al. 2013). Beide miRNAs greifen laut *in silico* Vorhersagen zusätzlich in den PI3K-Akt Signalweg ein und können so die Angiogenese beeinflussen. Darüber hinaus können die miR-103a-3p und let-7f-2-3p vermutlich den TGF β Signalweg regulieren, und die Angiogenese auch auf diese Weise modulieren (Vlachos et al. 2012).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob *CCM3* in HUVECs durch die Kandidaten-miRNAs herunterreguliert wird und so ursächlich für einen Teil der

Auswirkungen dieser miRNAs auf die Angiogenese sein kann. Dafür wurde die relative Expression von *CCM3* nach miRNA-Analoga bzw. miR-30a-3p Inhibitor Transfektion durch eine digitale PCR beurteilt und zusätzlich die relative Proteinmenge von *CCM3* ermittelt. Auf Ebene der mRNA-Expression konnte keine einheitliche Herunterregulation von *CCM3* durch die Kandidaten-miRNAs festgestellt werden. So zeigten nur mit miR-103a-3p oder let-7f-2-3p transfizierte HUVECs eine verminderte Transkriptmenge, während eine signifikante Regulation weder für das miR-30a-5p Analogon, noch für den zugehörigen Inhibitor nachgewiesen werden konnte. Insgesamt ist die Herunterregulation der *CCM3*-Transkripte als gering einzustufen. Ähnliche Ergebnisse, die keine deutliche Regulation der mRNA des Zielgens zeigten, lassen sich in der Literatur wiederfinden. So reduziert die miR-103a-3p ihr Zielgen *TFDP2* ausschließlich auf Proteinebene, während die mRNA-Expression durch die miRNA nicht verändert wurde (Han et al. 2016). Auch die miR-30a-5p verringert nur die Proteinexpression der Zielgene *HP1γ*, *Snai1*, und *SEPT7*, ohne signifikante Auswirkungen auf die mRNA-Expression (Liu et al. 2015; Zhou et al. 2013; Jia et al. 2013). Für die let-7f-2-3p selbst liegen keine Daten vor, für andere miRNAs der let-7 Familie konnte jedoch eine entsprechende Regulation bereits festgestellt werden (Jakymiw et al. 2010). In der Literatur wird diskutiert, ob der Hauptmechanismus der miRNA-Regulation die Translationshemmung oder mRNA-Degradation ist. Erste Studien zeigten, dass miRNAs hauptsächlich zu einer Translationshemmung führen (Olsen et al. 1999). Nachfolgend konnte bestätigt werden, dass eine miRNA eine Vielzahl von Zielgenen auf Proteinebene herunterregulieren kann, ohne einen Einfluss auf die mRNA-Expression zu nehmen (Selbach et al. 2008). Die Proteine sind jedoch häufig nur geringfügig herunterreguliert und es wird angenommen, dass der Großteil der miRNA-Regulation über eine mRNA-Degradation erfolgt (Baek et al. 2008). Ergebnisse aus Microarray und RNASeq-Studien konnten diese Annahme weiter stützen (Hendrickson et al. 2009; Guo et al. 2010). Die miRNAs miR-103a-3p und let-7f-2-3p zeigten auf Proteinebene erwartungsgemäß einen signifikanten Abfall. Für die miRNA miR-30a-5p war nur nach Transfektion des miRNA Inhibitors ein Effekt zu verzeichnen, während die Transfektion des miRNA-Analogons zu einer tendenziellen, aber statistisch nicht signifikanten Reduktion der relativen Proteinmenge führte. Da diese miRNA in HUVECs hoch exprimiert ist, ist fraglich, inwiefern eine Überexpression von miR-30a-5p das *CCM3*-Transkript bzw. Protein noch weiter verringern kann. Der

Anstieg des CCM3-Proteins nach Transfektion des Inhibitors deutet jedoch auf eine Regulation auf Proteinebene hin.

6. Zusammenfassung

Zerebrale kavernöse Malformationen (CCM) sind Gefäßfehlbildungen des zentralen Nervensystems. Diese können durch Blutungen zu rezidivierenden Kopfschmerzen, epileptischen Anfällen oder hämorrhagischen Schlaganfällen führen. CCMs treten sowohl sporadisch als auch familiär mit autosomal-dominantem Erbgang auf. Die Prävalenz für symptomatisch erbliche Kavernome liegt bei 1:5400 bis 1:6200. Es wurden pathogene Sequenzveränderungen in den Genen *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* mit der familiären Kavernomatose assoziiert. MicroRNAs (miRNA) sind kurze, nichtkodierende RNAs, die die Expression von vielen Zielgenen regulieren können. Bisher ist wenig über die posttranskriptionale Regulation der *CCM3*-Expression durch miRNAs bekannt.

Durch *in silico* Analysen wurde die Regulation von *CCM3* durch die miRNAs miR-103a-3p, miR-30a-5p und let-7f-2-3p vorhergesagt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Bindung dieser miRNAs an die 3'-UTR von *CCM3* bestätigt werden. Die Transfektion von miR-103a-3p, miR-30a-5p- und let-7f-2-3p-Analoga in humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs) führte zudem zu einer signifikanten oder tendenziellen Herunterregulation der *CCM3*-Expression auf mRNA-Ebene. Auf Protein-Ebene wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. *In vitro*-Untersuchungen zur Wirkung der miRNA-Analoga auf die angiogenetischen Eigenschaften von Endothelzellen zeigten besonders nach miR-30a-5p-Transfektion einen proangiogenen Effekt auf HUVECs. Daher wurde die Wirkung dieser miRNA nachfolgend durch Transfektion eines miR-30a-5p-Inhibitors weiter untersucht. Diese führte zu einer Erhöhung der *CCM3*-Proteinmenge, nicht jedoch zu einer gesteigerten Expression auf mRNA-Ebene. In Übereinstimmung mit der Annahme einer proangiogenen Wirkung dieser miRNA zeigten sich negative Auswirkungen auf die angiogenetischen Eigenschaften von HUVECs nach Transfektion des miR-30a-5p-Inhibitors. Zusammenfassend ergeben sich Hinweise, dass *CCM3* von miR-103a-3p, miR-30a-5p und let-7f-2-3p reguliert wird und dass besonders miR-30a-5p proangiogene Eigenschaften aufweist. Die Rolle der ausgewählten miRNAs bei der Pathogenese der CCMs ist jedoch nicht abschließend geklärt, wobei die Regulation von *CCM3* durch ein großes, größtenteils noch unbekanntes Netzwerk von miRNAs anzunehmen ist.

7. Literaturverzeichnis

- Afonso-Grunz, F., und Müller, S. 2015. 'Principles of miRNA–mRNA interactions: beyond sequence complementarity', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72: 3127-41.
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., und Bartel, D. P. 2015. 'Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs', *Elife*, 4.
- Agrawal, R., Tran, U., und Wessely, O. 2009. 'The miR-30 miRNA family regulates *Xenopus* pronephros development and targets the transcription factor *Xlim1/Lhx1*', *Development*, 136: 3927-36.
- Aken, B. L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Fernandez Banet, J., Billis, K., García Girón, C., Hourlier, T., Howe, K., Kähäri, A., Kokocinski, F., Martin, F. J., Murphy, D. N., Nag, R., Ruffier, M., Schuster, M., Tang, Y. A., Vogel, J.-H., White, S., Zadissa, A., Flicek, P., und Searle, S. M. J. 2016. 'The Ensembl gene annotation system', *Database*, 2016: baw093-baw93.
- Alexiou, P., Maragkakis, M., Papadopoulos, G. L., Reczko, M., und Hatzigeorgiou, A. G. 2009. 'Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification', *Bioinformatics*, 25: 3049-55.
- Anand, S., Majeti, B. K., Acevedo, L. M., Murphy, E. A., Mukthavaram, R., Schepke, L., Huang, M., Shields, D. J., Lindquist, J. N., Lapinski, P. E., King, P. D., Weis, S. M., und Cheresch, D. A. 2010. 'MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis', *Nat Med*, 16: 909-14.
- Arndt, G. M., Dossey, L., Cullen, L. M., Lai, A., Druker, R., Eisbacher, M., Zhang, C., Tran, N., Fan, H., Retzlaff, K., Bittner, A., und Raponi, M. 2009. 'Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer', *BMC Cancer*, 9: 374.
- Auld, D. S., Southall, N. T., Jadhav, A., Johnson, R. L., Diller, D. J., Simeonov, A., Austin, C. P., und Inglese, J. 2008. 'Characterization of chemical libraries for luciferase inhibitory activity', *J Med Chem*, 51: 2372-86.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., und Bartel, D. P. 2008. 'The impact of microRNAs on protein output', *Nature*, 455: 64-71.
- Barrier, A., Lemoine, A., Boelle, P.-Y., Tse, C., Braut, D., Chiappini, F., Breittschneider, J., Lacaine, F., Houry, S., Huguier, M., Van der Laan, M. J., Speed, T., Debuire, B., Flahault, A., und Dudoit, S. 2005. 'Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling', *Oncogene*, 24: 6155-64.
- Bartel, D. P. 2004. 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function', *Cell*, 116: 281-97.
- . 2009. 'MicroRNAs: target recognition and regulatory functions', *Cell*, 136.
- Batra, S., Lin, D., Recinos, P. F., Zhang, J., und Rigamonti, D. 2009. 'Cavernous malformations: natural history, diagnosis and treatment', *Nat Rev Neurol*, 5: 659-70.
- Baumann, C. R., Acciarri, N., Bertalanffy, H., Devinsky, O., Elger, C. E., Lo Russo, G., Cossu, M., Sure, U., Singh, A., Stefan, H., Hammen, T., Georgiadis, D., Baumgartner, R. W., Andermann, F., und Siegel, A. M. 2007. 'Seizure outcome after resection of supratentorial cavernous malformations: a study of 168 patients', *Epilepsia*, 48: 559-63.
- Bergametti, F., Denier, C., Labauge, P., Arnoult, M., Boetto, S., Clanet, M., Coubes, P., Echenne, B., Ibrahim, R., Irthum, B., Jacquet, G., Lonjon, M., Moreau, J. J., Neau, J. P., Parker, F., Tremoulet, M., Tournier-Lasserre, E., und Neurochirurgie, S. F. d. 2005. 'Mutations within the *programmed cell death 10* gene cause cerebral cavernous malformations', *Am J Hum Genet*, 76: 42-51.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., und Hannon, G. J. 2001. 'Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference', *Nature*, 409: 363-6.
- Borchert, G. M., Lanier, W., und Davidson, B. L. 2006. 'RNA polymerase III transcribes human microRNAs', *Nat Struct Mol Biol*, 13: 1097-101.

- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., und Cohen, S. M. 2005. 'Principles of microRNA-target recognition', *PLoS Biol*, 3: e85.
- Bridge, G., Monteiro, R., Henderson, S., Emuss, V., Lagos, D., Georgopoulou, D., Patient, R., und Boshoff, C. 2012. 'The microRNA-30 family targets *DLL4* to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis', *Blood*, 120: 5063-72.
- Brueckner, B., Stresemann, C., Kuner, R., Mund, C., Musch, T., Meister, M., Sultmann, H., und Lyko, F. 2007. 'The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function', *Cancer Res*, 67: 1419-23.
- Busk, P. K. 2014. 'A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR', *BMC Bioinformatics*, 15: 29.
- Chan, A. C., Drakos, S. G., Ruiz, O. E., Smith, A. C., Gibson, C. C., Ling, J., Passi, S. F., Stratman, A. N., Sacharidou, A., Revelo, M. P., Grossmann, A. H., Diakos, N. A., Davis, G. E., Metzstein, M. M., Whitehead, K. J., und Li, D. Y. 2011. 'Mutations in 2 distinct genetic pathways result in cerebral cavernous malformations in mice', *J Clin Invest*, 121: 1871-81.
- Chen, H. Y., Lin, Y. M., Chung, H. C., Lang, Y. D., Lin, C. J., Huang, J., Wang, W. C., Lin, F. M., Chen, Z., Huang, H. D., Shyy, J. Y., Liang, J. T., und Chen, R. H. 2012. 'miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4', *Cancer Res*, 72: 3631-41.
- Chen, L., Tanriover, G., Yano, H., Friedlander, R., Louvi, A., und Gunel, M. 2009. 'Apoptotic functions of *PDCD10/CCM3*, the gene mutated in Cerebral Cavernous Malformation 3', *Stroke*, 40: 1474-81.
- Chen, P. Y., Chang, W. S. W., Chou, R. H., Lai, Y. K., Lin, S. C., Chi, C. Y., und Wu, C. W. 2007. 'Two non-homologous brain diseases-related genes, *SERPINI1* and *PDCD10*, are tightly linked by an asymmetric bidirectional promoter in an evolutionarily conserved manner', *BMC Mol Biol*, 8: 2.
- Chen, Z., Lai, T. C., Jan, Y. H., Lin, F. M., Wang, W. C., Xiao, H., Wang, Y. T., Sun, W., Cui, X., Li, Y. S., Fang, T., Zhao, H., Padmanabhan, C., Sun, R., Wang, D. L., Jin, H., Chau, G. Y., Huang, H. D., Hsiao, M., und Shyy, J. Y. 2013. 'Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis', *J Clin Invest*, 123: 1057-67.
- Cho, S., Jang, I., Jun, Y., Yoon, S., Ko, M., Kwon, Y., Choi, I., Chang, H., Ryu, D., Lee, B., Kim, V. N., Kim, W., und Lee, S. 2013. 'miRGator v3.0: a microRNA portal for deep sequencing, expression profiling and mRNA targeting', *Nucleic Acids Res*, 41: D252-D57.
- Clatterbuck, R. E., Eberhart, C. G., Crain, B. J., und Rigamonti, D. 2001. 'Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71: 188-92.
- Coomer, B. L., und Gottlieb, A. I. 1990. 'In vitro endothelial wound repair. Interaction of cell migration and proliferation', *Arteriosclerosis*, 10: 215-22.
- Dahiya, N., Sherman-Baust, C. A., Wang, T.-L., Davidson, B., Shih, I.-M., Zhang, Y., Wood, W., III, Becker, K. G., und Morin, P. J. 2008. 'MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer', *PLoS One*, 3: e2436.
- Dammann, P., Wrede, K., Zhu, Y., Matsushige, T., Maderwald, S., Umutlu, L., Quick, H. H., Hehr, U., Rath, M., Ladd, M. E., Felbor, U., und Sure, U. 2016. 'Correlation of the venous angioarchitecture of multiple cerebral cavernous malformations with familial or sporadic disease: a susceptibility-weighted imaging study with 7-Tesla MRI', *J Neurosurg*: 1-9.
- Demolli, S., Doebele, C., Doddaballapur, A., Lang, V., Fisslthaler, B., Chavakis, E., Vinciguerra, M., Sciacca, S., Henschler, R., Hecker, M., Savant, S., Augustin, H. G., Kaluza, D., Dimmeler, S., und Boon, R. A. 2015. 'MicroRNA-30 mediates anti-inflammatory effects of shear stress and KLF2 via repression of angiopoietin 2', *J Mol Cell Cardiol*, 88: 111-9.
- Denier, C., Goutagny, S., Labauge, P., Krivosic, V., Arnoult, M., Cousin, A., Benabid, A. L., Comoy, J., Frerebeau, P., Gilbert, B., Houtteville, J. P., Jan, M., Lapierre, F., Loiseau,

- H., Menei, P., Mercier, P., Moreau, J. J., Nivelon-Chevallier, A., Parker, F., Redondo, A. M., Scarabin, J. M., Tremoulet, M., Zerah, M., Maciazek, J., Tournier-Lasserre, E., und Neurochirurgie, S. F. d. 2004. 'Mutations within the *MGC4607* gene cause cerebral cavernous malformations', *Am J Hum Genet*, 74: 326-37.
- Denier, C., Labauge, P., Bergametti, F., Marchelli, F., Riant, F., Arnoult, M., Maciazek, J., Vicaut, E., Brunereau, L., Tournier-Lasserre, E., und Neurochirurgie, S. F. d. 2006. 'Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients', *Ann Neurol*, 60: 550-6.
- Dibble, C. F., Horst, J. A., Malone, M. H., Park, K., Temple, B., Cheeseman, H., Barbaro, J. R., Johnson, G. L., und Bencharit, S. 2010. 'Defining the functional domain of programmed cell death 10 through its interactions with phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate', *PLoS One*, 5: e11740.
- Ding, Z., Wang, X., Schnackenberg, L., Khaidakov, M., Liu, S., Singla, S., Dai, Y., und Mehta, J. L. 2013. 'Regulation of autophagy and apoptosis in response to ox-LDL in vascular smooth muscle cells, and the modulatory effects of the microRNA hsa-let-7g', *Int J Cardiol*, 168: 1378-85.
- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G. K., Khatun, J., Williams, B. A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Roder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R. F., Alioto, T., Antoshechkin, I., Baer, M. T., Bar, N. S., Batut, P., Bell, K., Bell, I., Chakraborty, S., Chen, X., Chrast, J., Curado, J., Derrien, T., Drenkow, J., Dumais, E., Dumais, J., Duttagupta, R., Falconnet, E., Fastuca, M., Fejes-Toth, K., Ferreira, P., Foissac, S., Fullwood, M. J., Gao, H., Gonzalez, D., Gordon, A., Gunawardena, H., Howald, C., Jha, S., Johnson, R., Kapranov, P., King, B., Kingswood, C., Luo, O. J., Park, E., Persaud, K., Preall, J. B., Ribeca, P., Risk, B., Robyr, D., Sammeth, M., Schaffer, L., See, L.-H., Shahab, A., Skancke, J., Suzuki, A. M., Takahashi, H., Tilgner, H., Trout, D., Walters, N., Wang, H., Wrobel, J., Yu, Y., Ruan, X., Hayashizaki, Y., Harrow, J., Gerstein, M., Hubbard, T., Reymond, A., Antonarakis, S. E., Hannon, G., Giddings, M. C., Ruan, Y., Wold, B., Carninci, P., Guigo, R., und Gingeras, T. R. 2012. 'Landscape of transcription in human cells', *Nature*, 489: 101-08.
- Draheim, K. M., Fisher, O. S., Boggan, T. J., und Calderwood, D. A. 2014. 'Cerebral cavernous malformation proteins at a glance', *J Cell Sci*, 127: 701-7.
- Duisters, R. F., Tijssen, A. J., Schroen, B., Leenders, J. J., Lentink, V., van der Made, I., Herias, V., van Leeuwen, R. E., Schellings, M. W., Barenbrug, P., Maessen, J. G., Heymans, S., Pinto, Y. M., und Creemers, E. E. 2009. 'miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling', *Circ Res*, 104: 170-8, 6p following 78.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., und Izaurralde, E. 2009. 'Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation', *RNA*, 15: 21-32.
- Farh, K. K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B., und Bartel, D. P. 2005. 'The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution', *Science*, 310: 1817-21.
- Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M. C., und Martelli, F. 2008. 'MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3', *J Biol Chem*, 283: 15878-83.
- Fauth, C., Rostasy, K., Rath, M., Gizewski, E., Lederer, A. G., Sure, U., Zschocke, J., und Felbor, U. 2015. 'Highly variable intrafamilial manifestations of a *CCM3* mutation ranging from acute childhood cerebral haemorrhage to late-onset meningiomas', *Clin Neurol Neurosurg*, 128: 41-3.
- Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M. L., Nervi, C., und Bozzoni, I. 2005. 'A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP-alpha regulates human granulopoiesis', *Cell*, 123: 819-31.
- Felbor, U., Sure, U., Grimm, T., und Bertalanffy, H. 2006. 'Genetics of cerebral cavernous angioma', *Zentralbl Neurochir*, 67: 110-6.

- Feng, Z.-M., Qiu, J., Chen, X.-W., Liao, R.-X., Liao, X.-Y., Zhang, L.-P., Chen, X., Li, Y., Chen, Z.-T., und Sun, J.-G. 2015. 'Essential role of miR-200c in regulating self-renewal of breast cancer stem cells and their counterparts of mammary epithelium', *BMC Cancer*, 15: 645.
- Fidalgo, M., Fraile, M., Pires, A., Force, T., Pombo, C., und Zalvide, J. 2010. 'CCM3/PDCD10 stabilizes GCKIII proteins to promote Golgi assembly and cell orientation', *Journal of Cell Science*, 123: 1274-84.
- Fidalgo, M., Guerrero, A., Fraile, M., Iglesias, C., Pombo, C. M., und Zalvide, J. 2012. 'Adaptor protein cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) mediates phosphorylation of the cytoskeletal proteins ezrin/radixin/moesin by mammalian Ste20-4 to protect cells from oxidative stress', *J Biol Chem*, 287: 11556-65.
- Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A., und Greaves, M. F. 1990. 'Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells', *Blood*, 75: 2417-26.
- Finnerty, J. R., Wang, W. X., Hébert, S. S., Wilfred, B. R., Mao, G., und Nelson, P. T. 2010. 'The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases', *J Mol Biol*, 402: 491-509.
- Fischer, A., Zalvide, J., Faurobert, E., Albiges-Rizo, C., und Tournier-Lasserre, E. 2013. 'Cerebral cavernous malformations: from CCM genes to endothelial cell homeostasis', *Trends Mol Med*, 19: 302-8.
- Fisher, O. S., und Boggon, T. J. 2014. 'Signaling pathways and the cerebral cavernous malformations proteins: lessons from structural biology', *Cell Mol Life Sci*, 71: 1881-92.
- Fisher, O. S., Liu, W., Zhang, R., Stiegler, A. L., Ghedia, S., Weber, J. L., und Boggon, T. J. 2015. 'Structural basis for the disruption of the cerebral cavernous malformations 2 (CCM2) interaction with Krev interaction trapped 1 (KRIT1) by disease-associated mutations', *J Biol Chem*, 290: 2842-53.
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., und Bartel, D. P. 2009. 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs', *Genome Res*, 19: 92-105.
- Frischer, J. M., Göd, S., Gruber, A., Saringer, W., Grabner, G., Gatterbauer, B., Kitz, K., Holzer, S., Kronnerwetter, C., Hainfellner, J. A., Knosp, E., und Trattnig, S. 2012. 'Susceptibility-weighted imaging at 7 T: Improved diagnosis of cerebral cavernous malformations and associated developmental venous anomalies', *Neuroimage Clin*, 1: 116-20.
- Fu, X., Zhang, W., Su, Y., Lu, L., Wang, D., und Wang, H. 2016. 'MicroRNA-103 suppresses tumor cell proliferation by targeting *PDCD10* in prostate cancer', *Prostate*, 76: 543-51.
- Gaetzner, S., Stahl, S., Sürücü, O., Schaafhausen, A., Halliger-Keller, B., Bertalanffy, H., Sure, U., und Felbor, U. 2007. '*CCM1* gene deletion identified by MLPA in cerebral cavernous malformation', *Neurosurg Rev*, 30: 155-9; discussion 59-60.
- Gao, Y., Yin, Y., Xing, X., Zhao, Z., Lu, Y., Sun, Y., Zhuang, Z., Wang, M., Ji, W., und He, Y. 2016. 'Arsenic-induced anti-angiogenesis via miR-425-5p-regulated CCM3', *Toxicol Lett*.
- Gault, J., Shenkar, R., Recksiek, P., und Awad, I. A. 2005. 'Biallelic somatic and germ line *CCM1* truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion', *Stroke*, 36: 872-4.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., und Betsholtz, C. 2003. 'VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia', *J Cell Biol*, 161: 1163-77.
- Ghazawi, I., Cutler, S. J., Low, P., Mellick, A. S., und Ralph, S. J. 2005. 'Inhibitory effects associated with use of modified *Photinus pyralis* and *Renilla reniformis* luciferase vectors in dual reporter assays and implications for analysis of ISGs', *J Interferon Cytokine Res*, 25: 92-102.
- González-Porta, M., Frankish, A., Rung, J., Harrow, J., und Brazma, A. 2013. 'Transcriptome analysis of human tissues and cell lines reveals one dominant transcript per gene', *Genome Biology*, 14: R70.

- Gore, A. V., Lampugnani, M. G., Dye, L., Dejana, E., und Weinstein, B. M. 2008. 'Combinatorial interaction between CCM pathway genes precipitates hemorrhagic stroke', *Dis Model Mech*, 1: 275-81.
- Goudreault, M., D'Ambrosio, L. M., Kean, M. J., Mullin, M. J., Larsen, B. G., Sanchez, A., Chaudhry, S., Chen, G. I., Sicheri, F., Nesvizhskii, A. I., Aebersold, R., Raught, B., und Gingras, A. C. 2009. 'A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein', *Mol Cell Proteomics*, 8: 157-71.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., und Shiekhattar, R. 2005. 'Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing', *Cell*, 123: 631-40.
- Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., und Bartel, D. P. 2007. 'MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing', *Mol Cell*, 27: 91-105.
- Guled, M., Lahti, L., Lindholm, P. M., Salmenkivi, K., Bagwan, I., Nicholson, A. G., und Knuutila, S. 2009. 'CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma - a miRNA microarray analysis', *Genes Chromosomes Cancer*, 48: 615-23.
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., und Bartel, D. P. 2010. 'Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels', *Nature*, 466: 835-40.
- Halkein, J., Tabruyn, S. P., Ricke-Hoch, M., Haghikia, A., Nguyen, N.-Q.-N., Scherr, M., Castermans, K., Malvaux, L., Lambert, V., Thiry, M., Sliwa, K., Noel, A., Martial, J. A., Hilfiker-Kleiner, D., und Struman, I. 2013. 'MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy', *J Clin Invest*, 123: 2143-54.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., und Hannon, G. J. 2000. 'An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells', *Nature*, 404: 293-6.
- Han, B., Lian, L., Li, X., Zhao, C., Qu, L., Liu, C., Song, J., und Yang, N. 2016. 'Chicken gga-miR-103-3p Targets CCNE1 and TFDP2 and Inhibits MDCC-MSB1 Cell Migration', *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 6: 1277-85.
- Hand, N. J., Master, Z. R., EauClaire, S. F., Weinblatt, D. E., Matthews, R. P., und Friedman, J. R. 2009. 'The microRNA-30 family is required for vertebrate hepatobiliary development', *Gastroenterology*, 136: 1081-90.
- Haudenschild, C. C., und Schwartz, S. M. 1979. 'Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity', *Lab Invest*, 41: 407-18.
- He, Y., Zhang, H., Yu, L., Gunel, M., Boggon, T. J., Chen, H., und Min, W. 2010. 'Stabilization of VEGFR2 signaling by cerebral cavernous malformation 3 is critical for vascular development', *Sci Signal*, 3: ra26.
- Heiss, M., Hellström, M., Kalén, M., May, T., Weber, H., Hecker, M., Augustin, H. G., und Korff, T. 2015. 'Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis *in vitro*', *Faseb Journal*, 29: 3076-84.
- Hellström, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A. K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalén, M., Gerhardt, H., und Betsholtz, C. 2007. 'Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis', *Nature*, 445: 776-80.
- Hendrickson, D. G., Hogan, D. J., McCullough, H. L., Myers, J. W., Herschlag, D., Ferrell, J. E., und Brown, P. O. 2009. 'Concordant Regulation of Translation and mRNA Abundance for Hundreds of Targets of a Human microRNA', *PLoS Biol*, 7.
- Herter, T., Brandt, M., und Szüwart, U. 1988. 'Cavernous hemangiomas in children', *Childs Nerv Syst*, 4: 123-7.
- Heusschen, R., van Gink, M., Griffioen, A. W., und Thijssen, V. L. 2010. 'MicroRNAs in the tumor endothelium: novel controls on the angioregulatory switchboard', *Biochim Biophys Acta*, 1805: 87-96.

- Hilder, T. L., Malone, M. H., Bencharit, S., Colicelli, J., Haystead, T. A., Johnson, G. L., and Wu, C. C. 2007. 'Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex', *J Proteome Res*, 6: 4343-55.
- Hollerer, I., Curk, T., Haase, B., Benes, V., Hauer, C., Neu-Yilik, G., Bhuvanagiri, M., Hentze, M. W., and Kulozik, A. E. 2016. 'The differential expression of alternatively polyadenylated transcripts is a common stress-induced response mechanism that modulates mammalian mRNA expression in a quantitative and qualitative fashion', *RNA*, 22: 1441-53.
- Hu, Y. L., Lu, S., Szeto, K. W., Sun, J., Wang, Y., Lasheras, J. C., and Chien, S. 2014. 'FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells', *Sci Rep*, 4.
- Hunt, M. A., Currie, M. J., Robinson, B. A., and Dachs, G. U. 2010. 'Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents', *J Biomol Tech*, 21: 66-72.
- Hutvagner, G., and Zamore, P. D. 2002. 'A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex', *Science*, 297: 2056-60.
- Jain, R. K. 2003. 'Molecular regulation of vessel maturation', *Nat Med*, 9: 685-93.
- Jakymiw, A., Patel, R. S., Deming, N., Bhattacharyya, I., Shah, P., Lamont, R. J., Stewart, C. M., Cohen, D. M., and Chan, E. K. L. 2010. 'Overexpression of Dicer as a Result of Reduced let-7 microRNA Levels Contributes to Increased Cell Proliferation of Oral Cancer Cells', *Genes, chromosomes & cancer*, 49: 549-59.
- Jamieson, J. S., Tumbarello, D. A., Hallé, M., Brown, M. C., Tremblay, M. L., and Turner, C. E. 2005. 'Paxillin is essential for PTP-PEST-dependent regulation of cell spreading and motility: a role for paxillin kinase linker', *J Cell Sci*, 118: 5835-47.
- Ji, Y., Wrzesinski, C., Yu, Z., Hu, J., Gautam, S., Hawk, N. V., Telford, W. G., Palmer, D. C., Franco, Z., Sukumar, M., Roychoudhuri, R., Clever, D., Klebanoff, C. A., Surh, C. D., Waldmann, T. A., Restifo, N. P., and Gattinoni, L. 2015. 'miR-155 augments CD8+ T-cell antitumor activity in lymphoreplete hosts by enhancing responsiveness to homeostatic gamma-c cytokines', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 476-81.
- Jia, Z., Wang, K., Wang, G., Zhang, A., and Pu, P. 2013. 'MiR-30a-5p antisense oligonucleotide suppresses glioma cell growth by targeting SEPT7', *PLoS One*, 8: e55008.
- Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Aoki, M., and Vogt, P. K. 2000. 'Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 1749-53.
- Jiang, Q., Feng, M.-G., and Mo, Y.-Y. 2009. 'Systematic validation of predicted microRNAs for cyclin D1', *BMC Cancer*, 9: 194.
- Jiang, Q., Lagos-Quintana, M., Liu, D., Shi, Y., Helker, C., Herzog, W., and le Noble, F. 2013. 'miR-30a regulates endothelial tip cell formation and arteriolar branching', *Hypertension*, 62: 592-8.
- Johnson, C. D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., Chin, L., Brown, D., and Slack, F. J. 2007. 'The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells', *Cancer Res*, 67: 7713-22.
- Johnston, R. J., and Hobert, O. 2003. 'A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 426: 845-49.
- Karaa Zi, S., Iacovoni, J. S., Bastide, A., Lacazette, E., Touriol, C., and Prats, H. 2009. 'The VEGF IRESes are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16', *RNA*, 15: 249-54.
- Kean, M. J., Ceccarelli, D. F., Goudreault, M., Sanches, M., Tate, S., Larsen, B., Gibson, L. C., Derry, W. B., Scott, I. C., Pelletier, L., Baillie, G. S., Sicheri, F., and Gingras, A. C. 2011. 'Structure-function analysis of core STRIPAK Proteins: a signaling complex implicated in Golgi polarization', *J Biol Chem*, 286: 25065-75.
- Kiezun, A., Artzi, S., Modai, S., Volk, N., Isakov, O., and Shomron, N. 2012. 'miRviewer: a multispecies microRNA homologous viewer', *BMC Research Notes*, 5: 92.

- Kim, H. W., Mallick, F., Durrani, S., Ashraf, M., Jiang, S., und Haider, K. H. 2012. 'Concomitant activation of miR-107/*PDCD10* and hypoxamir-210/*Casp8ap2* and their role in cytoprotection during ischemic preconditioning of stem cells', *Antioxid Redox Signal*, 17: 1053-65.
- Kin, K., Miyagawa, S., Fukushima, S., Shirakawa, Y., Torikai, K., Shimamura, K., Daimon, T., Kawahara, Y., Kuratani, T., und Sawa, Y. 2012. 'Tissue- and plasma-specific MicroRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm', *J Am Heart Assoc*, 1: e000745.
- Korff, T., und Augustin, H. G. 1998. 'Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation', *J Cell Biol*, 143: 1341-52.
- Kozomara, A., und Griffiths-Jones, S. 2014. 'miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data', *Nucleic Acids Res*, 42: D68-D73.
- Krishnan, K., Steptoe, A. L., Martin, H. C., Wani, S., Nones, K., Waddell, N., Mariasegaram, M., Simpson, P. T., Lakhani, S. R., Gabrielli, B., Vlassov, A., Cloonan, N., und Grimmond, S. M. 2013. 'MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair', *RNA*, 19: 230-42.
- Kuehbachner, A., Urbich, C., Zeiher, A. M., und Dimmeler, S. 2007. 'Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis', *Circ Res*, 101: 59-68.
- Labauge, P., Denier, C., Bergametti, F., und Tournier-Lasserre, E. 2007. 'Genetics of cavernous angiomas', *Lancet Neurol*, 6: 237-44.
- Labauge, P., Laberge, S., Brunereau, L., Levy, C., Tournier-Lasserre, E., und Neurochirurgie, S. F. d. 1998. 'Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families.', *Lancet*, 352: 1892-7.
- Laberge-le Couteulx, S., Jung, H. H., Labauge, P., Houtteville, J. P., Lescoat, C., Cecillon, M., Marechal, E., Joutel, A., Bach, J. F., und Tournier-Lasserre, E. 1999. 'Truncating mutations in *CCM1*, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas', *Nat Genet*, 23: 189-93.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., und Ambros, V. 1993. 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75: 843-54.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., und Kim, V. N. 2003. 'The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing', *Nature*, 425: 415-9.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., und Kim, V. N. 2004. 'MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II', *Embo j*, 23: 4051-60.
- Lennox, K. A., Owczarzy, R., Thomas, D. M., Walder, J. A., und Behlke, M. A. 2013. 'Improved performance of anti-miRNA oligonucleotides using a novel non-nucleotide modifier', *Mol Ther Nucleic Acids*, 2: e117-.
- Leslie, J. D., Ariza-McNaughton, L., Bermange, A. L., McAdow, R., Johnson, S. L., und Lewis, J. 2007. 'Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis', *Development*, 134: 839-44.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., und Bartel, D. P. 2005. 'Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets', *Cell*, 120: 15-20.
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., und Burge, C. B. 2003. 'Prediction of mammalian microRNA targets', *Cell*, 115: 787-98.
- Li, X., Ji, W., Zhang, R., Folta-Stogniew, E., Min, W., und Boggon, T. J. 2011. 'Molecular recognition of leucine-aspartate repeat (LD) motifs by the focal adhesion targeting homology domain of cerebral cavernous malformation 3 (*CCM3*)', *J Biol Chem*, 286: 26138-47.
- Liang, C.-C., Park, A. Y., und Guan, J.-L. 2007. 'In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*', *Nat. Protocols*, 2: 329-33.
- Liang, J., Liu, X., Xue, H., Qiu, B., Wei, B., und Sun, K. 2015. 'MicroRNA-103a inhibits gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting c-Myb', *Cell Prolif*, 48: 78-85.

- Lin, C., Meng, S., Zhu, T., und Wang, X. 2010. 'PDCD10/CCM3 acts downstream of gamma-protocadherins to regulate neuronal survival', *J Biol Chem*, 285: 41675-85.
- Linsley, P. S., Schelter, J., Burchard, J., Kibukawa, M., Martin, M. M., Bartz, S. R., Johnson, J. M., Cummins, J. M., Raymond, C. K., Dai, H., Chau, N., Cleary, M., Jackson, A. L., Carleton, M., und Lim, L. 2007. 'Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression', *Mol Cell Biol*, 27: 2240-52.
- Liquori, C. L., Berg, M. J., Siegel, A. M., Huang, E., Zawistowski, J. S., Stoffer, T., Verlaan, D., Balogun, F., Hughes, L., Leedom, T. P., Plummer, N. W., Cannella, M., Maglione, V., Squitieri, F., Johnson, E. W., Rouleau, G. A., Ptacek, L., und Marchuk, D. A. 2003. 'Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations', *Am J Hum Genet*, 73: 1459-64.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., und Hannon, G. J. 2004. 'Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi', *Science*, 305: 1437-41.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., und Parker, R. 2005. 'MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies', *Nat Cell Biol*, 7: 719-23.
- Liu, M., Huang, F., Zhang, D., Ju, J., Wu, X. B., Wang, Y., Wang, Y., Wu, Y., Nie, M., Li, Z., Ma, C., Chen, X., Zhou, J. Y., Tan, R., Yang, B. L., Zen, K., Zhang, C. Y., Chen, Y. G., und Zhao, Q. 2015. 'Heterochromatin protein HP1gamma promotes colorectal cancer progression and is regulated by miR-30a', *Cancer Res*, 75: 4593-604.
- Liu, X., Cheng, Y., Yang, J., Xu, L., und Zhang, C. 2012. 'Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application', *J Mol Cell Cardiol*, 52: 245-55.
- Lu, T. J., Lai, W. Y., Huang, C. Y., Hsieh, W. J., Yu, J. S., Hsieh, Y. J., Chang, W. T., Leu, T. H., Chang, W. C., Chuang, W. J., Tang, M. J., Chen, T. Y., Lu, T. L., und Lai, M. D. 2006. 'Inhibition of cell migration by autophosphorylated mammalian sterile 20-like kinase 3 (MST3) involves paxillin and protein-tyrosine phosphatase-PEST', *J Biol Chem*, 281: 38405-17.
- Lukasik, A., Wójcikowski, M., und Zielenkiewicz, P. 2016. 'Tools4miRs – one place to gather all the tools for miRNA analysis', *Bioinformatics*, 32: 2722-24.
- Ma, X., Zhao, H., Shan, J., Long, F., Chen, Y., Chen, Y., Zhang, Y., Han, X., und Ma, D. 2007. 'PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway', *Mol Biol Cell*, 18: 1965-78.
- Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., Parenti, A. R., Daidone, M. G., Biciato, S., und Piccolo, S. 2010. 'A microRNA targeting Dicer for metastasis control', *Cell*, 141: 1195-207.
- Martinez, I., Cazalla, D., Almstead, L. L., Steitz, J. A., und DiMaio, D. 2011. 'miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 522-27.
- Marzi, M. J., Ghini, F., Cerruti, B., de Pretis, S., Bonetti, P., Giacomelli, C., Gorski, M. M., Kress, T., Pelizzola, M., Muller, H., Amati, B., und Nicassio, F. 2016. 'Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach', *Genome Res*, 26: 554-65.
- McCall, M. N., Kent, O. A., Yu, J., Fox-Talbot, K., Zaiman, A. L., und Halushka, M. K. 2011. 'MicroRNA profiling of diverse endothelial cell types', *BMC Medical Genomics*, 4: 78.
- Miranda, K. C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y. S., Tam, W. L., Thomson, A. M., Lim, B., und Rigoutsos, I. 2006. 'A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes', *Cell*, 126: 1203-17.
- Molina-Pinelo, S., Carnero, A., Rivera, F., Estevez-Garcia, P., Bozada, J. M., Limon, M. L., Benavent, M., Gomez, J., Pastor, M. D., Chaves, M., Suarez, R., Paz-Ares, L., de la Portilla, F., Carranza-Carranza, A., Sevilla, I., Vicioso, L., und Garcia-Carbonero, R. 2014. 'MiR-107 and miR-99a-3p predict chemotherapy response in patients with advanced colorectal cancer', *BMC Cancer*, 14: 656.

- Nejepinska, J., Malik, R., Moravec, M., und Svoboda, P. 2012. 'Deep sequencing reveals complex spurious transcription from transiently transfected plasmids', *PLoS One*, 7: e43283.
- Nogueira, E., Fidalgo, M., Molnar, A., Kyriakis, J., Force, T., Zalvide, J., und Pombo, C. M. 2008. 'SOK1 translocates from the Golgi to the nucleus upon chemical anoxia and induces apoptotic cell death', *Journal of Biological Chemistry*, 283: 16248-58.
- Noren Hooten, N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A. B., und Evans, M. K. 2010. 'microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age', *PLoS One*, 5: e10724.
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., und Mendell, J. T. 2005. 'c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression', *Nature*, 435: 839-43.
- Okamura, K., Phillips, M. D., Tyler, D. M., Duan, H., Chou, Y. T., und Lai, E. C. 2008. 'The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution', *Nat Struct Mol Biol*, 15: 354-63.
- Olsen, P. H., und Ambros, V. 1999. 'The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation', *Dev Biol*, 216: 671-80.
- Pagenstecher, A., Stahl, S., Sure, U., und Felbor, U. 2009. 'A two-hit mechanism causes cerebral cavernous malformations: complete inactivation of *CCM1*, *CCM2* or *CCM3* in affected endothelial cells', *Hum Mol Genet*, 18: 911-8.
- Painter, J. N., Kaufmann, S., O'Mara, T. A., Hillman, K. M., Sivakumaran, H., Darabi, H., Cheng, T. H., Pearson, J., Kazakoff, S., Waddell, N., Hoivik, E. A., Goode, E. L., Scott, R. J., Tomlinson, I., Dunning, A. M., Easton, D. F., French, J. D., Salvesen, H. B., Pollock, P. M., Thompson, D. J., Spurdle, A. B., und Edwards, S. L. 2016. 'A common variant at the 14q32 endometrial cancer risk locus activates *AKT1* through YY1 binding', *Am J Hum Genet*, 98: 1159-69.
- Papadopoulos, G. L., Reczko, M., Simossis, V. A., Sethupathy, P., und Hatzigeorgiou, A. G. 2009. 'The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase', *Nucleic Acids Res*, 37: D155-8.
- Pardo, O. E., Castellano, L., Munro, C. E., Hu, Y., Mauri, F., Krell, J., Lara, R., Pinho, F. G., Choudhury, T., Frampton, A. E., Pellegrino, L., Pshezhetskiy, D., Wang, Y., Waxman, J., Seckl, M. J., und Stebbing, J. 2016. 'miR-515-5p controls cancer cell migration through MARK4 regulation', *EMBO Rep*, 17: 570-84.
- Peterson, S. M., Thompson, J. A., Ufkin, M. L., Sathyanarayana, P., Liaw, L., und Congdon, C. B. 2014. 'Common features of microRNA target prediction tools', *Front Genet*, 5: 23.
- Pfaffl, M. W. 2001. 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Res*, 29: e45.
- Pillai, R. S., Artus, C. G., und Filipowicz, W. 2004. 'Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis', *RNA*, 10: 1518-25.
- Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., Mercatanti, A., Hammond, S., und Rainaldi, G. 2006. 'MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs', *Blood*, 108: 3068-71.
- Preisinger, C., Short, B., De Corte, V., Bruyneel, E., Haas, A., Kopajtich, R., Gettemans, J., und Barr, F. A. 2004. 'YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3-zeta', *J Cell Biol*, 164: 1009-20.
- Rath, M., Spiegler, S., Nath, N., Schwefel, K., Di Donato, N., Gerber, J., Korenke, G. C., Hellenbroich, Y., Hehr, U., Gross, S., Sure, U., Zoll, B., Gilberg, E., Kaderali, L., und Felbor, U. 2016. 'Constitutional de novo and postzygotic mutations in isolated cases of cerebral cavernous malformations', *Molecular Genetics & Genomic Medicine*.
- Reczko, M., Maragkakis, M., Alexiou, P., Grosse, I., und Hatzigeorgiou, A. G. 2012. 'Functional microRNA targets in protein coding sequences', *Bioinformatics*, 28: 771-6.

- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., und Ruvkun, G. 2000. 'The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 403: 901-6.
- Retta, S. F., und Glading, A. J. 2016. 'Oxidative Stress and Inflammation in Cerebral Cavernous Malformation Disease Pathogenesis: Two Sides of the Same Coin', *Int J Biochem Cell Biol*.
- Risau, W. 1997. 'Mechanisms of angiogenesis', *Nature*, 386: 671-4.
- Robinson, J. R., Jr., Awad, I. A., Magdinec, M., und Paranandi, L. 1993. 'Factors predisposing to clinical disability in patients with cavernous malformations of the brain', *Neurosurgery*, 32: 730-5; discussion 35-6.
- Rouhi, P., Lee, S. L., Cao, Z., Hedlund, E. M., Jensen, L. D., und Cao, Y. 2010. 'Pathological angiogenesis facilitates tumor cell dissemination and metastasis', *Cell Cycle*, 9: 913-7.
- Roush, S., und Slack, F. J. 2008. 'The let-7 family of microRNAs', *Trends Cell Biol*, 18: 505-16.
- Sætrom, P., Heale, B. S. E., Snøve, O., Aagaard, L., Alluin, J., und Rossi, J. J. 2007. 'Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity', *Nucleic Acids Res*, 35: 2333-42.
- Sainson, R. C. A., Aoto, J., Nakatsu, M. N., Holderfield, M., Conn, E., Koller, E., und Hughes, C. C. W. 2005. 'Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis', *The FASEB Journal*.
- Satoh, M., Minami, Y., Takahashi, Y., Tabuchi, T., und Nakamura, M. 2011. 'A cellular microRNA, let-7i, is a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy', *Journal of cardiac failure*, 17: 923-29.
- Schleider, E., Stahl, S., Wustehube, J., Walter, U., Fischer, A., und Felbor, U. 2011. 'Evidence for anti-angiogenic and pro-survival functions of the cerebral cavernous malformation protein 3', *Neurogenetics*, 12: 83-6.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., und Zamore, P. D. 2003. 'Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex', *Cell*, 115: 199-208.
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., und Rajewsky, N. 2008. 'Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs', *Nature*, 455: 58-63.
- Shen, G., Li, X., Jia, Y. F., Piazza, G. A., und Xi, Y. 2013. 'Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer', *Acta Pharmacol Sin*, 34: 336-41.
- Shenkar, R., Shi, C., Check, I. J., Lipton, H. L., und Awad, I. A. 2007. 'Concepts and hypotheses: inflammatory hypothesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformations', *Neurosurgery*, 61: 693-702.
- Shenkar, R., Shi, C., Rebeiz, T., Stockton, R. A., McDonald, D. A., Mikati, A. G., Zhang, L., Austin, C., Akers, A. L., Gallione, C. J., Rorrer, A., Gunel, M., Min, W., Marcondes de Souza, J., Lee, C., Marchuk, D. A., und Awad, I. A. 2015. 'Exceptional aggressiveness of cerebral cavernous malformation disease associated with *PDCD10* mutations', *Genet Med*, 17: 188-96.
- Sherf, B. A., Navarro, S. L., Hannah, R. R., und Wood, K. V. 1996. 'Dual-luciferase reporter assay: An advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays', *Promega Notes* 57; 2-8.
- Shi, L., Fisslthaler, B., Zippel, N., Frömel, T., Hu, J., Elgheznavy, A., Heide, H., Popp, R., und Fleming, I. 2013. 'MicroRNA-223 antagonizes angiogenesis by targeting $\beta 1$ Integrin and preventing growth factor signaling in endothelial cells', *Circ Res*, 113: 1320-30.
- Spiegler, S., Najm, J., Liu, J., Gkalympoudis, S., Schröder, W., Borck, G., Brockmann, K., Elbracht, M., Fauth, C., Ferbert, A., Freudenberg, L., Grasshoff, U., Hellenbroich, Y., Henn, W., Hoffjan, S., Huning, I., Korenke, G. C., Kroisel, P. M., Kunstmann, E., Mair, M., Munk-Schulenburg, S., Nikoubashman, O., Pauli, S., Rudnik-Schöneborn, S., Sudholt, I., Sure, U., Tinschert, S., Wiednig, M., Zoll, B., Ginsberg, M. H., und Felbor, U. 2014. 'High mutation detection rates in cerebral cavernous malformation upon

- stringent inclusion criteria: one-third of probands are minors', *Mol Genet Genomic Med*, 2: 176-85.
- Spiegler, S., Rath, M., Paperlein, C., und Felbor, U. 2018. 'Cerebral Cavernous Malformations: An Update on Prevalence, Molecular Genetic Analyses, and Genetic Counselling', *Mol Syndromol*, 9: 60-69.
- Stahl, S., Gaetzner, S., Voss, K., Brackertz, B., Schleider, E., Sürücü, O., Kunze, E., Netzer, C., Korenke, C., Finckh, U., Habek, M., Poljakovic, Z., Elbracht, M., Rudnik-Schöneborn, S., Bertalanffy, H., Sure, U., und Felbor, U. 2008. 'Novel CCM1, CCM2, and CCM3 mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in CCM2 prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex', *Hum Mutat*, 29: 709-17.
- Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Pober, J. S., und Sessa, W. C. 2007. 'Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells', *Circ Res*, 100: 1164-73.
- Sure, U., Freman, S., Bozinov, O., Benes, L., Siegel, A. M., und Bertalanffy, H. 2005. 'Biological activity of adult cavernous malformations: a study of 56 patients', *J Neurosurg*, 102: 342-7.
- Tahergorabi, Z., und Khazaei, M. 2012. 'A Review on Angiogenesis and Its Assays', *Iran J Basic Med Sci*, 15: 1110-26.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., und Takahashi, T. 2004. 'Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival', *Cancer Res*, 64: 3753-6.
- Tang, R., Liang, L., Luo, D., Feng, Z., Huang, Q., He, R., Gan, T., Yang, L., und Chen, G. 2015. 'Downregulation of MiR-30a is Associated with Poor Prognosis in Lung Cancer', *Med Sci Monit*, 21: 2514-20.
- ten Klooster, J. P., Jansen, M., Yuan, J., Oorschot, V., Begthel, H., Di Giacomo, V., Colland, F., de Koning, J., Maurice, M. M., Hornbeck, P., und Clevers, H. 2009. 'Mst4 and Ezrin induce brush borders downstream of the Lkb1/Strad/Mo25 polarization complex', *Dev Cell*, 16: 551-62.
- Thomas, P., und Smart, T. G. 2005. 'HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins', *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51: 187-200.
- Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M., und Goodall, G. J. 2013. 'On Measuring miRNAs after Transient Transfection of Mimics or Antisense Inhibitors', *PLoS One*, 8: e5214.
- Trajkovski, M., Hausser, J., Soutschek, J., Bhat, B., Akin, A., Zavolan, M., Heim, M. H., und Stoffel, M. 2011. 'MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity', *Nature*, 474: 649-53.
- Trapani, E., und Retta, S. F. 2015. 'Cerebral cavernous malformation (CCM) disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors', *J Neurosurg Sci*, 59: 201-9.
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P. H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., und Ponten, F. 2015. 'Proteomics. Tissue-based map of the human proteome', *Science*, 347: 1260419.
- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Liu, N., Williams, A. H., McAnally, J., Gerard, R. D., Richardson, J. A., und Olson, E. N. 2006. 'A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 18255-60.
- Vejnar, C. E., und Zdobnov, E. M. 2012. 'MiRmap: comprehensive prediction of microRNA target repression strength', *Nucleic Acids Res*, 40: 11673-83.
- Vinciguerra, A., Formisano, L., Cerullo, P., Guida, N., Cuomo, O., Esposito, A., Di Renzo, G., Annunziato, L., und Pignataro, G. 2014. 'MicroRNA-103-1 selectively downregulates

- brain NCX1 and its inhibition by anti-miRNA ameliorates stroke damage and neurological deficits', *Mol Ther*, 22: 1829-38.
- Vinnikov, I. A., Hajdukiewicz, K., Reymann, J., Beneke, J., Czajkowski, R., Roth, L. C., Novak, M., Roller, A., Dorner, N., Starkuviene, V., Theis, F. J., Erfle, H., Schutz, G., Grinevich, V., und Konopka, W. 2014. 'Hypothalamic miR-103 protects from hyperphagic obesity in mice', *J Neurosci*, 34: 10659-74.
- Vlachos, I. S., Kostoulas, N., Vergoulis, T., Georgakilas, G., Reczko, M., Maragkakis, M., Paraskevopoulou, M. D., Prionidis, K., Dalamagas, T., und Hatzigeorgiou, A. G. 2012. 'DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways', *Nucleic Acids Res*, 40: W498-504.
- Voss, K., Stahl, S., Schleider, E., Ullrich, S., Nickel, J., Mueller, T. D., und Felbor, U. 2007. 'CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations', *Neurogenetics*, 8: 249-56.
- Wang, B., Li, S., Qi, H. H., Chowdhury, D., Shi, Y., und Novina, C. D. 2009. 'Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins', *Nat Struct Mol Biol*, 16: 1259-66.
- Wang, Y. P., und Li, K. B. 2009. 'Correlation of expression profiles between microRNAs and mRNA targets using NCI-60 data', *BMC Genomics*, 10: 218.
- Wiesen, J. L., und Tomasi, T. B. 2009. 'Dicer is regulated by cellular stresses and interferons', *Mol Immunol*, 46: 1222-8.
- Wijnen, W. J., van der Made, I., van den Oever, S., Hiller, M., de Boer, B. A., Picavet, D. I., Chatzisprou, I. A., Houtkooper, R. H., Tijssen, A. J., Hagoort, J., van Veen, H., Everts, V., Ruijter, J. M., Pinto, Y. M., und Creemers, E. E. 2014. 'Cardiomyocyte-specific miRNA-30c over-expression causes dilated cardiomyopathy', *PLoS One*, 9: e96290.
- Winter, J., und Diederichs, S. 2013. 'Argonaute-3 activates the let-7a passenger strand microRNA', *RNA Biol*, 10: 1631-43.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., und Diederichs, S. 2009. 'Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation', *Nat Cell Biol*, 11: 228-34.
- Witkos, T., Koscianska, E., und Krzyzosiak, W. 2011. 'Practical aspects of microRNA target prediction', *Curr Mol Med*, 11: 93-109.
- Wong, J. H., Awad, I. A., und Kim, J. H. 2000. 'Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: a preliminary report', *Neurosurgery*, 46: 1454-9.
- Wong, M. K., und Gotlieb, A. I. 1984. 'In vitro reendothelialization of a single-cell wound. Role of microfilament bundles in rapid lamellipodia-mediated wound closure', *Lab Invest*, 51: 75-81.
- Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R., und He, X. 2010. 'Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region', *Oncogene*, 29: 2302-8.
- Wu, T., Zhou, H., Hong, Y., Li, J., Jiang, X., und Huang, H. 2012. 'miR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation', *J Biol Chem*, 287: 7503-11.
- Wu, Z., Qi, Y., Guo, Z., Li, P., und Zhou, D. 2016. 'miR-613 suppresses ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by targeting the *programmed cell death 10* gene', *Biosci Trends*, 10: 251-7.
- Würdinger, T., Tannous, B. A., Saydam, O., Skog, J., Grau, S., Soutschek, J., Weissleder, R., Breakefield, X. O., und Krichevsky, A. M. 2008. 'miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells', *Cancer Cell*, 14: 382-93.
- Xin, M., Small, E. M., Sutherland, L. B., Qi, X., McAnally, J., Plato, C. F., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., und Olson, E. N. 2009. 'MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury', *Genes Dev*, 23: 2166-78.
- Xu, X., Ge, S., Jia, R., Zhou, Y., Song, X., Zhang, H., und Fan, X. 2015. 'Hypoxia-induced miR-181b enhances angiogenesis of retinoblastoma cells by targeting PDCD10 and GATA6', *Oncol Rep*, 33: 2789-96.

- Xu, X., Wang, X., Zhang, Y., Wang, D.-C., und Ding, J. 2013. 'Structural Basis for the Unique Heterodimeric Assembly between Cerebral Cavernous Malformation 3 and Germinal Center Kinase III', *Structure*, 21: 1059-66.
- Yang, J. S., Phillips, M. D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A. C., Chen, K. C., und Lai, E. C. 2011. 'Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species', *RNA*, 17: 312-26.
- Yang, Y., Ago, T., Zhai, P., Abdellatif, M., und Sadoshima, J. 2011. 'Thioredoxin 1 negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through upregulation of miR-98/let-7', *Circ Res*, 108: 305-13.
- Yao, J., Hennessey, T., Flynt, A., Lai, E., Beal, M. F., und Lin, M. T. 2010. 'MicroRNA-related Cofilin abnormality in Alzheimer's Disease', *PLoS One*, 5: e15546.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., und Cullen, B. R. 2003. 'Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs', *Genes Dev*, 17: 3011-6.
- You, C., Erol Sandalcioglu, I., Dammann, P., Felbor, U., Sure, U., und Zhu, Y. 2013. 'Loss of CCM3 impairs DLL4-Notch signalling: implication in endothelial angiogenesis and in inherited cerebral cavernous malformations', *J Cell Mol Med*, 17: 407-18.
- Zabramski, J. M., Wascher, T. M., Spetzler, R. F., Johnson, B., Golfinos, J., Drayer, B. P., Brown, B., Rigamonti, D., und Brown, G. 1994. 'The natural history of familial cavernous malformations: results of an ongoing study', *J Neurosurg*, 80: 422-32.
- Zaragosi, L.-E., Wdziekonski, B., Brigand, K. L., Villageois, P., Mari, B., Waldmann, R., Dani, C., und Barbry, P. 2011. 'Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis', *Genome Biology*, 12: R64.
- Zhang, Y., Hu, X., Miao, X., Zhu, K., Cui, S., Meng, Q., Sun, J., und Wang, T. 2016. 'MicroRNA-425-5p regulates chemoresistance in colorectal cancer cells via regulation of Programmed Cell Death 10', *J Cell Mol Med*, 20: 360-9.
- Zhang, Y., Tang, W., Zhang, H., Niu, X., Xu, Y., Zhang, J., Gao, K., Pan, W., Boggon, T. J., Toomre, D., Min, W., und Wu, D. 2013. 'A network of interactions enables CCM3 and STK24 to coordinate UNC13D-driven vesicle exocytosis in neutrophils', *Dev Cell*, 27: 215-26.
- Zhang, Z., Qin, Y. W., Brewer, G., und Jing, Q. 2012. 'MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators', *WIREs RNA*, 3: 593-600.
- Zheng, H., Fu, R., Wang, J. T., Liu, Q., Chen, H., und Jiang, S. W. 2013. 'Advances in the techniques for the prediction of microRNA targets', *Int J Mol Sci*, 14: 8179-87.
- Zheng, X., Xu, C., Di Lorenzo, A., Kleaveland, B., Zou, Z., Seiler, C., Chen, M., Cheng, L., Xiao, J., He, J., Pack, M. A., Sessa, W. C., und Kahn, M. L. 2010. 'CCM3 signaling through sterile 20-like kinases plays an essential role during zebrafish cardiovascular development and cerebral cavernous malformations', *J Clin Invest*, 120: 2795-804.
- Zhong, X., Li, N., Liang, S., Huang, Q., Coukos, G., und Zhang, L. 2010. 'Identification of microRNAs regulating reprogramming factor *LIN28* in embryonic stem cells and cancer cells', *Journal of Biological Chemistry*, 285: 41961-71.
- Zhou, H. J., Qin, L., Zhang, H., Tang, W., Ji, W., He, Y., Liang, X., Wang, Z., Yuan, Q., Vortmeyer, A., Toomre, D., Fuh, G., Yan, M., Kluger, M. S., Wu, D., und Min, W. 2016. 'Endothelial exocytosis of angiopoietin-2 resulting from CCM3 deficiency contributes to cerebral cavernous malformation', *Nat Med*, 22: 1033-42.
- Zhou, Q., Yang, M., Lan, H., und Yu, X. 2013. 'miR-30a negatively regulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and peritoneal fibrosis by targeting Snai1', *Am J Pathol*, 183: 808-19.
- Zhu, Y., Wu, Q., Fass, M., Xu, J. F., You, C., Muller, O., Sandalcioglu, I. E., Zhang, J. M., und Sure, U. 2011. 'In vitro characterization of the angiogenic phenotype and genotype of the endothelia derived from sporadic cerebral cavernous malformations', *Neurosurgery*, 69: 722-31; discussion 31-2.
- Zhu, Y., Wu, Q., Xu, J. F., Miller, D., Sandalcioglu, I. E., Zhang, J. M., und Sure, U. 2010. 'Differential angiogenesis function of CCM2 and CCM3 in cerebral cavernous malformations', *Neurosurg Focus*, 29: E1.

8. Anhang

8.1. Vektorkarten der pLightSwitch Plasmide

Die von der Firma SwitchGear bezogenen Plasmide, die im Luciferase-Reporter-Gen-Assay eingesetzt wurden, sind als Vektorkarten in Abbildung 21 dargestellt.

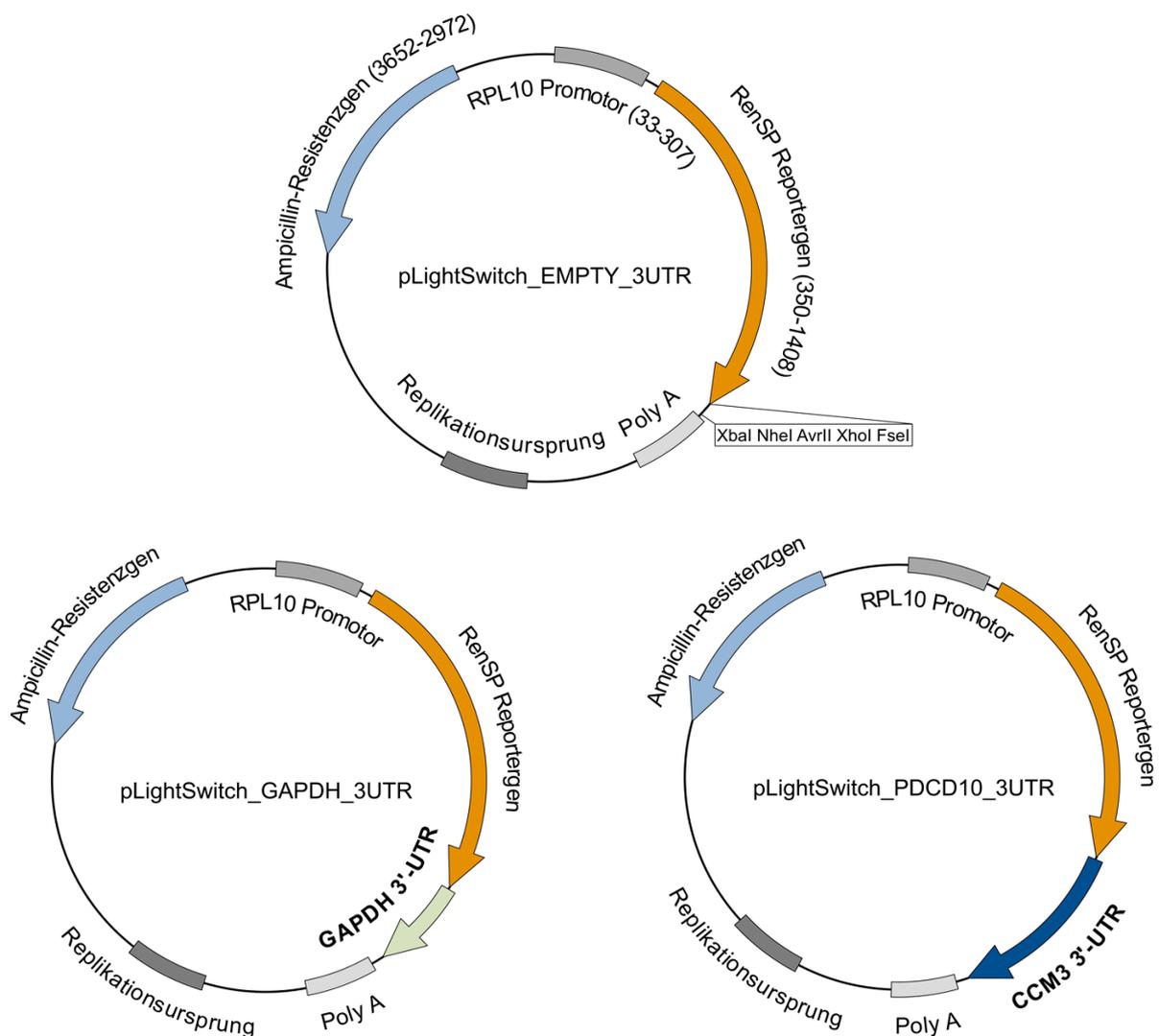


Abbildung 21. Vektorkarten der im Luciferase-Assay eingesetzten Plasmide pLightSwitch_Empty_3UTR, pLightSwitch_GAPDH_3UTR und pLightSwitch_PDCD10_3UTR. Der RPL10 (*Ribosomal protein L10*) Promotor, ein Replikationsursprung und eine Polyadenylierungsstelle (Poly A) sind in grau gekennzeichnet. Das Reporter-Gen RenSP (Renilla) ist in orange hervorgehoben. Das Kontrollplasmid *Empty* beinhaltet keine 3'-UTR, die *Multiple cloning site* des Plasmids (Restriktionsschnittstellen: Xba I, Nhe I, Avr II, Xho I und Fse I) ist als Kasten dargestellt.

8.2. Optimierung der Transfektion in HEK293T-Zellen und HUVECs

Da HUVECs schwierig zu transfizieren sind (Hunt et al. 2010), wurden die Transfektionsbedingungen im Vorfeld der experimentellen Arbeiten optimiert. Zur Transfektion wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine[®] RNAiMAX eingesetzt. Zur Überprüfung wurde eine mit Fluorescein markierte miRNA verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden im Rahmen des vom Hersteller für HUVECs optimierten Protokolls variiert, mit miRNA Konzentrationen zwischen 10-50 nM und Konfluenzen der Zellen zwischen 60-80 %. Optimale Konditionen konnten bei 100 nM miRNA Konzentration und 80 % Konfluenz erreicht werden. Nach 4 Stunden wurde die Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch überprüft und Bilder aufgenommen (s. Abbildung 22 A).

Für das Luciferase-Reportergen-Assay wurden HEK293T-Zellen eingesetzt. Auch für diese Zellen wurden die Transfektionsbedingungen optimiert. Da in diesem Ansatz neben den miRNA-Analoga auch Plasmide transfiziert werden sollten, wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine[®] 2000 ausgewählt. Es wurden Transfektionen mit unterschiedlichen Lipofectamine[®] 2000 Konzentrationen im Rahmen der Herstellerempfehlungen durchgeführt. Um die Transfektionseffizienz von Plasmiden beurteilen zu können, wurde ein für ein fluoreszierendes Protein kodierendes Plasmid (pmCherry-C1) in die HEK293T-Zellen eingebracht. Zur Optimierung der miRNA-Transfektion wurde eine fluoreszenzmarkierte siRNA (*small interfering RNA*) in die HEK293T-Zellen eingeschleust. Da siRNAs den miRNAs in ihrer chemischen Struktur gleichen (Bartel 2004), konnte die fluoreszenzmarkierte siRNA zur Optimierung der miRNA-Transfektion eingesetzt werden. Nach 4 Stunden wurde die Transfektion fluoreszenzmikroskopisch überprüft und Aufnahmen gemacht (s Abbildung 22 B).

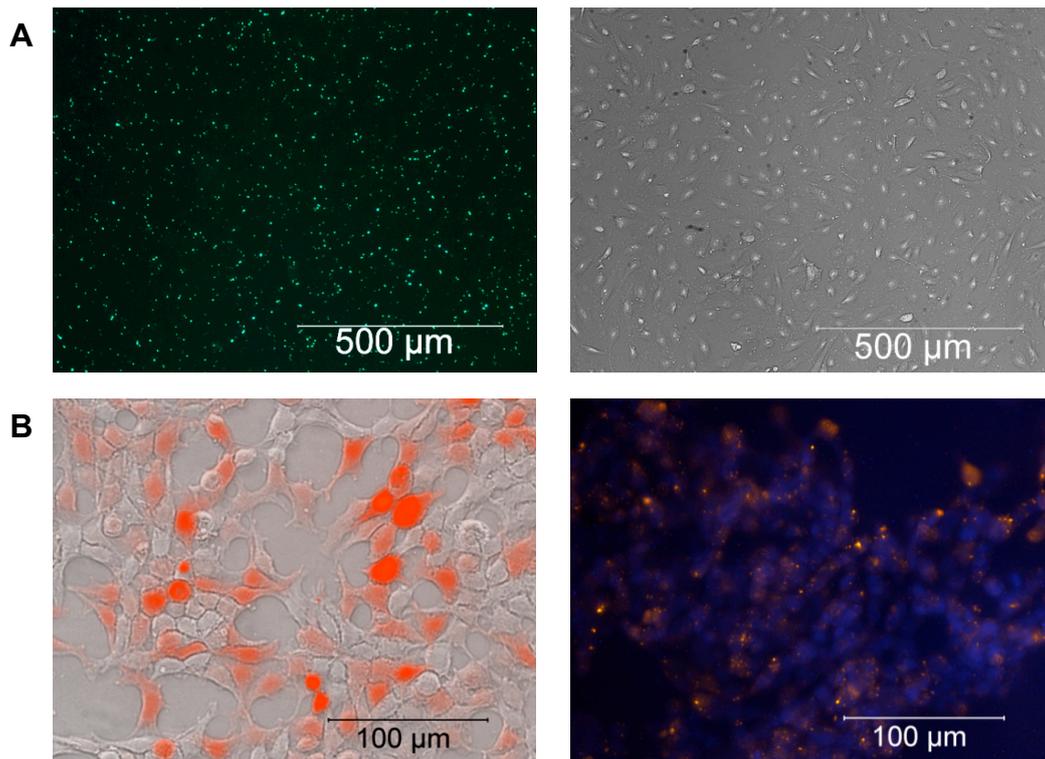


Abbildung 22. (A) Optimierung der Transfektionsbedingungen von miRNAs in HUVECs. Links ist die Fluoreszenzaufnahme, rechts das korrespondierende Hellfeldbild dargestellt. Die Transfektionsbedingungen entsprechen denen, die bei der Transfektion von miRNA-Analoga in HUVECs beschrieben sind. Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm bei einer 10 x Vergrößerung. **(B)** Optimierung der Transfektionsbedingungen von Plasmiden und miRNAs in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden auf einem zuvor gelatinisierten Deckgläschen ausgesät und bei 80 % Konfluenz entweder mit Plasmid oder siRNA transfiziert. Links ist die Plasmidtransfektion, rechts die Transfektion der siRNA zu sehen. Zur besseren Beurteilung der Transfektionseffizienz wurden das fluoreszenzmikroskopische Bild und das korrespondierende Hellfeldbild (links) digital übereinander gelegt. Erfolgreich mit Plasmid transfizierte Zellen sind in rot dargestellt. Zur Darstellung der siRNA-Transfektionseffizienz wurden die Kerne (blau) mit DAPI eingefärbt, die fluoreszenzmarkierte siRNA ist in orange dargestellt. Die beiden fluoreszenzmikroskopischen Bilder (rechts) sind digital übereinander gelegt. Die Darstellung entspricht einer Transfektion bei optimalen Bedingungen, die auch bei der Co-Transfektion von miRNA-Analoga und Plasmiden in HEK293T-Zellen beschrieben ist. Das Bild wurde bei einer 20 x Vergrößerung aufgenommen, der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

8.3. Sphäroid-basierter Sprossungs-Assay

Das bereits im Ergebnisteil dargestellte Sprossverhalten von HUVECs nach miRNA-Analoga, bzw. miRNA Inhibitoren Behandlung (s. 4.5 bzw. 4.9) wurde auch bei geringeren Konzentrationen der Wachstumsfaktoren VEGF-A und FGF-2 untersucht. Die Transfektion der miRNA-Analoga und miRNA Inhibitoren erfolgte hier analog zu vorangegangenen Versuchen (s. 3.1.2), das Sphäroid-basierte Sprossungs-Assay (s. 3.1.3) wurde dahingehend abgeändert, dass die genannten Wachstumsfaktoren in einer Konzentration von 25 ng/ml zur Stimulation des Wachstums verwendet wurden. Es wurde der Effekt der Transfektion von miR-30a-5p Analoga bzw. Inhibitoren auf die Sphäroide überprüft, da diese miRNA aufgrund der Ergebnisse hinsichtlich ihrer Proangiogenität von besonderem Interesse erschien. Entsprechend dem im Ergebnisteil beschriebenen Versuch wurden auch hier Sprossanzahl pro Sphäroid und mittlere Sprosslänge pro Sphäroid ausgewertet.

Bei der Sprossanzahl pro Sphäroid konnten insgesamt keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle nach Transfektion des miR-30a-5p Analogons bzw. Inhibitors gezeigt werden (s. Abbildung 23). Unter Basalstimulation konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der jeweiligen Negativkontrolle und den mit miRNA-Analoga (Negativkontrolle: 12,88 vs. miR-30a-5p: 14,81; $p = 0,38$): bzw. mit miRNA Inhibitoren transfizierten Sphäroiden (Negativkontrolle: 12,6 vs. miR-30a-5p: 12,1; $p = 0,7$) festgestellt werden.

Auch unter Stimulation mit VEGF-A konnte kein Unterschied zwischen der Sprossanzahl pro Sphäroid bei sowohl miRNA-Analoga (Negativkontrolle: 18,1 vs. miR-30a-5p: 21,05; $p = 0,18$) als auch bei miRNA Inhibitoren gemessen werden (Negativkontrolle: 19,5 vs. miR-30a-5p Inhibitor: 19,03; $p = 0,71$).

Unter Stimulationsbedingungen mit FGF-2 konnten ähnliche Ergebnisse gezeigt werden, auch hier führte die Transfektion mit miRNA-Analogen nicht zu einer Vermehrung der Sprossanzahl pro Sphäroid (Negativkontrolle: 20,23 vs. miR-30a-5p: 22,88; $p = 0,23$). Die Transfektion des miRNA Inhibitors führte nicht zu einer Verringerung der Sprossanzahl (Negativkontrolle: 20,55 vs. miR-30a-5p Inhibitor: 19,15; $p = 0,29$).

Die mittlere Sprosslänge pro Sphäroid hingegen war nach Transfektion des miRNA Analogons signifikant länger im Vergleich zur Negativkontrolle.

Unter Basalstimulation war die mittlere Sprosslänge pro Sphäroid um 24,9 % gesteigert (Negativkontrolle: 87,74 μm vs. miR-30a-5p: 109,6 μm ; $p = 0,0042$), unter Stimulation mit VEGF-A um 19,5 % (Negativkontrolle: 105,9 μm vs. miR-30a-5p 126,6 μm ; $p = 0,0061$) und unter Stimulation mit FGF-2 um 27,4 % (Negativkontrolle: 120,1 μm vs. miR-30a-5p 153 μm ; $p = 0,0001$).

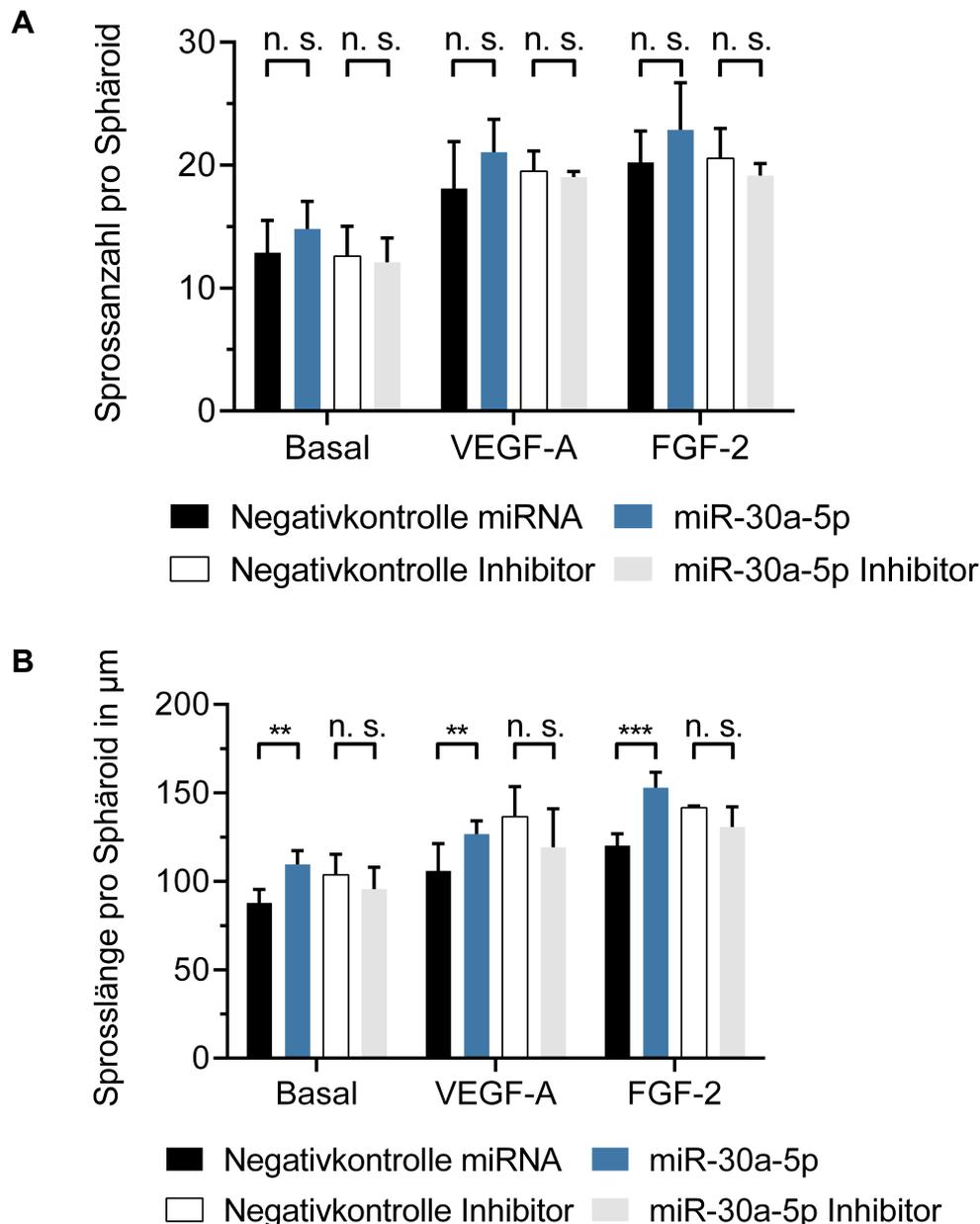


Abbildung 23. (A) Sprossanzahl pro Sphäroid und **(B)** mittlere Sprosslänge pro Sphäroid nach Transfektion mit einem miR-30a-5p Analogon bzw. miR-30a-5p Inhibitor und der jeweiligen Negativkontrolle. Weder die Transfektion des Analogons, noch des Inhibitors führte zu einer signifikanten Veränderung der Sprossanzahl pro Sphäroid. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, n. s. nicht signifikant. Das Experiment wurde in 3 unabhängigen Versuchen wiederholt ($n = 3$).

Nach Transfektion des miRNA Inhibitors zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung des Sprossverhaltens, die mittlere Sprosslänge pro Sphäroid wurde durch die Transfektion nicht verringert.

Unter basalen Stimulationsbedingungen konnte kein signifikanter Unterschied nach Transfektion des Inhibitors gemessen werden (Negativkontrolle: 103,7 μm vs. miR-30a-5p Inhibitor: 95,61 μm ; $p = 0,427$), ebenso wie unter Stimulation mit VEGF-A (Negativkontrolle: 136,5 μm vs. miR-30a-5p Inhibitor: 119,3 μm , $p = 0,098$) und Stimulation mit FGF-2 (Negativkontrolle: 141,6 μm vs. miR-30a-5p Inhibitor: 130,6; $p = 0,28$).

Zusammenfassend konnte nur bei der Transfektion mit miR-30a-5p Analogon eine signifikant erhöhte mittlere Sprosslänge pro Sphäroid gemessen werden, Veränderungen bei der Sprossanzahl pro Sphäroid bzw. nach Transfektion des miRNA Inhibitors ließen sich nicht zeigen.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Interaktionen von CCM3 in der Zelle.....	4
Abbildung 2. Eine akute Inaktivierung von CCM3 führt zu einer Steigerung der Angiogenese.....	6
Abbildung 3. Biogenese der miRNAs.....	8
Abbildung 4. Klassifikation von miRNA-Bindungsstellen	9
Abbildung 5. Klassifizierung der Bindungsstellen der Kandidaten-miRNAs in der 3'-UTR von <i>CCM3</i>	38
Abbildung 6. Schematische Darstellung des <i>CCM3</i> 3'-UTR-Reporterplasmids.....	39
Abbildung 7. Die miR-30a-5p und let-7f-2-3p binden an die 3'-UTR von <i>CCM3</i>	40
Abbildung 8. (A) Schematische Darstellung der Transkriptlänge von <i>CCM3</i> . (B) Transkript-Varianten, die alle Bindungsstellen der miRNAs beinhalten, konnten in HUVECs nachgewiesen werden	42
Abbildung 9. HUVECs konnten erfolgreich mit miRNA-Analoga transfiziert werden	43
Abbildung 10. Lichtmikroskopische Aufnahmen der in Sphäroiden kultivierten HUVECs	44
Abbildung 11. (A) Sprossanzahl und (B) mittlere Sprosslänge von HUVEC-Sphäroiden nach Transfektion von miR-103a, miR-30a-5p oder let-7f-2-3p Analoga.....	46
Abbildung 12. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Migration von HUVECs nach miRNA-Analoga Transfektion	47
Abbildung 13. Die Transfektion der miRNA-Analoga führte zu einer erhöhten Migration von HUVECs.....	47
Abbildung 14. Relative <i>CCM3</i> -Expression nach Transfektion von miR-103a-3p, miR-30a-5p und let-7f-2-3p Analoga	48
Abbildung 15. (A) Exemplarische Darstellung des durchgeführten Western Blots. (B) Die relative Proteinmenge nach Transfektion der miRNA-Analoga.....	49
Abbildung 16. HUVECs wurden erfolgreich mit miR-30a-5p Inhibitor transfiziert	50
Abbildung 17. Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit dem miR-30a-5p Inhibitor oder nicht-bindendem Inhibitor behandelten HUVECs	51
Abbildung 18. (A) Sprossanzahl und (B) mittlere Sprosslänge von HUVEC-Sphäroiden waren nach Transfektion des miR-30a-5p Inhibitors verringert.....	52
Abbildung 19. (A) Relative Expression von <i>CCM3</i> nach Transfektion mit miR-30a-5p Inhibitor. (B) Relative Proteinmenge nach Transfektion von HUVECs mit einem miR-30a-5p Inhibitor. (C) Nach Transfektion des miR-30a-5p Inhibitors ist die relative <i>CCM3</i> Proteinmenge erhöht	53
Abbildung 20. Kriterien zur Auswahl der Kandidaten miRNAs.....	56
Abbildung 21. Vektorkarten der im Luciferase-Assay eingesetzten Plasmide	81
Abbildung 22. (A) Optimierung der Transfektionsbedingungen von miRNAs in HUVECs. (B) Optimierung der Transfektionsbedingungen von Plasmiden und miRNAs in HEK293T-Zellen	83
Abbildung 23. (A) Sprossanzahl pro Sphäroid und (B) mittlere Sprosslänge pro Sphäroid nach Transfektion mit einem miR-30a-5p Analogon bzw. miR-30a-5p Inhibitor	85

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. In den Versuchen verwendete miRNAs.....	20
Tabelle 2. Primer für die qPCR der Kandidaten-miRNAs.....	20
Tabelle 3. Primerpaare zur Transkriptanalyse von <i>CCM3</i>	21
Tabelle 4. PCR-Programm zur Vervielfältigung von Amplikon I, II und III.....	32
Tabelle 5. PCR-Programm zur Amplifikation von <i>CCM3</i>	33
Tabelle 6. <i>In silico</i> Berechnungen zur Bindungswahrscheinlichkeit der Kandidaten-miRNAs an die 3'-UTR von <i>CCM3</i>	37

11. Danksagung

Mein erster herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Ute Felbor, die es mir ermöglichte, im Institut für Humangenetik an diesem spannenden Forschungsthema zu arbeiten. Besonders die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, stetige Unterstützung und Ansprechbarkeit waren von großer Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön richtet sich auch an Dr. Matthias Rath, der mir während der gesamten Zeit rat- und tatkräftig zur Seite stand. Danke für dein offenes Ohr, das du für all meine Fragen hattest und für deine Bereitschaft zur konstruktiven Diskussion, die stets zu neuen Impulsen führte. Auch deine Hilfe bei der Korrektur der Arbeit weiß ich sehr zu schätzen.

Auch bei Dr. Stefanie Spiegler möchte ich mich herzlich bedanken, die neben ihrer Forschung stets die Zeit fand, mir Fragen zu beantworten und nach Lösungen zu suchen. Ohne dich wäre der Western-Blot so nicht möglich gewesen - danke für deine Hilfe.

Mein besonderer Dank geht an Konrad Schwefel und Christiane Much, die mir beide zur Seite gestanden haben, geduldig Fragen beantwortet, mich in die Laborarbeit eingeführt, und mit ihrem Einsatz sehr geholfen haben.

Bei Dr. Winnie Schröder, Dr. Juliane Najm und Katja Hartwig möchte ich mich für die Anregungen und die Unterstützung bedanken.

Ein zusätzlicher Dank gilt allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik.

Ein ganz herzlicher Dank geht auch an unsere Kooperationspartnerin aus dem ZIK HIKE, Frau Prof. Dr. Mihaela Delcea, für die freundliche Bereitstellung des Infinite 200[®] Pro Microplate Readers, der die Arbeiten mit dem Luciferase-Reportergen-Assay ermöglichte. Für die Hilfe bei der Durchführung möchte ich mich bei Doreen Biedenweg bedanken.