

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Strahlentherapie - Radioonkologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Theodor Eich-

Untersuchungen zum Einfluss des *Epidermal Growth Factor Receptors*
auf die Reifung bestimmter mikro-RNAs als zelluläre Strahlenantwort

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor rerum medicinalium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Franz-Josef Wischmann
aus Lippstadt
2017

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Greve

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Götte

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2017

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Strahlentherapie – Radioonkologie

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Theodor Eich-

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Greve

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Martin Götte

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zum Einfluss des *Epidermal Growth Factor Receptors* auf die Reifung bestimmter mikro-RNAs als zelluläre Strahlenantwort

Franz-Josef Wischmann

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *Epidermal Growth Factor Receptor*, ein Mitglied der Rezeptor-Tyrosinkinase Familie und Argonaut2, ein an der RNA-Interferenz beteiligtes Protein, die zelluläre Strahlenantwort auf der Ebene der mikro-RNA Reifung beeinflussen. Mikro-RNAs sind kleine 20-25 Nukleotide lange RNA Moleküle, die Einfluss auf die posttranskriptionale Genregulation nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die mikro-RNAs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-106b und miR-218 dem Regulierungssystem aus *Epidermal Growth Factor Receptor* und Argonaut2 unterliegen.

Darüber hinaus konnte die Tumorsuppressorfunktion von miR-218 gezeigt werden, die neben EGFR auch Birc5, Birc6, Decorin, Notch2, Robo1, Tenascin C und Tob1 reguliert und damit Einfluss auf die Invasivität, Motilität, das Zellwachstum sowie das Zellteilungsverhalten nimmt.

Die vorliegenden Daten sprechen für eine Feinregulierung der Strahlenantwort von EGFR durch miR-218.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2017

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:
„Untersuchungen zum *Einfluss des Epidermal Growth Factor Receptors* auf
die Reifung bestimmter mikro-RNAs als zelluläre Strahlenantwort“, in der
Klinik für Strahlentherapie - Radioonkologie unter der Anleitung von
Herrn Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Greve

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen
Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder
ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer
in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit,
Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades,
vorgelegt habe.

Münster, 03.11.2017

Ort, Datum

Franz-Josef Wischmann

Für Imke

Clemens & Jakob

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Krebserkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland	2
1.1.1	Mammakarzinom.....	2
1.1.2	Lungenkarzinom.....	6
1.2	Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	8
1.2.1	Physiologie von Rezeptor-Tyrosinkinasen am Beispiel des <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	9
1.2.2	Pathologie von Rezeptor-Tyrosinkinasen am Beispiel des <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> im Mammakarzinom	12
1.3	Mikro-RNAs	14
1.3.1	Transkription, Spleißen, Nucleus-Export, Reifung und Gene- silencing von mikro-RNAs am Beispiel der miR-218.....	15
1.3.2	Bedeutung von mikro-RNA-Fehlregulationen bei Krebs- Erkrankungen	19
1.4	Ionisierende Strahlung und ihr Einfluss auf biologische Systeme und biologisch funktionelle Moleküle	22
1.5	Zielsetzung der Arbeit	26
2	MATERIAL & METHODEN	28
2.1	Material	28
2.1.1	Chemikalien.....	28
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	30
2.1.3	Zelllinien	32
2.1.4	Zellkulturmedien und Zusätze	35
2.1.5	Enzyme.....	36
2.1.6	Primer	37
2.1.6.1	Housekeeping Gen Assay	38
2.1.7	TaqMan® Sonden.....	39
2.1.8	TaqMan® MicroRNA Assays	39
2.1.9	Antikörper	40
2.1.9.1	Unkonjugierte Primärantikörper.....	40
2.1.9.2	Konjugierte Sekundärantikörper	41

2.1.9.3 Konjugierte Primär-Antikörper	42
2.1.10 RNAi Anwendungen	42
2.1.11 Geräte	42
2.1.12 Verwendete Kits	44
2.1.13 Verbrauchsmaterial.....	45
2.1.14 Software	46
2.1.15 Online Datenbanken	46
2.2 Methoden	47
2.2.1 Zellkultur	47
2.2.2 Transiente Transfektion.....	47
2.2.3 RNA Isolation.....	48
2.2.3.1 total-RNA Isolation.....	48
2.2.3.2 mikro-RNA Isolation	48
2.2.5 cDNA Synthese	48
2.2.5.1 cDNA Synthese von total-RNA Isolaten	48
2.2.5.2 cDNA Synthese von mikro-RNA Isolaten	49
2.2.6 PCR und qPCR.....	50
2.2.6.1 PCR.....	50
2.2.6.2 qPCR mit SYTO9	51
2.2.6.3 qPCR mit TaqMan® Assay.....	53
2.2.7 Bestrahlung von Zellen	54
2.2.8 Vorbehandlung von Zellen mit Cytochalasin D oder Tyrphostin vor Bestrahlung.....	55
2.2.9 Western Blot.....	57
2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie.....	57
2.2.11 Durchflusszytometrie	58
2.2.12 Luc-Pair Duo-Luciferase Assay.....	59
2.2.13 Zell-Invasions-Assay	59
2.2.14 Digitale-Holographische-Mikroskopie	60
2.2.15 Statistik	61
3 ERGEBNISSE	63

3.1 EGFR Expression und miR-218 Reifung in verschiedenen Zelllinien	63
3.1.1 EGFR Transkription in verschiedenen Zelllinien.....	63
3.1.2 Reifung von miR-218 in verschiedenen Zelllinien	64
3.1.3 Zusammenhang zwischen EGFR Expression und miR-218 Reifung in verschiedenen Zelllinien	65
3.2 Zielsequenzen von miR-218	67
3.2.1 Ergebnisse der <i>Target Scan</i> Abfrage für Ziel-mRNAs von miR- 218.....	67
3.2.2 Experimentelle Überprüfung der potentiellen Zielsequenzen von miR-218	69
3.2.2.1 Luciferase-Test für EGFR 3' UTR und miR-218 in MDA-MB- 231 Zellen	69
3.2.2.2 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf verschiedene mRNAs von MDA-MB-231, BT474 und A549 Zellen.....	70
3.2.2.3 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Translation verschiedener Proteine von MDA-MB-231, BT474 und A549 Zellen	72
3.3 Einfluss von miR-218 auf die Zellphysiologie	74
3.3.1 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Aktivierung des MAPK Signalweges in MDA-MB-231 Zellen	74
3.3.2 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Zellmotilität, Zellfläche und Zelltrockenmasse in MDA-MB-231 Zellen	76
3.3.3 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Mitose in MDA- MB-231, BT474 und A549 Zellen	80
3.3.4 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Invasivität in MDA-MB-231 Zellen	84
3.4 Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Reifung von mikro- RNAs und den daran beteiligten molekularen Bestandteilen	85
3.4.1 Micro-Array Analyse zur Identifikation radiosensitiver miRs ...	85
3.4.1.1 Veränderung der miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR- 100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach 2Gy Bestrahlung mit und ohne transientem EGFR Knock Down in BT474 Zellen	87

3.4.1.2	Veränderung der miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach 5Gy Bestrahlung mit und ohne transientem EGFR Knock Down in BT474 Zellen	88
3.4.1.3	Veränderung der miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach 2Gy Bestrahlung mit und ohne transientem EGFR Knock Down in A549 Zellen	90
3.4.1.4	Veränderung der miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach 5Gy Bestrahlung mit und ohne transientem EGFR Knock Down in A549 Zellen	91
3.4.2	Einfluss von Tyrosinkinaseinhibition und der Inhibition der Endozytose auf die strahlenabhängige miR-218 Reifung	93
3.4.2.1	Einfluss von Tyrosinkinaseinhibition und der Inhibition der Endozytose auf die strahlenabhängige miR-218 Reifung in BT474 Zellen.....	93
3.4.2.2	Einfluss von Tyrosinkinaseinhibition und der Inhibition der Endozytose auf die strahlenabhängige miR-218 Reifung in A549 Zellen.....	95
3.4.3	Strahleninduzierte Argonaut2 Phosphorylierung in BT474 und A549	96
3.4.4	Strahleninduzierte EGFR Translokation	98
3.4.5	Strahleninduzierte Phosphorylierung von EGFR-Tyr-1068 in A549	105
3.4.6	Co-Lokalisation von EGFR und p-AGO2 in A549 und BT474 ..	106
4	DISKUSSION	111
5	LITERATURVERZEICHNIS	126
6	DANKSAGUNG	150
7	LEBENS LAUF.....	151
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
	TABELLENVERZEICHNIS.....	X
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI

1 EINLEITUNG

Die Pathogenese von Krebserkrankungen ist komplex und lässt sich nicht auf ein Ereignis reduzieren. Letztlich basiert sie auf einer Vielzahl genetischer Modifikationen, die ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod hervorrufen. Das Spektrum fehlregulierter Gene ist dabei groß und betrifft häufig direkt Moleküle mit Schlüsselfunktion wie Hormonrezeptoren, Zelltodliganden, Adhäsionsrezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen oder beeinflusst deren Funktion oder Expression. Die Kenntnis der genauen Zusammenhänge ist von großer Wichtigkeit. So liefern schon heute tumorspezifische Biomarker wichtige Informationen bezüglich Diagnose, Prognose und Therapie der jeweiligen Krebserkrankung.

Neuere Untersuchungen zeigen allerdings wie komplex die Regelmechanismen sind. Denn die genetischen Modifikationen, die sich zu einem Ungleichgewicht zugunsten der malignen Zellproliferation verschieben, beruhen nicht nur auf Mutationen, sondern sind ebenfalls in epigenetischen Ereignissen zu suchen. Ursprünglich als unwichtig erachtete Methylierungsmuster der DNA oder Acetylierungen von Histonen spielen in der Tumorgenese eine gleichbedeutende Rolle wie Mutationen. Ebenfalls erst in der jüngeren Wissenschaftsgeschichte sind mikro-RNAs in den Fokus der Tumorbioogie gerückt. Diese kleinen Ribonukleinsäure-Moleküle besitzen die Fähigkeit zur posttranskriptionalen Genregulation und sind in der Lage so die Tumorgenese zu begünstigen oder Einfluss auf das Mikroklima eines Tumors zu nehmen.

Diese kurzen Ribonukleinsäure-Moleküle sind Gegenstand der hier vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit. Es soll untersucht werden, durch welche Regulationsmechanismen mikro-RNAs nach einer Bestrahlung in ihrer Expression beeinflusst werden und welche Zielmoleküle und stoffwechselphysiologischen Veränderungen einige ausgewählte mikro-RNAs regulieren. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Rezeptor-Tyrosinkinase *Epidermal Growth Factor Receptor*, von der

vermutet wird, als Zellstressreporter und –mediator nach Bestrahlung zu fungieren und aufgrund seines speziellen molekularbiologischen Verhaltens nach der Applikation ionisierender Strahlung, Einfluss auf die Biogenese von mikro-RNAs zu nehmen. [86]

1.1 Krebserkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland

Laut des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts erkrankten im Jahr 2012 ca. 478.000 Bundesbürger an Krebs. Mit 220.923 Sterbefällen im selben Jahr sind Krebserkrankungen nach den Herz-, Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland.

Dabei bildet das Mammakarzinom mit ca. 70.000 Neuerkrankungen und 17.748 Sterbefällen im Jahr 2012 die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Bei Männern hingegen ist mit ca. 63.700 Neuerkrankungen und 12.957 Sterbefällen das Prostatakarzinom die häufigste Form der Krebserkrankung im Jahr 2012.

Weitere geschlechtsunspezifische häufige Krebserkrankungen sind mit ca. 62.500 Fällen die des Darms und mit ca. 52.500 Fällen die der Lunge. [120]

1.1.1 Mammakarzinom

Als Mammakarzinom werden alle malignen Neoplasien der Brustdrüse bezeichnet, C50 nach ICD-10 der WHO. Das Mammakarzinom kann sowohl sporadisch als auch durch genetische Disposition induziert sein. Zu den Risikofaktoren des sporadischen Mammakarzinoms zählen ein erhöhter Östrogenspiegel, eine frühe erste Regelblutung, ein später Eintritt in die Menopause, Kinderlosigkeit, ein höheres Alter bei der ersten Geburt, ein erhöhtes Lebensalter, eine fleisch- und fettreiche Ernährung, Adipositas, Alkohol, Bewegungsmangel in der Menopause und die Hormonersatztherapie in der Menopause. [146; 86] Besonders die

Kombination von Gestagenen und Östrogenen in der Hormonersatztherapie wirkt sich hier negativ aus. [151]

Bis zu 20% der Mammakarzinome entstehen aufgrund genetischer Eigenschaften, wobei wiederum ca. 50% dieser Erkrankungen einer Mutation der Gene *BRCA1*, *BRCA2* oder *RAD51C* zu Grunde liegen. Ein frühes Manifestationsalter sowie das erhöhte Risiko ein Ovarialkarzinom zu entwickeln, unterscheidet diese klinische Gruppe von der, deren Erkrankung sporadischen Ursprungs ist. [86]

Das Mammakarzinom wird anhand seines Ursprungsgewebes in zwei Grundtypen eingeteilt. Ist das Karzinom im Gewebe der Brustdrüsen-Läppchen (*Lobuli glandulae mammariae*) entstanden handelt es sich um ein lobuläres Mammakarzinom. Neoplasien mit Ursprung in den Brustdrüsengängen (*Ductus lactifer*) werden als duktales Mammakarzinom bezeichnet. Die duktales Mammakarzinome bilden die größte Gruppe von malignen Neoplasien der Mamma. Weiterhin wird unterschieden, ob der Tumor durch eine Basalmembran vom gesunden Gewebe abgegrenzt ist, diese Form wird als *Carcinoma in situ* bezeichnet. Ein invasives Karzinom hingegen hat die Basalmembran bereits durchwachsen. Neben dem *Carcinoma lobulare in situ*, dem invasiven lobulären Mammakarzinom, dem duktales *Carcinoma in situ* und dem invasiven duktales Mammakarzinom, gibt es noch weitere, seltenere Formen des Mammakarzinoms, die allesamt eines duktales Gewebeansprungs sind: Medulläres Karzinom, Gallertkarzinom, Tubuläres Karzinom, Papilläres Karzinom, Morbus Paget der Mamille mit invasivem duktales Mammakarzinom sowie weitere Subtypen. Zur weiteren Beurteilung des entsprechenden Mammakarzinoms wird mittels TNM-Klassifikation der Tumorstatus, der Status der Lymphknoten und der Metastasen erfasst. [86]

Eine weitere essentielle Information über den Tumorstatus liefert die Analyse des Hormon- und HER2-Rezeptorstatus. Dabei wird immunhistologisch erfasst, ob die Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron sowie HER2, einem zur *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) Rezeptor-Tyrosinkinase Familie gehörender Rezeptor, im Tumorgewebe exprimiert werden. Dies ist eine für die Therapie und

Prognose sehr wesentliche Information. Gerade sogenannte Triple-negative Tumoren, die keinen der drei oben genannten Rezeptoren exprimieren, bieten neben den klassischen Therapiemethoden, bestehend aus Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie, nur begrenzte Möglichkeiten für eine zielgerichtete Therapie mit Antikörpern oder spezifischen Inhibitoren. Tumoren mit einem dreifach negativen Hormon-Rezeptorstatus sind sehr aggressiv, sehr schwierig therapierbar und immer mit einer schlechten Prognose assoziiert. [118] In Europa besitzen ca. 12%-17% der Mammakarzinome einen Tripel-negativen Hormon-Rezeptorstatus. [41] Dieser Tumor-Phänotyp scheint ethnisch manifestiert zu sein. So weisen in Asien ca. 25%-30% der Brustkrebs-Patientinnen einen Triple-negativen Hormon-Rezeptorstatus auf. [46]

Allein schon aus der konventionellen histologischen Klassifikation der Tumoren wird die Heterogenität des Mammakarzinoms deutlich. Die Möglichkeit, heutzutage auch moderne DNA-micro-Array Analysen durchzuführen, ergibt noch eine weitere Einteilung in fünf Subtypen. Diese sind: Luminal A, Luminal B, HER2, Basal und Normal. Eine Übersicht über die molekularen Feinheiten dieser Subtypen ist in Tabelle 1 zusammengefasst. [56]

Tabelle 1: Übersicht über die molekulare Klassifikation des Mammakarzinoms. [56]

Klassifikation	Immun-Profil	Weitere Charakteristika
LUMINAL A	ER ⁺ PR ^{+/-} HER2 ⁻	wenig Ki67, endokrines Ansprechen, häufiges Ansprechen auf Chemotherapie
LUMINAL B	ER ⁺ PR ^{+/-} HER2 ⁺	viel Ki67, unterschiedlich endokrines Ansprechen, variabel in der Chemotherapie, Trastuzumab Ansprechen
HER2	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁺	viel Ki67, Ansprechen auf Chemotherapie, Trastuzumab Ansprechen
BASAL	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	EGFR ⁺ und/oder Cytokreatin 5 ⁺ /6 ⁺ , viel Ki67, kein endokrines Ansprechen, häufiges Ansprechen auf Chemotherapie
CLAUDIN LOW	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	wenig Ki67, wenig E-Cadherin, wenig Claudin 3/4/7, mittleres Ansprechen auf Chemotherapie

Die Therapie beim Mammakarzinom besteht nach Möglichkeit aus einer brusterhaltenden lokalen Tumorsektion sowie einer systemischen Chemotherapie. Diese ist notwendig, da Mammakarzinome häufig in einem frühen Stadium dissiminierende Tumorzellen freisetzen. Dadurch lassen sich nicht selten schon zum Zeitpunkt der Diagnose Metastasen nachweisen. Diesen zwei Strategien folgt meistens eine adjuvante Strahlentherapie, bei der das Operationsgebiet bestrahlt wird, um das Risiko lokaler Rezidive zu verringern. Allerdings sind die Therapieansätze so mannigfaltig wie die Tumoren der Patienten selbst und reichen von einer radikalen Mastektomie bis hin zu neoadjuvanter Chemo- oder Strahlentherapie, um das Tumorgewebe vor der Operation zu verkleinern. [86]

Im Einzelnen kann das Management des Mammakarzinoms in der „Interdisziplinären S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ eingesehen werden. [75]

Ähnlich wie Frauen können auch Männer ein Mammakarzinom entwickeln. Als Risikofaktor in Form der genetischen Prädisposition ist *BRCA2* beschrieben. Als Ursachen einer sporadischen Brustkrebserkrankung bei Männern sind ein erhöhter endogener Östrogenspiegel und eine Strahlenexposition in Form einer früheren Strahlentherapie bekannt. Die Therapie und Prognose bei den jährlich ca. 400 erkrankenden Männern ist mit der des Mammakarzinoms der Frau vergleichbar. [86]

1.1.2 Lungenkarzinom

Als Lungenkarzinom werden Neoplasien bezeichnet die ihren Ursprung im Bronchialepithel haben und entsprechend dort lokalisiert sind. Es wird mit C33-C34 der ICD-10 Nomenklatur der WHO bezeichnet. Diese meist hochmalignen Tumoren sind verantwortlich für 25% der Krebssterbefälle bei Männern und 14% bei Frauen in Deutschland. Im Jahr 2012 erkrankten 34.490 Männer und 18.030 Frauen neu an einem Lungenkarzinom. Zu diesem Zeitpunkt der Datenerhebung lag die 5-Jahres Überlebensrate bei Männern bei 16% und bei Frauen bei 21%. Dies impliziert die relativ schlechte Prognose des Lungenkarzinoms. [120]

Die Risikofaktoren des annähernd nur sporadisch auftretenden Lungenkarzinoms sind mit ca. 90% im inhalativen Konsum von Zigarettenrauch zu sehen sowie des Weiteren in der Radonbelastung der Wohnung, Asbest, Arsen, Kfz-Abgasen, allgemeiner Luftverschmutzung sowie der Luftverschmutzung am Arbeitsplatz. Eine genetische Prädisposition ist nicht evident. Es gibt allerdings Auffälligkeiten bezüglich der Mutation von p53 und des Retinoblastomgens sowie einer Expression des *myc*-Gens. [86]

Auch das Lungenkarzinom wird mittels TNM-System klassifiziert. Die klinisch bedeutsamere Einordnung erfolgt allerdings anhand des histologischen Befundes. Hier wird zunächst in das kleinzellige

Lungenkarzinom (SCLC), die ca. 15%-20% der Lungenkarzinome darstellen und in das nicht kleinzellige (NSCLC) Lungenkarzinom unterschieden. Die kleinzelligen Tumoren weisen einen charakteristischen lockeren Zellverband auf, der mit einer hohen Metastasierungsrate assoziiert ist. Ist die Metastasierung zum Diagnosezeitpunkt bereits eingetreten, dies ist oftmals der Fall, wird im Zuge der makroskopischen Klassifikation darin unterschieden, ob sich der Tumor auf den Hemithorax beschränkt, *limited disease* (LD), oder nicht, *extensive disease* (ED). Nicht kleinzellige Tumoren wachsen deutlich kompakter und sind meist Varianten des Plattenepithel- oder Adenokarzinoms. Typisch sind hier charakteristische Riesenzellen. Des Weiteren werden die Tumoren anhand ihrer Ausbreitung und Lage makroskopisch klassifiziert und damit in zentral und hilusnah, peripher und diffus unterteilt. [86]

Die Therapie des jeweiligen Karzinoms richtet sich nach dem histologischen Befund sowie dem Tumorstatus. Das kleinzellige Lungenkarzinom wird primär mit einer Polychemotherapie behandelt. Da die meisten Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert sind, ist eine systemische Therapie grundsätzlich unumgänglich. Außerdem sprechen kleinzellige Lungenkarzinome gut auf eine Chemotherapie an. Die Tumorresektion sowie eine anschließende Strahlen- und Chemotherapie sind in den wenigsten Fällen möglich.

Das nicht kleinzellige Lungenkarzinom, das vergleichsweise spät metastasiert, kann aufgrund der ebenfalls späten Diagnosestellung in 30% aller Fälle operativ reseziert werden und mit einer adjuvanten oder neoadjuvanten Radio-/Chemotherapie versorgt werden. [145; 86]

Abschließend muss noch eine molekulare Eigenschaft der Lungenkarzinome hervorgehoben werden, die großen Einfluss auf die Tumorgenese und Tumorprogression hat. Viele Tumoren überexprimieren EGFR, davon betroffen sind ca. 62% aller nicht kleinzelligen Lungentumoren. Dies ist eine ungünstige Situation, da beschrieben ist, dass kleinzellige Lungenkarzinome die Liganden von EGFR, *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α) in hohem Maße exprimieren und so ein positiver autokriner Kreislauf etabliert wird

mit Auswirkungen auf das Tumorwachstum und das damit verbundene Fortschreiten der Erkrankung. Eine zielgerichtete Therapie gegen EGFR, vor allem in der palliativen Behandlung, ist daher eine stets zu prüfende Option. [123]

1.2 Rezeptor-Tyrosinkinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen sind transmembrane Proteine, die eine Schlüsselposition für viele zelluläre Prozesse wie Zell-Proliferation, -Differenzierung, -Stoffwechselprozesse, -Migration, -Überleben, Zellzyklus-Kontrolle und Angiogenese einnehmen. Gerade weil sie diese Schlüsselkompetenzen besitzen, sind die Rezeptor-Tyrosinkinasen innerhalb der letzten 30 Jahre sehr in den Fokus der Krebsforschung gerückt. [88]

Die entsprechenden Rezeptor-Tyrosinkinasen oder die ihnen nachgeschalteten Signalwege zu inhibieren, bieten aktuell vielversprechende Ansatzpunkte für die moderne Chemotherapie. Als prominentes Beispiel ist hier der Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib zu nennen [152] oder auch die humanisierten monoklonalen Antikörper Cetuximab [60] und Trastuzumab anzuführen, [6] die sich gegen EGFR und HER2-neu richten. Für *Homo sapiens* sind 58 verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen beschrieben, die sich in 20 Sub-Familien aufteilen: *Epidermal Growth Factor Receptor* (ErbB), *Insulin-like Growth Factor* (Ins), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Protein Tyrosine Kinase 7* (PTK7), *Tropomyosin Receptor Kinase* (Trk), *Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor* (Ror), *Muscle, Skeletal, Receptor Tyrosine Kinase* (MuSK), *MET proto-oncogene, Receptor Tyrosine Kinase* (MET), *AXL Receptor Tyrosine Kinase* (AXL), *Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains* (TIE), *Ephrin Receptors* (Eph), *Receptor Tyrosine Kinase* (RET), *Receptor-like Tyrosine Kinase* (Ryk), *Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase* (DDR), *ROS proto-oncogene 1*, *Receptor Tyrosine Kinase* (Ros), LMR, *Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine*

Kinase (ALK), Serine/Threonine/Tyrosine Kinase (STYK1). Der Aufbau und ihre Funktion ist im Wesentlichen sehr ähnlich, sodass dies am konkreten Beispiel des *Epidermal Growth Factor Receptor* in 1.2.1 diskutiert wird. [88]

1.2.1 Physiologie von Rezeptor-Tyrosinkinase am Beispiel des *Epidermal Growth Factor Receptor*

Der *Epidermal Growth Factor Receptor* oder auch HER1 oder ErbB1 genannt, ist im *ErbB* Gen codiert und gehört, wie bereits unter 1.2 erwähnt zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase. EGFR ist ein Transmembranprotein, das sehr stark N-terminal glycosyliert ist und ein Molekulargewicht von 170kDa hat. Die Glycosylierung ist besonders für die Protein-Protein Interaktionen wichtig und macht bei EGFR einen Anteil von ca. 20% des Molekulargewichtes aus. [28] Grundsätzlich liegt EGFR als autoinhibiertes, in sich geschlossenes Monomer vor, dessen extrazelluläre Rezeptordomäne sich in vier Domänen (DI-DIV) aufteilt. DI (Abb. 2 1. v.l. blau) und DIII (Abb. 2 1. v.l. gelb) sind die Liganden-Bindungs-Domänen. Der Großteil der Bindungsenergie geht von DIII aus. Seine Affinität zu EGF liegt bei 400nM. [87]

Die Liganden-Bindung führt zu einer „Aufrichtung“ der gesamten extrazellulären Rezeptordomäne (Abb. 2 2. v.l.). Sollte ein benachbartes EGFR Molekül ebenfalls seinen Liganden gebunden haben, ist es dem Dimerisierungsarm DII (Abb. 2 2. v.l. grün) möglich, die DII des benachbarten EGFR Moleküls zu binden und es entsteht ein stabiles Homodimer. Dabei ist allerdings die Rolle von DIV (Abb. 2 2. v.l. rot), die als Verbindungsstück zur Transmembran-Domäne beschrieben wird, noch immer unklar. Es handelt sich hier um eine cysteinreiche Region, die aufgrund ihrer Möglichkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken den Zustand des Homodimers stabilisieren könnte.

Zu den Liganden, die eine Rezeptoröffnung und -dimerisierung zufolge haben, gehören: EGF, TGF- α , Amphiregulin, Betacellulin, Epigen, Epiregulin, Neuregulin 2- β . [88]

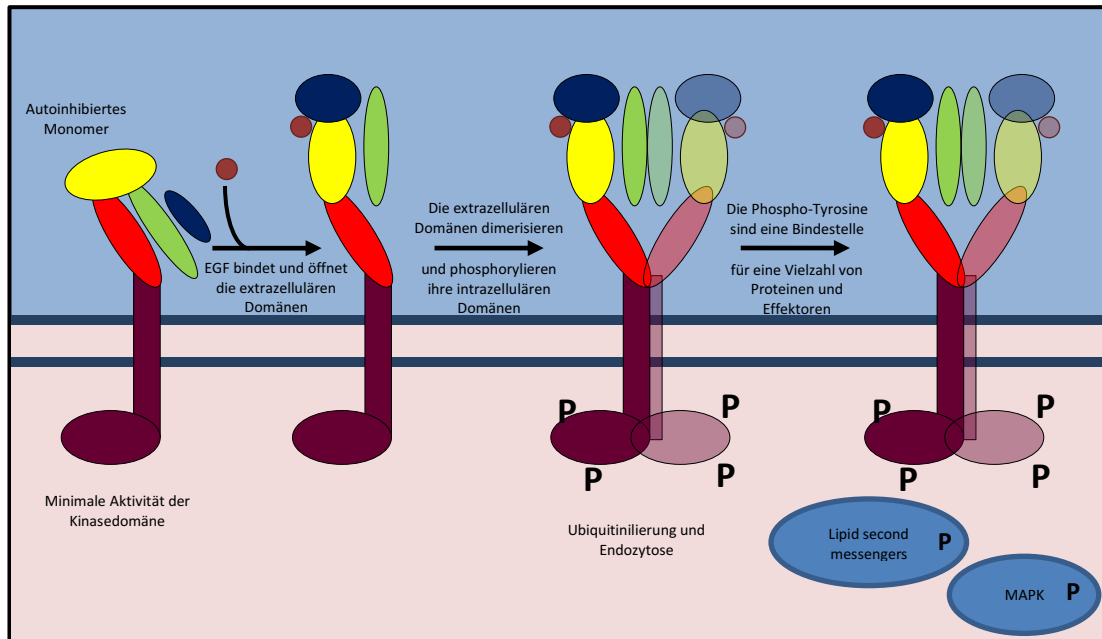


Abbildung 1: Nach der Ligandbindung dimerisiert EGFR und aktiviert nachgeschaltete Signalwege. Die Abbildung zeigt ein autoinhibiertes EGFR Molekül (1. v.l.). Bindet es seinen Liganden EGF richtet sich das Molekül um 130° auf (2. v.l.) und kann ein weiteres aktiviertes EGFR Molekül mit seinem Dimerisierungsarm (grün) binden (3. v.l.). Die EGFR Dimere phosphorylieren sich nun gegenseitig und können durch Phosphorylierung die nachgeschalteten Signalwege aktivieren (4. v.l.). (Verändert nach Pollard [115])

Die eigentliche Signalverarbeitung bzw. -weiterleitung findet C-terminal an der intrazellulären Domäne statt. Sie besitzt die Tyrosinkinase-Eigenschaft.

Die Ligandenbindung induziert in der zytoplasmatischen Domäne ebenfalls eine Konformationsänderung. Die katalytisch aktiven Tyrosin-Reste werden präsentiert und in dieser Form stabilisiert, sodass die Übertragung von Phosphatgruppen auf das jeweils andere EGFR Molekül möglich ist. Aktuell sind zehn Tyrosin-Reste als Phosphorylierungsstellen bekannt. [122] Abhängig davon, welcher Ligand an den Rezeptorteil bindet, unterscheidet sich die Konformationsänderung des gesamten Moleküls, was dann wiederum das Phosphorylierungsmuster und die damit verbundene

Signalweiterleitung beeinflusst. Dieser Effekt ist für TGF- α und EGF beschrieben. [148]

Die Phosphotyrosine sind eine Bindestelle für eine Vielzahl an Effektorproteinen, die bestimmte nachgeschaltete Signalwege aktivieren. Als wichtigste, die Einfluss auf Zell-Proliferation, -Differenzierung, -Migration, -Überleben und Zellzykluskontrolle einnehmen, sind folgende Effektorproteine zu nennen: RAS, MAPK, Src, STAT3/5, PLC γ , PKC und PI3K. [88]

Neben diesen ausschließlich positiven Reizen kann es beispielsweise zu negativen Modulierungen von EGFR kommen. Die Phosphorylierung von Tyrosin974 bewirkt die EGFR-Endozytose [130] oder die Phosphorylierung von Tyrosin1045 die Cbl-abhängige EGFR Ubiquitinierung und proteosomale Degeneration. [148] In einer Fehlregulation des sensiblen Gleichgewichts aus positiven und negativen Reizen, kann der Zusammenhang zu einem malignen Phänotypen gesehen werden. [159]

In adultem Gewebe findet man EGFR stark exprimiert in der Haut, der Mundschleimhaut, der Gallenblase und der Plazenta. (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000146648-EGFR/tissue>; Tag der Datenbankabfrage: 11. Mai 2016, 16:45 Uhr)

Ebenso nimmt EGFR in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle ein. In *loss of function* Experimenten im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Embryonen, die kein oder mutierte EGFR-Gene besitzen, entweder noch *in utero* sterben, oder schwere Entwicklungsstörungen in Lunge, Gehirn, Herz, Leber, Haut und Knochen aufwiesen und nur wenige Tage überleben. [125]

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Rezeptor-Tyrosinkinasen wie zum Beispiel EGFR hochkomplexe Proteine sind, die sehr aufwendig und kompliziert reguliert sind und dadurch ebenfalls auf eine nicht triviale Art und Weise eine Schlüsselkompetenz in Zellen höherer Organismen einnehmen. [159]

1.2.2 Pathologie von Rezeptor-Tyrosinkinasen am Beispiel des *Epidermal Growth Factor Receptor* im Mammakarzinom

EGFR sowie auch andere Rezeptor-Tyrosinkinasen entwickeln eine pathogene Eigenschaft, beziehungsweise nehmen positiven Einfluss auf die Tumorgenese, indem sie im jeweiligen Gewebe überexprimiert werden. Diesen Zusammenhang konnte Thierry J. Velu bereits 1987 an der Universität Kopenhagen aufzeigen. Die Gruppe transfizierte das humane EGFR-Gen in Maus-Fibroblasten (NIH3T3), die in Folge dessen humanes EGFR exprimierten und einen veränderten und aggressiven Phänotyp aufwiesen. [142] Allerdings wurde der Zusammenhang zwischen EGFR Aktivierung und dem damit verbundenen Zellwachstum sowie der Assoziation, eine wichtige Rolle in der Tumor-Regulation zu spielen, neun Jahre zuvor von De Larco und Todaro in Maryland, USA aufgezeigt. [31] Wie in 1.2 und 1.2.1 beschrieben, nehmen Rezeptor-Tyrosinkinasen in der Zellphysiologie eine Schlüsselkompetenz ein. Werden die ihnen nachgeschalteten Signalwege durch sie selbst dauerhaft aktiviert, nehmen sie uneingeschränkt Einfluss auf unkontrollierte Zell-Proliferation, -Differenzierung, -Stoffwechselprozesse, -Migration, -Überleben, Zellzykluskontrolle und Angiogenese. Das sensible Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Signalen der jeweiligen Stoffwechselprozesse ist also nachhaltig zu immer fortwährend positiven Reizen verschoben. Mitverantwortlich dafür ist, wie eingangs bereits erwähnt, vor allem die Überexpression von EGFR. Gesunde Zellen exprimieren ca. 4×10^4 bis 1×10^5 Rezeptormoleküle. Krebszellen hingegen exprimieren bis zu 2×10^6 Rezeptormoleküle. [53] Damit kann die Menge an EGFR-Molekülen bei malignem Phänotyp bis zu 100 Mal höher sein. Daraus resultiert eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber dem autokrinen System, wie zum Beispiel den Wachstumsfaktoren wie TGF- α oder EGF, was zu einer deutlich schlechteren Prognose der Krebserkrankung führt. [137; 54]

In die Pathologie von EGFR ist noch ein Rezeptor der ErbB-Familie involviert. Einige Tumoren exprimieren zusätzlich ErbB2, welcher auch

HER2/-neu genannt wird. HER2/-neu selbst bindet keinen Liganden, interagiert aber bevorzugt mit EGFR-Molekülen die bereits einen Liganden gebunden haben und bildet so EGFR-HER2/-neu Heterodimere. Für eine Signaltransduktion ist in diesem Fall der Heterodimerisierung, entgegen dem physiologischen EGFR-Signalweg nur ein einziges EGFR-Molekül notwendig. [27] Diese HER2/-neu Heterodimere haben die stärkste katalytische Kinase-Eigenschaft der ErbB-Familie und wirken somit am stärksten auf die nachgeschalteten Signalwege ein. Sie sind vermutlich daher für sehr aggressive Tumoren verantwortlich. [47]

Neben der pathogenen Überexpression von EGFR oder zusätzlich auch HER2/-neu können aber auch sporadische Mutationen von EGFR auftreten. Dies können Duplikationen, Deletionen oder Punktmutationen sein. Die aus den letzten zwei Mutationsarten resultierenden Veränderungen beeinflussen beziehungsweise erschweren die gegen EGFR gerichtete Chemotherapie der entsprechenden Tumoren, da zum Beispiel Epitope für humanisierte monoklonale Antikörper nicht mehr vorhanden sind. Von der Mutation unberührt bleibt hingegen meist die Signaltransduktion. [159]

Diese Pathologien von Rezeptor-Tyrosinkinasen und in diesem Beispiel von EGFR findet man in einer Vielzahl von Tumorentitäten. Eine Übersicht mit prozentualem Anteil der EGFR-Überexpression ist in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2: Übersicht der EGFR überexprimierenden Tumorentitäten und das jeweilige prozentuale Auftreten der EGFR Überexpression. [53]

Tumorentität	EGFR Überexpression
Colon	25-77%
Hals und Kopf	80-100%
Pankreas	30-50%
NCLC	40-80%
Brust	14-91%
Renal	50-90%
Ovar	35-70%
Gliom	40-63%
Blase	31-48%

1.3 Mikro-RNAs

Mikro-RNAs (miR) sind 20 Nukleotide - 22 Nukleotide kleine RNAs, die in der Lage sind, durch komplementäre Basenpaarung vorzugsweise an die *3'-untranslated region* (3'UTR) ihrer jeweiligen Ziel-mRNAs zu hybridisieren und so die Translation in aktives Protein zu inhibieren oder die Degradation der gebunden mRNA zu induzieren. [62] Neben diesem Hauptmechanismus des miR induzierten *gene-silencing* ist beschrieben, dass dies auch über die Bindung der 5'UTR [102] oder des *open reading frame* (ORF) [108] geschehen kann.

Die Entdeckung der micro-RNAs fällt in das Jahr 1993 zurück. Rosalind C. Lee entdeckte bei Arbeiten an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* lin-4 als erste micro-RNA. Ihre Erkenntnisse waren, dass lin-4 nicht für ein Protein codiert sondern für zwei kleine RNAs von einer Länge von ca. 60 Nukleotiden und ca. 20 Nukleotiden mit einer anti-sense Komplementarität zu lin-14. [82] Lee hatte also, wie heute bekannt, die pre-miR-lin4 und die gereifte miR-lin4 entdeckt. Die funktionalen und

grundlegenden Einzelheiten der mikro-RNAs werden in 1.3.1 dargestellt und erörtert.

1.3.1 Transkription, Spleißen, Nucleus-Export, Reifung und Gene-silencing von mikro-RNAs am Beispiel der miR-218

Von denen aktuell für *Homo sapiens* 2.588 (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>; Tag der Datenbankabfrage: 11. Mai 2016, 16:45 Uhr) bekannten miRs sind ca. 50% in eigenen miR-Genen lokalisiert, 40% in nicht codierenden intronischen Sequenzen und ca. 10% in Exon-Sequenzen, die allerdings nicht codierend sind. [73]

Die miR-218 ist auf Chromosom vier (4p15.31), in einer nicht codierenden intronischen Sequenz des *slit guidance ligand 2* (SLIT2), lokalisiert. [116] Parallel zur Arbeit von Punnamoottil et al., die die Lokalisation von miR-218 genau charakterisiert hat, kamen Mathew et al. zu der Vermutung, dass miR-218 durch den SLIT2-Promotor reguliert ist. Diese Annahme belegten sie mit der Korrelation der SLIT2 und miR-218 Expression in Biopsien von Glioblastoma Patienten. [105]

Die Transkription der jeweiligen Gene oder auch der speziellen miR-Gene erfolgt durch die RNA-Polymerase II. Diese generiert zunächst eine pri-miR mit einer Länge von bis zu mehreren kilo-Basenpaaren, die eine *stem-loop* Sekundärstruktur ausbildet (Abb. 2 oben). [85] Die transkribierte pri-miR wird in einem nächsten Schritt von der Typ-III RNase Drosha [83] in eine deutlich kleinere pre-miR, ca. 70 Basenpaare, mit einer *stem-loop* Sekundärstruktur zerteilt. Drosha benötigt allerdings noch einen Co-Faktor, um die pri-miR an der richtigen Position schneiden zu können. Das Protein DGCR8 [49] erkennt die den *stem loop* flankierenden Einzelstrang-Bereiche der pri-miR und lagert sich dort an, sodass sich im Folgenden Drosha an DGCR8 anlagern kann und die pri-miR so an der richtigen Position schneidet (vgl. Abb. 2 mittig). Anschließend wird die pre-miR durch Exportin 5 [72] unter GTP-Hydrolyse aus dem Nucleus in das Cytoplasma freigesetzt (Abb. 2 unten).

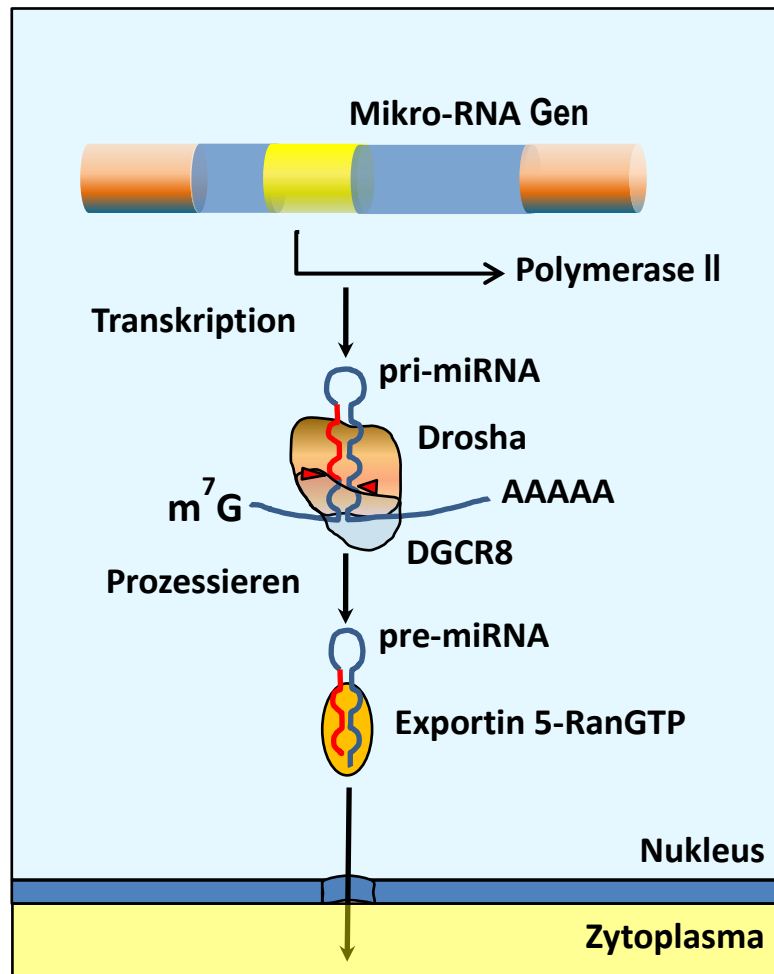


Abbildung 2: Die Transkription der pri-miR und das Spleißen der pre-miR finden im Nucleus statt. Aus den miR Genen werden durch die RNA-Polymerase II pri-miRs transkribiert und durch Drosha in pre-miRs gespleißt. Die pre-miRs werden durch Exportin 5 ins Cytoplasma entlassen. (Verändert nach Kim [73])

Im konkreten Beispiel von miR-218 beträgt die Länge der pre-miR 112 Nukleotide. Dies ist verhältnismäßig lang, da die durchschnittliche Länge von pre-miRs nur ca. 70 Nukleotide beträgt. Die Sequenz und die daraus resultierende Sekundärstruktur der pre-miR-218 sind in Abbildung 3 dargestellt. Der in dieser Abbildung hellblau gehaltene Bereich entspricht dem späteren doppelsträngigen Bereich, der bei der pre-miR Reifung herausgeschnitten wird.

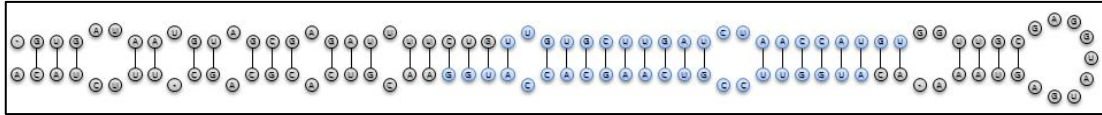


Abbildung 3: Die pre-miR-218 besteht aus 112 Nucleotiden und nimmt die typische *stem loop* Sekundärstruktur ein. Das 5' Ende ist oben links zu sehen und das 3' Ende unten links. Der in hellblau hervorgehobene Bereich entspricht der späteren doppelsträngigen Sequenz der miR-218, der aus der pre-miR herausgeschnitten wird.

Nach dem Nucleus-Export der pre-miR bilden die Endoribonuklease Dicer, [61] TRBP [25] oder PACT, [84] Argonaut2 (AGO2) [25] und die pre-miR den *RNA induced silencing complex* (RISC). [25] Dicer schneidet die pre-miR nahe dem *hairpin loop* (vgl. Abb. 4 oben). Im nächsten Schritt, wird der Leitstrang determiniert und auf AGO2 übertragen (Abb. 4 mittig). Ausschlaggebend für die Auswahl des Leitstranges ist die Stabilität des jeweiligen 5' Endes. Das 5' Ende mit der geringeren Stabilität, bedingt durch eine labilere Basenpaarung, wird als Leitstrang determiniert. [70] Der komplementäre Strang wird anschließend vom Leitstrang abgespalten und degradiert. Schlussendlich liegt nur noch das mit der entsprechenden reifen miR beladene AGO2 vor (Abb. 4 unten).

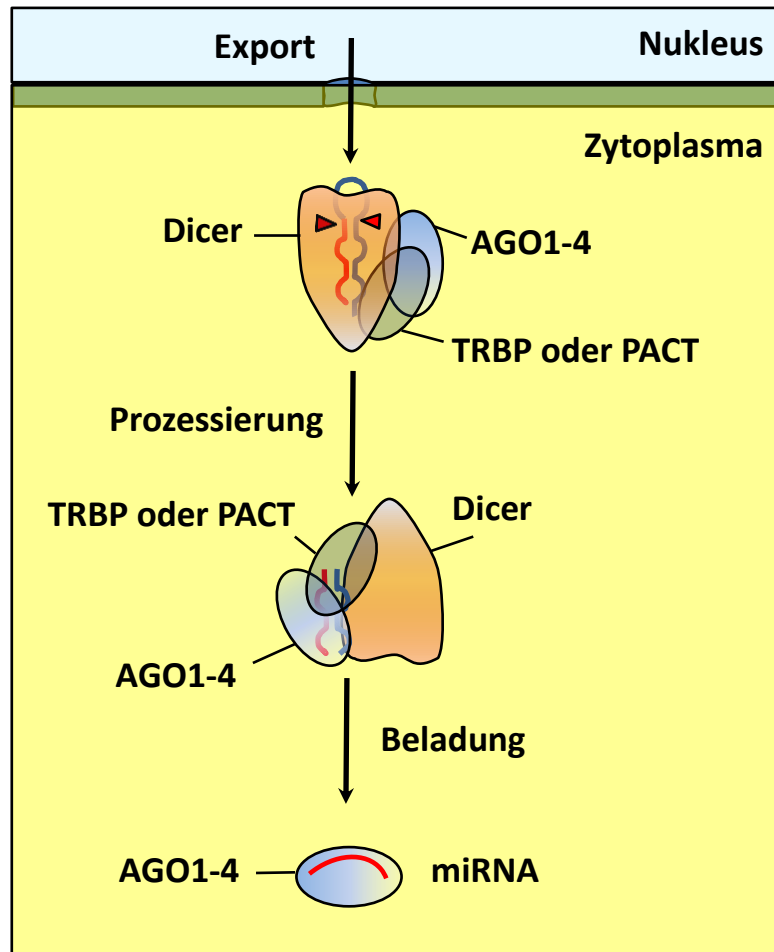


Abbildung 4: Die exportierte pre-miR wird im Zytoplasma aktiviert und kann so genregulatorisch wirken. Die Proteine Dicer, AGO und TRBP oder PACT bilden mit der pre-miR den *RNA induced silencing complex* (RISC). Diese drei Proteine prozessieren die pre-miR zur reifen miR, die dann mit der mRNA hybridisieren kann. (Verändert nach Kim [73])

In dieser Form ist die gereifte miR in der Lage, gestützt durch AGO2 seine Zielsequenz in der 3' UTR, 5' UTR oder dem ORF zu hybridisieren und so die Translation der Ziel-mRNA zu inhibieren oder deren Degradation zu induzieren.

Abbildung 5 zeigt die Sequenz der gereiften miR-218-5p. Die Bezeichnung „5p“ bedeutet, dass das 5' Ende der pre-miR als Leitstrang ausgewählt wurde.



Abbildung 5: Gezeigt ist die Sequenz der reifen miR-218-5p. Die Auftragung von links nach rechts entspricht der 5´ nach 3´ Richtung.

Für die Hybridisierung der miRs an ihre Ziel mRNAs, ist die Ausbildung einer thermodynamisch stabilen *seed site* von großer Bedeutung. Als *seed site* wird der 5´ Bereich der miR bezeichnet, der durchgehend mit der Ziel mRNA hybridisieren kann. [89] In Abbildung 6 ist als Beispiel die vorhergesagte *seed site* von miR-218 und der 3´ UTR der EGFR mRNA Rot eingefasst. Zur Verdeutlichung sind die weiteren komplementären Basenpaarungen hier nicht eingezeichnet. Mathematische Modelle berechnen unter der Berücksichtigung thermodynamischer Komponenten die Ausbildung einer solchen *seed site*. Im Rahmen dieser Arbeit findet die p_{CT} Methode [42] Anwendung.

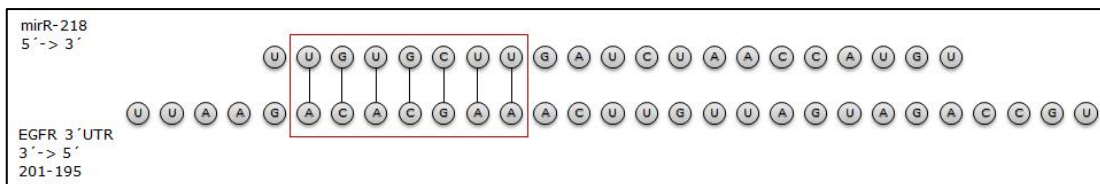


Abbildung 6: Die miR-218 bildet bei der Hybridisierung mit der 3´ UTR der EGFR mRNA eine 7mer *seed site* aus. Die thermodynamisch prognostizierten Bindungseigenschaften sind mit einem $p_{CT} < 0,1$ als schlecht anzusehen.

1.3.2 Bedeutung von mikro-RNA-Fehlregulationen bei Krebs-Erkrankungen

Die Regulation oder Fehl-Regulation von miRs in malignen Neoplasien ist als sehr mannigfaltig zu beschreiben. Da bereits in gesundem Gewebe die miR Regulation entsprechenden gewebespezifischen Expressionsmustern unterliegt, verkompliziert sich dieses Expressionsmuster, sobald sich

verschiedene individuelle Mutationen zu einem malignen Phänotyp akkumulieren und in einer malignen Neoplasie manifestieren.

Aus diesem Grund konzentriert sich die Darstellung in diesem Abschnitt auf die allgemein gültigen Erkenntnisse, beziehungsweise auf konservative miRs, die in den meisten Tumorentitäten eine Schlüsselkompetenz für die Tumorgenese und -progression einnehmen.

Die Fehlregulation von miRs und damit verbundene funktionale Veränderungen von Zellen ist für die Mehrzahl der diversen Tumorentitäten beschrieben. Grundsätzlich lassen sich die fehlregulierten miRs in zwei funktionale Gruppen aufteilen. Die erste Gruppe zeigt die Eigenschaften von Onkogenen, indem sie Tumorsuppressorgene inhibieren. Die zweite Gruppe hat die Eigenschaften von Tumorsuppressorgenen, indem sie Onkogene inhibieren. Eine pathologische Fehlregulation beginnt, wenn miRs mit onkogenen Eigenschaften überexprimiert werden und miRs mit tumorsuppressorgenen Eigenschaften stark vermindert oder gar nicht exprimiert werden. Ursachen der miR Fehlregulation liegen in Mutationen oder epigenetischen Modifikationen der genomischen DNA. Ungefähr die Hälfte aller onkologisch relevanten miRs ist an fragilen Stellen des Genoms lokalisiert. [5]

Die fehlregulierten miRs können in einzelnen miRs manifestiert sein oder in mehreren homologen miRs, die als Cluster bezeichnet werden.

Am bekanntesten und sehr bedeutsam, ist die Fehlregulation der miRs der let-7 Familie. Let-7 ist in der Lage die Onkogene RAS und MYC, sowie Proteine des Zellzyklus zu regulieren. [65; 8] Die Herunterregulierung von let-7 bewirkt eine Erhöhung von Lymphknotenmetastasen und Zellproliferation. Diese Art der Fehlregulation von let-7 ist für verschiedene Tumorentitäten beschrieben, unter anderem für das Lungen-, Mamma- und Prostatakarzinom. [101; 96]

Als erstes evidenten miR Cluster für die Tumorgenese wurde das miR-15a/miR-16-1 Cluster für die chronisch lymphatische Leukämie beschrieben. Das miR-15a/miR-16-1 Cluster gehört zu den

Tumorsuppressor miRs, da es das anti-Apoptose Protein BCL-2 reguliert und ist bei der chronisch lymphatischen Leukämie meist herunterreguliert. [17; 26]

Ein weiteres sehr wichtiges und sehr gut verstandenes miR Cluster ist das miR-17-92 Cluster, das aus sieben homologen miRs, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a und miR-92a-1, besteht. Untersuchungen im Mausmodell bestätigten diesem miR Cluster die Eigenschaft eines Onkogens, da seine Überexpression c-myc reguliert. [52] Des Weiteren wird die onkogene Eigenschaft des miR-17-92 Clusters in der Verschiebung der E2F Transkription von E2F1 zu E2F3 gesehen, das Proliferation induziert. [150] Außerdem reguliert das miR-17-92 Cluster den Tumorsuppressor PTEN und das pro-Apoptose Protein Bim jeweils negativ. [153]

Neben der Tumorgenese sind miRs auch bei der Tumorprogression von großer Bedeutung. Ein wichtiger Faktor für das Tumorwachstum ist die Versorgung mit Sauerstoff. Bereits ab einer Tumorgroße von ca. 10^6 Zellen, das entspricht einem Volumen von ca. 1mm^3 , entstehen erste hypoxische Bereiche innerhalb des Tumors. [66] Eine Vaskularisierung des Tumorgewebes, induziert durch die Ausschüttung von Signalmolekülen wie VEGF und FGF, ist die Folge. Daran sind auch die miRs miR-9, miR-296, miR-378 und das miR-17-92 Cluster beteiligt und begünstigen die Angiogenese, während die miRs miR-34, miR-98 und miR-125b als Angiogenese Inhibitoren wirken. [5]

Ein weiterer wichtiger Aspekt im Verlauf einer Krebserkrankung bildet die Metastasierung des Tumors. Die miRs miR-10b, miR-21, miR-373 und miR-520c begünstigen die Metastasierung. Diesen miRs wirken die miRs miR-31, miR-126, miR-193b und miR-335 entgegen. [5]

Ein für die Metastasierung notwendiger Prozess ist die Epitheliale-Mesenchymale-Transition. Epitheliale Tumorzellen verändern durch diesen Prozess ihren Phänotyp hin zu einem mesenchymalen Phänotyp, der es ihnen erlaubt, aus dem soliden primären Tumorgewebe in ein Blutgefäß zu migrieren und es an einer anderen geeigneten Stelle des Körpers wieder

zu verlassen und dort Metastasen zu bilden. [155] Die miRs miR-125b und miR-200 wurden mit der Eigenschaft beschrieben, den Prozess der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition evident zu erhöhen. [5]

Wie an ausgewählten Beispielen gezeigt, sind miRs in der Lage Einfluss auf das Tumorwachstum, Tumorprogression und damit den Verlauf einer Krebserkrankung zu nehmen. Daher wird ihnen eine immer größere Bedeutung bezüglich Prognose und Therapie zuteil. Sie sind ein interessanter und vielversprechender Ansatzpunkt in der modernen Tumorthherapie. Ein Beispiel ist die Studie zum Einfluss von miR-16 auf das Ansprechen auf eine Therapie mit Trastuzumab und Lapatinib im ErbB-2 positiven Mammakarzinom und Magenkarzinom. Eine hohe miR-16 Expression impliziert ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit diesen Substanzen. [143] In Summe sind es tausende derartiger Untersuchungen, die verdeutlichen wie wichtig es ist, ein sehr gutes Verständnis von der Bedeutung von miRs in der Krebsentwicklung zu haben.

1.4 Ionisierende Strahlung und ihr Einfluss auf biologische Systeme und biologisch funktionelle Moleküle

Als ionisierende Strahlung wird kurzweilige und energiereiche Strahlung bezeichnet, die aufgrund ihrer hohen Energie die Ionisation von Atomen und damit von Molekülen bewirkt, indem Hüllelektronen der jeweiligen Atome soweit energetisch angeregt werden, dass sie die Orbitale des Atoms irreversibel verlassen. Bei dieser Strahlung kann es sich um massehaltige Strahlung und masselose Strahlung handeln. Zur massehaltigen Korpuskularstrahlung zählen α -Teilchen (Heliumkerne), β^+ -Teilchen (Positronen), β^- -Teilchen (Elektronen), Protonen, Deuteronen, schwere Ionen, π -Mesonen und Neutronen. Die masselose Photonenstrahlung kann aus γ -Strahlung, Röntgenstrahlung oder UV-Strahlung bestehen. [66]

Interagiert ionisierende Strahlung direkt oder indirekt mit biologisch funktionalen Molekülen, führt diese zur chemischen Veränderung des

jeweiligen Moleküls, was oftmals mit einem Funktionsverlust einhergeht. Entsprechend der Komplexität des Strahlenschadens, können biologische Systeme in der Lage sein den Schaden zu reparieren, zu konservieren oder er führt zum Zelltod oder dem Tod des Organismus.

Als direkter Strahleneffekt wird eine Energieabsorption durch ein biologisch funktionales Molekül bezeichnet. Dies können Nukleinsäuren, Lipide oder Proteine sein. Die Moleküle absorbieren die Energie in ca. 10^{-16} s und werden in dem als physikalische Phase bezeichnetem Zeitraum ionisiert. In der sich anschließenden biochemischen Phase, die eine Dauer von Sekunden bis Minuten haben kann, kommt es zu Veränderung des betroffenen Biomoleküls und zunächst zum Funktionsverlust des selbigen. Sind RNAs, Enzyme oder Lipide von diesem Funktionsverlust betroffen, werden sie degradiert und sofern die Stoffwechsellistung der Zelle nicht von dem Strahlenschaden betroffen ist durch neue ersetzt. Schäden an der DNA hingegen können, sofern sie nicht repariert werden können, Mutationen zufolge haben, die eigenständig oder in Akkumulation mit ggf. weiteren Mutationen karzinogen wirken können. Den Zeitraum der unmittelbaren Auswirkung des Strahlenschadens auf die Zellphysiologie sowie die Ausprägung und Manifestation von Mutationen wird als biologische Phase bezeichnet und umfasst Minuten bis Jahre. Gerade im Falle von entstanden generativen Mutationen kann eine phänotypische Ausprägung sogar Generationen dauern.

Als indirekter Strahleneffekt wird die Absorption der Energie durch Wasser bezeichnet. Da Zellen aus ca. 80% Wasser bestehen, wird 80% der Strahlungsenergie von Wasser absorbiert. Auf die Radiolyse von Wasser entfällt also die anteilig meiste absorbierte Strahlenenergie, wenn Zellen von ionisierender Strahlung getroffen werden. In der physikalischen Phase entsteht zunächst das Wasserradikalkation (H_2O^+), das eine sehr kurze Lebensdauer von ca. 10^{-10} s hat. Das H_2O^+ , sowie das entstandene freie Elektron (e^-) reagieren weiter zu Primärradikalen. Dies sind das Wasserstoffradikal (H^{\cdot}), das Hydroxyradikal (OH^{\cdot}) sowie hydratisierte Elektronen (e^-_{aq}). Unter der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, dies gilt für gut oxygenierte Zellen oder Gewebe, kommt es zur Bildung von

Sekundärradikalen, dem Sauerstoffradikalanion ($O_2^{\cdot-}$), dem Hydroperoxyradikal (HO_2^{\cdot}) und der Erhöhung von Peroxiden. Die Bildung dieser Sekundärradikale unter der Anwesenheit von Sauerstoff, wird als Sauerstoffeffekt bezeichnet. Anschließend reagieren diese Radikale zu Bioradikalen und induzieren so eine Veränderung von Biomolekülen, die in einem Funktionalitätsverlust münden. Anders als beim direkten Strahleneffekt, ist es den Radikalen möglich durch Diffusion biologisch funktionale Moleküle zu schädigen, die nicht in direkter Nähe des Ortes der Energieabsorption liegen. Der Zeitraum in dem diese Radikale entstehen, wird als radiochemische Phase bezeichnet, die 10^{-6} s nach Energieabsorption beendet ist. Es schließt sich nun die biochemische Phase an. [66]

Wie bereits erwähnt, ist die Schädigung von RNAs, Lipiden und Enzymen für Zellen, sofern sie noch die Kapazität der Erneuerung geschädigter Komponenten besitzen nicht relevant. Eine Schädigung der DNA ist hier von deutlich größerer Bedeutung, da sie alle genomische Information beinhaltet. Mögliche DNA Schäden sind, wie auch ihre Reparaturmechanismen mannigfaltig und werden nachstehend im Einzelnen behandelt.

Der bedeutendste und gleichzeitig gravierendste Strahlenschaden ist der DNA-Doppelstrangbruch (DSB). Dabei wird die DNA-Doppelhelix komplett unterbrochen, was zu einem genomischen Informationsverlust führen würde. Allerdings sind Zellen in der Lage DSBs zu reparieren. [139] Entsteht ein DSB, wird durch die Phosphorylierung von ATM das Histon H2AX zu γ H2AX großräumig im Bereich des DSB phosphoryliert. Das phosphorylierte Histon γ H2AX zeigt den Reparaturproteinen die schadhafte Stelle an. Der immunologische Nachweis von γ H2AX ist daher ideal zum qualitativen und quantitativen Nachweis von DSB geeignet (Abb. 7). [78]

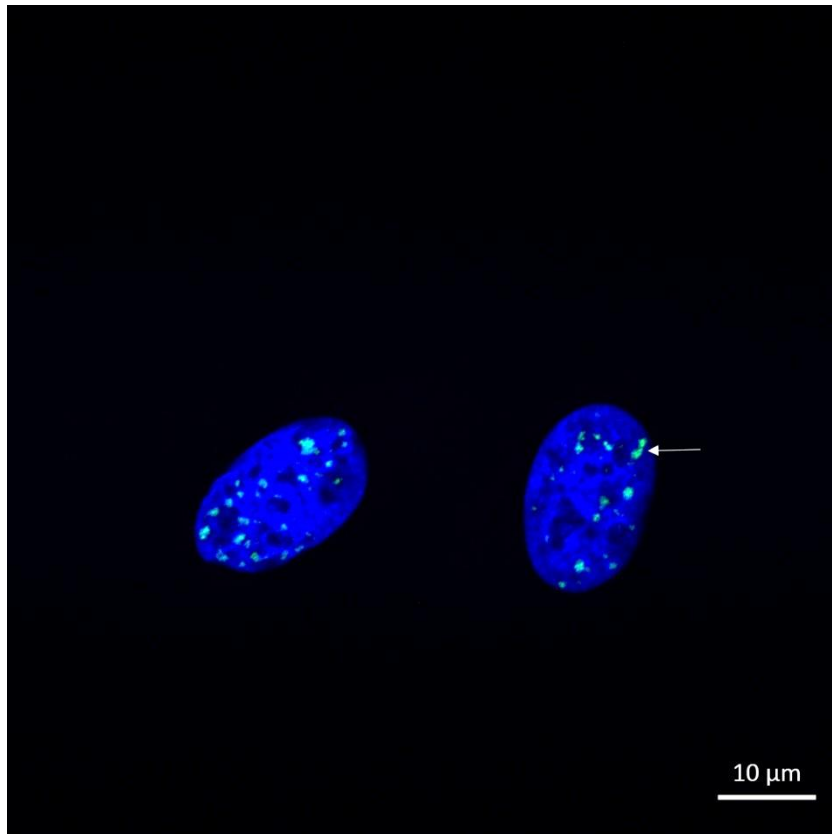


Abbildung 7: Ionisierende Strahlung verursacht DNA-Schäden wie den DSB. Die im fluoreszenzmikroskopischen Bild zu sehenden zwei SK-BR-3 Brustkrebszellen zeigen unmittelbar nach einer 2Gy Röntgen-Bestrahlung in ihren mit DAPI blau gefärbten Zellkernen, 15-20 γ H2AX-Foci (grün \leftarrow). γ H2AX-Foci gelten als molekularer Marker, wobei die Anzahl der Foci der Anzahl der DSBs pro Zellkern entspricht.

Die Reparatur eines DSB erfolgt nach einem der drei folgenden Reparaturmechanismen. Der dominanteste und damit vorherrschende Reparaturmechanismus von DSBs ist das *non-homologous end-joining* (NHEJ). Die zuvor durch Proteine vor dem Abbau geschützten DNA-Enden werden wieder zusammen legiert. Dieser Mechanismus ist allerdings fehleranfällig und kann zu Mutationen führen. [30] Der zweite Reparaturmechanismus ist die homologe Rekombination (HR). Dieser Mechanismus kann nur in bestimmten Zellzyklusphasen ablaufen und nutzt das homologe Schwesterchromosom als Matrize um den schadhaften Bereich auszubessern. Die HR ist ein relativ fehlerfreier Reparaturmechanismus. [76] Das *single-strand-annealing* ist die dritte

Form der DSB Reparatur. Durch Exonukleasen werden Bruchstücke zunächst abgebaut, bevor eine Ligation der Enden erfolgt. Dieser Mechanismus ist immer fehlerhaft und führt zum Verlust genomischer Information. [141]

Der DNA-Einzelstrangbruch ist ein weiterer durch ionisierende Strahlung induzierter Schaden. Allerdings kann dieser DNA-Schaden im Gegensatz zum DSB durch einfache Ligation behoben werden, da der komplementäre Strang als Matrize zur Verfügung steht. [15]

Des Weiteren können auch einzelne Basen Schaden nehmen (Basen- oder Zuckerveränderungen). Diese werden dann durch die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) repariert. [103] Werden mehrere Basen nacheinander geschädigt, unter Umständen auch durch die Bildung von Thymin-Dimeren oder Quervernetzungen mehrere Basen mit Proteinen, kommt es zur Strang-Exzisions-Reparatur (NER). [15] Eine Häufung und Verknüpfung von Basen Einfach- oder Mehrfachschäden kann durchaus lokal am selben DNA Strang sehr stark akkumuliert sein. Solche Bereiche werden als *Bulky Lesions* bezeichnet und könne nur sehr schlecht bis gar nicht repariert werden und führen in der Regel zum Zelltod. [66]

Sollten durch diese Reparaturmechanismen Fehler in der DNA entstanden sein, werden diese durch eine *mismatch-repair* (MMR) repariert. [77]

Versagen diese Reparaturmechanismen oder sind die Schäden durch die Exposition ionisierender Strahlung innerhalb einer Zelle zu groß, tritt sie in die Apoptose ein oder stirbt einen nekrotischen Zelltod. [66]

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Aktuelle Publikationen deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR und der Reifung von mikro-RNAs hin. Untersuchungen an Zellen unter hypoxischem Stress ergaben eine Argonaut-2 vermittelte Regulation hypoxierelevanter miRs. Dabei wird EGFR internalisiert und Argonaut2 phosphoryliert, wodurch die Ausbildung eines aktiven *RNA induced silencing complex* unterbleibt. [124] Die gleiche EGFR Internalisierung findet man auch nach einer Bestrahlung, allerdings

ist hier nur beschrieben, dass das internalisierte EGFR als Regulator der Strahlenantwort und als Transkriptionsfaktor fungiert. [34]

In vorangegangenen Arbeiten konnte in der Arbeitsgruppe Experimentelle Radioonkologie von Prof. Dr. Greve gezeigt werden, dass in Zelllinien des Ewing Sarkoms Survivin die Strahlenantwort moduliert. [45] Eine posttranskriptionale Regulierung erfährt Survivin durch die mikro-RNA miR-218. [58] Da miR-218 neben Survivin potentiell auch noch weitere bedeutsame Onkogene regulieren kann, rückt sie in den Fokus dieser Arbeit.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss einer Bestrahlung auf die mikro-RNA Reifung geprüft werden, dabei sollen die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Lässt sich diese hypoxieinduzierte miR-Regulation durch EGFR auch bei strahleninduziertem Zellstress beschreiben
2. Welche Rolle spielt die miR-218 für die Zellphysiologie und gibt es einen Zusammenhang mit EGFR
3. Welche onkologisch relevanten Ziel mRNAs der miR-218 lassen sich beschreiben und validieren
4. Welche weiteren mikro-RNAs können als strahlenreguliert beschrieben werden
5. Lässt sich dieser Zusammenhang für eine gezielte Therapie nutzen

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose	Peqlab, Erlangen
Acrylamid 30%	Roth, Karlsruhe
APS	Pharmacia
Benzin	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bradford-Lösung	Sigma-Aldrich®, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich®, München
CO ₂ (gas)	Westfalengas, Münster
CyStain®	Symex-Partec, Görlitz
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich®, München
DAPI	Sigma-Aldrich®, München
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl	Bernd Kraft®, Duisburg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt

Lipofectamine®RNAiMAX	Invitrogen™, Thermo Scientific, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ (25mM Lösung)	Bioron, Ludwigshafen
N ₂ (<i>liquid</i>)	Westfalengas, Münster
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH (<i>liquid</i>)	Bernd Kraft®, Duisburg
NaOH (<i>solid</i>)	Merck, Darmstadt
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich®, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich®, München
PCR Puffer 10x	HAT Biotechnology, Cambridge, UK
PMSF	Sigma-Aldrich®, München
Ponceaurot	Sigma-Aldrich®, München
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
SYTO9	life technologies™, Thermo Scientific, Darmstadt
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris HCl	Sigma-Aldrich®, München
TritonX-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg
Tyrphostin	Sigma-Aldrich®, München

2.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Antikörper-Blocklösung	5% BSA (w/v) 0,1% Triton X-100 (v/v)
EDTA Lösung 2mM	0,58g EDTA ad 1000ml dH ₂ O
Lämmli-Puffer (5x)	300 mM Tris 10% SDS (w/v) 25% β-Mercaptoethanol (v/v) 50% Glycerin (w/v) 0,02% Bromphenolblau (v/v) mit 1M HCl auf pH 6,8 einstellen
Paraformaldehyd (4% in PBS)	16g Paraformaldehyd (PFA) ad 400mL 1x PBS Lösen durch pH 11 mit 10M NaOH mit 1M HCl auf pH 7,3 einstellen
PBS	8,0g NaCl 1,15g Na ₂ HPO ₄ 0,2g KH ₂ PO ₄ 0,2g KCl ad 1000ml dH ₂ O auf pH 7,4 einstellen
Ponceau-Lösung	0,19% Ponceaurot 5% Eisessig

Stop-Mix	60% Saccharose (w/v) 0,1% SDS (w/v) 0,05% Bromphenolblau (w/v) 20mM EDTA pH 8,0
TBE (10x)	108g Tris 55g Borsäure 40ml 0,5M EDTA (pH 8,0) ad 1000ml dH ₂ O
TBE (1x)	100ml 10x TBE ad 1000ml dH ₂ O
TBS (10x)	160g NaCl 48,4g Tris mit 1M HCl auf pH 7,6 einstellen ad 2000ml dH ₂ O
TBST (1x)	100ml 10x TBS ad 1000ml dH ₂ O 1 ml Tween20
Trypsin 0,05%	0,5g Trypsin 0,2g EDTA 8,0g NaCl 0,4g KCl 0,58g NaHCO ₃ auf pH 7,2 einstellen

Western Blot Aufschlusspuffer	20mM Tris 1mM EDTA 1mM β -Mercaptoethanol 5% Glycerin (w/v) 0,5mM PMSF 10mM DTT 1 μ M Na ₃ VO ₄ mit HCl auf pH 8,5 einstellen
Western Blot Blottingpuffer	200ml Western Blot Laufpuffer (5x) 200ml Methanol ad 1000ml H ₂ O
Western Blot Laufpuffer (5x)	30g Tris 144g Glycin ad 1000ml H ₂ O
Western Blot Laufpuffer (1x)	200ml Western Blot Laufpuffer (5x) ad 1000ml H ₂ O SDS 0,1% (w/v)

2.1.3 Zelllinien

A549

Es handelt sich um eine Zelllinie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC). Die Zelllinie wurde 1972 von D.J. Giard aus einem soliden, epithelialen Tumor, von Typ2 Pneumozyten explantiert und etabliert. [44] Die meisten Zellen sind hypotriploid und weisen einen Chromosomensatz von 66 oder 64 Chromosomen auf. Die Zellen haben eine Verdoppelungszeit von 22h. Kultiviert werden die Zellen in DMEM nach 2.1.4, bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Wasseratmosphäre. Erworben wurde die Zelllinie bei der Firma ATCC®.

BT474

Bei der Zelllinie BT474 handelt es sich um Zellen eines soliden, epithelialen, invasiven, duktales Karzinoms der Mamma. Explantiert und etabliert wurde die Zelllinie 1978 von Lasfargues von einer 60 Jahre alten, kaukasischen Patientin. [79] BT474 ist Progesteron-Rezeptor und HER2 positiv, EGFR überexprimierend und gehört zur Subtypen-Gruppe Luminal B. Die Zelllinie wurde bei der Firma Cell Lines Service GmbH aus Eppelheim gekauft. Kultiviert werden die Zellen in einem speziellen Medium (2.1.4), bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Wasseratmosphäre.

HaCat

HaCat Zellen sind eine Zelllinie von spontan immortalisierten humanen Keratinozyten. [149] Die Zellen werden in DMEM nach 2.1.4, bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Wasseratmosphäre kultiviert. Zur Verfügung gestellt wurden die Zellen von Frau Dr. Anja Heselich vom Institut für Entwicklungsbiologie und Neurogenetik der Technischen Universität Darmstadt.

MCF-7

MCF-7 wurden 1973 aus einem soliden, epithelialen, Adenokarzinom der Mamma einer 69 Jahre alten kaukasischen Patientin explantiert und etabliert. [132] Die Zelllinie ist für alle Hormonrezeptoren positiv und wird dem Subtyp Luminal A zugeordnet. Die Zelllinie wurde bei der Firma Cell Lines Service GmbH aus Eppelheim gekauft. Kultiviert werden die Zellen in RPMI nach 2.1.4, bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Wasseratmosphäre.

MCF-10A

Die Zelllinie MCF-10A wurde aus der Zelllinie MCF-10 generiert. Diese Zelllinie selbst wurde 1984 aus einer Fibrozyste der Mamma, einer 39 Jahre alten kaukasischen Patientin explantiert und etabliert. [131] Die Zellen sind epithelialen Ursprungs und weisen einen benignen Phänotyp auf. Sie sind positiv für HER2, nicht für die Rezeptoren von Östrogen und Progesteron und überexprimieren EGFR. In der Subtypen Klassifikation werden sie dem Subtyp Basal zugeordnet. Die Zelllinie wurde bei der Firma ATCC® gekauft. Kultiviert werden die Zellen in einem speziellen Medium (2.1.4), bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Wasseratmosphäre.

MDA-MB-231

MDA-MB-231 sind 1974 aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen, kaukasischen Brustkrebspatientin explantiert und etabliert worden. [14] Es handelt sich um ein aneuploides Adenokarzinom mit epithelialen Gewebeeigenschaften. Die länglich, fast schon fibroblasten-artig wachsenden Zellen sind hochgradig invasiv, Tripel negativ, EGFR überexprimierend und werden dem Subtyp Basal zugeordnet. Die Zelllinie wurde bei der Firma Cell Lines Service GmbH aus Eppelheim gekauft. Kultiviert werden die Zellen in DMEM nach 2.1.4, bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Wasseratmosphäre.

MDA-MB-468

MDA-MB-468 sind 1977 aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen, schwarzen Brustkrebspatientin explantiert und etabliert worden. [13] Es handelt sich um ein aneuploides Adenokarzinom mit epithelialen Gewebeeigenschaften. Die kleinzelligen Zellen sind, Tripel negativ, stark EGFR überexprimierend, aufgrund einer fragilen Stelle des EGFR *locus*. Es können 7 bis 16 Replikationen des EGFR Gens in einer Zellpopulation auftreten. [1] MDA-MB-468 werden dem Subtyp Basal zugeordnet. Die

Zelllinie wurde bei der Firma ATCC® gekauft. Kultiviert werden die Zellen in DMEM nach 2.1.4, bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Wasseratmosphäre.

SK-BR-3

Aus dem Pleuraerguss einer 43 Jahre alten, kaukasischen Brustkrebspatientin wurde die Zelllinie SK-BR-3 explantiert und etabliert. [140] SK-BR-3 sind hypertriploide Krebszellen eines Adenokarzinoms und zeigen epitheliale Eigenschaften. Sie sind negativ für die Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren, aber stark positiv für HER2. Darum zählen sie auch zum Subtyp HER2. Die Zelllinie wurde bei der Firma Cell Lines Service GmbH aus Eppelheim gekauft. Kultiviert werden die Zellen in DMEM nach 2.1.4, bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Wasseratmosphäre.

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Medium

F-12	Merck Millipore, Darmstadt
DMEM	Merck Millipore, Darmstadt
OptiMEM	Gibco®, Thermo Scientific, Darmstadt
RPMI	Merck Millipore, Darmstadt

Hersteller

Zusatzstoff

Cholera Toxin	Sigma-Aldrich®, München
EGF	Sigma-Aldrich®, München
FCS	Merck Millipore, Darmstadt
Hydrocortison	Sigma-Aldrich®, München
Insulin	Sigma-Aldrich®, München
Penicillin/ Streptomycin	Gibco®, Thermo Scientific, Darmstadt

Hersteller

Medien-Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM für A549, HaCat, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SK-BR-3	500ml DMEM 10% FCS 1% Pen/Strep
RPMI für BT474	500ml RPMI 20% FCS 1% Pen/Strep 0,1% Insulin
RPMI für MCF-10A	DMEM:F-12 (1:1) 10% FCS 5% HS 1% Pen/Strep 2ng/ml EGF 0,5mg/ml Hydrocortison 100ng/ml Cholera Toxin 10µg/ml Insulin
RPMI für MCF-7	500ml RPMI 10% FCS 1% Pen/Strep

2.1.5 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Super Taq Polymerase	HT Biotechnology, Cambridge, UK
Trypsin	Serva, Heidelberg
UDG	Bioron, Ludwigshaven

2.1.6 Primer

Die mRNA Sequenzen der unten aufgeführten Gene wurden mit Hilfe der *pubmed* Datenbank für *Homo sapiens* ermittelt (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Unter Zuhilfenahme des *Ensembl Genome Browser* (www.ensembl.org) wurde abgeglichen, welche mRNA Sequenzen in allen bekannten *Splice*-Varianten der jeweiligen mRNA identisch sind. Anschließend wurde dieser Bereich in cDNA übersetzt und mittels *primer BLAST* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) wurden mögliche Primer-Vorschläge generiert. Diese wurden dann manuell beurteilt und das geeignetste Primer-Paar ausgewählt. Der Tag der Datenbankabfragen der oben genannten Datenbanken wird separat zu jedem Primer angegeben und ist darum nicht in den URL-Angabe enthalten.

Die Primer wurden von der Firma Eurogentec synthetisiert.

Birc6

Tag der Datenbankabfrage	03.10.2014 (09:53 Uhr)
<i>Forward primer</i>	AGGGCATGCTGGAATGTTGA
<i>Reverse primer</i>	TTGCCTGCTGCAACTTTAGC
Produktlänge	225bp
<i>Annealing</i> Temperatur	60°C

EGFR

Tag der Datenbankabfrage	15.07.2013 (15:06 Uhr)
<i>Forward primer</i>	GGAGATCGCCACTGATGGAG
<i>Reverse primer</i>	GAACCCCGAGGGCAAATACA
Produktlänge	272bp
<i>Annealing</i> Temperatur	60°C

Robo1

Tag der Datenbankabfrage	03.10.2014 (11:24 Uhr)
<i>Forward primer</i>	AGACCGGGGCAGTAGTACAT
<i>Reverse primer</i>	TGGAGTTCTTCCTGTGGGGA
Produktlänge	357bp
<i>Annealing</i> Temperatur	60°C

TNC

Tag der Datenbankabfrage	21.10.2014 (13:20 Uhr)
<i>Forward primer</i>	ATGGTGTAGAGGCCAGAGGT
<i>Reverse primer</i>	TTCAGTCGGAACTGCCCTC
Produktlänge	307 bp
<i>Annealing</i> Temperatur	60°C

TOB1

Tag der Datenbankabfrage	21.10.2014 (14:34 Uhr)
<i>Forward primer</i>	ATGCCATAAGTGACCCAGC
<i>Reverse primer</i>	TGGGAGAAGTACGTGCAACC
Produktlänge	202bp
<i>Annealing</i> Temperatur	60°C

2.1.6.1 Housekeeping Gen Assay

Assay	Hersteller
HPRT	Qiagen, Hilden

2.1.7 TaqMan® Sonden

Sonde	Hersteller
18S	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
Birc5	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
Decorin	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
Notch2	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt

2.1.8 TaqMan® MicroRNA Assays

Assay	Hersteller
hsa-miR-15a	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
hsa-miR-19a	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
hsa-miR-21	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
hsa-miR-100	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
hsa-miR-101	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
hsa-miR-106b	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
hsa-miR-218	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
RNU6B	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt

Die hier beschriebenen mikro-RNA Assays amplifizieren ausschließlich reife und somit katalytisch funktionale mikro-RNAs. Alle Vorstufen von mikro-RNAs können aufgrund des speziellen Primer-Designs -Loop-Primer- nicht amplifiziert werden.

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Unkonjugierte Primärantikörper

Sämtliche unten aufgeführten Antikörper richten sich gegen die genannten Epitope in *Homo sapiens*. Der Erzeugungsorganismus des Antikörpers ist dem Epitop gegen das er gerichtet ist vorangestellt.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ratte anti EGFR monoklonal	IHC 1:200	abcam, Cambridge, UK
Maus anti EGFR monoklonal	IHC 1:200	Leica, Newcastle, UK
Kaninchen anti EGFR monoklonal	WB 1:1000	Cell signaling, Boston, USA
Kaninchen anti p-Y1068-EGFR monoklonal	IHC 1:200	abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti EEA1 polyklonal	IHC 1:500	abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti AGO2 polyklonal	IHC 1:500	abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti p-Tyr393-AGO2 polyklonal	IHC 1:200	ECM Biosciences, Versailles, USA

Kaninchen anti γ H2AX monoklonal	IHC 1:500 WB 1:1000	Upstate Biotechnology Merck-Millipore, Darmstadt
Kaninchen anti Notch2 monoklonal	WB 1:2000	Cell signaling, Boston, USA
anti Taq Polymerase	0,1 μ g	Takara Clontech, Frankreich
Kaninchen anti p42/44 monoklonal	WB 1:2000	Cell signaling, Boston, USA
Kaninchen anti phospho p42/44 monoklonal	WB 1:2000	Cell signaling, Boston, USA

2.1.9.2 Konjugierte Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti Ratte-Alexa488 polyklonal	1:200	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen -Alexa647, polyklonal	1:200	Dianova, Hamburg
Ziege anti Maus-Alexa488 polyklonal	1:200	Invitrogen, Thermo Scientific, Darmstadt
anti Maus-HRP polyklonal	1:1000	R&D systems

anti Kanninchen-HRP polyclonal	1:1000	R&D systems
-----------------------------------	--------	-------------

2.1.9.3 Konjugierte Primär-Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ratte anti Notch2 PE monoklonal	1:10	eBioscience, Frankfurt
Isotyp PE	1:10	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.10 RNAi Anwendungen

RNA	Nummer	Hersteller
Kontroll-siRNA	#1siRNA	Ambion™, Thermo Scientific, Darmstadt
Birc5 siRNA	s1458	Ambion™, Thermo Scientific, Darmstadt
EGFR siRNA	s563	Ambion™, Thermo Scientific, Darmstadt
Kontroll-pre-miR	#2	Ambion™, Thermo Scientific, Darmstadt
pre-miR-218	PM10328	Ambion™, Thermo Scientific, Darmstadt

2.1.11 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav, VX-65	Systec, Linden
Becherglas 20 ml, 50ml, 100ml, 500ml	Schott, Mainz
Brenner, phoenix	Schuett, Göttingen

Durchflusszytometer, CyFlow® space	Sysmex-Partec, Görlitz
Durchflusszytometer, PAS III	Sysmex-Partec, Görlitz
Duranflasche mit Deckel	Schott, Mainz
50ml, 100ml, 500ml, 1l, 2l, 5l	
Eismaschine, AF-10	Scotsman Eur, Mailand
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Pharmacia
Elektrophoresesystem, CyFox	Sysmex-Partec, Görlitz
Elektrophoresesystem, SDS-PAGE	Hoefer, Holliston, USA
Mighty Small	
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
50ml, 100ml, 500ml, 1l, 2l	
Feinstwaage, Delta Range®, Mettler AE260	Mettler-Toledo, Gießen
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Biberach
Gefriertruhe, -70°C, Ultra low	Sanyo, Moriguchi, Japan
Heizblock, DRI-BLOCK® DB2A	Techne, Cambridge, UK
Heizrührer, IKAMAG® RCT	IKA®, Staufen
Heizschrank	Memmert, Schwabach
Imager, Fusion SL	Peqlab, Erlangen
Inkubator	Thermo Scientific
Hera cell	Heraeus,
Function line	Loughborough, UK
Kolbenhubpipette	Eppendorf, Hamburg
10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	
Kühlschrank 4°C	Bosch, Stuttgart
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Biberach
Laserscan Mikroskop, LSM880	Zeiss, Jena
Linearbeschleuniger, TrueBeam™	Varian, USA
Luminometer, Veritas Microplate	Turner BioSystems, Sunnyvale, USA
Lyophilisations-System	Bachofen, Uster, CH
Messzylinder 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml	Schott, Mainz
Mikroskop, Fluoreszenz-, Axiophot	Zeiss, Jena
pH-Meter, CG840	Schott, Mainz

PCR Cycler, Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
PCR Cycler, MyCycler™	Eppendorf, München
qPCR Cycler, Rotor-Gen Q 5plex	Qiagen, Hilden
Pipettierhilfe, pipetus®-akku	Hirschmann, Eberstadt
Pipettierhilfe, Peleusball	Diagonal, Münster
Rührschüttler, VF	IKA®, Staufen
Schüttler, S4	Elmi, Riga, Lettland
Spektralphotometer, BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer, U-1100	Hitachi, Düsseldorf
Sterilbank, LaminAir® LB-48-C	Thermo Scientific
	Heraeus,
	Loughborough, UK
Transferkammer, Mighty Small Tranphor	Hoefer, Holliston, USA
Ultraschallsonde, Sonorex	Bandelin, Berlin
Umwälzerhitzer, Haake D1	Haake, PLS, Osterode
Vakuumpumpe	Biometra, Göttingen
Waage, 1412	Sartorius, Göttingen
Wasserbad, GFL 1004	GFL, Burgwedel
Wasserbad	Feinwerkstatt WWU
Zentrifuge, 3-16 KL	Sigma, Osterode
Zentrifuge, Biofuge fresco	Thermo Scientific
	Heraeus,
	Loughborough, UK
Zentrifuge, Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Mini Centrifuge C-1200	Krackeler, Albany, USA

2.1.12 Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
CellLight® Tubulin-GFP,	molecular probes™, Thermo Scientific,
BacMam 2.0	Darmstadt
Differential Quik Staining Set	Medion Diagnostics, Miami, USA

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
Luc-Pair Duo-Luciferase Assay Kit, mit EGFR 3' UTR Plasmid HmiT004605-MT01	GeneCopoeia™, Rockville, USA
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Darmstadt
<i>mirVana</i> ™	Ambion™, Thermo Scientific, Darmstadt
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.13 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen	Menzel-Gläser®, Thermo Scientific, Darmstadt
Filterpapier	Whatman
<i>Fluorescence Mounting Medium</i>	Dako, Hamburg
Invasionsfilter 8.0 Micron	Corning, Kaiserslautern
Nitrozellulosemembran 0,2µm	Whatman
Objektträger	Engelbrecht, Endermünde
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Sigma-Aldrich®, München
Pipettenspitzen - gestopft 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Peqlab
Pipettenspitzen – Kapillar, 20µl	VWR, Darmstadt
Reaktiongefäße 2,0ml, 1,5ml, 0,5ml, 0,2ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktiongefäße 0,2ml für Rotor Gen	Qiagen, Hilden
Roti® <i>Liquid Barrier</i>	Roth, Karlsruhe

Serologische Pipetten	Greiner, Frickenhausen
2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	
Well-Plates 6, 12, 24, 96	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen T25, T75	Sigma-Aldrich®, München
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	Greiner, Frickenhausen

2.1.14 Software

Software

ImageJ 1.43m
MS-Office 2010
MS-Office 2013
Photoshop CS6
SPSS Statistics 22
ZEN black edition
ZEN blue edition

Hersteller

Open-Source-Software
Microsoft, Unterschleißheim
Microsoft, Unterschleißheim
Adobe, Dublin
IBM, Ehningen
Zeiss, Jena
Zeiss, Jena

2.1.15 Online Datenbanken

Pubmed

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Ensembl Genome Browser

www.ensembl.org

microRNA.org Targets and Expression

www.microrna.org/microrna/home/do

miRBase

www.mirbase.org

Target Scan Human - Prediction of microRNA targets

www.targetscan.org

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten im Rahmen von Zellkulturtechniken wurden unter einer Sterilbank mit kontinuierlicher, laminarer Luftströmung durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen innerhalb der Inkubatoren, für alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, lagen bei 37 °C, 5% CO₂ Anteil und gesättigter Wasseratmosphäre. Die Kulturmedien der jeweiligen Zelllinien wurden in 2.1.4 detailliert beschrieben. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C vortemperiert. Sofern die Zellen nicht passagiert werden mussten, wurde das Kulturmedium alle 48h durch neues ersetzt. Passagen wurden nach Bedarf durchgeführt. D.h. sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten wurden sie passagiert, um den Prozess des exponentiellen Wachstums durch mögliche Kontaktinhibition nicht zu beeinträchtigen. Zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen wurde eine 0,05%ige (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung benutzt. Der Trypsinverdau wurde individuell nach dem Ablösen der jeweiligen Zellen mit deren Kulturmedium beendet und eine neue Zellkulturflasche wurde beimpft.

2.2.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von Zellen erfolgte mit Lipofectamine®RNAiMAX in 6-well Platten und nach dem dafür angegebenen Protokoll. Durchgeführt wurde die jeweilige Transfektion in serum- und antibiotikafreiem OptiMEM. 24h vor der Transfektion wurden 1×10^5 - 3×10^5 Zellen, je nach Fragestellung des Experiments und Zelllinie, ausgesät. Sofern nicht explizit daraufhin gewiesen wurde, wurden alle

Zellen mit jeweils 10pmol siRNA oder pre-miR-RNA transfiziert. Die Transfektions-Lösung wurde nach 24h durch Zellkulturmedium ersetzt, sofern die Zellen nicht direkt einer Analyse zugeführt wurden. Sowohl siRNA als auch pre-miR-RNA lagen bis zu 72h nach Transfektion stabil und in funktionaler Form laut Herstellerangaben in den Zellen vor.

2.2.3 RNA Isolation

2.2.3.1 total-RNA Isolation

Die Isolation von total-RNA erfolgte mittels „RNeasy® Mini Kit“ der Firma Qiagen. Anschließend wurde eine qualitative und quantitative Bestimmung der Isolate mit einem UV-vis-Spektralphotometer durchgeführt. Die Isolate wurden bei -70 °C gelagert.

2.2.3.2 mikro-RNA Isolation

Die Isolation von micro-RNAs, bzw. RNAs kleiner 200nt erfolgte nach dem Protokoll für kleine RNAs mittels „mirVana™“ Kit der Firma Ambion™. Anschließend wurde eine qualitative und quantitative Bestimmung der Isolate mit einem UV-vis-Spektralphotometer durchgeführt. Die Isolate wurden bei -70 °C gelagert.

2.2.5 cDNA Synthese

2.2.5.1 cDNA Synthese von total-RNA Isolaten

Die cDNA Synthese von total-RNA Isolaten wurde mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems™ durchgeführt. Pro Probe wurden 1000ng des jeweiligen total-RNA Isolats eingesetzt. Das Primer-System war ein *random hexamer* Primer-System.

Der Reaktionsansatz für die reverse Transkription ist in Tabelle 3 dargestellt. Es wurde jeweils der Probenanzahl entsprechend ein Master Mix ohne die revers zu transkribierende RNA angesetzt.

Tabelle 3: Pipettierschema für cDNA Synthese von total RNA Isolaten.

10x RT Puffer	2,0µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8µl
10x Random Primer	2,0µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0µl
RNase Inhibitor	1,0µl
Nuklease freies H ₂ O	3,2µl
1000ng total RNA in H ₂ O	10,0µl

Der Ansatz wurde im Thermocycler zunächst für 10min bei 25 °C inkubiert. Danach erfolgt die reverse Transkription bei 37 °C für 120min. Zuletzt wurde die Reverse Transkriptase bei 85 °C für 5s denaturiert.

2.2.5.2 cDNA Synthese von mikro-RNA Isolaten

Die cDNA Synthese von mikro-RNA Isolaten wurde mit dem „TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems™ durchgeführt. Pro Probe wurden 100ng des jeweiligen mikro-RNA Isolats eingesetzt. Für jede mikro-RNA von Interesse sowie der Kontrolle, wurde ein spezifisches Primer-System benutzt. Der Master Mix wurde nach Tabelle 4 für die jeweilige Probenanzahl ohne mikro-RNA angesetzt.

Tabelle 4: Pipettierschema für cDNA Synthese von total miR Isolaten.

10x RT Puffer	1,50µl
dNTP Mix (100 mM)	0,15µl
Primer	3,00µl
MultiScribe™ 50U/µl Reverse Transkriptase	1,00µl
RNase Inhibitor 20U/µl	0,18µl
Nuklease freies H ₂ O	4,16µl
100ng total mikro-RNA in H ₂ O	5,00µl

Der Ansatz wurde im Thermocycler zunächst für das Primer *annealing* für 30min bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte die reverse Transkription bei 42 °C für 30min. Zuletzt wurde die Reverse Transkriptase bei 85 °C für 5min denaturiert.

2.2.6 PCR und qPCR

2.2.6.1 PCR

Die verschiedenen Komponenten wurden entsprechend der Anzahl an benötigten Ansätzen zu einem Master Mix, mit Ausnahme der cDNA, nach Tabelle 5 gemischt. Vorab musste allerdings die Polymerase mit ihrem Antikörper gemischt und bei RT für 25min inkubiert werden. Vom fertigen Master Mix wurden 23µl in ein 0,2ml oder 0,5ml Reaktionsgefäß aliquotiert. Abschließend wurden 2µl der zuvor mit H₂O 1:5 verdünnten cDNA zugegeben, der Ansatz durchmischt und in den PCR-Cycler überführt.

Tabelle 5: Pipettierschema für einen PCR Ansatz.

H ₂ O	ad 25µl
10x PCR Puffer	2,5µl
dNTPs (10mM) + 50% UTP	0,5µl
UDG (1U/µl)	0,5µl
Primer <i>forward</i> (5pmol/µl)	1,0µl
Primer <i>reverse</i> (5pmol/µl)	1,0µl
cDNA (1:5)	2,0µl
Super Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1µl
Taq Antikörper (1,1µg/µl)	0,1µl

Das PCR-Programm begann mit einem UDG-Verdau für 15min bei 37 °C. Anschließend folgt die Denaturierung für 10min bei 95 °C. Es schlossen sich 45 PCR-Zyklen folgendermaßen an: Denaturierung für 30s bei 95 °C, Primer-*Annealing* für 40s bei individueller *Annealing*-Temperatur und die Polymerisation für 30s bei 72 °C. Abschließend wurde die PCR-Reaktion noch für 6min bei 72 °C terminiert. [147]

2.2.6.2 qPCR mit SYTO9

Für einen qPCR Ansatz mit SYTO9 wurden nach Tabelle 6 die verschiedenen Komponenten mit Ausnahme der cDNA zu einem Master Mix zusammengeführt. Zuvor wurde die Polymerase mit ihrem Antikörper vermischt und für 25min bei RT inkubiert. Der DNA-Farbstoff SYTO9 wurde mit dem 10x PCR-Puffer im Verhältnis 3,2µl SYTO9 auf 1000µl 10x PCR-Puffer vermischt. Es wurden 23µl des fertigen Master Mix in spezielle 0,2ml Reaktionsgefäße der Firma Qiagen für den 36-*well* Rotor überführt und 2µl der zuvor 1:5 mit H₂O verdünnten cDNA zugegeben, durchmischt und in den Rotor-Gen PCR-real-time-Cycler gestellt.

Tabelle 6: Pipettierschema für einen qPCR Ansatz mit SYTO9.

H ₂ O	ad 25µl
10x PCR Puffer + SYTO9	2,5µl
MgCl ₂ (25mM)	0,5µl
dNTPs (10mM) + 50% UTP	0,5µl
UDG (1U/µl)	0,5µl
Primer <i>forward</i> (5pmol/µl)	1,0µl
Primer <i>reverse</i> (5pmol/µl)	1,0µl
cDNA (1:5)	2,0µl
Super Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1µl
Taq Antikörper (1,1µg/µl)	0,1µl

Zu Beginn erfolgte ein UDG-Verdau für 15min bei 37 °C. Anschließend folgte die Denaturierung für 10min bei 95 °C. Es schließen sich 45 PCR-Zyklen folgendermaßen an: Denaturierung für 30s bei 95 °C, Primer-*Annealing* für 40s bei individueller *Annealing*-Temperatur und die Polymerisation für 30s bei 72 °C. Am Ende eines jeden Polymerisations-Schrittes wurde die Fluoreszenz gemessen. Abschließend wurde die PCR-Reaktion noch für 6min bei 72 °C terminiert. Um die Produktreinheit sowie das Auftreten von Primer-Dimeren, die ein falsch positives Signal erzeugen, beurteilen zu können, wurde nach der eigentlichen PCR-Reaktion eine Schmelzkurve der PCR-Produkte erstellt. [147]

Um mögliche falsch positive Fluoreszenzsignale von Primer-Dimer von der Fluoreszenzmessung auszuschließen kann ein zweiter Messpunkt in einem Temperaturbereich gewählt werden, indem die Primer-Dimere bereits aufgeschmolzen sind und so keine falsch positive Fluoreszenz erzeugen können.

So ist eine Quantifizierung ohne eine spezielle Sonde im Bereich des PCR-Produktes möglich. Quantifiziert wurden die einzelnen Gene mit dem HPRT-*Housekeeping* Gen Assay der Firma Qiagen.

2.2.6.3 qPCR mit TaqMan® Assay

Konventioneller qPCR TaqMan® Assay

Die qPCR Analysen mittels TaqMan® Assay wurden mit dem „TaqMan® Gene Expression Master Mix“ und den dazugehörigen TaqMan®-Sonden der Firma Applied Biosystems™ durchgeführt. Quantifiziert wurden die einzelnen Genprodukte gegen 18S rRNA. In benötigter Probenanzahl wurde nach Tabelle 7 ein Master Mix ohne das Produkt der Reversen Transkription vorbereitet.

Tabelle 7: Pipettierschema für einen qPCR TaqMan® Assay Ansatz.

TaqMan® Sonde	1,25µl
TaqMan® Gene Expression Master Mix	12,50µl
Nuklease freies H ₂ O	8,75µl
Produkt Reverse Transkription Verdünnt 1:5 in H ₂ O	2,50µl

Die PCR wurde im Rotor-Gen PCR-real-time-Cycler durchgeführt. Zuerst wurden die PCR-Ansätze 2min bei 50 °C inkubiert. Einer Enzymaktivierung bei 95 °C für 10min folgten 40 Zyklen, bestehend aus einer Denaturierungsphase für 15s bei 95 °C und einer *Annealing*- und Elongationsphase von 60s bei 60 °C.

qPCR TaqMan® Assay für mikro-RNAs

Die qPCR Analysen mittels TaqMan® Assay wurden mit dem „TaqMan® Gene Expression Master Mix“ und den dazugehörigen TaqMan®-Sonden der Firma Applied Biosystems™ durchgeführt. Quantifiziert wurden die einzelnen miRs gegen die kurze nukleäre RNA RNU6B. In benötigter Probenanzahl wurde nach Tabelle 8 ein Master Mix ohne das Produkt der Reversen Transkription vorbereitet.

Tabelle 8: Pipettierschema für einen qPCR TaqMan® Assay Ansatz für mikro-RNAs.

TaqMan® MicroRNA Assay	1,00µl
TaqMan® Gene Expression Master Mix	10,00µl
Nuklease freies H ₂ O	7,67µl
Produkt Reverse Transkription	1,33µl

Die PCR wurde im Rotor-Gen PCR-real-time-Cycler durchgeführt. Einer Enzymaktivierung bei 95 °C für 10min folgten 40 Zyklen, bestehend aus einer Denaturierungsphase für 15s bei 95 °C und einer *Annealing*- und Elongationsphase von 60s bei 60 °C.

2.2.7 Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung von lebenden Zellkultur-Präparaten wurde in *well*-Platten oder Zellkulturflaschen am Linearbeschleuniger TrueBeam™ der Firma Varian Medical Systems mit einer Dosisleistung von 4,8 Gy/min durchgeführt. Dazu wurde der Patiententisch auf eine Höhe von 1m eingestellt und eine Öffnungsposition von 180° gewählt (Abb. 8, links). Um eine homogene Bestrahlung der Präparate zu gewährleisten, befand sich unterhalb der Präparate 1,5cm Plexiglas und oberhalb der Präparate 2,0cm Plexiglas (Abb. 8, rechts).

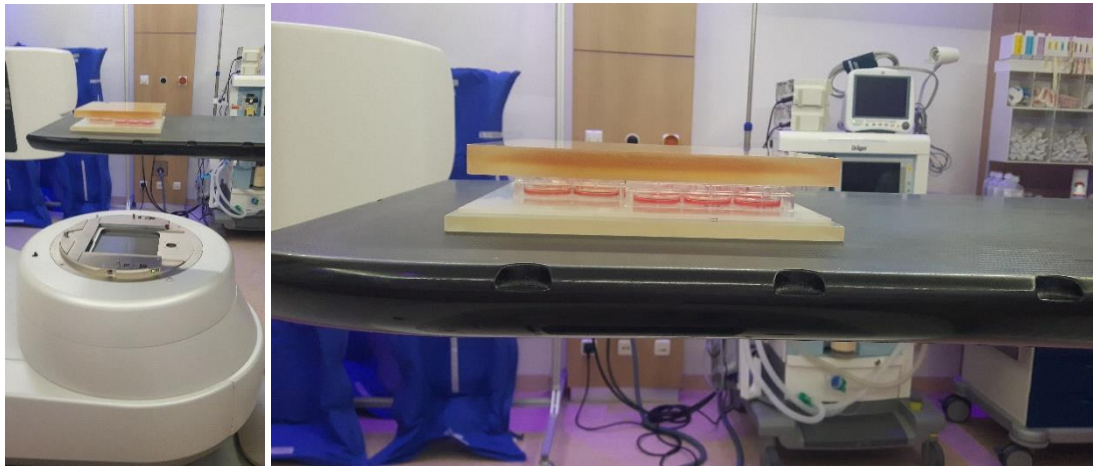


Abbildung 8: Gezeigt ist der Versuchsaufbau für die Bestrahlung von Zellen in *well plates*. Dazu nimmt der Strahlenkopf eine Öffnungsposition von 180° ein (links). Für eine homogene Bestrahlung sorgen unterhalb der Präparate 1,5cm Plexiglas und 2,0cm oberhalb des Präparates (rechts).

Den Präparaten konnte jetzt die gewünschte Dosis ultraharter Röntgenstrahlung appliziert werden.

2.2.8 Vorbehandlung von Zellen mit Cytochalasin D oder Tyrphostin vor Bestrahlung

Um den Zusammenhang zwischen der Endozytose sowie der Tyrosinkinaseaktivität und der strahlenabhängigen miR Regulation zu bestimmen, ist es notwendig die Endozytose oder die Funktion von Tyrosinkinasen zu inhibieren. Dazu wurden Zellen in 6-*well* Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Die Zellen wurden 30min vor der Bestrahlung mit PBS gewaschen und in 1ml serumfreiem und antibiotikafreiem Medium mit der entsprechenden Konzentration des jeweiligen Inhibitors weiter kultiviert.

Die Endozytose wurde mit 5µg/ml Cytochalasin D (Abb. 9) inhibiert. [29] Das Mycotoxin Cytochalasin D gehört zur Stoffklasse der Alkaloide und wird

vom *Zygosporium mansonii* produziert. Es inhibiert die Endozytose durch die Inhibition der Elongation von F-Aktin. [121; 38; 135]

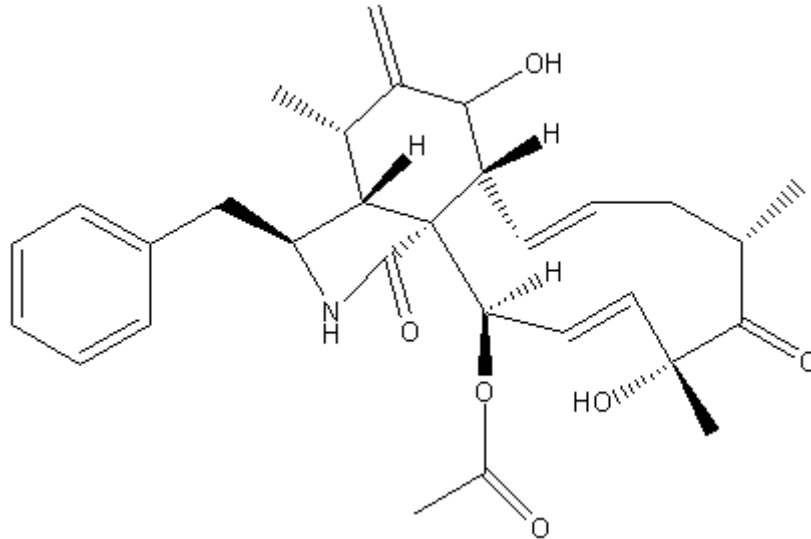


Abbildung 9: Gezeigt ist die Strukturformel des von *Zygosporium mansonii* gebildeten Mycotoxins Cytochalasin D, welches die Elongation von F-Aktin inhibiert.

Die Aktivität der Tyrosinkinase wurde durch die Gabe von 10µM Tyrphostin (Abb. 10) unspezifisch inhibiert. Allerdings wird Tyrphostin von einigen Autoren auch eine EGFR Spezifität attestiert. [164]

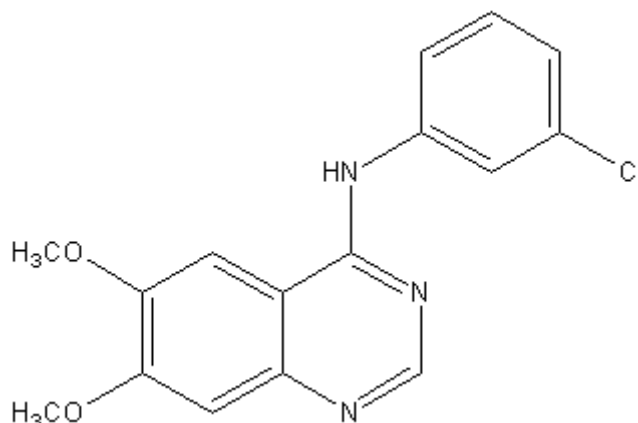


Abbildung 10: Gezeigt ist die Strukturformel des Tyrosin-Kinase Inhibitors Tyrphostin.

2.2.9 Western Blot

Zellen, die mittels Western Blot Methode analysiert werden sollten, wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und in 150µl Western Blot Aufschlusspuffer aufgenommen. Als Phosphatase-Inhibitor wurde dem Puffer Na_3VO_4 zugesetzt. Es folgte ein mechanischer Zellaufschluss mittels Ultraschall-Sonde. Die Suspension wurde zwei Mal mit jeweils zehn Pulsstößen bei einer Intensität von 200mA sonifiziert. Mittels Bradford-Assay wurde die Gesamt-Proteinmenge des Lysates ermittelt. Nach Möglichkeit wurden 20µg Gesamt-Proteinmenge in Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95 °C für 5min denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen, denaturierenden 7,5%igem Acrylamid Gel bei einer konstanten Spannung von 100mV. Der Proteintransfer, auf eine Nitrozellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,2µm erfolgte als *wet blot* bei einer Stromstärke von 300mA für 1h. Der Transfer wurde mit einer Ponceaurot Färbung kontrolliert. Nach der Entfärbung mit TBST wurde die Membran für 1h bei RT in 5% fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST geblockt. Die Inkubation mit den jeweiligen Primär-Antikörpern erfolgte in 2,5% fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST bei 4 °C über Nacht unter kontinuierlichem Schütteln. Anschließend wurde die Membran drei Mal in TBST für 10min gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden in 2,5% fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST entsprechend verdünnt. Nach einer Inkubation von 1h bei RT unter Schütteln, wurde die Antikörperlösung verworfen und die Membran zwei Mal mit TBST für 10min gewaschen. Die abschließende Chemilumineszenzmessung wurde am Fusion SL-System der Firma Peqlab durchgeführt. Benutzt wurden die ECL Substrate von Pierce nach Herstellerprotokoll.

2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzfärbung und die sich anschließende Fluoreszenzmikroskopie wurden Zellen zunächst auf Deckgläschen in 6-well Platten kultiviert. Nachdem die Zellen adhärirt waren, konnten die

gewünschten Behandlungen durchgeführt werden. Zum Fixationszeitpunkt wurde das Medium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und für 10min in 4% PFA in PBS bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5min in PBS gewaschen und falls notwendig bei 4 °C in PBS gelagert. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Antikörper in Blocklösung, 5% BSA und 0,1% Triton X-100 in PBS, verdünnt und die Zellen damit über Nacht bei 4 °C in einer Kammer bei gesättigter Wasseratmosphäre inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung verworfen und die Zellen dreimal für jeweils 5min mit PBS gewaschen. Die entsprechenden Sekundärantikörper wurden ebenfalls in Blocklösung verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 60min bei RT im Dunkeln. Wiederum wurde die Antikörperlösung verworfen, die Zellen dreimal in PBS gewaschen und abschließend in dH₂O gespült. Abschließend wurden die Deckgläschen mit DAPI (1µg/ml) versetztem Eindeckmedium auf Objektträgern fixiert. Nachdem das Eindeckmedium über Nacht getrocknet war, konnten die Präparate mikroskopiert werden.

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am LSM880. Eine Nachbearbeitung der Aufnahmen, um Beschriftungen einzufügen, bestimmte Kanäle darzustellen oder Kollagen zu erstellen, erfolgte später mit der Bildbearbeitungssoftware ZEN blue, ImageJ, Power Point und Photo Shop.

2.2.11 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurden in dieser Arbeit Membranproteine an lebenden Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen und quantifiziert. Um die extrazellulären Epitope für die einzelnen Antikörper nicht zu zerstören, mussten die Zellen mit einer 2mM EDTA Lösung abgelöst werden.

Durchgeführt wurden die Immunfluoreszenzfärbungen in 15ml Zentrifugenröhrchen. Nach jedem Wasch- und Inkubationsschritt wurden die Zellen 5min bei 900rpm (3-16 KL, Sigma) zu einem Pellet zentrifugiert, sodass die Überstände der jeweiligen Lösungen problemlos dekantiert werden konnten.

Die Zellen wurden nach dem Ablösen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 100µl Blockpuffer aufgenommen. Danach wurde die entsprechende Menge Antikörper hinzugegeben und die Suspension gut durchmischt. Der Ansatz wurde für 30min bei RT unter mehrmaligem Durchmischen inkubiert. Waren die Antikörper direkt mit einem Fluorophor konjugiert, musste die Inkubation im Dunkeln durchgeführt werden. Nach der Inkubation wurde die Probe dreimal mit PBS gewaschen. Falls nicht mit direkt konjugierten Antikörpern gearbeitet wurde, wurde das Pellet erneut in 100µl Blocklösung aufgenommen und mit dem passenden Sekundäantikörper 30min bei RT in Dunkelheit und unter mehrfachen durchmischen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, und in 1000µl PBS aufgenommen und am CyFlow® Space analysiert. Um die Signalverstärkung (*Gain*-Einstellungen) der Sensoren (Photomultiplier) richtig einzustellen und um unspezifische Bindungen auszuschließen wurden immer Isotyp-Kontrollen mitgeführt.

2.2.12 Luc-Pair Duo-Luciferase Assay

Für den Luc-Pair Duo-Luciferase Assay wurden 3×10^5 Zellen in 6-well Platten kultiviert. Die Zellen wurden 24h nach ihrer Aussaat mit 100ng Plasmid (Produkt ID: HmiT004605-MT01) und 20pmol Kontroll-pre-miR oder pre-miR-218 co-transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde die Transfektionslösung durch Kulturmedium ersetzt. 72h nach der Transfektion wurden die Zellen nach Protokoll lysiert und nach Herstellerprotokoll analysiert.

2.2.13 Zell-Invasions-Assay

Für den Zell-Invasions-Assay wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen auf einer 8micron Zell-Invasions-Membran in 12-well Platten kultiviert. Nach 24h wurde aus dem oberen Kompartiment das Kulturmedium entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt. Das untere Kompartiment enthielt weiterhin

Medium mit FCS. 24h nach dem Medienwechsel des oberen Kompartiments wurden die Zellen mit dem „Differential Quik Staining Set“ fixiert und gefärbt. Die noch auf der Oberseite verbliebenen Zellen wurden vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt. Abschließend wurde die Membran auf einem Objektträger fixiert und mittels Mikroskopie konnte manuell ausgezählt werden, wie viele Zellen bei der jeweiligen Behandlungsart durch die Membranporen gewandert waren.

Soll untersucht werden, wie sich eine transiente Transfektion auf die Invasivität von Zellen auswirkt, muss diese 24h vor der Aussaat auf der Invasion-Membran geschehen.

2.2.14 Digitale-Holographische-Mikroskopie

Als Vorbereitung für die Digitale-Holographische-Mikroskopie (DHM), [69] die eine Möglichkeit der Zellbeobachtung in Echtzeit bietet, wurden 10^5 Zellen in 6-well Platten kultiviert, mit Kontroll-pre-miR oder pre-miR-218 transfiziert und 24h nach der Transfektion der DHM zugeführt. Von diesen transfizierten Zellen wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen in spezielle Zellkulturschalen (Ibidi) überführt und für 48h mikroskopiert. [68] Diese spezielle Mikroskopie-Technik bietet die Möglichkeit des sogenannten Zelltracking, der automatisierten, zeitlichen Verfolgung von Zellen zur Erstellung eines Bewegungsprofils. [67]

Zusätzlich war es möglich die so generierten Daten bezüglich der Zelltrockenmasse [7] und Zellfläche [133; 39] zu untersuchen, um so Ergebnisse über Zellgrößenwachstum und die Zellproliferation zu erhalten.

2.2.15 Statistik

Unter der Annahme des zentralen Grenzwertsatzes wurden die Versuche dieser Arbeit mittels ungepaartem oder gepaartem t-Test bezüglich ihrer Signifikanz überprüft.

Viele Ergebnisse wurden in Form einer relativen Veränderung zueinander dargestellt, da dies die Betrachtung und Diskussion selbiger deutlich vereinfacht. In die statistische Auswertung sind die absoluten Messwerte eingegangen. Im Falle der PCR Untersuchungen wurden die ΔC_t -Werte für die statistischen Tests benutzt.

Die Versuche in Kapitel 3.4.1-3.4.2 vergleichen jeweils den Einfluss einer Behandlung auf die Strahlenantwort. Vor der Anwendung des gepaarten t-Test zum Vergleich der gepaarten Testreihen, wurden neue Testvariablen definiert. Durch Subtraktion der jeweiligen Kontroll Probe von der jeweiligen behandelten Probe innerhalb einer Dosisgruppe (0 Gy, 2 Gy, 5 Gy) kann so sichergestellt werden, dass in die statistische Betrachtung nur der Strahleneffekt einfließt.

Sämtliche statistischen Testergebnisse die in Versuchen erhoben wurden, in denen mehrere Zelllinien bezüglich einer bestimmten Eigenschaft oder mehrere Gene analysiert wurden, wurden nach der Bonferroni-Holm Methode adjustiert.

Die Korrelation von EGFR-Status und miR-218-Status in Versuch 3.1.3 wurde mit der Pearson-Korrelation (r) untersucht, die für die Überprüfung der Signifikanz benötigt wurde.

Alle Fehlerbalken in den Diagrammen der quantitativen Ergebnisse zeigen den Standardfehler.

Die folgenden p-Werte wurden als statistisch signifikant definiert:
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

War die Veränderung einer Messreihe signifikant wurde dies durch eine entsprechende Markierung, zum Beispiel direkt am Balken der entsprechenden Messreihe markiert.

Wiesen zwei Messreihen zueinander einen statistisch signifikanten Unterschied auf, so wurde dieser Vergleich mit einer horizontalen Markierung mit Hinweis auf entsprechende Signifikanz dargestellt.

Trugen Ergebnisse keine Markierung, die auf eine Signifikanz hinweisen, bedeutete dies, dass die oben genannten statistischen Tests durchgeführt wurden, das Ergebnis allerdings statistisch nicht signifikant war.

3 ERGEBNISSE

3.1 EGFR Expression und miR-218 Reifung in verschiedenen Zelllinien

3.1.1 EGFR Transkription in verschiedenen Zelllinien

Die Zelllinien des Mammakarzinoms MCF-7, BT474, MDA-MB231, MDA-MB468, SK-BR-3, die benigne Zelllinie MCF-10, die immortalisierte Keratinozytenzelllinie HaCat, sowie die Zelllinie A549 als Vertreter des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms wurden bezüglich ihrer EGFR Expression untersucht. Die für EGFR negative Zelllinie MCF-7 wurde als Referenzgröße für die Auswertung nach der *fold change* Methode ($2^{-\Delta\Delta ct}$) herangezogen. [98] Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung in aufsteigender Reihenfolge der EGFR Expression. Der Zelllinie MCF-7, als Referenzgröße mit einem *fold change* von 1, folgten BT474 mit 86,51, A549 mit 158,50, HaCat mit 261,06, MDA-MB-231 mit 365,14, SK-BR-3 mit 394,27, MCF-10 mit 1010,56. Den größten *fold change* wies MDA-MB-468 mit 4471,65 auf. Dieser, im Verhältnis zu allen anderen untersuchten Zelllinien sehr große *fold change* ist zu erwarten gewesen, da bekannt ist, dass diese Zelllinie eine fragile Stelle des EGFR *locus* hat und 7 bis 16 Replikationen des EGFR Gens in einer Zelle auftreten. [1]

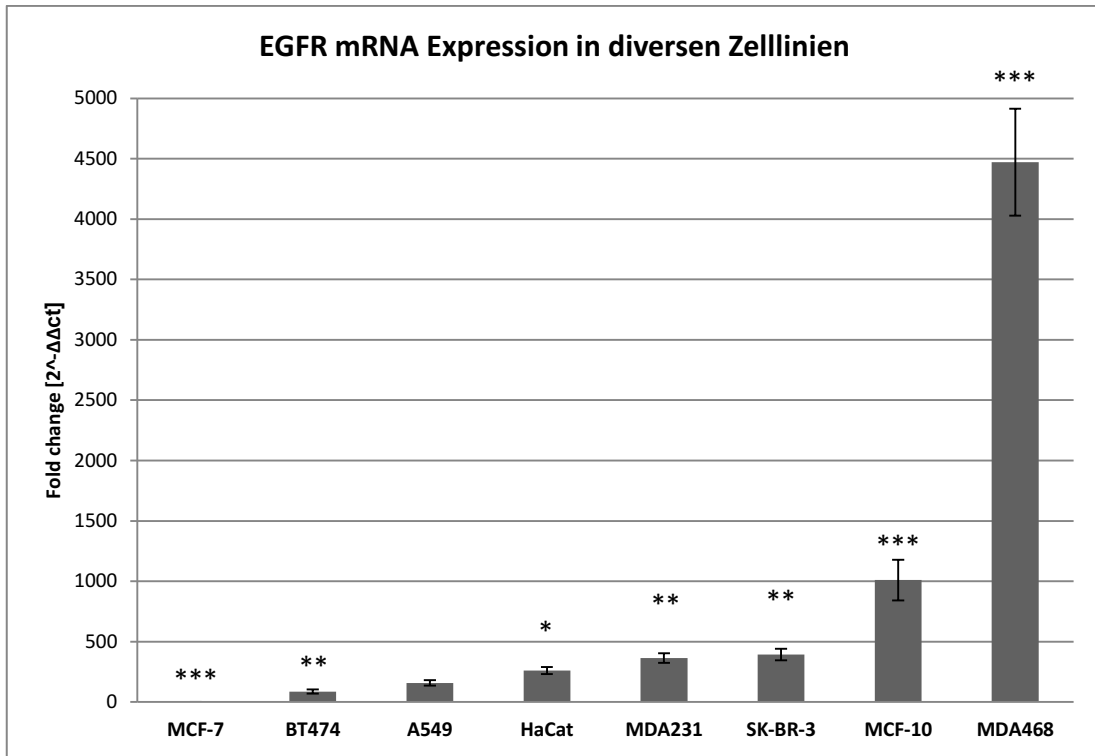


Abbildung 11: Die verschiedenen Zelllinien zeigten eine breite Varianz in ihrer individuellen EGFR Expression. Die qRT-PCR Untersuchung diverser Zelllinien bezüglich ihrer EGFR Expression hat folgende *fold change* Werte in aufsteigender Reihenfolge ergeben: MCF-7 (1), BT474 (86,51), A549 (158,50), HaCat (261,06), MDA-MB-231 (365,14), SK-BR-3 (394,27), MCF-10 (1010,56), MDA-MB-468 (4471,65). (n=7, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

3.1.2 Reifung von miR-218 in verschiedenen Zelllinien

Analog zu 3.1.1 wurden die entsprechenden Zelllinien bezüglich ihres Gehalts reifer miR-218 untersucht. Als Bezugsgröße wurde ebenfalls die Zelllinie MCF-7 gewählt. Den geringsten *fold change* hatten MDA-MB-468 mit 0,02 (Abb. 12). Es folgten aufsteigend SK-BR-3 mit 0,30, MCF-7 mit 1, MCF-10 mit 2,50, BT474 mit 9,86, HaCat mit 10,14, A549 mit 10,34. Den größten *fold change* wies MDA-MB-231 mit 27,52 auf.

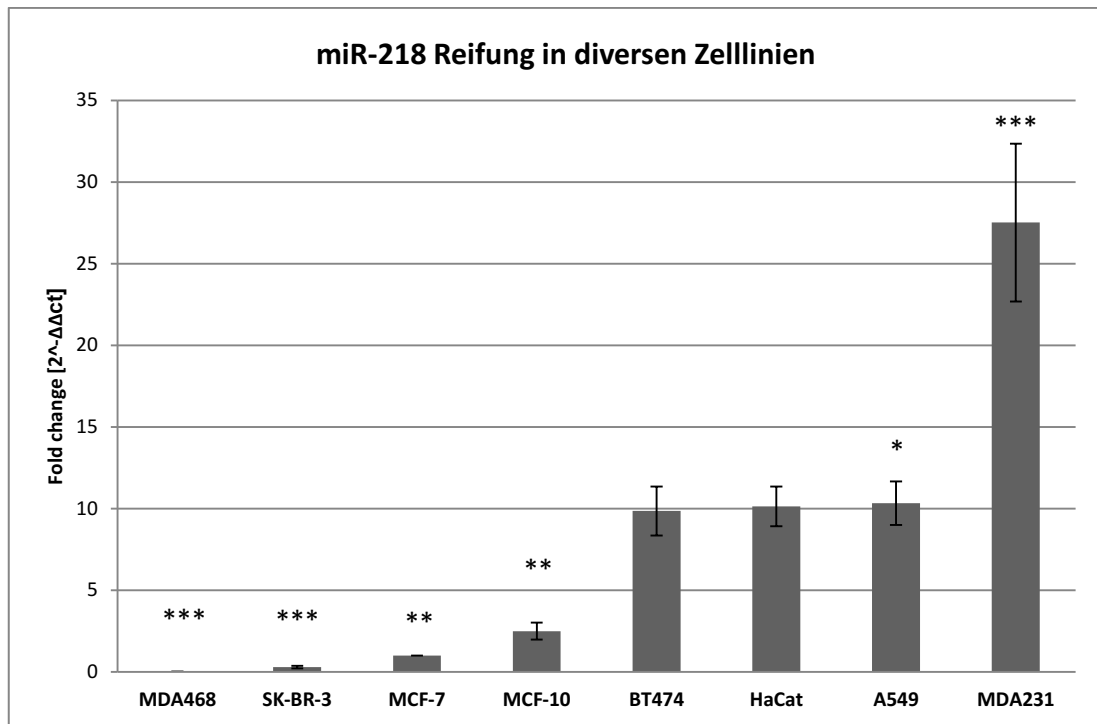


Abbildung 12: Die verschiedenen Zelllinien zeigten eine breite Varianz in ihrer individuellen miR-218 Expression. Die qRT-PCR Untersuchung diverser Zelllinien bezüglich reifer miR-218 hat folgende *fold change* Werte in aufsteigender Reihenfolge ergeben: MDA-MB-468 (0,02), SK-BR-3 (0,30), MCF-7(1), MCF-10 (2,50), BT474 (9,89), HaCat (10,14), A549 (10,34), MDA-MB-231 (27,52). (n=6, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

3.1.3 Zusammenhang zwischen EGFR Expression und miR-218 Reifung in verschiedenen Zelllinien

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der EGFR Expression und der miR-218 Reifung zu untersuchen, wurde die miR-218 Reifung auf der Abszisse gegen den Logarithmus (log) der EGFR Expression auf der Ordinate aufgetragen (Abb. 13). Für die Betrachtung der linearen Regression wurden die Werte für die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 ausgeblendet. Dies lag daran, dass MCF-7 stets die Bezugsgröße in diesen Versuchen war und so immer den Wert 1 annimmt. Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde aufgrund ihrer extremen Abweichung nicht berücksichtigt, die in der generellen konstitutiven hohen Regulation von Wachstumsfaktoren in dieser Zelllinie begründet ist. [104; 97] So ergab

sich eine idealisierte Regression, die eindeutig den Zusammenhang zwischen einer stark erhöhten EGFR Expression und einer stark verminderten miR-218 Reifung zeigte. Statistisch war das Ergebnis nicht signifikant, wies jedoch einen starken Korrelationskoeffizienten von $r=0,63$ auf. Damit ist gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der EGFR Expression und der Reifung von miR-218 besteht, dieses Modell jedoch nicht auf alle Zelllinien angewendet werden darf, da es keine absolute Allgemeingültigkeit besitzt, wie im Falle von MDA-MB-231 zu sehen war.

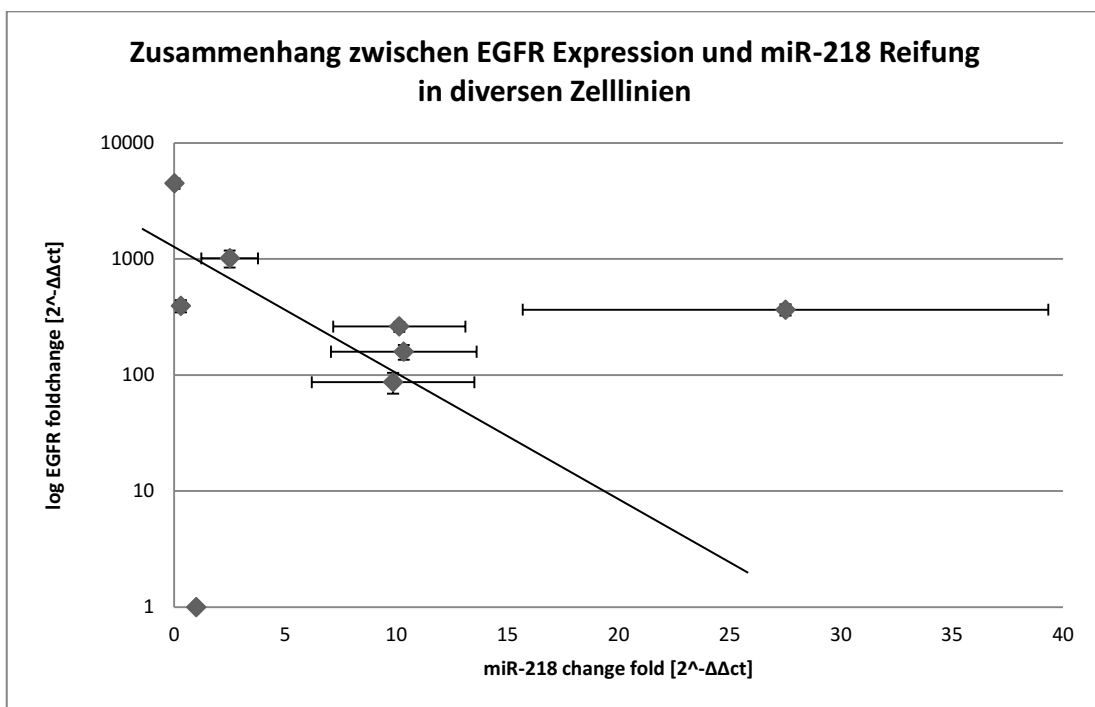


Abbildung 13: Der Graph zeigt den Zusammenhang zwischen EGFR Expression und miR-218 Reifung. Für die Berechnung der linearen Regression wurden die Werte für MDA-MB-231 und MCF-7 nicht berücksichtigt. ($n=6$; $r=0,63$)

3.2 Zielsequenzen von miR-218

3.2.1 Ergebnisse der *Target Scan* Abfrage für Ziel-mRNAs von miR-218

Mit Hilfe der online-Datenbank *Target Scan Human - Prediction of microRNA targets 6.2* wurde erfasst, welche radioonkologisch relevanten Ziel-mRNAs durch miR-218 reguliert werden könnten. Die Datenbankabfrage wurde anschließend manuell auf aussichtsreiche Kandidaten geprüft und dahingehend selektiert (Tabelle 9).

Die Datenbankabfrage vom 12. September 2014 ergab, dass zu erwarten ist, dass miR-218 an die mRNAs von EGFR, Tob1 [165], Robo1 [20; 112], Birc5 [3; 58], Tenascin C [106], Notch2 [4], Decorin [64] und Birc6 [36] hybridisiert. Alle prognostizierten Hybridisierungsstellen liegen in der 3' UTR der jeweiligen mRNA. Für EGFR wurde eine 7mer *seed site* mit einem p_{CT} von $<0,1$, für Tob1 eine 7mer *seed site* mit einem p_{CT} von 0,57, für Robo1 eine 7mer *seed site* mit einem p_{CT} von 0,88, für Birc5 eine 6mer *seed site* mit einem p_{CT} von $<0,1$, für TNC eine 7mer *seed site* mit einem p_{CT} von 0,98, für Norch2 eine 7mer *seed site* mit einem p_{CT} von 0,59, für Decorin eine 7mer *seed site* mit einem p_{CT} von $<0,1$ und für Birc6 eine 7mer *seed site* mit einem p_{CT} von 0,84 vorhergesagt. Die p_{CT} -Werte beruhen auf dem Algorithmus der online-Datenbank *Target Scan Human - Prediction of microRNA targets 6.2* und müssen experimentell validiert werden. Je höher der p_{CT} -Wert, umso wahrscheinlicher ist die Bindung der miR an die entsprechende Ziel-mRNA. Der p_{CT} -Wert kann einen Wertebereich von 0-1 annehmen.

Tabelle 9: Ergebnisse der *Target Scan Human - Prediction of microRNA targets 6.2* Abfrage vom 12. September 2014.

GEN	SEQUENZ	P _{CT}
EGFR 195-201 miR-218	5' C C A G A U G A U U G U U C A A A G C A C A G 3' I I I I I I I I I I I I I I 3' U G U A C C A A U C U A G U U C G U G U U 5'	<0,1
Tob1 162-169 miR-218	5' U U U C A U U U G C C A A C C A A G C A C A A 3' I I I I I I I I I I I I I I 3' U G U A C C A A U C U A G U U C G U G U U 5'	0,57
Robo1 971-978 miR-218	5' U U U U U U G G U U U U A A - A A G C A C A A 3' I I I I I I I I I I I I I I 3' U G U A C C A A U C U A G U U C G U G U U 5'	0,88
Birc5 634-640 miR-218	5' G U U A A U U C A C A G A A U A G C A C A A 3' I I I I I I I I I I I I I I 3' U G U A C C A A U C U A G U U C G U G U U 5'	<0,1
TNC 606-613 miR-218	5' U U U U U U U U U A A A U A A A A G C A C A A 3' I I I I I I I I I I I I I I 3' U G U A C C A A U C U A G - U U C G U G U U 5'	0,98
Notch2 2336-2342 miR-218	5' C C U C C C U U U U C C U U A A G C A C A A 3' I I I I I I I I I I I I I I 3' U G U A C C A A U C U A G U U C G U G U U 5'	0,59
Decorin 712-719 miR-218	5' A U G U A A G C U U A U A - - A A G C A C A A 3' I I I I I I I I I I I I I I 3' U G U A C C A A U C U A G U U C G U G U U 5'	<0,1
Birc6 39-46 miR-218	5' G A C A C A A A G G C U U C G A A G C A C A A 3' I I I I I I I I I I I I I I 3' U G U A C C A A U C U A G U U C G U G U U 5'	0,84

3.2.2 Experimentelle Überprüfung der potentiellen Zielsequenzen von miR-218

3.2.2.1 Luciferase-Test für EGFR 3' UTR und miR-218 in MDA-MB-231 Zellen

Die in 3.2.1 ermittelten potentiellen Hybridisierungsstellen der miR-218 in der 3' UTR ihrer möglichen Ziel mRNAs müssen experimentell validiert werden. Dieser Nachweis wurde mit dem Luc-Pair Duo-Luciferase Assay für EGFR durchgeführt. Alle weiteren möglichen Ziel mRNAs wurden in qRT-PCR Experimenten in 3.2.2.2 validiert.

Der Luciferase-Test wurde wie in 2.2.12 beschrieben durchgeführt. 72h nach der transienten Co-Transfektion des Plasmids und der Kontroll-pre-miR, beziehungsweise der pre-miR-218 wurden die Zellen lysiert und die jeweiligen Proben bezüglich ihrer Luciferase-Aktivität analysiert. Zellen die mit pre-miR-218 co-transfiziert wurden, zeigten eine signifikante, im Mittel um 24,50% verminderte Luciferase-Aktivität (Abb. 14). Damit wurde experimentell bestätigt, dass die in 3.2.1 ermittelte, theoretische *seed-site* von miR-218 die 3' UTR der EGFR mRNA erkannte und miR-218 dadurch Einfluss auf deren Translation nehmen konnte.

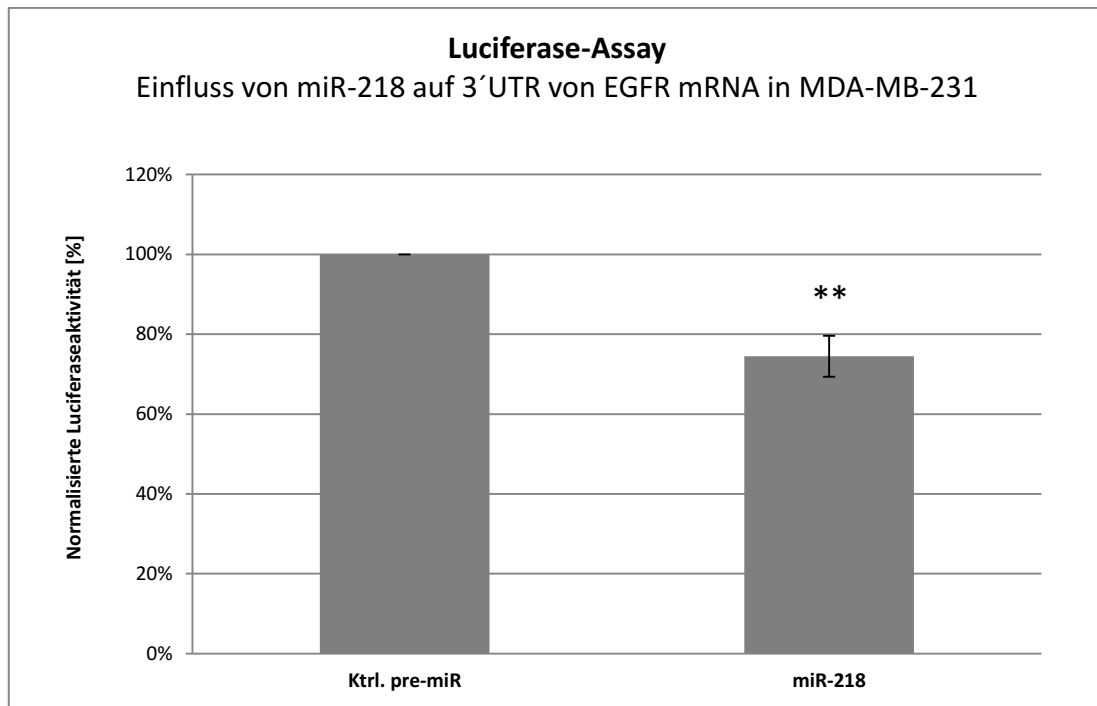


Abbildung 14: Mittels Luciferase-Assay lässt sich die Bindung zwischen miR-218 und der EGFR mRNA beweisen. Die Luciferase-Aktivität in MDA-MB-231 Zellen nimmt signifikant 72h nach der Co-Transfektion des Plasmids und pre-miR-218 um 24,50% ab. (n=10, ** p<0,01)

Diese Untersuchungen wurden an MDA-MB-231 Zellen durchgeführt. Die Untersuchungen an weiteren Zelllinien, BT474 und A549, waren nicht möglich, da das Plasmid in diesen Zellen unter allen gewählten Versuchsbedingungen toxisch wirkte und alle Zellen vor der Analyse vollständig abgestorben waren.

3.2.2.2 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf verschiedene mRNAs von MDA-MB-231, BT474 und A549 Zellen

Die potentiell nach 3.2.1 von miR-218 post-transkriptional beeinflussten mRNAs wurden mittels qRT-PCR untersucht. Dazu wurden MDA-MB-231, BT474 und A549 Zellen mit Kontroll-pre-miR und pre-miR-218 transfiziert und nach 24h bezüglich des Expressionsmusters der entsprechenden Gene analysiert.

Abbildung 15 zeigt, die Veränderung von Birc5, Birc6, Decorin, EGFR, Notch2, Robo1, TNC und Tob1 nach transienter miR-218 Überexpression für die Zelllinien MDA-MB-231 (■), BT474 (■) und A549 (■). Alle analysierten möglichen Ziel-mRNAs zeigten eine signifikant geringere Expression durch die transiente Überexpression von miR-218.

Im Detail war in MDA-MB-231 (■) ein Rückgang von Birc5 um 68%, von Birc6 um 4%, von EGFR um 56%, von Notch2 um 31%, von Robo1 um 77%, von TNC um 60% und von Tob1 um 33% zu beobachten. Für Decorin waren MDA-MB231 Zellen negativ.

BT474 (■) zeigten einen Rückgang von Birc5 um 54%, von Birc6 um 7%, von Decorin um 10%, von EGFR um 40%, von Notch2 um 46%, von Robo1 um 68%, von TNC um 49% und von Tob1 um 32%.

Bei A549 (■) Zellen war ein Rückgang von Birc5 um 68%, von Birc6 um 15%, von Decorin um 45%, von EGFR um 69%, von Notch2 um 64%, von Robo1 um 73%, von TNC um 32% und von Tob1 um 32% zu sehen.

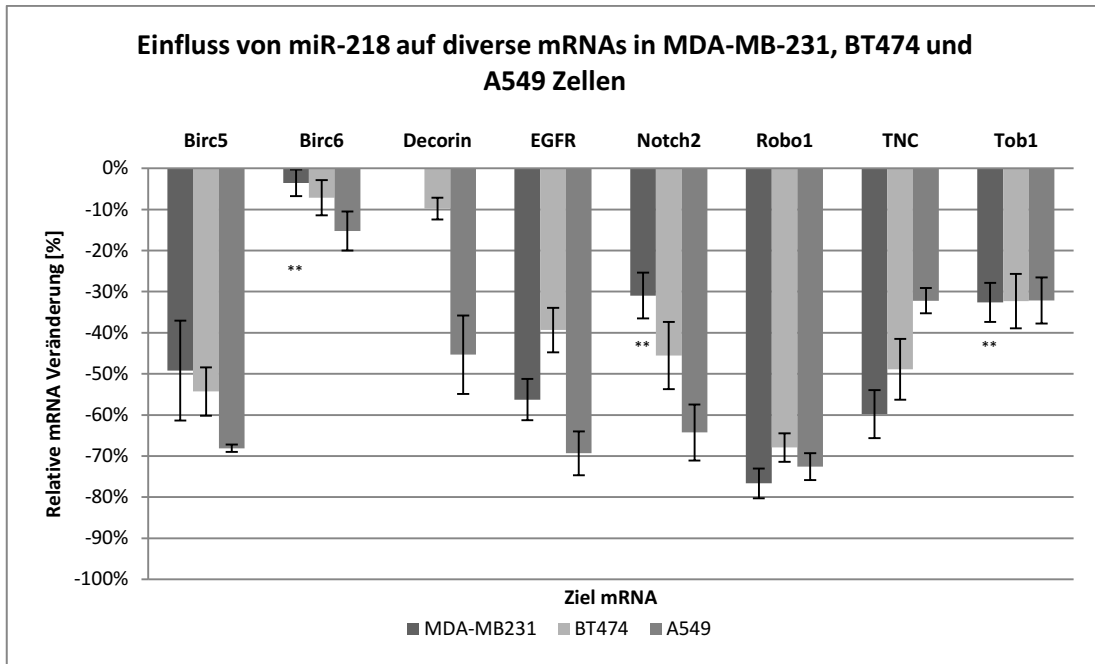


Abbildung 15: miR-218 reguliert sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressorgene. Die qRT-PCR Untersuchungen an mit pre-miR-218 transfizierten Zellen der Zelllinien MDA-MB-231, BT474 und A549 zeigten 24h nach Transfektion, dass miR-218 die mRNAs von Birc5, Birc6, Decorin, EGFR, Notch2, Robo1, TNC und Tob1 negativ post-transkriptional signifikant reguliert. (n=4, ** p<0,01)

3.2.2.3 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Translation verschiedener Proteine von MDA-MB-231, BT474 und A549 Zellen

Da die Ergebnisse aus 3.2.2.2 der post-transkriptionalen Genregulation durch miR-218, nicht einfach auf die Translation in aktives Protein extrapoliert werden können, muss eine Analyse mittels Western Blot und Durchflusszytometrie durchgeführt werden, um Aussagen über den Einfluss von miR-218 auf die Regulation von Proteinen treffen zu können. Sowohl für den qualitativen Nachweis mittels Western Blot als auch für den quantitativen Nachweis mittels Durchflusszytometrie wurden Zellen der Zelllinien MDA-MB-231, BT474 und A549 mit Kontroll-pre-miR oder pre-miR-218 transfiziert und 72h nach der Transfektion den jeweiligen Analysetechniken zugeführt.

Mittels Western Blot Analyse (Abb. 16) wurden EGFR und Notch2 nach pre-miR-218 Transfektion untersucht. In allen drei Zelllinien war ein deutlicher Rückgang von EGFR und Notch2 72h nach der Transfektion zu erkennen.

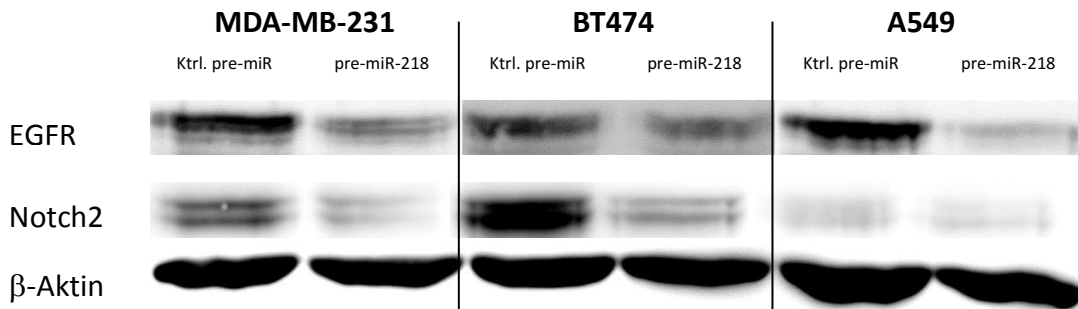


Abbildung 16: Der Einfluss von miR-218 ist auch auf Proteinebene deutlich. In der Western Blot Analyse ist klar zu erkennen, dass miR-218 72h nach der Transfektion zu einem deutlichen Rückgang von EGFR und Notch2 in MDA-MB-231, BT474 und A549 Zellen auf Proteinebene führt. (Repräsentative Abbildung, n=3)

Mit der Durchflusszytometrie wurde eine weitere quantitative Analysemethode für die Proteine EGFR und Notch2 verwendet. Für die Zelllinie MDA-MB-231 konnten für Notch2 leider keine Daten erhoben werden, da der für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper das Notch2 Molekül von MDA-MB-231 nicht erkannte.

Die quantitative Bestimmung von EGFR und Notch2 in den Zelllinien MDA-MB-231 (Abb. 17 ■), BT474 (Abb. 17 ■) und A549 (Abb. 17 ■) zeigte für alle drei Zelllinien eine signifikante Abnahme von EGFR 72h nach der pre-miR-218 Transfektion. Für Notch2 konnte nur in BT474 Zellen eine signifikante Abnahme nachgewiesen werden.

Im Einzelnen verringerte sich EGFR in MDA-MB-231 um 53%, in BT474 um 32% und in A549 um 63%. Notch2 verringerte sich in BT474 um 42% und in A549 um 28%.

Damit wurde bestätigt, dass die post-transkriptionale Genregulation von miR-218 für EGFR und Notch2 signifikante Effekte auf Proteinebene zur Folge hat.

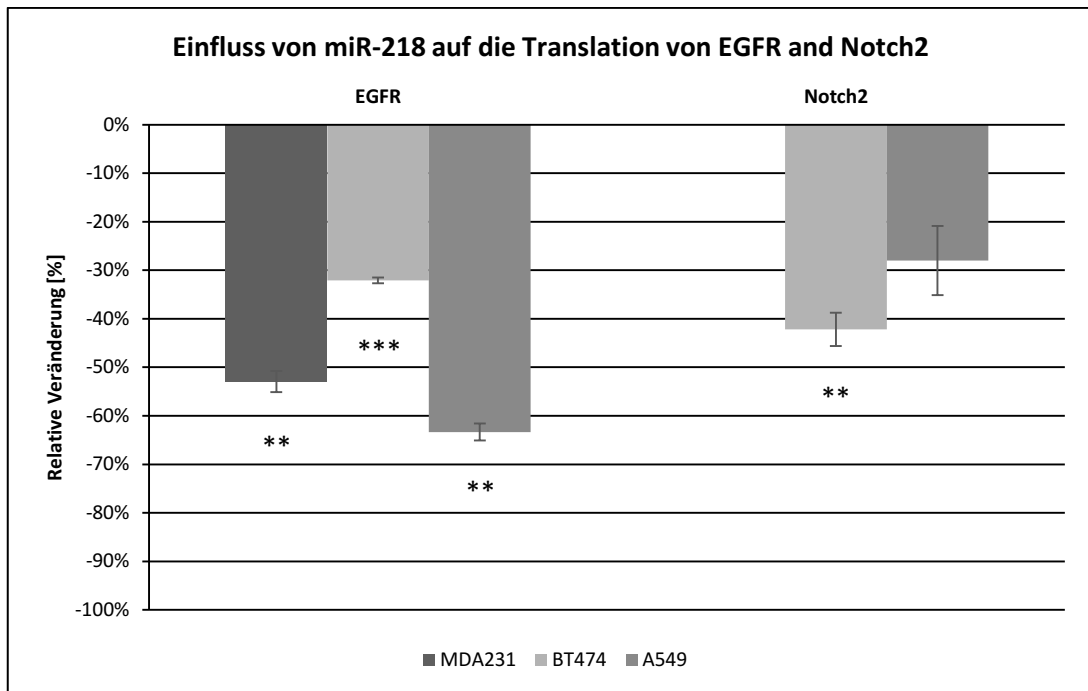


Abbildung 17: Der Einfluss von miR-218 ist auch auf Proteinebene deutlich. Die Analysen mittels Durchflusszytometrie ergaben, dass sich die Transfektion von miR-218 nach 72h negative auf EGFR und Notch2 in MDA-MB-231 (■), BT474 (□) und A549 (▒) auf Proteinebene auswirkte. (n=3, ** p<0,01, ***p<0,001)

3.3 Einfluss von miR-218 auf die Zellphysiologie

3.3.1 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Aktivierung des MAPK Signalweges in MDA-MB-231 Zellen

Die Versuche 3.2.2.1, 3.2.2.2 und 3.2.2.3 zeigten, dass EGFR von miR-218 signifikant auf Gen- und Proteinebene reguliert wird. Um weitere Rückschlüsse auf die Bedeutung dieser Regulation zuzulassen, muss überprüft werden, ob diese Regulation Einfluss auf die der EGFR Aktivierung nachgeschalteten Signalwege hat. Diese Untersuchung wurde am Beispiel des MAPK Signalweges in MDA-MB-231 Zellen durchgeführt. Dazu wurden MDA-MB-231 Zellen mit Kontroll-pre-miR oder pre-miR-218 transient transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch serumfreies DMEM ersetzt und 100ng/ml EGF

zugegeben. Zu den Zeitpunkten 0min, 10min und 20min nach EGF Applikation wurden Proben für die Western Blot Analyse in entsprechendem Aufschlusspuffer fixiert. Die Western Blot Analyse zeigte, dass weder die miR-218 noch die Gabe von EGF die MAPK Konzentration beeinflusste (Abb. 18 p44/42). Allerdings gab es deutliche Unterschiede in der Aktivierung (Phosphorylierung) der MAPK. 10min nach der Gabe von EGF war in den pre-miR-218 transfizierten Zellen die MAPK deutlich weniger stark phosphoryliert (Abb. 18 phospho p44/42). Auch der Prozess der Dephosphorylierung nach 20min verlief in den pre-miR-218 behandelten Zellen schneller und entsprach schon fast wieder dem Ausgangsniveau zum Zeitpunkt 0min.

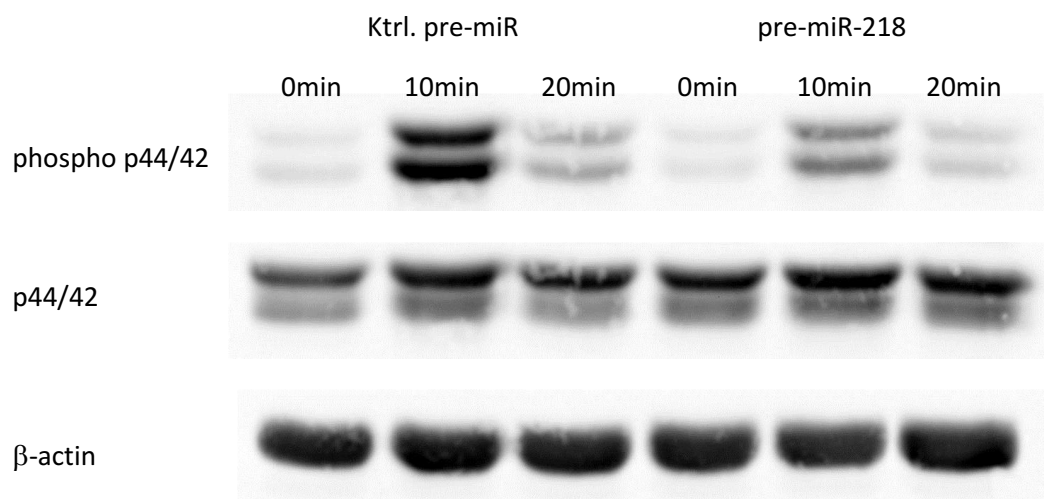


Abbildung 18: Durch den regulativen Einfluss von miR-218 auf EGFR wurden die nachgeschalteten Signalwege beeinflusst. Der Western Blot zeigt deutlich, die verminderte Phosphorylierung von MAPK (phospho p44/42) in pre-miR-218 behandelten MDA-MB-231 Zellen 10min nach EGFR Aktivierung durch 100ng/ml EGF. Nach 20min ist dieser Effekt in den pre-miR-218 Proben wieder auf dem Ausgangsniveau, in den Kontroll-pre-miR Proben jedoch nicht. Die MAPK Grundform (p44/42) bleibt trotz der pre-miR-218 Transfektion und der EGF Applikation unverändert. (Repräsentative Abbildung, n=3)

Damit konnte gezeigt, dass die Regulierung von EGFR durch miR-218 auch Einfluss auf EGFR nachgeschalteten Signalwegen wie den MAPK Signalweg hat.

3.3.2 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Zellmotilität, Zellfläche und Zelltrockenmasse in MDA-MB-231 Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die transient induzierte Überexpression von miR-218 signifikanten Einfluss sowohl auf die Signaltransduktion als auch auf Proteine, mit essentieller Relevanz für Zellwachstum und -überleben nimmt, gilt es zu untersuchen, wie sich diese Faktoren auf Zell-Motilität und -Wachstum auswirken. Dazu wurden mittels Digitaler-Holographischer-Mikroskopie MDA-MB-231 Zellen bezüglich ihrer Veränderung in der Zellmotilität, Zellfläche und Zelltrockenmasse nach Behandlung mit pre-miR-218 untersucht. 2×10^5 Zellen wurden in 6-well Platten mit Kontroll-pre-miR oder pre-miR-218 behandelt, nach 24h abgelöst und $2,5 \times 10^4$ Zellen der Analyse mittels Digitaler-Holographischer-Mikroskopie zugeführt. Die ersten 14h der 48h dauernden Beobachtungszeit wurden von der Datenerhebung ausgenommen, um sicher zu stellen, dass der von der Präparation der Zellen induzierte Zellstress keine Auswirkung auf die Messergebnisse hat.

Zellen die mit Kontroll-pre-miR transfiziert wurden, zeigten eine hohe Beweglichkeit und entfernten sich über 34h durchschnittlich $62,51\mu\text{m}$ (Abb. 19 C) von ihrem Ursprungspunkt. In Abbildung 19 A ist in jeweils einer anderen Farbe die gesamte Strecke der einzelnen Zellen als Zell-Track gezeigt. Analog zeigt Abbildung 19 B das Tracking-Profil für Zellen, die zuvor mit pre-miR-218 behandelt wurden. Bereits auf dieser Abbildung ist zu erkennen, dass diese Zellen ein deutlich verringertes Bewegungsprofil zeigten. Im Detail bewegten sich die mit pre-miR-218 transfizierten Zellen nur $41,50\mu\text{m}$ von ihrem Ursprungsort zu Beginn der Beobachtung. Der Unterschied zu ihren Kontrollen ist signifikant und beträgt $21,01\mu\text{m}$.

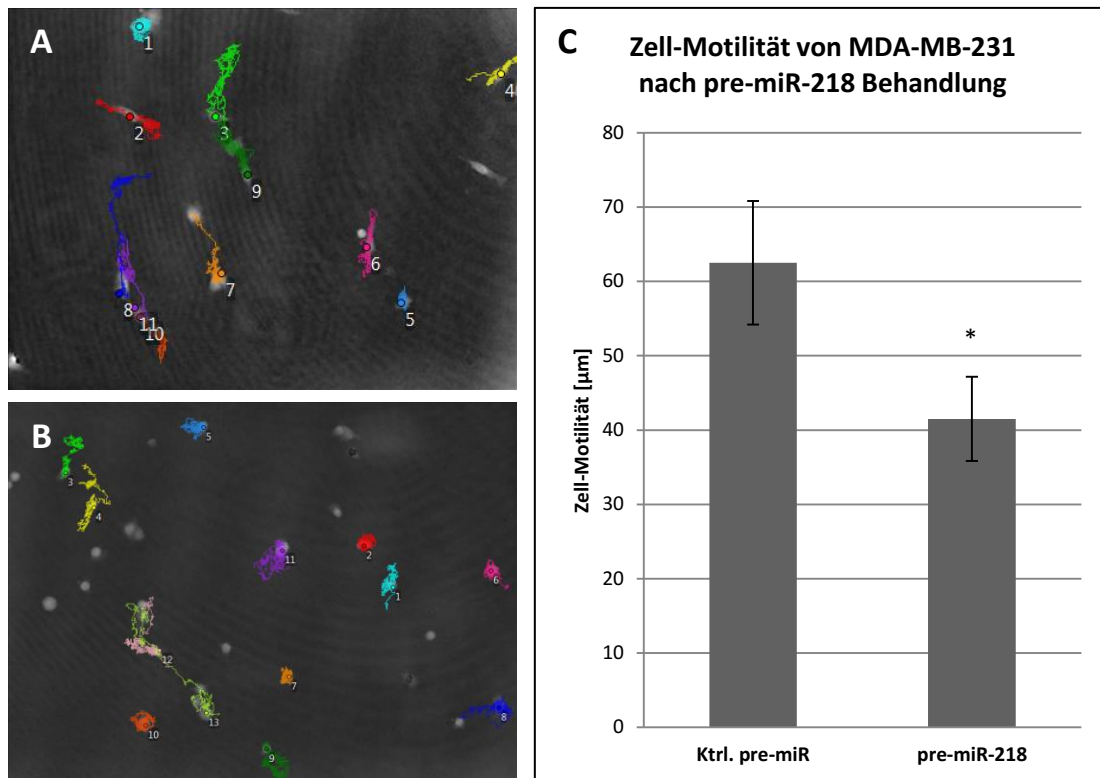


Abbildung 19: Eine transiente Überexpression von miR-218 führt zu einer verminderten Motilität. Die Ergebnisse der Digitalen-Holographischen-Mikroskopie zeigten, dass sich MDA-MB-231 Zellen, die mit Kontroll-pre-miR behandelt wurden (A) durchschnittlich 62,51µm von ihrem Ursprungsort bewegten (C). Zellen die mit pre-miR-218 transfiziert wurden (B), bewegten sich signifikant weniger, durchschnittlich nur 41,50µm (C). (n=3, *p<0,05)

Neben der Information über die Zellmotilität konnten anhand der Bilder der Digitalen-Holographischen-Mikroskopie auch Daten zur Veränderung in der projizierten Zelltrockenmasse und -fläche erhoben werden.

Die Zellen, die mit Kontroll-pre-miR behandelt wurden hatten zu Beginn der Messung beziehungsweise zum Nullpunkt der Datenerhebung eine Gesamttrockenmasse von 6,45ng (Abb. 20 A). Nach 34h erhöhte sich die Gesamttrockenmasse auf 11,14ng. Zellen die mit pre-miR-218 transfiziert wurden, hatten anfangs eine Zelltrockenmasse von 5,84ng. Zum Ende der Messung hatte sich die Zelltrockenmasse auf 7,52ng erhöht. Zellen, die mit pre-miR-218 behandelt wurden hatten also nur eine Zunahme der Zelltrockenmasse von 28,77%. Ihre Kontrollen zeigten eine Zunahme der Zelltrockenmasse von 72,71%.

Analog zur Veränderung der Zelltrockenmasse verhielt sich auch die Entwicklung der Zellfläche über den Beobachtungszeitraum von 34h. Zu Beginn der Messung hatten die Kontroll-pre-miR transfizierten und pre-miR-218 transfizierten mit $6059\mu\text{m}^2$ und $5924\mu\text{m}^2$ fast die gleiche Ausgangsgröße der Zellfläche (Abb. 20 B). Die Zellfläche der Kontrolle erhöhte sich auf $9961\mu\text{m}^2$, eine Zunahme um 64,40%. Zellen, die mit pre-miR-218 behandelt wurden zeigten nur einen Zunahme der Zellfläche auf $7192\mu\text{m}^2$, ein vermindertes Plus von 21,40%.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass mittels Digitaler-Holographischer-Mikroskopie gezeigt werden konnte, dass die transiente Überexpression von miR-218 eindeutigen und teilweise signifikanten Einfluss auf die Physiologie von MDA-MB-231 Zellen in Form der Zellmotilität, -trockenmasse und -fläche nehmen konnte.

Die Zelllinie BT474 eignete sich aufgrund ihrer Immobilität leider nicht für diesen Versuch.

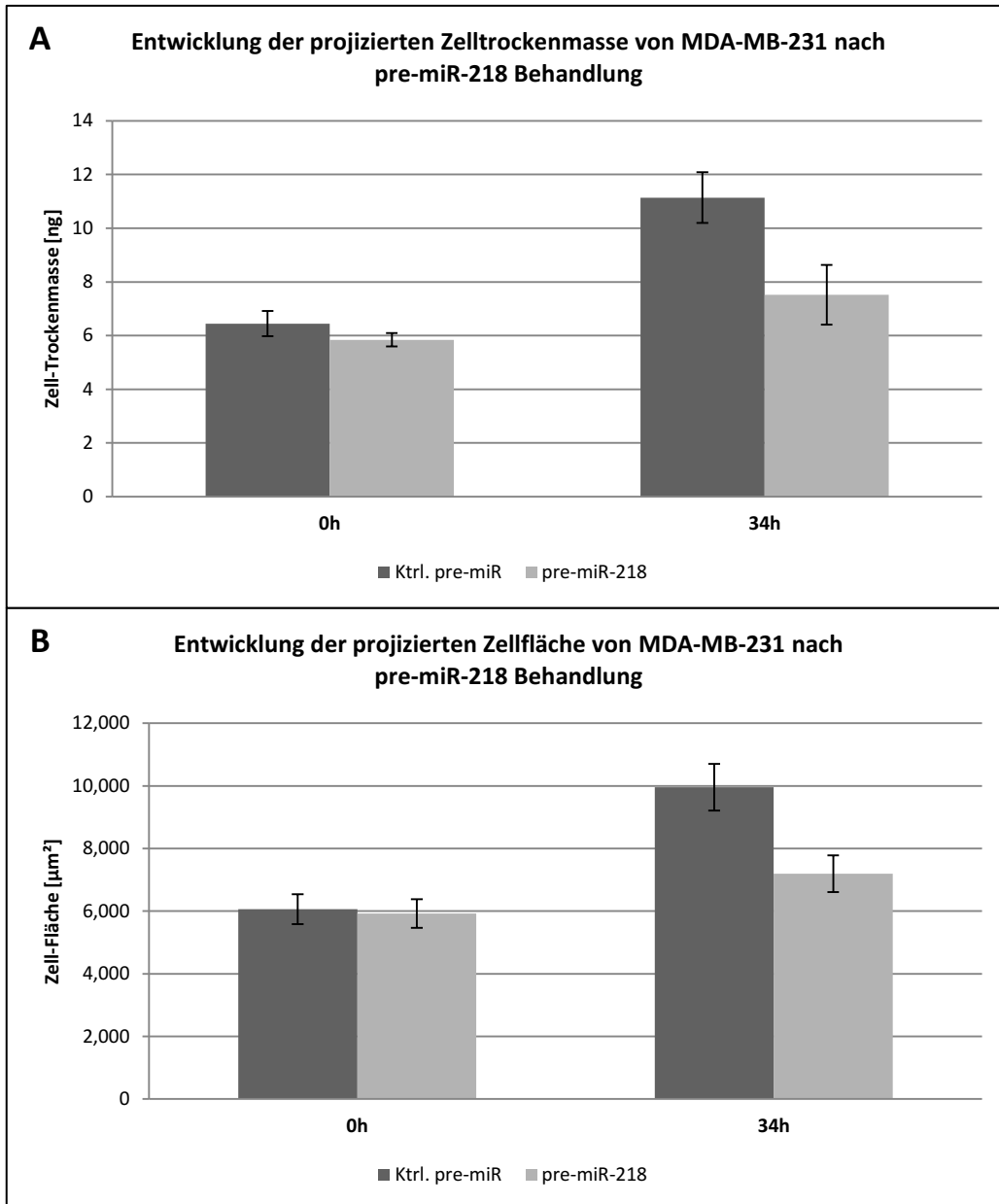


Abbildung 20: Eine transiente Überexpression von miR-218 führt zu einer Veränderung in Zelltrockenmasse und Zellgröße. Die Bilder der Digitalen-Holographischen-Mikroskopie lassen sich zusätzlich auf Veränderungen der projizierten Zelltrockenmasse und -fläche untersuchen. MDA-MB-231 Zellen die mit Kontroll-pre-miR transfiziert wurden vergrößerten ihre Trockenmasse von 6,45ng auf 11,14ng (A ■) und ihre Fläche nahm von 6059µm² auf 9961µm² zu (B ■). Zellen die mit pre-miR-218 behandelt wurden vergrößerten ihre Trockenmasse von 5,84ng auf nur 7,52ng (A ■) und ihre Fläche wuchs lediglich von 5924µm² auf 7192µm² (B ■). Die Digitale-Holographische Mikroskopie wurde in Kooperation mit dem Biomedizinischen Technologiezentrum des UKM durchgeführt. (n=3)

3.3.3 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Mitose in MDA-MB-231, BT474 und A549 Zellen

Während der Untersuchungen des Einflusses von miR-218 auf die Zellphysiologie mittels Digitaler-Holographischer-Mikroskopie in 3.3.2 wurden Zellen auch mittels Fluoreszenzmikroskopie bezüglich ihres Zellteilungsverhalten hin überprüft. Dabei wurden die DNA mit Hoechst33342 (Abb. 21 ■), einem Lebendfarbstoff, und das Zytoskelett mit dem Baculovirus-System CellLight® Tbulin-GFP (Abb. 21 ■) gefärbt.

Die in Abbildung 21 gezeigten Bilder sind Auszüge aus einer Videosequenz sich teilender Zellen, einmal mit Kontroll-pre-miR transfiziert oder mit pre-miR-218.

Die Kontroll-pre-miR transfizierten Zellen, zeigten 24h nach der Transfektion, also zum Zeitpunkt 0min Prometaphase-Chromosomen, die sich in der Äquatorialebene der betrachteten Zelle anordnen. Nach 20min war die Zelle in der Metaphase, in der deutlich die Zellpole und der mitotischen Spindelapparat zu erkennen sind. Die Anaphase war nach 38min mit gut erkennbarer Chromosomen-Segregation erreicht. Weitere 4min später, nach 42min hatte sich die Zelle nahezu vollständig geteilt und trat in die Telophase ein.

Ein grundlegend anderes Mitoseverhalten zeigten die mit pre-miR-218 behandelten Zellen. Die Bildausschnitte beginnen zum Zeitpunkt 0min mit einer Zelle in der späten Meta- und eigentlich einsetzenden Anaphase. Der nächste Bildausschnitt zeigte die Zelle 160min später, beim immer noch andauernden Versuch der Chromosomensegregation. Zu erkennen sind immer noch die Zellpole und die mitotische Spindel. Nach weiteren 32min und 72min zu den Zeitpunkten 192min und 233min änderte sich dieser Zustand nicht. Letztendlich endeten diese Versuche der Zellteilung in einer mitotischen Katastrophe. Diese zeigte sich in polynukleären Zellen mit Mikrokernen, zu sehen in Abbildung 22 D. Die Zellen treten aus dem Zellzyklus aus und nach weiteren Tagen in die Apoptose ein.

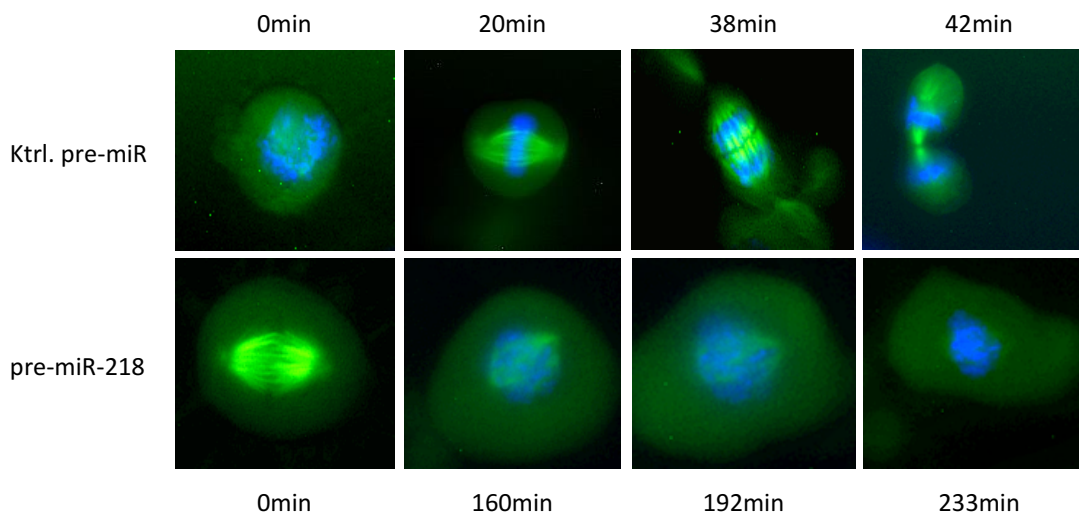


Abbildung 21: Eine transiente Überexpression von miR-218 kann zu Komplikationen in der Mitose führen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, für die die DNA (Hoechst33342 ■) und Tubulin (■) gefärbt wurden, von MDA-MB-231 Zellen zeigen eine physiologische Mitose für Zellen mit Kontroll-pre-miR Transfektion, 24h vor der Beobachtung. Zellen die mit pre-miR-218 transfiziert wurden, sind häufig nicht in der Lage die Mitose vollständig abzuschließen, da es ihnen nicht möglich ist die Chromosomen korrekt zu segregieren. Die Messung wurde in Kooperation mit dem Biomedizinischen Technologiezentrum des UKM durchgeführt. (Repräsentative Abbildung, n=3)

Da die in Abbildung 21 gezeigten Beispiele aus einer sehr kleinen Stichprobe stammten, galt es zu untersuchen, wie repräsentativ und gegebenenfalls signifikant das Ereignis der miR-218 induzierten mitotischen Katastrophen war.

Dazu wurden jeweils 10^5 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit Kontroll-pre-miR oder pre-miR-218 transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen fixiert und die Nuklei mit DAPI gefärbt. Während der Fluoreszenzmikroskopie wurden Bilder generiert, die anschließend manuell bezüglich der Anteile mitotischer Katastrophen (Abb. 22 D) ausgewertet wurden.

Die Untersuchung zeigte bei den Zelllinien MDA-MB-231, BT474 und A549 eine signifikante Erhöhung mitotischer Katastrophen (Abb. 22 A-C ■). Im Detail stieg der Anteil von mitotischen Katastrophen bei MDA-MB-231 um 5,59% (Abb. 22 A ■), bei BT474 um 3,07% (Abb. 22 B ■) und A549 um 4,26% (Abb. 22 C ■).

Da in 3.2.2.2 gezeigt werden konnte, dass miR-218 Birc5 reguliert und Birc5 für die Stabilisierung der mitotischen Spindel mitverantwortlich ist, galt es zu untersuchen, ob ein transienter siRNA basierter *Knock Down* von Birc5 einen ähnlichen Phänotyp generiert, zumal die Ergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie zeigten, dass es unter miR-218 Einfluss zu Problemen mit der Chromosomensegregation kam (Abb. 21). Dazu wurde der Versuch zur Ermittlung mitotischer Katastrophen erneut durchgeführt. Allerdings wurde die Kontrolle mit Kontroll siRNA behandelt und der *Knock Down* mit Birc5 siRNA durchgeführt. Es konnte der gleiche Phänotyp für alle drei Zelllinien signifikant mittels transientem Birc5 *Knock Down*, der mittels qRT-PCR überprüft wurde, reproduziert werden (Abb. 22 E). Im Einzelnen erhöhte sich der Anteil an mitotischen Katastrophen bei MDA-MB-231 um 5,66% (Abb. 22 A ■), bei BT474 um 3,02% (Abb. 22 B ■) und bei A549 (Abb. 22 C ■) um 5,30 %.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die transiente Überexpression von miR-218 zu einem signifikant erhöhten Auftreten mitotischer Katastrophen führte. Ein transienter *Knock Down* von Birc5 führte zu einem ähnlichen bis identischen Phänotyp.

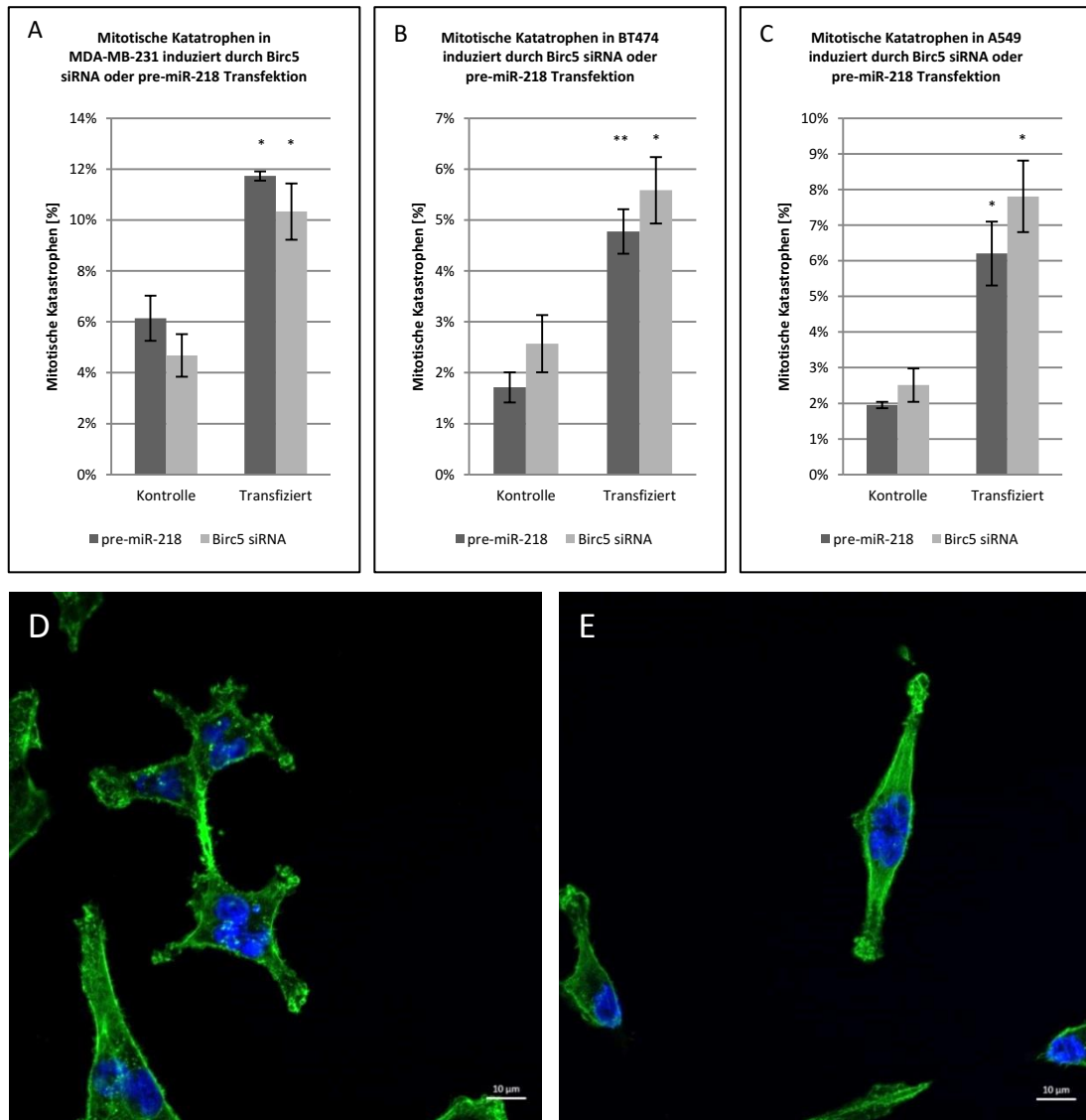


Abbildung 22: Eine transiente Überexpression von miR-218 führt zu einer Zunahme mitotischer Katastrophen. Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigt, dass miR-218 eine Erhöhung von mitotischen Katastrophen (D ■ DAPI, ■ Phalloidin-Alexa488) induziert. In MDA-MB-231 stieg der Anteil mitotischer Katastrophen um 5,59% (A ■), in BT474 um 3,07% (B ■) und in A549 um 4,26% (C ■). Durch einen transienten Birc5 *Knock Down* konnte dieser Phänotyp ebenfalls induziert werden (E ■ DAPI, ■ Phalloidin-Alexa488) und führte in MDA-MB-231 zu 5,66% mehr mitotischen Katastrophen (A ■), in BT474 zu 3,02% (B ■) und in A549 5,30% (C ■). (Repräsentative Abbildung in D und E, n=3, *p<0,05, **p<0,01)

3.3.4 Einfluss der pre-miR-218 Transfektion auf die Invasivität in MDA-MB-231 Zellen

Der in 3.3.2 gezeigte Einfluss von miR-218 auf die Zellmotilität von MDA-MB-231 Zellen gab den Grund zur Annahme, dass damit einhergehend auch die Invasivität dieser als sehr aggressiv bekannten Zelllinie vermindert wird. [50] Verglichen mit den mit Kontroll-pre-miR (Abb. 23 B) behandelten Zellen, war die Invasivität der mit pre-miR-218 (Abb. 23 C) transfizierten Zellen signifikant um 32% vermindert (Abb. 23 A).

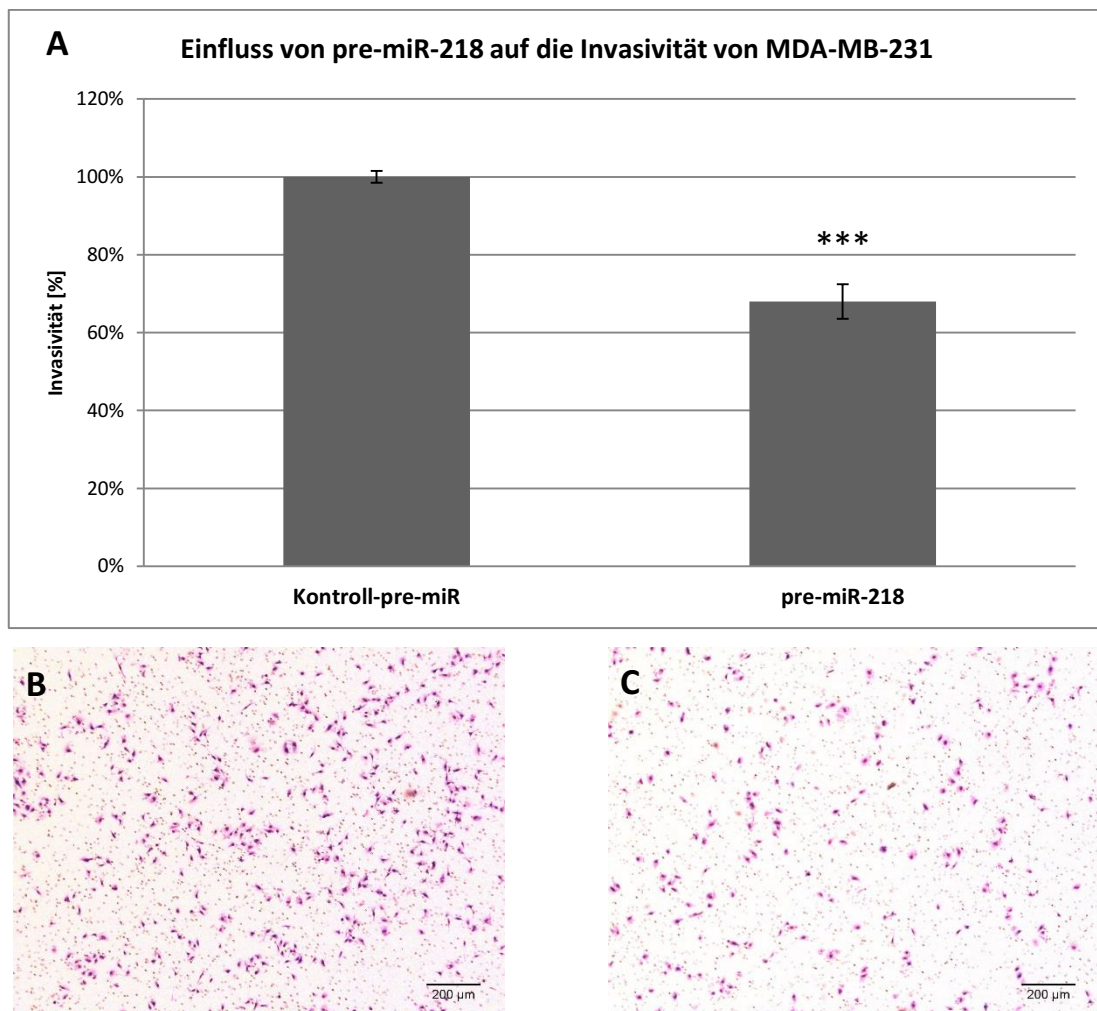


Abbildung 23: miR-218 vermindert die Aggressivität von MDA-MB-231 Zellen. Der Invasions-Assay zeigt, dass miR-218 (C) die Fähigkeit von MDA-MB-231 zur Invasion signifikant auf 68% (A) gegenüber der Kontrolle (B) vermindert. Der Test wurde in Kooperation mit dem Forschungslabor der Klinik für Frauenheilkunde des UKM durchgeführt. (Repräsentative Abbildung in B und C, n=3, ***p<0,001)

3.4 Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Reifung von mikro-RNAs und den daran beteiligten molekularen Bestandteilen

3.4.1 Micro-Array Analyse zur Identifikation radiosensitiver miRs

BT474 Zellen wurden 72h nach einem transienten EGFR *Knock Down*, dessen Effizienz im Vorfeld mittels qRT-PCR überprüft wurde, mit 2Gy bestrahlt und 4h nach Bestrahlung für die Isolierung von miRs lysiert. Die aufgereinigten Lysate wurden anschließend der Firma Exiqon in Dänemark übergeben, die die micro-Array Analyse durchführte. Es wurden insgesamt vier Proben analysiert. Dies waren jeweils die unbestrahlten Kontrollen der Kontroll siRNA und EGFR siRNA Behandlung, sowie die mit 2Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Proben von Kontroll siRNA und EGFR siRNA Behandlung. Da vermutet wird, dass EGFR eine Schlüsselkompetenz bei der Strahlenantwort auf miR-Ebene besitzt, wurden die Proben mit transientem EGFR *Knock Down* generiert. Abbildung 24 zeigt in der *Heat Map* Darstellung die 50 miRs, die die größten Unterschiede zueinander aufwiesen.

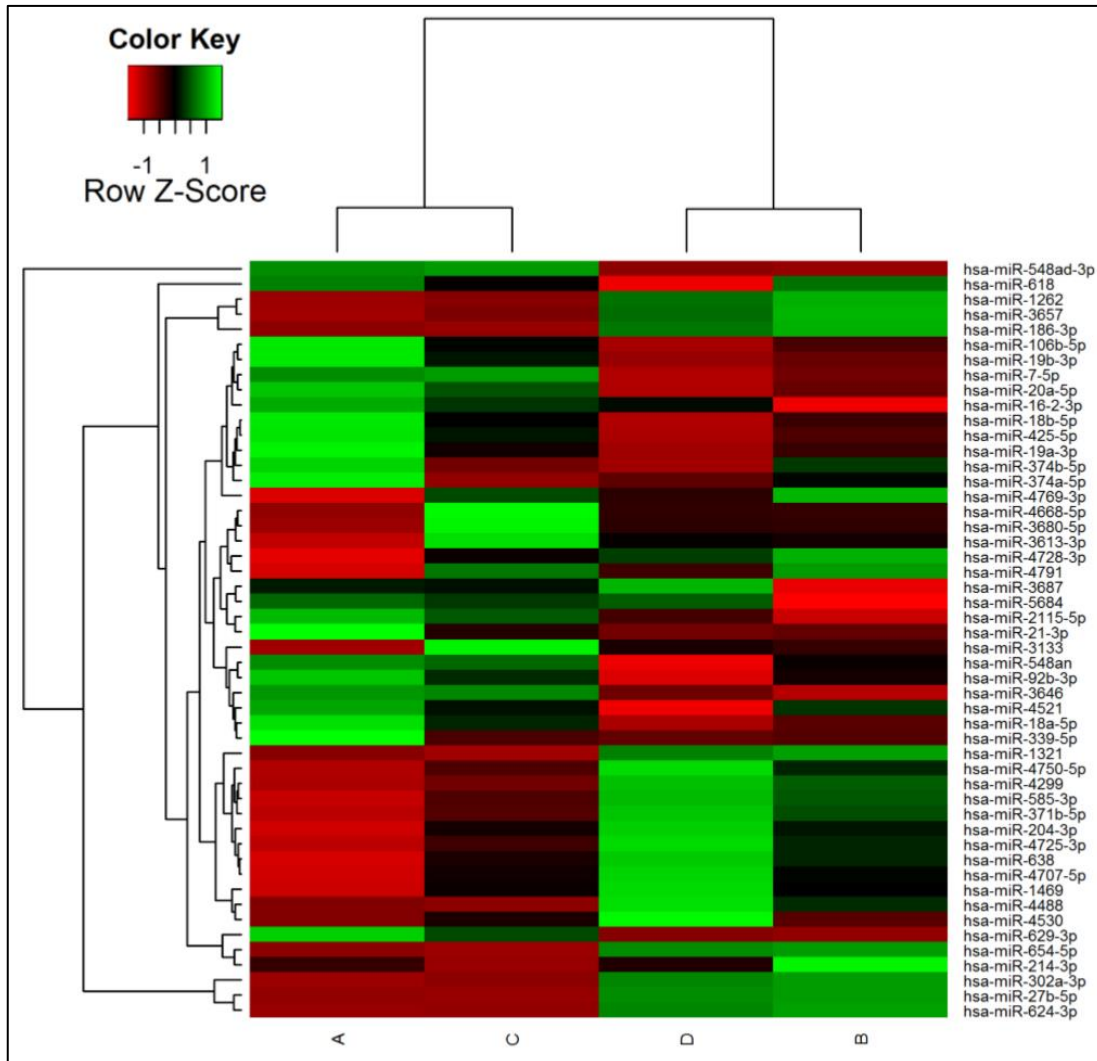


Abbildung 24: Die *Heat Map* Darstellung der micro-Array Analyse, durchgeführt von der Firma Exiqun, zeigt die 50 miRNAs, die zueinander die größten Veränderungen in allen Proben aufwiesen. Die Proben der Gruppe A wurden nicht bestrahlt, aber mit Kontroll siRNA transfiziert. Mit EGFR siRNA wurden die Proben der Gruppe B behandelt. Gruppe B wurde ebenfalls nicht bestrahlt. Die Proben der Gruppe C wurden mit 2Gy bestrahlt und zuvor mit Kontroll siRNA transfiziert. Proben der Gruppe D wurde mit EGFR siRNA behandelt und mit 2Gy bestrahlt. (Ergebnis einer micro-Array Analyse, n=1; Validierung erfolgt in 3.4.1.1-3.4.1.4)

Eine manuelle Auswertung aller Daten ergab, dass die miRNAs miR-19a, miR-15a, miR-21, miR-101 und miR-106b die höchste Radiosensitivität in Form einer Herunterregulierung aufwiesen und gleichzeitig diesen Effekt der Radiosensitivität nicht zeigten, sobald EGFR

per transientem *Knock Down* herunterreguliert war. Der micro-Array Analyse vorausgegangene Versuche zeigten für die miRs miR-100 und miR-218 die gleichen Ergebnisse.

Eine Validierung dieser Ergebnisse (3.4.1.1-3.4.1.4) erfolgte in weiteren biologischen Replikaten dieses Versuchsaufbaus. Die einzelnen miRs wurden mittels qRT-PCR validiert. Anschließend wurde überprüft, ob diese Effekte in der Bronchialkarzinomzelllinie A549 ebenfalls messbar waren.

3.4.1.1 Veränderung der miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach 2Gy Bestrahlung mit und ohne transientem EGFR *Knock Down* in BT474 Zellen

Der Versuchsaufbau entsprach dem von 3.4.1. Die Analyse erfolgte mittels qRT-PCR. In der Ergebnisdarstellung wurden die *fold change* Werte der bestrahlten Proben jeweils mit Kontroll siRNA oder mit EGFR siRNA behandelt, in Relation zu ihren unbestrahlten Kontrollen gesetzt und der veränderte Anteil an miRs prozentual dargestellt. So wurde sichergestellt, dass nur der Strahleneffekt betrachtet wurde.

Sowohl die fünf in der micro-Array-Analyse ermittelten miRs, als auch die miR-100 und miR-218 zeigten eine Abnahme 4h nach 2Gy Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (Abb. 25 ■). Im Einzelnen verringerte sich die Menge an miR-15a um 47%, miR-19a um 30%, miR-21 um 42%. miR-100 um 27%, miR-101 um 57%, miR-106b um 43% und miR-218 um 42%. Die Zellen, die 72h vor Bestrahlung mit EGFR siRNA behandelt wurden, zeigten keinen solchen Effekt (Abb. 25 ■). Sie schwankten bis zu 10% um das Niveau ihrer ebenfalls mit EGFR siRNA behandelten unbestrahlten Kontrollen. Es konnte gezeigt werden, dass in BT474 4h nach 2Gy Röntgenstrahlung, die miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 strahlenreguliert sind und diese Strahlenregulierung vermutlich EGFR abhängig ist.

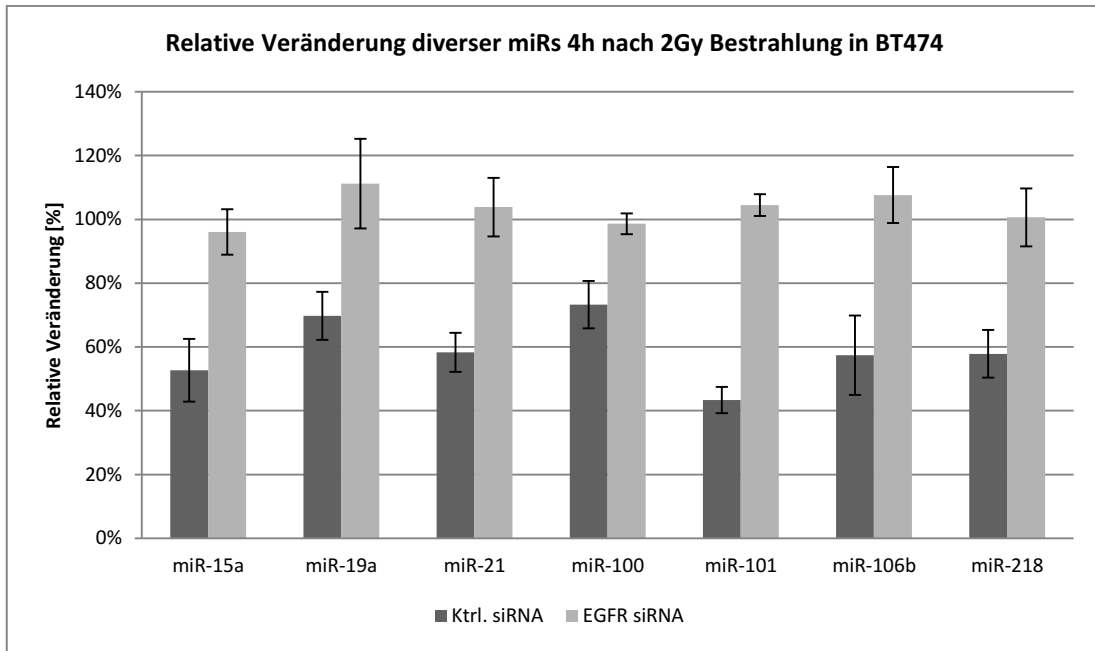


Abbildung 25: Ionisierende Strahlung verändert die Expression bestimmter miRs. Mittels qRT-PCR wurden die miRs miR-19a, miR-15a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 in BT474 Zellen 4h nach einer 2Gy Bestrahlung quantifiziert. Die micro-Array Daten konnten hierdurch bestätigt werden. Die Kontroll siRNA behandelten Proben zeigten nach 2Gy eine Abnahme der getesteten miRs (■). Bei transientem EGFR *Knock Down* (□) konnte keine strahleninduzierte Reduktion nachgewiesen werden. (n=3)

3.4.1.2 Veränderung der miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach 5Gy Bestrahlung mit und ohne transientem EGFR *Knock Down* in BT474 Zellen

Analog zu 3.4.1.1 wurden die Effekte der Radiosensitivität der oben genannten miRs für die Dosis von 5Gy untersucht.

Die Bestrahlung mit einer Dosis von 5Gy führt nach 4h in BT474 ebenfalls zum Rückgang der miRs miR-19a, miR-15a, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 (Abb. 26 ■). Eine Ausnahme bildete die miR-21. Sie zeigte keinen solchen Effekt. Statistisch signifikant war allerdings nur der Wert für miR-218. Im Einzelnen werden miR-15a auf 75%, miR-19a auf 91%, miR-21 auf 104%, miR-100 auf 84%, miR-101 auf 86%, miR-106b auf

63% und miR-218 auf 68% ihrer jeweiligen unbestrahlten Kontrollen herunter, bzw. herauf reguliert. Die Proben mit einem transienten EGFR *Knock Down* unterzogen worden ist, zeigten keinen Rückgang 4h nach 5Gy Bestrahlung (Abb. 26 ■). Entweder schwankten sie wie bei miR-15a und miR-218 um ihr Ausgangsniveau oder wurden wie miR-101 um 10%, miR-21 und miR-106b um 20%, miR19a um 30% oder miR-100 um 40% herauf reguliert. Der Unterschied zwischen Behandlung mit Kontroll siRNA oder EGFR siRNA war nur für miR-218 signifikant.

Diese Untersuchung zeigte, dass die miRs miR-19a, miR-15a, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 auch für eine Dosis von 5Gy 4h nach Bestrahlung strahlensensitiv mit einem Rückgang in der Expression reagieren. Der Effekt trat bei transientem EGFR *Knock Down* nicht auf.

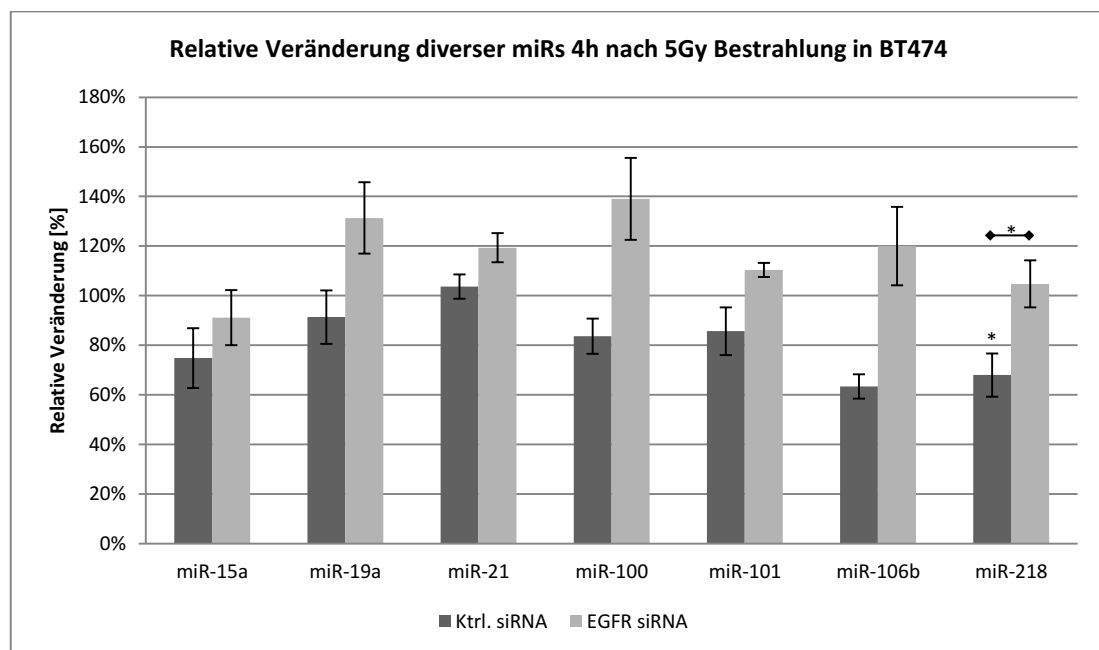


Abbildung 26: Ionisierende Strahlung nimmt Einfluss auf den miR-Metabolismus. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten für die miRs miR-19a, miR-15a, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 eine Radiosensitivität in Form einer Herunterregulation 4h nach 5Gy Bestrahlung (■) in BT474 Zellen. Die miR-21 zeigt diesen Effekt nicht. Der transiente *Knock Down* von EGFR verhindert die miR Abnahme nach Bestrahlung (□). (n=3, * p<0,05)

3.4.1.3 Veränderung der miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach 2Gy Bestrahlung mit und ohne transientem EGFR *Knock Down* in A549 Zellen

Dieser Versuch soll zeigen, ob die Ergebnisse der Strahleneffekte auf miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 in der Zelllinie BT474 des Mammakarzinoms auch auf andere Tumorentitäten extrapoliert werden können. Dazu wurden dieselben Versuchsparameter auf die Zelllinie des Lungenkarzinoms A549 angewandt und dieselben miRs mittels qRT-PCR untersucht.

Die untersuchten miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 zeigten eine Herunterregulierung 4h nach einer Bestrahlung mit 2Gy (Abb. 27 ■). Diese Strahlenantwort war für miR-100 signifikant. Im Einzelnen verringerte sich die miR-15a um 14%, miR-19a um 27%, miR-21 um 10%, miR-100 um 13%, miR-101 um 16%, miR-106b um 10% und miR-218 um 15%. Proben, die 72h zuvor mit EGFR siRNA (Abb. 27 ■) behandelt wurden, zeigten diesen Effekt des miR Rückganges nicht. Entweder schwankten sie um ca. 10% um ihr Ursprungsniveau der unbestrahlten Kontrolle oder zeigten einen Anstieg wie miR-15a um 21% und miR-106b um 36%.

Die Unterschiede zwischen Zellen die mit Kontroll siRNA oder EGFR siRNA behandelt wurden, waren nur für miR-100 signifikant.

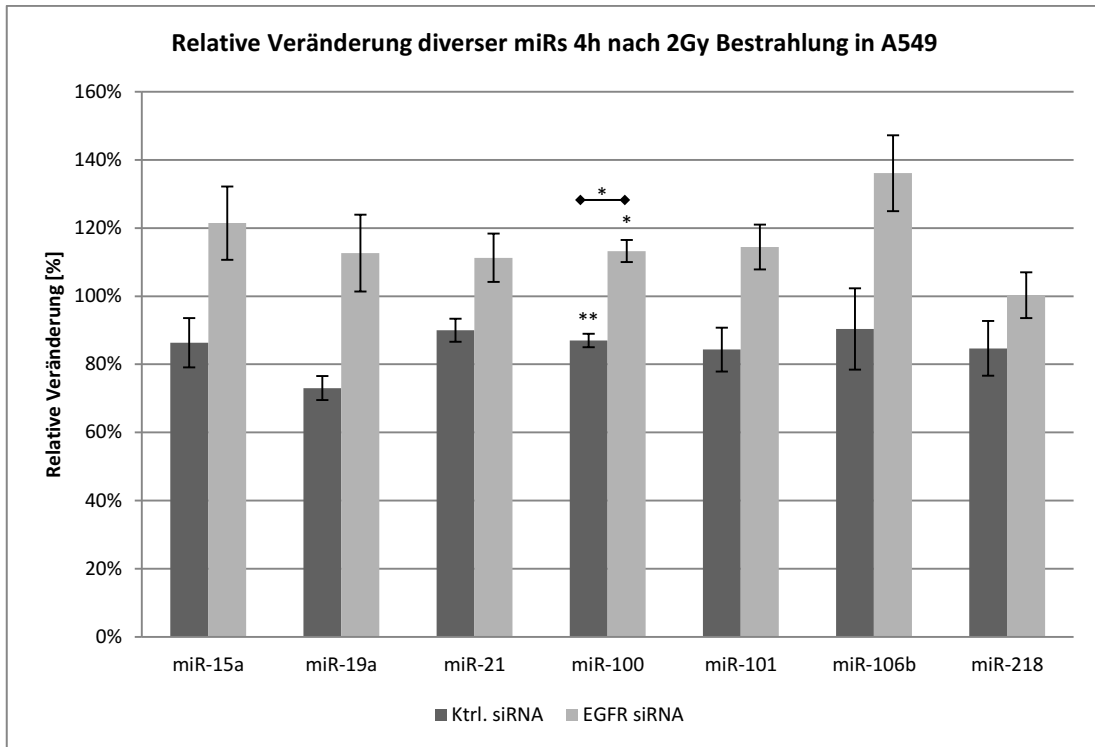


Abbildung 27: Die Exposition von ionisierender Strahlung veränderte die Reifung bestimmter miRs. Mittels qRT-PCR wurden die Veränderungen von miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 in A549 Zellen 4h nach einer Bestrahlung mit 2Gy untersucht. Zellen die mit Ktrl siRNA (■) 72h zuvor transfiziert wurden zeigten einen Rückgang der oben genannten miRs. Eine Transfektion mit EGFR siRNA (□) 72h vor Bestrahlung, inhibierte diesen Rückgang und führte im Fall von miR-15a und miR-106b zu einem deutlichen Anstieg. (n=3, *p<0,05, **p<0,01)

3.4.1.4 Veränderung der miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach 5Gy Bestrahlung mit und ohne transientem EGFR Knock Down in A549 Zellen

Wie in Versuch 3.4.1.3 gezeigt werden konnte, wiesen die miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 in A549 Zellen ebenfalls ein strahlensensitives Verhalten für eine Dosis von 2Gy Röntgenstrahlung auf. Es soll nun untersucht werden, ob dieser Effekt der Radiosensitivität bei einer Dosis von 5Gy auftritt.

Die Radiosensitivität in Form einer Herunterregulierung der miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 konnte ebenfalls für eine Dosis von 5 Gy 4h nach Bestrahlung beobachtet werden (Abb. 28 ■). Für miR-100 war die Veränderung statistisch signifikant. Im Einzelnen verringerte sich miR-15a auf 81%, miR-19a auf 89%, miR-21 auf 93%, miR-100 auf 80%, miR-101 auf 82%, miR-106b auf 89% und miR-218 auf 76%. Wurde allerdings EGFR einem transienten *Knock Down* 72h vor Bestrahlung unterzogen, so trat der Effekt der Herunterregulierung der entsprechenden miRs nicht auf (Abb. 28 ■). Mit Ausnahme von miR-15a, die eine Hochregulation um 16% zeigte, schwankten alle anderen miRs ca. um 10% um ihr Ursprungsniveau. Der Unterschied zwischen der Transfektion mit Kontroll siRNA und EGFR siRNA war für miR-218 signifikant.

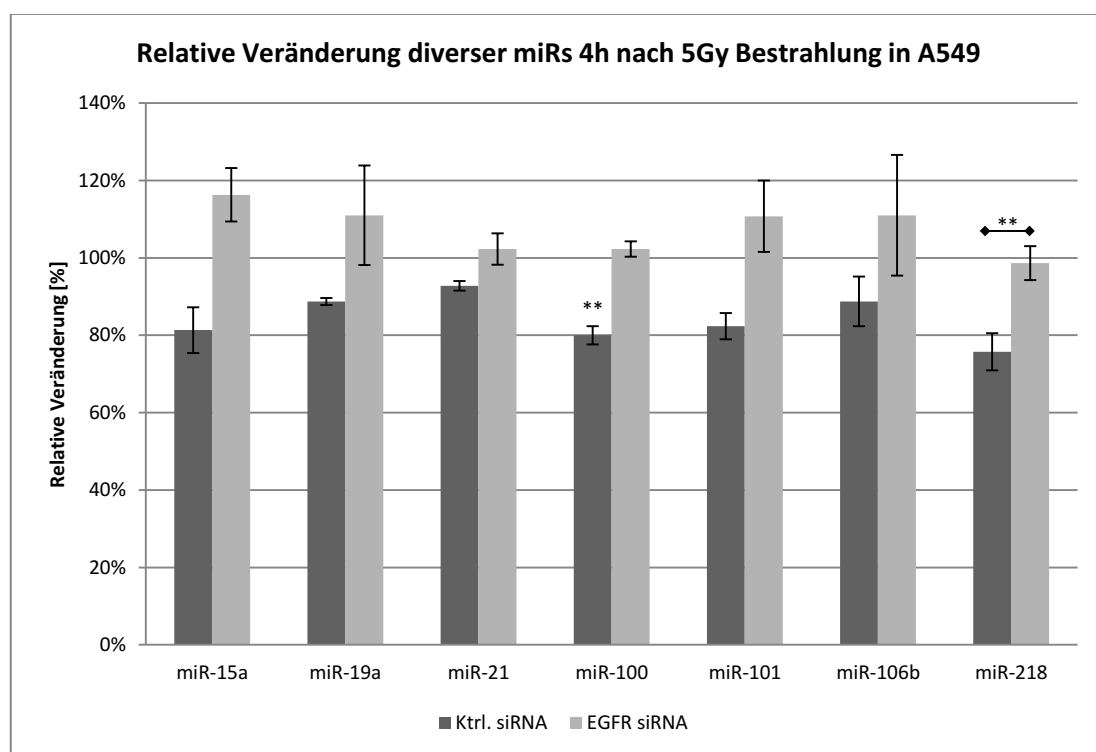


Abbildung 28: Die miR Expression wurde durch ionisierende Strahlung verändert. Durch qRT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass in A549 Zellen die miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach einer Bestrahlung mit 5Gy herunterreguliert wurden (■). Proben mit EGFR siRNA (■) Behandlung wurden durch die Bestrahlung nicht negativ reguliert. (n=3, **p<0,01)

3.4.2 Einfluss von Tyrosinkinaseinhibition und der Inhibition der Endozytose auf die strahlenabhängige miR-218 Reifung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass bestimmte miRs in BT474 und A549 Zellen durch Bestrahlung mit 2Gy oder 5Gy eine negative Regulierung aufwiesen, wurde als nächstes untersucht, welchem Mechanismus diese Strahlenantwort unterliegt. Da Zellen nach transientem *Knock Down* von EGFR eine Hemmung der miR Reifung nicht zeigten, wäre es möglich, dass EGFR in diesen Mechanismus involviert ist. EGFR ist ein Transmembranprotein und wird durch Bestrahlung internalisiert und aktiviert. [93; 34] Mit Hilfe des Endozytoseinhibitors Cytochalasin D lässt sich dieser Prozess der Internalisierung unterbinden. Ein weiterer Angriffspunkt stellt die Tyrosinkinasefunktion von EGFR dar, bei der Informationen durch die Phosphorylierung von *second messenger* Proteinen weitergeleitet werden. Daher wurde die Tyrosinkinaseaktivität durch den Tyrosinkinaseinhibitor Tyrphostin gehemmt. Die Behandlung wurde 30min vor der Bestrahlung wie in 2.2.8 beschrieben durchgeführt. Wie in den Versuchen zuvor (3.4.1-3.4.1.4) wurden die Zellen 4h nach Bestrahlung mit Hilfe der qRT-PCR Analyse bezüglich der miR-218 Reifung charakterisiert.

3.4.2.1 Einfluss von Tyrosinkinaseinhibition und der Inhibition der Endozytose auf die strahlenabhängige miR-218 Reifung in BT474 Zellen

Die DMSO-Methanol-Kontrollen zeigten für die 2Gy Dosis einen Rückgang von miR-218 von 36% und für die 5Gy Dosis einen Rückgang von 37% jeweils 4h nach Bestrahlung (Abb. 29 ■). Beide Werte sind statistisch signifikant. Wurden die Endozytose mit Cytochalasin D (Abb. 29 ■) oder die Tyrosinkinasen mit Tyrphostin (Abb. 29 ■) inhibiert, trat kein Rückgang von miR-218 4h nach Bestrahlung mit 2Gy oder 5Gy Röntgenstrahlung auf.

Mit Ausnahme der Probe „5Gy, Cytochalasin D“ (Abb. 29 ■), die mit einer Zunahme von 46% auf die Bestrahlung reagierte, schwankte die Veränderung um ca. 10% um ihr Ursprungsniveau.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Prozesse von Endozytose und die Aktivierung von Tyrosinkinase essentielle zellphysiologische Prozesse sind, die zum Rückgang von miR-218 und vermutlich weiteren miRs nach Bestrahlung in BT474 Zellen führen.

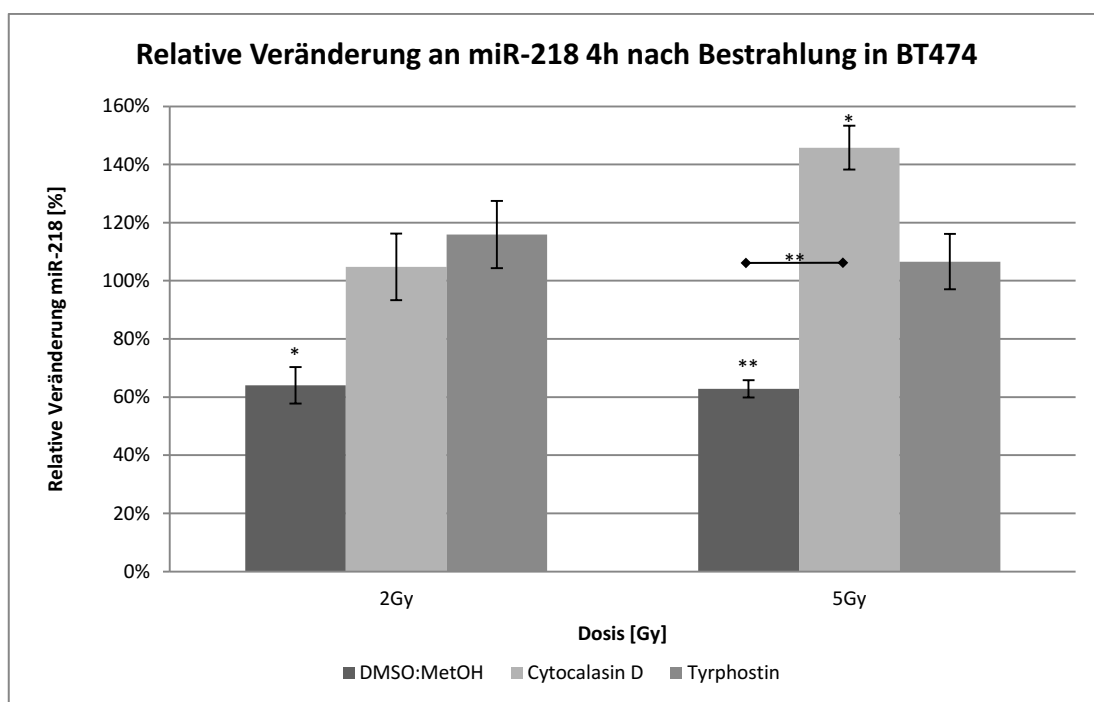


Abbildung 29: Endozytose und die Funktionalität von Tyrosinkinase sind essentiell für den Einfluss von ionisierender Strahlung auf miRs. In BT474 führte die Inhibition der Endozytose oder der Tyrosinkinase dazu, dass die typische Strahlenantwort ausblieb. Es trat also kein Rückgang von miR-218 4h nach Bestrahlung in den mit Cytochalasin D (■) oder mit Tyrphostin (■) behandelten Proben ein. Die entsprechenden DMSO-Methanol-Kontrollen zeigten diesen Rückgang für miR-218 (■). (n=3, *p<0,05, **p<0,01)

3.4.2.2 Einfluss von Tyrosinkinaseinhibition und der Inhibition der Endozytose auf die strahlenabhängige miR-218 Reifung in A549 Zellen

Analog zu 3.4.2.1 wurde der Einfluss der Inhibition der Endozytose oder der Tyrosinkinasen auf die strahlenabhängige Reifung der miR-218 an der Lungenkarzinomzelllinie A549 untersucht.

Die DMSO-Methanol-Kontrollen für die Dosen von 2Gy und 5Gy zeigten einen Rückgang der miR-218 4h nach Bestrahlung (Abb. 30 ■). Der Rückgang von miR-218 bei einer Dosis von 2Gy um 24,5% war im Gegensatz zum Rückgang um 13,5% bei einer Dosis von 5Gy signifikant. Wurden die Endozytose mit Cytochalasin D (Abb. 30 ■) oder die Tyrosinkinasen mit Tyrphostin (Abb. 30 ■) inhibiert, konnte bei keiner der beiden applizierten Dosen ein Rückgang von miR-218 4h nach Bestrahlung beobachtet werden. Verglichen mit der jeweiligen DMSO-Methanol-Kontrolle war dieser Effekt allerdings nur bei den Versuchen der 2Gy Dosis statistisch signifikant.

Damit ist auch für die Zelllinie A549 gezeigt, dass es unter der Inhibition der Endozytose oder der Inhibition von Tyrosinkinasen nicht zum Rückgang von miR-218 4h nach Bestrahlung als Strahlenantwort kommt.

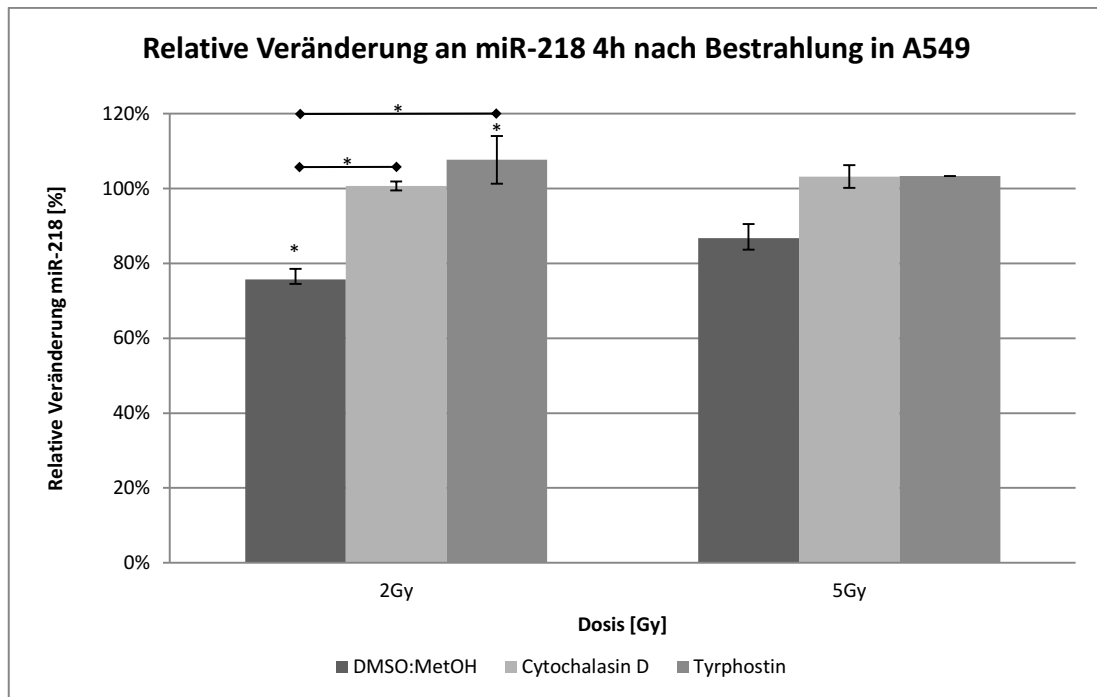


Abbildung 30: Ionisierende Strahlung veränderte die miR Expression nur, wenn Endozytose und Tyrosinkinase in ihrer Funktion nicht eingeschränkt sind. Die Inhibition von Endozytose mit Cytochalasin D (■) oder von Tyrosinkinase mit Tyrphostin (■) verhinderte den Rückgang von miR-218 4h nach Bestrahlung in A549 Zellen. Die DMSO-Methanol-Kontrollen (■) verhielten sich wie erwartet und zeigten einen Rückgang von miR-218. (n=3, *p<0,05)

3.4.3 Strahleninduzierte Argonaut2 Phosphorylierung in BT474 und A549

Die Versuche 3.4.1 bis 3.4.2.2 zeigten, dass bestimmte miRs mit einem Rückgang auf ionisierende Strahlung reagierten. Da diese Strahlenantwort zum Zeitpunkt 4h nach Bestrahlung den größten Effekt zeigte, erfolgt diese Regulation vermutlich auf Proteinebene und nicht auf Ebene der Genregulation, da diese vermutlich sehr viel länger dauern würde. Analog zu den Arbeiten von Shen et al. [124], die eine Phosphorylierung von AGO2 und verringerte miR Reifung durch Hypoxie im Cervixkarzinom zeigte, ist anzunehmen, dass der durch ionisierende Strahlung induzierte Zellstress einen ähnlichen Zustand hervorruft.

Dazu wurden die Zelllinien BT474 und A549 in T25 Zellkulturflaschen kultiviert und sobald sie eine Konfluenz von ca. 85% aufwiesen mit 2Gy bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Zellen für die Western Blot Analyse zu den Zeitpunkten 10min, 20min, 30min, 1h, 2h, 3h und 4h nach Bestrahlung lysiert und auf eine Phosphorylierung von AGO2 an Position Tyrosin-393 untersucht.

Die Zelllinie BT474 zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung in der Expression von AGO2 durch die Bestrahlung mit 2Gy (Abb. 31 A). Die unbestrahlte Kontrolle zeigte eine leichte Phosphorylierung von AGO2. Eine Zunahme von p-AGO2 konnte für die Zeitpunkte 1h und 2h nach Bestrahlung beobachtet werden. Vor und nach diesen Zeitpunkten zeigte das p-AGO2 Signal die gleiche Intensität wie die unbestrahlte Kontrolle. Grundsätzlich zeigte der Antikörper gegen p-AGO2 in der Zelllinie BT474 eine Doppelbande für AGO2 bzw. für p-AGO2. Diese zusätzliche Bande resultiert möglicherweise aus einer posttranslationalen Modifizierung, [144] hat aber für die Auswertung des p-AGO2 Signals keine Bedeutung.

In der Zelllinie A549 wurde AGO2 in seiner Expression ebenfalls durch die Bestrahlung mit 2Gy nicht verändert (Abb. 31 B), während das Signal für p-AGO2 1h nach der Bestrahlung am größten war und sich deutlich von der geringeren Phosphorylierung zu den anderen Zeitpunkten abhob. Bis auf den 1h-Wert, zeigten alle anderen Zeitpunkte das Niveau der unbestrahlten Kontrolle.

Damit bleibt festzuhalten, dass eine Bestrahlung mit 2Gy ultraharter Röntgenstrahlung analog zu den Experimenten von Shen et al. aus dem Jahre 2013 an Hypoxie, zu einer Phosphorylierung von AGO2 an Tyrosin-393 in BT474 und A549 Zellen führte, mit einem Maximum nach 1h.

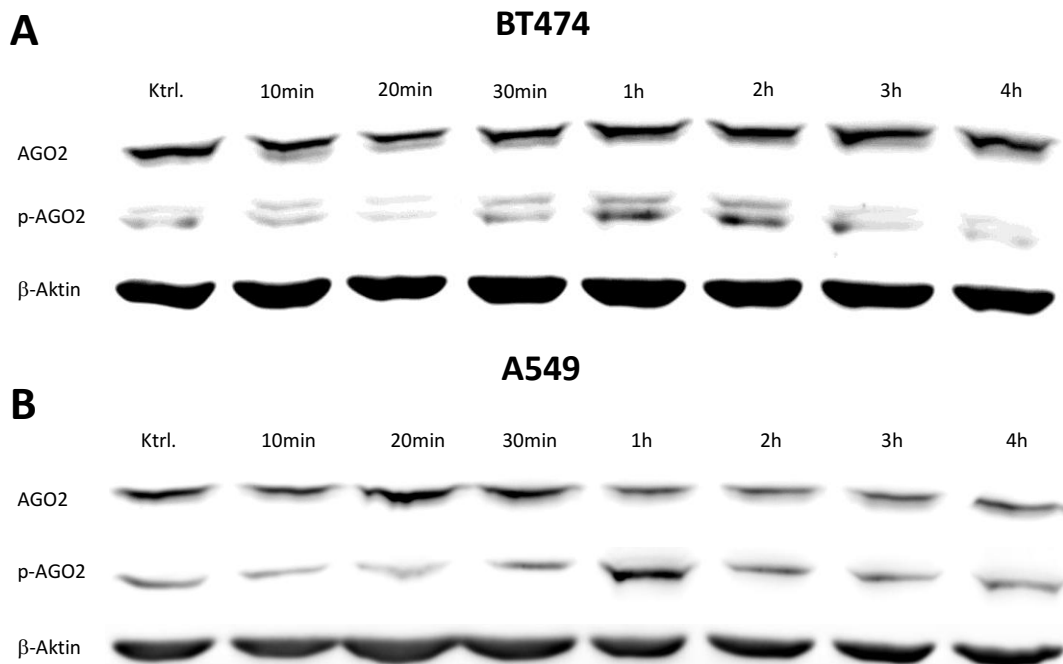


Abbildung 31: Ionisierende Strahlung verursachte eine Phosphorylierung von AGO2. Die Western Blot Analyse zeigte die Zunahme der Phosphorylierung von AGO2 in BT474 (A p-AGO2) und A549 (B p-AGO2) Zellen. Das Maximum war 1h nach einer 2Gy Bestrahlung mit ultraharter Röntgenstrahlung erreicht. In beiden Zelllinien hatte die Bestrahlung keinen Einfluss auf unphosphoryliertes AGO2. Die Subbande für p-AGO2 in der Zelllinie BT474 ist ohne Bedeutung und resultiert möglicherweise aus einer posttranslationalen Modifizierung. (Repräsentative Abbildung, n=5)

3.4.4 Strahleninduzierte EGFR Translokation

Die Experimente aus 3.4.3 zeigten eine Phosphorylierung von AGO2 durch ionisierende Strahlung an Position Tyrosin-393. Da bisher keine Kinase-Funktion für AGO2 beschrieben wurde, über welche die Phosphorylierung in Form einer Auto-Phosphorylierung erklärbar wäre, ist wahrscheinlich, dass AGO2 durch ein anderes Protein mit Kinase-Funktion phosphoryliert wird. Von EGFR ist bekannt, dass es Hypoxie-gesteuert AGO2 phosphoryliert. [124] Außerdem wurde die Internalisierung von EGFR infolge einer Bestrahlung bereits beschreiben, wodurch Zellen die Strahlenreaktion modulieren. [34]

Dieser Versuch sollte die strahlenvermittelte Translokation bestätigen und Auskunft darüber geben wo und wie diese Translokation in BT474 und A549 Zellen lokalisiert ist. Dazu wurden BT474 Zellen und A549 Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mit 2Gy bestrahlt. Nach 1h wurden die Zellen mit 4% PFA in PBS fixiert und gegen EGFR und EEA1, einem Marker-Protein für frühe Endozytose gefärbt, die Zellkerne mit DAPI. Proteine sind nicht in der Lage, frei von der Zellmembran ins Zytosol einzuwandern, sondern werden in Form von Endozytose internalisiert. Daher wurde der Marker für frühe Endosomen, EEA1, in die Untersuchungen einbezogen.

Die Ergebnispräsentation beginnt in diesem Experiment mit den A549 Zellen, da aufgrund ihrer Größe die Ergebnisse eindeutiger und besser zu beurteilen waren.

Die Verteilung von EGFR in unbestrahlten A549 Zellen war homogen und über den gesamten Zellkörper zu sehen (Abb. 32 A ■). Vereinzelt konnten einige frühe Endosomen nachgewiesen werden (Abb. 32 B ■). Einen Zusammenhang oder eine bestimmte Lokalisation zum Nukleus (Abb. 32 C ■) zwischen EGFR und frühen Endosomen war nicht zu erkennen (Abb. 32 C).

Deutlich verändert zeigte sich die EGFR Verteilung 1h nach 2Gy Bestrahlung. Es kam zu Akkumulationen von EGFR (Abb. 32 D ■ →), die die ganze Färbung heller erscheinen ließ. Die EGFR Akkumulationen waren Nukleus (Abb. 32 F ■) assoziiert. Außerdem erhöhte sich die Endozytose Aktivitäten der Zellen (Abb. 32 E ■). Die Darstellung im Mehrkanalbild (Abb. 32 F) zeigte, dass der größere Teil der Endosomen im Bereich der EGFR Akkumulationen zu finden war.

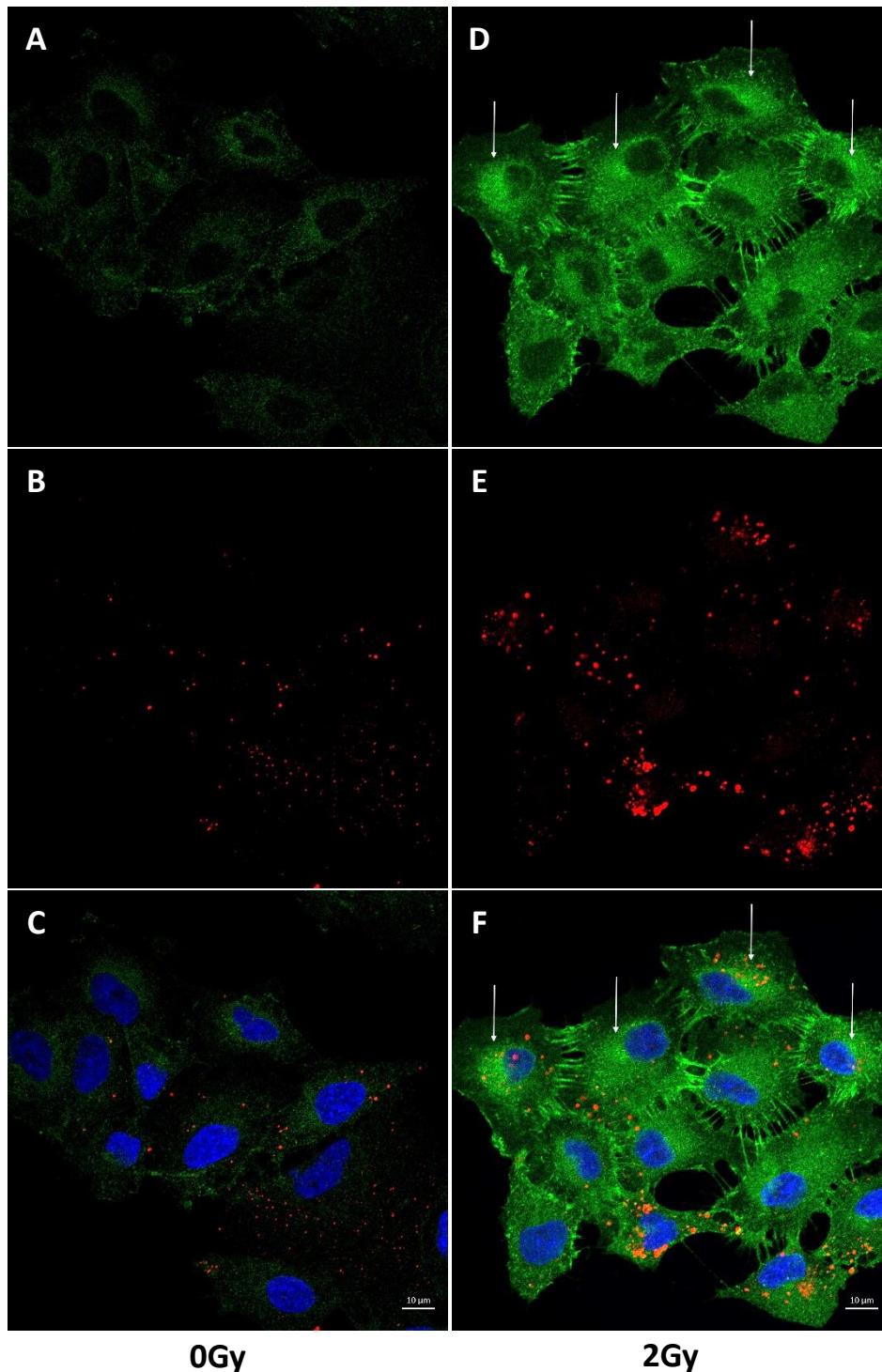


Abbildung 32: Ionisierende Strahlung führte zu einer EGFR Translokation und einer erhöhten Endozytose-Aktivität. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung von mit 2Gy bestrahlten und unbestrahlten A549 Zellen, zeigte eine homogene EGFR Verteilung in der unbestrahlten Kontrolle (A ■) sowie einzelne frühe Endosomen (B ■). Ein Zusammenhang oder besondere Lokalisation zum Nukleus (C ■) war nicht zu erkennen. Die mit 2Gy bestrahlten Zellen zeigten 1h nach Bestrahlung eine Nukleus assoziierte EGFR Akkumulation (D ■ →) und eine vermehrte Aufkommen früher Endosomen

(E ■), die vermehrt im Bereich der Nukleus ständigen EGFR Akkumulation lokalisiert waren (F ■). (Repräsentative Abbildung, n=5)

Deutlich schwieriger war diese Situation in BT474 Zellen zu beurteilen. Diese Zellen sind sehr klein und weisen nahezu kein Flächenwachstum auf, was die Deutung von Proteintranslokationen erschwerte.

In BT474 Zellen war EGFR in den unbestrahlten Kontrollen ebenfalls homogen über den ganzen Zellkörper verteilt (Abb. 33 A ■). Eine Akkumulation zeigte sich hier nicht. Die Färbung gegen EEA1 war bis auf einzelne Signale negativ (Abb. 33 B ■). Die BT474 zeigten nur eine sehr geringe Endozytose Aktivität. Das Mehrkanalbild verdeutlicht noch einmal das hier keine besonderen Verteilungsmuster zu erkennen waren (Abb. 33 C).

Hervorgerufen durch die 2Gy Bestrahlung konnte in den BT474 1h nach Bestrahlung ebenfalls eine EGFR Akkumulation beobachtet werden (Abb. 33 D ■ →). Im Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle nimmt die Endozytose-Aktivität stark zu (Abb. 33 E ■). Bei der Betrachtung des Mehrkanalbildes mit den DAPI gefärbten Nuklei (Abb. 33 F ■), fiel auch hier auf, dass die EGFR Akkumulationen Nukleus assoziiert waren und die meisten frühen Endosomen im Bereich dieser EGFR Akkumulationen zu finden waren.

Die beiden untersuchten Zelllinien, A549 und BT474 zeigten in allen biologischen Replikaten eine deutlich schwächere EGFR Färbung in den Kontroll-Präparaten als in den bestrahlten Proben. Da eine ungleiche Behandlung der Zellen während des Färbeprozesses auszuschließen war, musste untersucht werden, ob die bestrahlten Präparate, die heller und stärker gefärbt erschienen, tatsächlich deshalb mehr Fluoreszenz emittierten, weil die Bestrahlung eine Dimerisierung von zwei EGFR Molekülen induziert. Somit würden mehr Fluoreszenzmoleküle an einem Locus gebunden, was wiederum ein stärkeres Fluoreszenz-Signal erklären würde, als bei einer sehr breiten und homogenen Verteilung in unbestrahlten Zellen. Um diese These zu stützen wurde untersucht, ob ein

strahleninduzierter Einfluss auf die Gesamtmenge an EGFR auszuschließen ist.

Dazu wurden wie in 3.4.3 Proben 10min, 20min, 30min, 1h, 2h, 3h und 4h nach einer Bestrahlung von 2Gy für die Western Blot Analyse fixiert.

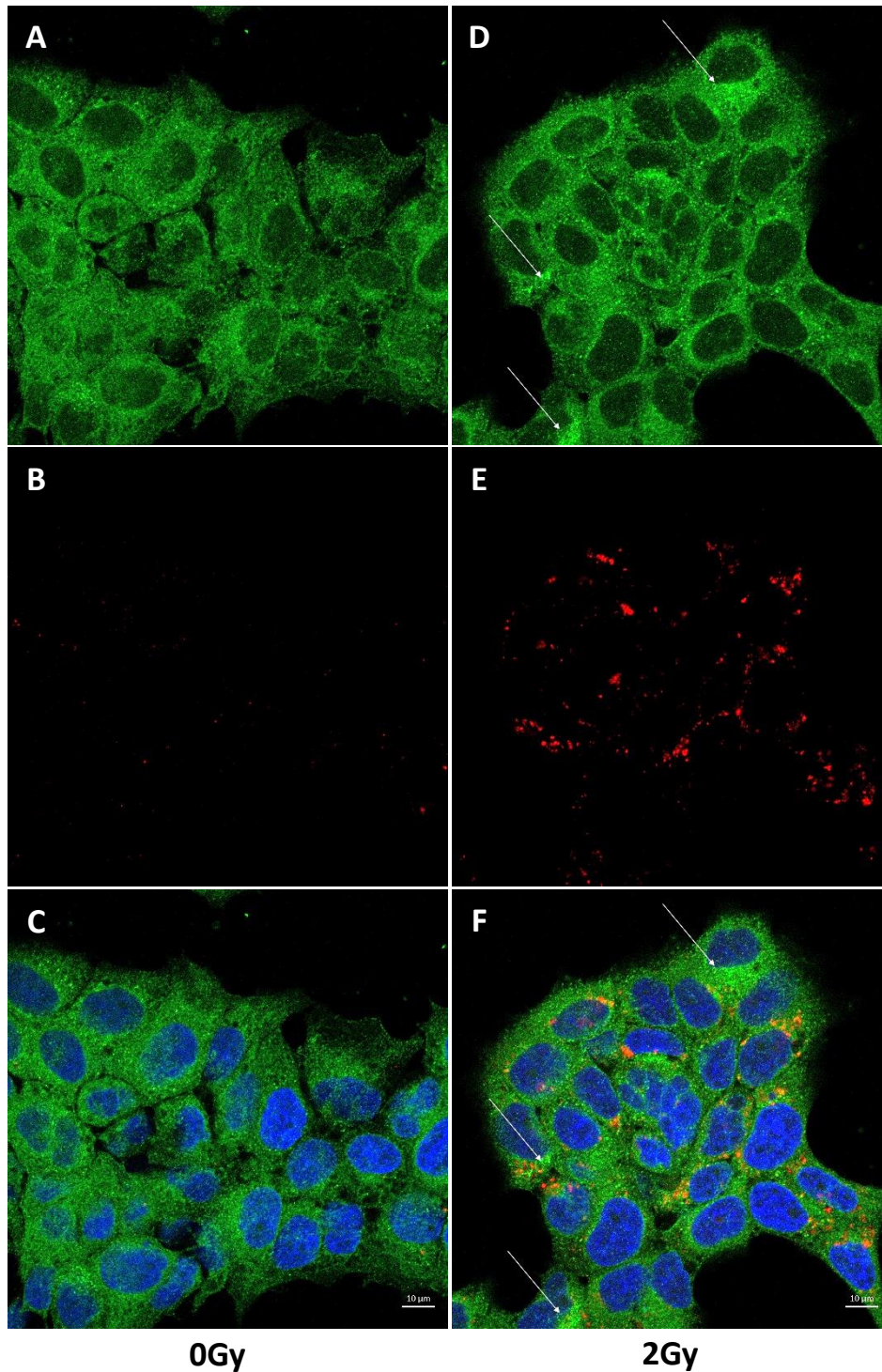


Abbildung 33: Eine Erhöhung der Endozytose-Aktivität und eine EGFR Translokation konnten nach der Exposition von ionisierender Strahlung beobachtet werden. Die konfokale fluoreszenzmikroskopische Analyse der Immunfluoreszenzfärbung von bestrahlten und unbestrahlten BT474 Zellen zeigte eine gleichmäßige EGFR Verteilung in den unbestrahlten Kontrollen (A ■), mit geringer Endozytose Aktivität (B ■). Die Darstellung im Mehrkanalbild mit den DAPI gefärbten Nuklei war unauffällig (C ■). BT474 Zellen die mit 2Gy bestrahlt wurden zeigten nach 1h eine Akkumulation von EGFR (D ■ →) nahe der Nuklei (F ■) und

eine starke Endozytose-Aktivität (E ■). Die Endosomen waren oft mit der EGFR Akkumulation co-lokalisiert. (Repräsentative Abbildung, n=5)

Abbildung 34 zeigt, dass die Bestrahlung mit 2Gy weder in A549 Zellen (Abb. 34 A), noch in BT474 Zellen (Abb. 34 B) Einfluss auf die Gesamtmenge von EGFR nahm. Zu allen untersuchten Zeitpunkten, 10min, 20min, 30min, 1h, 2h, 3h und 4h nach Bestrahlung entsprach die Intensität des jeweiligen Signals der unbestrahlten Kontrolle. Schwankungen in der Intensität waren stets äquivalent zum Signal von β -Aktin.

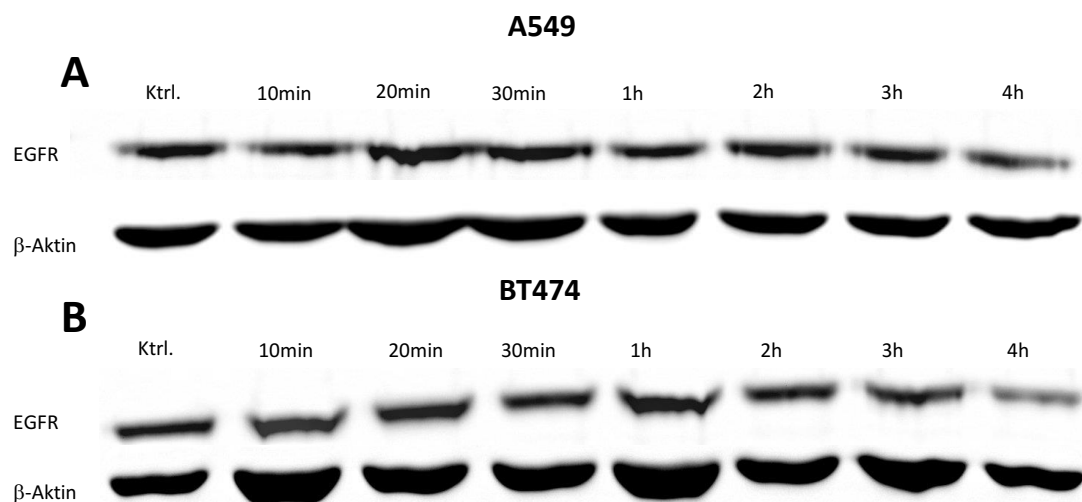


Abbildung 34: Eine Bestrahlung führte nicht zu einer EGFR Neubildung. Die Western Blot Analyse zeigte für keine der beiden Zelllinien, A549 (A) und BT474 (B), eine Veränderung der Gesamtmenge von EGFR nach einer Bestrahlung mit 2Gy. Bei allen gemessenen Zeitpunkten entsprach die relative Signalintensität der unbestrahlten Kontrolle. (Repräsentative Abbildung, n=3)

Dieser Versuch zeigte, dass die Bestrahlung von A549 Zellen und BT474 Zellen mit 2Gy nach 1h zur Translokation von EGFR führte. Dabei konnte beobachtet werden, dass die EGFR Moleküle sich Nukleus-ständig akkumulierten. Die Zunahme der Fluoreszenz resultiert vermutlich aus einer Rezeptor-Dimerisierung und nicht aus Protein-Neubildung. Begründet werden kann somit die Translokation von EGFR anhand der

vorliegenden Daten mit der Erhöhung der Endozytose Aktivität nach Bestrahlung.

3.4.5 Strahleninduzierte Phosphorylierung von EGFR-Tyr-1068 in A549

Da in 3.4.4 gezeigt wurde, dass EGFR nach Bestrahlung internalisiert wird und somit die Strahlenantwort der Zelle beeinflussen kann, ist der nächste Schritt der Nachweis der strahlenabhängigen Rezeptoraktivierung, da EGFR nur als aktivierte Tyrosin-Kinase in der Lage ist, weitere Proteine zu phosphorylieren (vgl. 1.2.1). Die EGFR Phosphorylierungsstelle an Position Tyrosin-1068 wird aktuell als diejenige beschrieben, die die deutlichsten Veränderungen nach Bestrahlung zeigt. [93]

Die Untersuchungen wurden mit demselben Probensatz wie in 3.4.4 durchgeführt.

Die Western Blot Analyse zeigte eine unveränderte Gesamtmenge von EGFR in A549 Zellen zu allen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (Abb. 34). Die Signalintensität glich dem der unbestrahlten Kontrolle. Das positive p-EGFR-Tyr-1068 Signal blieb während der ersten 10min nach 2Gy Bestrahlung unverändert, stieg aber nach 20min, 30min und 1h nach Bestrahlung an und erreichte zu den Zeitpunkten 2h, 3h und 4h wieder das Ausgangs-Niveau der unbestrahlten Kontrolle.

Die Zelllinie BT474 erwies sich für diese Untersuchung leider als ungeeignet. Der Grund dafür lag in der hohen EGFR Aktivierung im unbehandelten Grundzustand der Zellen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass BT474 Zellen mit 20% FCS und 0,1% Insulin kultiviert werden mussten. Selbst eine Stimulation mit EGF zeigte keine weitere Zunahme der EGFR Phosphorylierung an Position Tyrosin-1068. Eine Kultivierung in serumfreien und insulinfreien Mangel-Medium war nicht möglich.

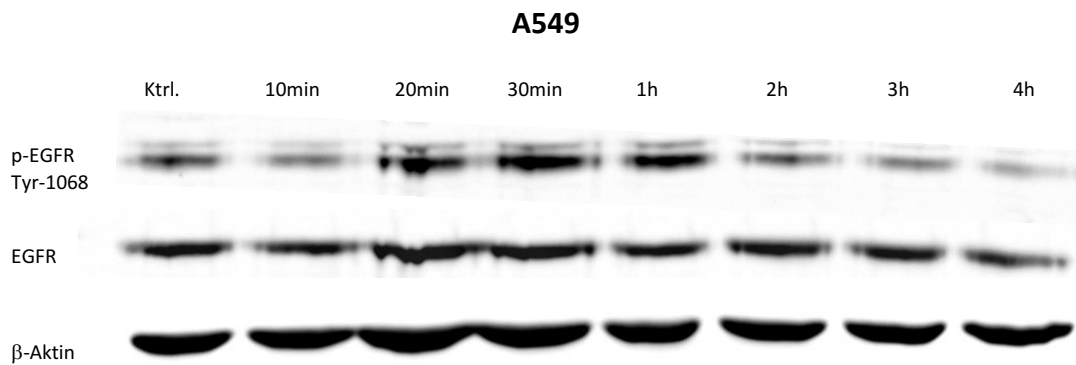


Abbildung 35: EGFR wurde nach einer Strahlenexposition phosphoryliert. Die Western Blot Analyse zeigt eine konstitutive Phosphorylierung von EGFR in A549 Zellen in der unbestrahlten Kontrolle an Position Tyrosin-1068. Zu den Zeitpunkten 20min, 30min und 1h nach einer Bestrahlung mit 2Gy ist eine Zunahme von p-EGFR-Tyr-1068 zu erkennen. Zu den Zeitpunkten davor und danach entspricht die Signalstärke der Kontrolle. (Repräsentative Abbildung, n=5)

Der Versuch zeigte, dass ionisierende Strahlung die Phosphorylierung von EGFR an Position Tyrosin-1068 in A549 Zellen induziert. Damit bestünde die Möglichkeit, dass EGFR nach Bestrahlung, analog zur Situation während Hypoxie, [124] mit AGO2 interagiert und phosphoryliert.

3.4.6 Co-Lokalisation von EGFR und p-AGO2 in A549 und BT474

Die Versuche 3.4.3-3.4.5 zeigten eine Phosphorylierung von EGFR und AGO2 durch ionisierende Strahlung. Für EGFR konnte zusätzlich die strahleninduzierte Internalisierung und Nukleus-assoziierte Akkumulation gezeigt werden. Daraus resultiert die Hypothese, dass EGFR als Effektor-Kinase und Zellstress-Reporter AGO2 im Zuge der zellulären Strahlenantwort phosphoryliert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sollen abschließend zeigen, dass EGFR und p-AGO2 nach Bestrahlung im Cytosol co-lokalisiert sind und dies die Hypothese stützt. Dazu wurden A549 Zellen und BT474 Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit 2Gy bestrahlt, nach 1h mit 4% PFA in PBS fixiert und auf EGFR und

p-AGO2 mit Antikörpern gefärbt. Zusätzlich wurde die DNA mit DAPI gefärbt.

A549 Zellen zeigten in der unbestrahlten Kontrolle vereinzelte positive Signale für p-AGO2 (Abb. 36 A ■). Die Mehrkanalaufnahme zeigte eine homogene EGFR Verteilung (Abb. 36 B ■) über den gesamten Zellkörper mit blauen Zellkernen nach einer DAPI-Färbung (Abb. 36 B ■).

Nach der Bestrahlung mit 2Gy nimmt das p-AGO2 Signal (Abb. 36 C ■) zum Zeitpunkt 1h nach Bestrahlung deutlich an Stärke zu. In der Mehrkanalaufnahme war die Nukleus assoziierte EGFR Translokation nach Bestrahlung gut zu erkennen (Abb. 36 D ■). Eine Betrachtung der bestrahlten Probe in einer höheren Vergrößerung zeigte, dass die Fluoreszenzsignale von EGFR und p-AGO2 sich überlagern und orange-gelblich erscheinen (Abb. 36 D □). Das deutet auf eine enge räumliche Nähe von EGFR und p-AGO2 zu diesem Zeitpunkt innerhalb des Cytosols hin.

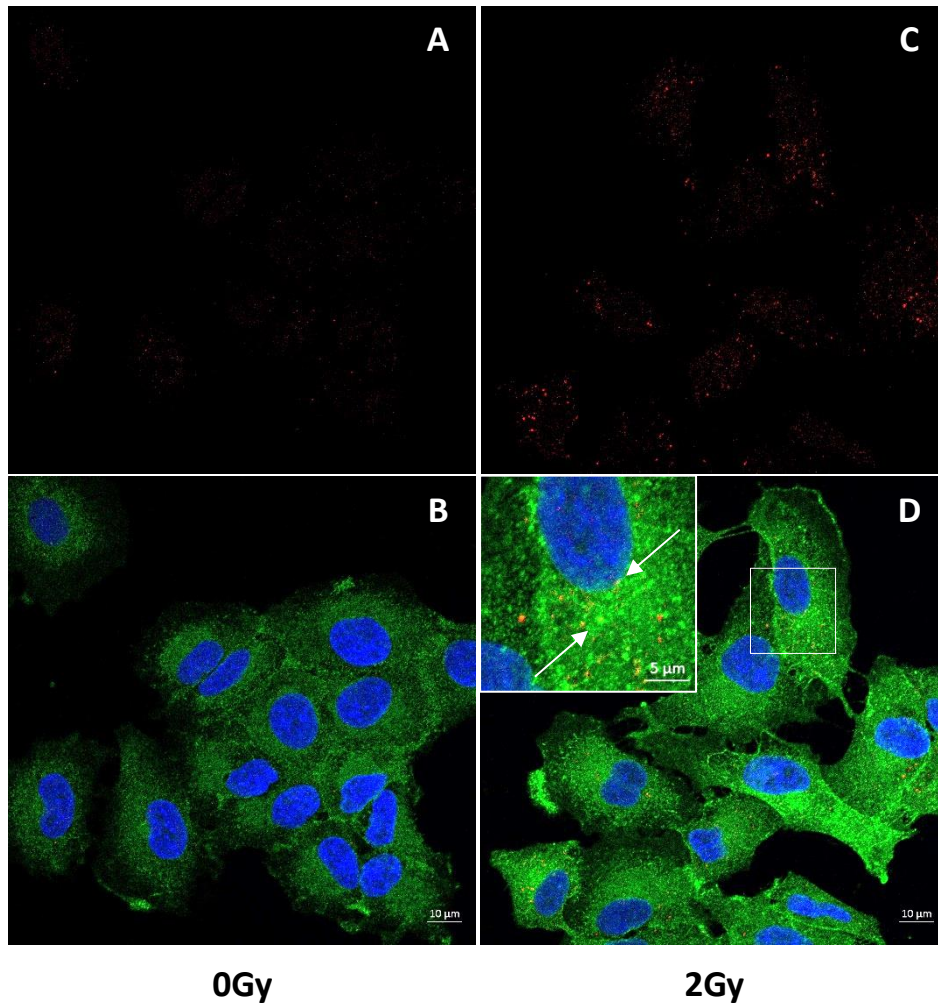


Abbildung 36: Eine Co-Lokalisation von EGFR und p-AGO2 ist eine Folge von Bestrahlung. In den konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von mit 2Gy bestrahlten und unbestrahlten A549 Zellen 1h nach Bestrahlung zeigte sich deutlich die Phosphorylierung von AGO2 (C ■). Die Nukleus (D ■) assoziierte EGFR (D ■) Translokation war ebenfalls zu sehen. Der vergrößerte Ausschnitt von Bild D (□) zeigt die Co-Lokalisation von EGFR (■) und p-AGO2 (■). Die unbestrahlte Kontrolle zeigte ein schwaches AGO2 Signal (A ■) und eine homogene EGFR Verteilung (B ■). (Repräsentative Abbildung, n=5)

Die unbestrahlte Kontrolle von BT474 Zellen zeigte eine leichte Phosphorylierung von AGO2 (Abb. 37 A ■). In der Mehrkanal Darstellung waren die Zellkerne (Abb. 37 B ■) und eine gleichmäßige Verteilung von EGFR (Abb. 37 B ■) zu erkennen.

1h nach einer Bestrahlung mit 2Gy konnte eine Zunahme des p-AGO2 (Abb. 37 C ■) Signals beobachtet werden. Ebenfalls zu erkennen waren die EGFR (Abb. 37 D ■) Akkumulation in räumlicher Nähe zum

Zellkern (Abb. 37 D ■). Eine Orange erscheinende Überlagerung des EGFR Signals und des p-AGO2 Signals, in einer höheren Vergrößerung, zeigte sich auch bei den BT474 Zellen (Abb. 37 D □).

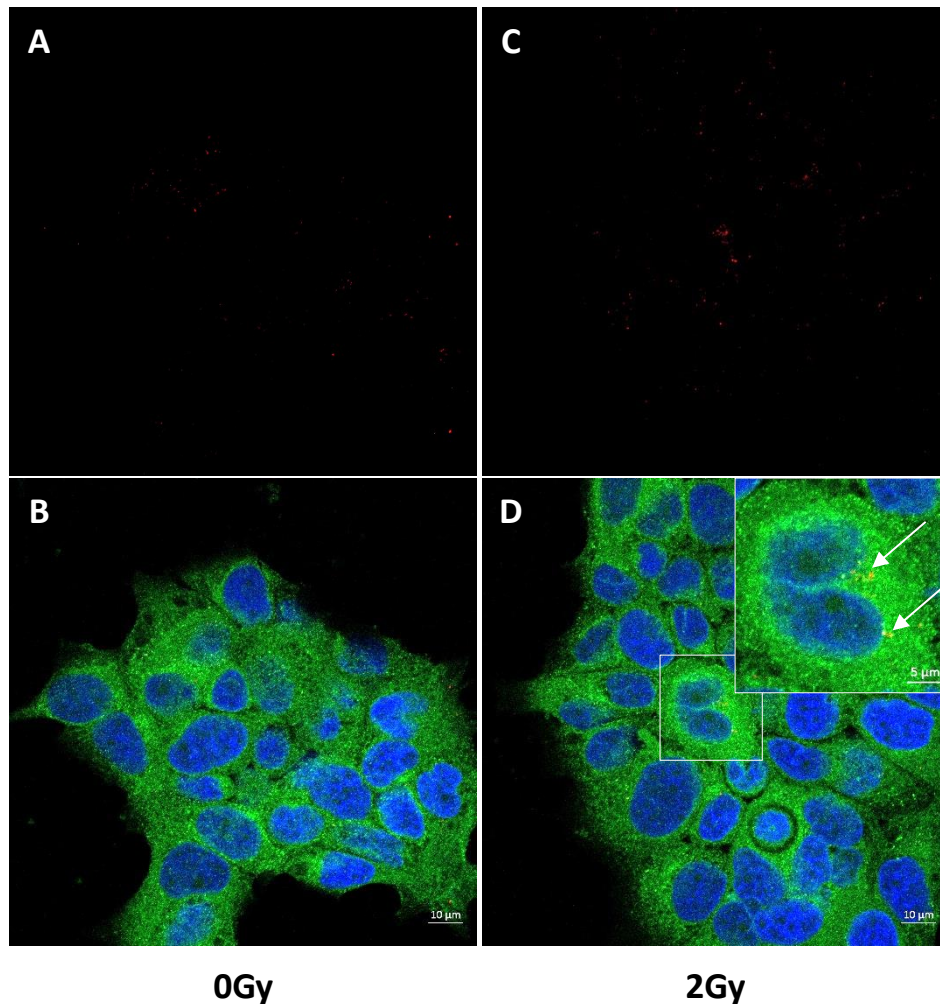


Abbildung 37: Ionisierende Strahlung führt zu einer Co-Lokalisation von p-AGO2 und EGFR. Auf den Bildern der konfokalen Laser Scan Mikroskopie der Immunfluoreszenzfärbung von mit 2Gy bestrahlten und unbestrahlten BT474 Zellen zeigte sich nach 1h in der 0Gy Kontrolle ein sehr schwaches p-AGO2 Signal (A ■). EGFR war in dieser Probe homogen verteilt (B ■). In der bestrahlten Probe zeigte sich eine Zunahme von p-AGO2, sowie eine Nukleus-ständige (D ■) EGFR (D ■) Akkumulation. Eine Vergrößerung von Bild D (□) zeigt die Co-Lokalisation von EGFR (■) und p-AGO2 (■) nach Bestrahlung. (Repräsentative Abbildung, n=5)

Sowohl in A549 Zellen, als auch in BT474 Zellen konnte somit eine Co-Lokalisation von EGFR und p-AGO2 1h nach einer Bestrahlung mit 2Gy im Cytosol beobachtet werden. Aufgrund der Zellgröße waren die Ergebnisse in A549 Zellen eindeutiger und besser zu erkennen als in BT474 Zellen.

4 DISKUSSION

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Fragestellung nach der Strahlenregulierung von miRs durch die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR. Aktuell sind 2.588 miRs bekannt, von denen nur einige strahlenreguliert sind. Als Beispiel für eine strahlenrelevante miR wurde miR-218 ausgewählt, die in Lage ist, Birc5 ein zur Familie der Apoptose inhibierenden Proteine (IAP-inhibitor of apoptosis proteins) gehörendes Protein zu regulieren. [58] Die Bedeutung von Birc5 in der Strahlentherapie ist bereits seit längerem Forschungsgegenstand der Klinik für Strahlentherapie -Radioonkologie- des Universitätsklinikums Münster. [45] Darum gilt der miR-218 und der möglichen Strahlenregulierung von miR-218 in dieser Arbeit eine besondere Aufmerksamkeit.

Zunächst wurde untersucht, ob es auffällige Zusammenhänge zwischen der EGFR und der miR-218 Expression gibt. Des Weiteren wurden Zielmoleküle der miR-218 im Mammakarzinom und in einem Vertreter des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms charakterisiert.

Dazu wurden MCF-7, BT474, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SK-BR-3, die benigne Zelllinie MCF-10, die immortalisierte Keratinozytenzelllinie HaCat sowie die Zelllinie A549 als Vertreter des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms bezüglich ihrer EGFR und miR-218 Expression untersucht (Abb. 11, 12). In den qRT-PCR Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Zelllinien, die eine hohe Expression von EGFR zeigten häufig eine geringe Menge an reifer miR-218 aufwiesen (Abb. 13). Die Zelllinie MDA-MB-468, die aufgrund eines fragilen EGFR-Genlocus bis zu 16 Wiederholungen des EGFR Gens aufwies, [1] zeigte diese Korrelation am deutlichsten. Eine Allgemeingültigkeit zum Verhältnis des Expressionsmusters des Onkogens EGFR und der Fehlregulation von miR-218 abzuleiten und zu extrapolieren wäre aufgrund der Stichprobe von acht untersuchten Zelllinien allerdings nicht zulässig. Um die Gültigkeit dieser Hypothese zu unterstützen wäre es notwendig gewesen, Untersuchungen an primärem Tumormaterial durchzuführen. Eine Akquise

dieser vermutlich sehr interessanten Metadaten ist bereits geplant und soll im Rahmen eines Folgeprojektes erfolgen.

Durch kürzlich publizierte Daten zum Glioblastom werden die hier beschriebenen Beobachtungen zur EGFR und miR-218 Korrelation gestützt. Es wurde in dieser Studie in Patientenproben (n=361) nachgewiesen, dass eine hohe EGFR Expression mit einer niedrigen miR-218 Expression korreliert. [105]

Neben der Korrelation in der Expression von EGFR und miR-218 ist beim Glioblastom die miR-218 streng mit Slit1, Slit2 und Slit3 assoziiert und unterliegt dem Methylierungsmuster des SLIT Promotors. [105; 71] Das SLIT Gen und die miR-218 teilen sich denselben Genlocus. [116]

Die in dieser Arbeit untersuchten Brustkrebszelllinien wiesen nahezu alle eine geringere miR-218 Expression auf, als die Keratinozytenzelllinie HaCat oder die Zelllinie MCF-10, die aus einer benignen Form einer Mammaneoplasie generiert wurden (Abb. 11). Diese Beobachtung bestätigt eine weitere Studie, die zeigen konnte, dass die miR-218 Expression in solidem Tumormaterial niedriger ist, als im direkt angrenzenden gesunden Brustgewebe. [94]

Von klinischer Bedeutung ist die miR-218 Fehlregulation in Karzinomen der Lunge, [57] der Gallenblase, [19] des Cervix [163] und bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. [63] Bei allen diesen Krebserkrankungen ist ein geringes Vorkommen von miR-218 mit einer schlechten Prognose verbunden. Noch deutlichere Daten liegen für Karzinome des Pankreas und der Leber vor. Hier ist die Fehlregulation von miR-218 nicht nur mit einer schlechten Prognose verbunden, sondern auch eindeutig mit der TNM-Klassifikation, dem Lymphknotenstatus, der Metastasierung, der Tumordifferenzierung und der Fünfjahresüberlebensrate. [90; 156]

Zusammenfassend lässt sich bis hierher sagen, dass es eine stringente Korrelation zwischen der EGFR Expression und der miR-218 Expression in verschiedensten Tumorentitäten gibt. Außerdem ist miR-218 von hoher prognostischer Bedeutung für verschiedene Tumorerkrankungen. Daraus

ergibt sich die Frage, welche mRNAs durch miR-218 reguliert werden, da ein besseres Verständnis des miR-218 Regelkreises neue Therapieansätze bieten könnte.

Die Recherche in der Datenbank *Target Scan Human - Prediction of microRNA targets 6.2* (Tab. 5) sowie die anschließende experimentelle Validierung mittels qRT-PCR nach transienter miR-218 Überexpression ergaben sowohl für die Brustkrebs-Zelllinien MDA-MB231 und BT474 als auch für die Zelllinie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms A549 eine signifikante Beeinflussung der mRNA-Expression von Birc5, Birc6, Decorin, EGFR, Notch2, Robo1, Tenascin C und Tob1 durch miR-218 (Abb. 15). Zusätzlich konnte für EGFR und Notch2 eine Beeinflussung auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 16, 17).

Birc5, ebenfalls bekannt als Survivin, gehört zur Familie der Apoptose inhibierenden Proteine (IAP-inhibitor of apoptosis proteins) und ist ein radioonkologisch sehr bedeutsames Protein, wie unter anderem Studien an Zelllinien des Ewing-Sarkoms zeigen konnten. [45] Sein Funktionsspektrum beschränkt sich allerdings nicht nur auf die Inhibition von Apoptose, die durch die Inhibierung von Caspase-9 und die Antagonisierung von mitochondrialen Zelltod Stimuli, sondern Birc5 ist auch sehr stark am Zellteilungsprozess beteiligt. Während der Mitose übernimmt es Funktionen im *chromosomal passenger complex*, der Formierung der mitotischen Spindel und der Checkpoint Kontrolle. Außerdem findet sich Survivin assoziiert mit auspolymerisierten Mikrotubuli. [3] In diesen bereits bekannten Eigenschaften von Birc5 wird die Begründung gesehen, dass mit pre-miR-218 transient transfizierte Zellen eine signifikante Erhöhung von mitotischen Katastrophen und polynukleären Kernen aufweisen (Abb. 21, 22). Diese Einflussnahme von Birc5 auf die Mitose spiegelt sich in der verringerten Trockenmasse und dem Zellgrößenwachstum wieder (Abb. 20). Hu konnte zwar bereits im Jahr 2015 Birc5 als Ziel mRNA von miR-218 publizieren, [58] allerdings untersuchte er nicht die Einflussnahme von miR-218 auf die Mitose.

Ein weiteres Mitglied der IAP-Familie ist Birc6, dessen Regulierung durch miR-218 hier erstmals beschrieben werden konnte. Die Regulierung von

Birc6 fiel allerdings sehr gering aus, obwohl der p_{CT} -Wert (Tab. 5) eine starke Regulierung vermuten ließ. Birc6 inhibiert die Caspasen -3, -6, -7 und -9. Außerdem inaktiviert Birc6 die Pro-Apoptotischen Proteine Smac/Diablo und HTRA2/OMI durch Ubiquitylierung. [36]

Decorin gehört zu den Proteoglykanen und ist in der Extrazellulären Matrix lokalisiert, wo es mit den Kollagenfibrillen interagiert. Früher wurde Decorin als strukturelle Komponente betrachtet. Heute wird dem Molekül eher eine Tumorsuppressorfunktion zugeordnet, mit Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung, Überleben, Adhesion, Migration und Entzündungsprozesse. [9] Humane Tumoren weisen nur eine geringe Expression von Decorin auf, wodurch sich auch die geringe Effektgröße durch den Einfluss von miR-218 in den untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und BT474 erklären lässt (Abb. 15). Die Zelllinie MDA-MB-231 ist sogar negativ für Decorin. Wird Decorin gar nicht erst exprimiert, induziert dies sogar die Tumorentwicklung. Die Gründe liegen vermutlich darin, dass Decorin Rezeptor-Tyrosinkinasen und den Prozess der Angiogenese inhibiert. [64] Der Einfluss von miR-218 auf Decorin konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden und stellt somit ein interessantes Zielmolekül für weitere Untersuchungen dar.

Notch2 gehört zur Familie der Notch Proteine. Es handelt sich um ein Transmembranprotein, das der direkten Zell-Zell Kommunikation dient. Der Notch Signalweg zählt zur gleichen Gruppe wie der Wnt-, *sonic hedgehog*-, BMP- oder TGF β -Signalweg. Dieser Zusammenhang macht deutlich, dass der Notch Signalweg bedeutend für die Embryonalentwicklung ist. Notch2 Mutanten führen in *Homo sapiens* zum Alagille Syndrom. Gerade im Mammakarzinom wurde häufig eine Überexpression von Notch2 beobachtet. Aufgrund der Wichtigkeit des Notch Signalweges ist seine Inhibition in den Fokus der Krebstherapie gerückt. [4] Eine Regulation der Notch2 Expression durch miR-218 wurde bislang nur theoretisch als *seed site* erwähnt. [119] Experimentell bestätigt wurde der Einfluss von miR-218 auf Notch2 erst im Rahmen dieser Arbeit. Interessant im Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen ist auch die

funktionelle Nähe von Notch2 zum Stammzellphänotyp beim Brustkrebs. [21]

Robo1 ist ein Transmembranrezeptor der in der Embryonalentwicklung, aktiviert durch seinen Liganden Slit2, die Orientierung des Richtungswachstums von Neuronen, die Aufteilung von Dendriten sowie die Zellmigration der Neuralleiste übernimmt. [161] In Tumoren, die eine negative miR-218 Regulation aufweisen, trägt die Interaktion von sekretiertem Slit2 aus Nachbargeweben zur Tumorgenese bei. Im Detail bedeutet dies, dass das Fehlen von miR-218 die Expression von Robo1 im Tumorgewebe nicht post-transkriptional verringern kann, allerdings würde im selben Verhältnis zu miR-218 die Slit2 Expression im Tumorgewebe vermindert sein. Wird jetzt allerdings aus gesundem Nachbargewebe Slit2 sekretiert, interagiert es mit den Robo1 Molekülen des Tumorgewebes und aktiviert so den Slit2/Robo1 Signalweg, der Angiogenese induziert, obwohl das Tumorgewebe selbst kein Slit2 exprimiert. In diesem Zusammenhang wurde Robo1 als Ziel mRNA von miR-218 bereits beschrieben [2; 20] und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

Ein weiteres im Zusammenhang mit dem Stammzellphänotyp und der Metastasierung wichtiges Protein ist Tenascin C, das mit der vorliegenden Arbeit erstmals als Zielmolekül der miR-218 identifiziert werden konnte. Das Glycoprotein Tenascin C ist in der Extrazellulär-Matrix lokalisiert. Seine „C-Domäne“ wird in adulten und epithelialen Tumorgewebe nicht exprimiert. Von Brusttumoren ist bekannt, dass sie Tenascin C produzieren und dies zu sehr aggressiven Metastasen in der Lunge führt. Induziert wird die Metastasierung zum einen durch die Aktivierung von Musashi1, das wiederum den Notch Signalweg aktiviert, indem es NUMB antagonisiert und zum anderen durch die Aktivierung von LGR5, das den Wnt Signalweg aktiviert. Allerdings verändert Tenascin C durch die Aktivierung dieser Stammzell- oder Progenitorzell-Faktoren den Stammzell-Phänotyp nicht. [110; 11] In Rezidivsituationen wurde vermehrt Tenascin C im Tumorstroma gefunden und war stets streng mit einer erhöhten EGFR Aktivierung assoziiert. [55] Beide Proteine werden über miR-218 reguliert.

Der Zusammenhang könnte auch von klinischem Nutzen sein, erfordert aber die Analyse primärer Proben, welche in einem Folgeprojekt untersucht werden könnten. Erst kürzlich konnte der Einfluss von miR-218 auf die Expression von Tob1 an mesenchymalen Stammzellen im Rattenmodell veröffentlicht werden. [43] Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte dieser Zusammenhang bestätigt und erstmalig für das Mammakarzinom beschrieben werden. Tob1 ist der negative Regulator der Rezeptor-Tyrosinkinase HER2/-neu. Des Weiteren antagonisiert Tob1 den Akt-Signalweg, inhibiert die β -Catenin abhängige Genregulation und induziert Apoptose in Krebszellen durch die Aktivierung von Bcl-2. Es handelt sich also um ein klassisches Tumorsuppressorgen. Wird Tob1 in Krebszellen überexprimiert induziert dies die Bildung weiterer Tumorsuppressorgene wie Smad4 und PTEN. [81]

Die hier beschriebenen Ziel-mRNAs von miR-218 gehören sowohl zu den Onkogenen, Birc5, Birc6, EGFR, Notch2, Robo1 und Tenascin C, als auch zu den Tumorsuppressorgenen, Decorin und Tob1.

Eine negative post-transkriptionale Regulierung der Tumorsuppressorgene Decorin und Tob1 durch miR-218 würde eine Tumorentwicklung begünstigen. MiR-218 würde entgegen seiner eigentlichen Funktion in diesem Fall eine onkogene Wirkung zeigen. Allerdings ist das grundsätzliche Expressionsniveau dieser Tumorsuppressorgene in den meisten Tumoren eher gering bis nicht vorhanden (vgl. Abb. 15 MDA-MB-231) und deutet darauf hin, dass weitere noch nicht beschriebene Regulationsmechanismen in deren Expression und Funktion eingreifen, wie zum Beispiel der Abbau von Decorin durch MMP8. [129]

Anders als bei den gerade genannten Tumorsuppressorgenen, ist die post-transkriptionale Regulation von Onkogenen, in diesem speziellen Fall von Birc5, Birc6, EGFR, Notch2, Robo1 und Tenascin C durch miR-218 von immenser Bedeutung für die Tumorentwicklung. In Abwesenheit von miR-218 und weiteren für diese Onkogene relevanten regulatorischen miRs, können sie so ungehindert positiven Einfluss auf Zellproliferation,

Invasivität, Angiogenese, Metastasierung und Inhibition von Apoptose nehmen und so die Tumorgenese beeinflussen.

Die Funktion und Bedeutung von EGFR wurde in der Einleitung unter den Punkten 1.2.1-1.2.2 eingehend erörtert. EGFR konnte als Zielmolekül der miR-218 identifiziert werden. Zusätzlich zu den qRT-PCR Untersuchungen konnte in Western Blot (Abb. 16), der Durchflusszytometrie (Abb. 17) und Luciferase-Test (Abb. 14) die signifikante, regulatorische Wirkung von miR-218 herausgestellt werden. Eine kürzlich erschienene Publikation konnte diesen Aspekt bereits für das nicht kleinzellige Bronchialkarzinom präsentieren, [168] allerdings wurden EGFR nachgeschalteten Signalwege nicht auf mögliche Veränderungen untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte für das Mammakarzinom gezeigt werden, dass die miR-218 Regulation von EGFR erheblichen Einfluss auf die Aktivierung des MAPK Signalweg hat. Durch die negative Regulation von EGFR durch miR-218 kann MAPK nicht mehr im gleichen Umfang phosphoryliert werden wie unter physiologischen Bedingungen (Abb. 18). Damit werden die essentiellen Wachstumssignale nicht an Transkriptionsfaktoren weitergeleitet. Im Detail sind durch die miR-218 Regulierung der PI3K/AKT/mTOR Signalweg, der NF- κ B Signalweg, der Wnt/ β -catenin Signalweg sowie *focal adhesion pathway* in Form von zum Beispiel Calveolin2 betroffen. [100] Parallel zu den Untersuchungen dieser Arbeit konnten Donzelli et al. ebenfalls den Einfluss von miR-218 auf die Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen am Beispiel von EGFR zeigen. [37] Speziell für EGFR beschreiben andere Studien eine Einflussnahme auf Zellproliferation und Zellwachstum. [168] Diese Effekte konnten in dieser Arbeit für das Mammakarzinom ebenfalls beobachtet werden. Die Verminderung von Zelltrockenmasse und Zellfläche bei miR-218 transient überexprimierenden MDA-MB-231 Zellen belegt die gestörte Proliferation und Zellgrößenwachstum (Abb. 20). Eine transiente Überexpression von miR-218 führte zu einer verminderten Invasivität (Abb. 23) und Motilität (Abb. 19) von MDA-MB-231 Zellen. Werden diese

Zellen unter physiologischen Bedingungen kultiviert, sind sie für ihre hohe Beweglichkeit und Aggressivität bekannt. [50]

EGFR scheint eine übergeordnete Rolle im Zusammenhang mit der miR-Reifung zu spielen. In einer aktuellen Publikation wurde beschrieben, dass es in hypoxischen Zellen zu einer EGFR induzierten AGO2 Phosphorylierung kommt, die dann zu einer Inhibition der Reifung bestimmter miRs führt und dies ein Ausdruck der Zellstressantwort ist. [124] Diesem Prozess der AGO2 Phosphorylierung geht eine EGFR Internalisierung, verursacht durch Hypoxie voraus. Eine solche EGFR Internalisierung konnte durch die Applikation von ionisierender Strahlung für die Zelllinie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms A549 ebenfalls beschrieben werden. [34] Aus diesen Arbeiten resultiert nun die Frage, ob sich der beschriebene Mechanismus der stressinduzierten Inhibition der miR-Reifung auf die zelluläre Strahlenantwort übertragen lässt.

Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen sowie Western Blot Analysen dieser Arbeit zeigten eine strahleninduzierte Translokation von EGFR (Abb. 32, 33), eine Autophosphorylierung von EGFR an Position Tyrosin-1068 zu den Zeitpunkten 20min, 30min und 1h nach Bestrahlung (Abb. 35) und eine Zunahme der Endozytose-Aktivitäten (Abb. 32, 33). Eine Co-Lokalisation der Signale von EGFR und dem Marker für frühe Endosomen, EEA1, lässt vermuten, dass EGFR via Endozytose internalisiert wird (Abb.32, 33). Um diese Annahme zu belegen wurden Experimente durchgeführt, in denen 30min vor der Bestrahlung mit Tyrphostin die Aktivität der Tyrosinkinase gehemmt wurde und mit Cytochalasin D die Endozytose unterbunden wurde. In diesen Versuchen konnte keine Strahlenantwort in Form der Herunterregulierung der miR-218 in BT474 oder A549 Zellen gemessen werden (Abb. 29, 30). Dass EGFR und AGO2 vermutlich miteinander interagieren, lassen die LSM-Bilder der Immunfluoreszenzfärbung vermuten (Abb. 36, 37). Die Co-Lokalisation der Fluoreszenzsignale beider Moleküle in enger räumlicher Nähe ist ein deutliches Indiz dafür.

Aus den bis hier vorliegenden Daten zur EGFR basierten Inhibition der miR-Reifung nach Bestrahlung lässt sich das folgende neuartige Schema ableiten:

Wird eine Zelle mit einer therapierelevanten Dosis von 2Gy Röntgenstrahlung belastet (Abb. 38 A), so führt dies zu einer Auto-phosphorylierung sowie der Endosomen-vermittelten Translokation von EGFR ins Zytosol, wo es Nukleus-ständig akkumuliert. Dieser Prozess der EGFR Internalisierung ist vermutlich durch die erhöhte Endozytose-Aktivität nach Bestrahlung zu erklären. Während der EGFR Translokation wird AGO2 an Position Tyrosin-393 durch EGFR phosphoryliert (Abb. 38 B). Infolge der Phosphorylierung von AGO2 ist es nun nicht mehr möglich, dass sich aus pre-miR, AGO2, Dicer und TRBP der *RNA Induced Silencing Complex* bildet, dies führt dann zur Inhibition der miR Reifung nach Bestrahlung.

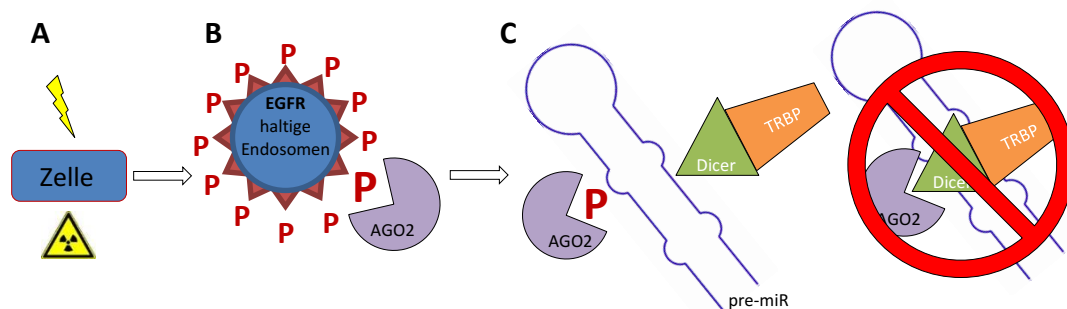


Abbildung 38: Internalisiertes EGFR inhibiert AGO2 durch Phosphorylierung als Strahlenantwort. Das neue Modell gibt schematisch den molekularen Ablauf der EGFR vermittelten Inhibition der miR Reifung nach Bestrahlung durch AGO2 Phosphorylierung wieder. Nach der Bestrahlung (A) wird strahlen-aktiviertes EGFR durch Endozytose internalisiert und phosphoryliert dabei AGO2 (B). p-AGO2 ist inaktiv und kann nicht mehr mit pre-miR, Dicer und TRBP den RISC bilden und es kommt zur Inhibition der miR Reifung (C).

Die einzelnen molekularen Parameter, die zur Annahme des in Abbildung 38 beschriebenen Mechanismus führten, konnten sowohl in der Zelllinie BT474 des Mammakarzinoms als auch in der Zelllinie A549 des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms nachgewiesen werden. Der

Nachweis in verschiedenen Tumorentitäten kann als Indiz für die Allgemeingültigkeit dieser Hypothese angesehen werden.

Um zu untersuchen, welche miRs durch das oben beschriebene EGFR-AGO2 System infolge einer Exposition mit ionisierender Strahlung reguliert werden, wurden Zellen einem transienten siRNA basierendem EGFR *Knock Down* unterzogen und bestrahlt, entsprechende transfizierte Kontrollen wurden mitgeführt. Nach 4h wurden die miRs extrahiert und die miR Isolate mittels Micro-Array (Exiqon) bezüglich der Veränderung aller miRs untersucht (Abb. 24). Die Ergebnisse des Micro-Array zeigten eine Vielzahl negativ strahlenregulierter miRs sowie eine immer noch beachtlich große Gruppe von miRs, bei denen der Effekt der negativen Strahlenregulierung nicht auftrat, wenn EGFR durch den *Knock Down* ausgeschaltet war. Diese letzte Gruppe wurde dann bezüglich ihrer Effekthöhe und den bereits aus der Literatur bekannten Ziel-mRNAs beurteilt und sieben miRs mittels qRT-PCR in weiteren Experimenten manuell validiert. Dies waren die miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 (Abb. 25, 26, 27, 28).

Die im Micro-Array bestimmten Effekte konnten also bestätigt werden und der Einfluss der EGFR-AGO2 Interaktion auf die Reifung strahlenrelevanter miRs gezeigt werden. Diese miRs sind für die Regulation einer Vielzahl von Onkogenen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren verantwortlich, die in Tabelle 10 mit den entsprechenden Literaturhinweisen gelistet sind.

Tabelle 10: Übersicht über bereits experimentell validierte und publizierte Ziel mRNAs von miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218.

micro-RNA	Experimentell validierte Ziel mRNAs
miR-15a-5p	Bcl2 und Jun [16], RET [33], VEGF A [158]
miR-19a-3p	Bcl2L11 [114], BMPR2 [10], ESR1 [99], N-Myc [12], TGF- β -R [32]
miR-21-5p	ATM <i>interactor</i> [48], Bcl2 [136], EGFR [167], HS3ST3B1 [48], p53 [18], Smad7 [166], STAT3 [167], TGF- β R2 [111], VEGF A [95], Wnt1 [51]
miR-100-5p	ATM [109], FGFR3 [18], IGF1R und mTOR [35]
miR-101-3p	ATM [154], Fos [92], mTOR [23], N-Myc [12]
miR-106b-5p	Casp7 [59], PTEN und RB1 [138], VEGF A [158]
miR-218-5p	Birc5, Birc6, Decorin, EGFR, Notch2, Robo1, Tenascin C und Tob1 (siehe 4.2), RET [33]

Durch die charakterisierten miRs wird eine Reihe von Genen reguliert. Dabei handelt es sich um proto-Onkogene wie Jun und Fos, [117] RET [74] und RB1 [80] die nachweislich von klinischer Relevanz für die Tumorgenese sind. Mit Casp7, [91] p53 [80] und Bcl2 [160] werden Schlüsselstellen des Apoptose-Signalweges reguliert. Außerdem werden wichtige Rezeptor-Tyrosinkinasen wie EGFR, IGF1R, TGF- β R2 sowie die ihnen nachgeschalteten Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren STAT3, mTOR, N-Myc und PTEN reguliert. [80; 88] Die letzte Gruppe bilden Wachstumsfaktoren wie VEGF A [40] und der Wnt1 [107] Signalweg. Aufgrund der posttranskriptionalen Regulierung dieser in Tabelle 10 dargestellten Gene, durch die als strahlensensitiv identifizierten miRs, lassen sich die folgenden beschriebenen Auswirkungen auf diverse Zelllinien verschiedener Tumorentitäten erstmalig aus einer neuen Sichtweise ableiten:

Ein Inhibition von miR-21 führt zu einer Erhöhung der Radiosensitivität in Zelllinien des nicht Kleinzelligen Bronchialkarzinoms [128] und des Cervixkarzinoms. [127]

Im Fall von miR-100 bewirkt eine durch Bestrahlung induzierte verminderte Prozessierung derselbigen eine Erhöhung der Radioresistenz in Zelllinien des Kolorektalkarzinoms. [157] Ähnlich verhält sich der Effekt für miR-101 in Zelllinien des Nasopharynxkarzinoms [134] und des nicht Kleinzelligen Bronchialkarzinoms. [24] In beiden Tumorentitäten erhöht eine hohe Menge miR-101 die Radiosensitivität. In diesen fünf Beispielen zeigt sich also eine erhöhte Radioresistenz für den Abfall der miRs miR-21, miR-100 und miR-101, die erstmalig für das Mammakarzinom in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Neben dem Einfluss auf die Radiosensitivität kann eine Veränderung bestimmter miRs auch ein verändertes Ansprechen auf gängige Chemotherapeutika zur Folge haben. Positive Veränderungen im Expressionsniveau von miR-15a zeigen ein vermindertes Ansprechen auf Doxorubicin in Zelllinien des Mammakarzinoms. [113] Wird miR-106b hochreguliert äußert sich dies in einem verbesserten Ansprechen auf Cisplatin in Zellen des nicht Kleinzelligen Bronchialkarzinoms. [162]

Aus diesen molekularbiologischen Untersuchungen wird also deutlich, dass Veränderung in der Reifung bestimmter miRs durch eine Bestrahlung in therapeutisch relevanten Dosen im Rahmen einer Strahlentherapie unmittelbare Folgen auf den Erfolg der gesamten Tumorthherapie haben kann und somit von hoher klinischer Relevanz ist.

Eine genaue Kinetik der miR Regulation wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, die Aufarbeitung der Proben erfolgte stets 4h nach der Bestrahlung. Der Vergleich der Effekthöhe nach Dosen von 2Gy und 5Gy Röntgenstrahlung zeigte, dass die Abnahme der miR-Reifung bei einer Dosis von 2Gy größer ist als bei 5Gy. Vermutlich ist der durch die Bestrahlung mit 5Gy verursachte intrazelluläre Schaden so hoch, dass er Einfluss auf die molekularen und biochemischen Abläufe der miR Reifung

hat. Andere Arbeitsgruppen konnten diesen Effekt ebenfalls beschreiben. [126]

Das Ergebnis der Micro-Array Analyse wies zu den sieben oben genannten miRs noch weitere strahlenregulierte miRs aus, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurden, aber interessant im Zusammenhang mit hierauf aufbauende Folgeprojekte sein können.

Abschließend muss noch aufgezeigt werden wo die Limitation der Arbeit liegt und wo sie Ansätze für weitere Fragestellungen und Folgeprojekte bietet.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, welche Bedeutung die miR-218 für die Tumorgenese und Tumorprogression hat. Darüber hinaus lässt sich aus den Daten die molekulare Funktionsweise des EGFR-AGO2 Systems ableiten und strahlensensitiv beeinflusste miRs identifizieren.

Um die Bedeutung von miR-218 für das Mammakarzinom im klinischen Zusammenhang beurteilen zu können, wäre es nötig gewesen primäres Patientenmaterial zu analysieren und den Verlauf der jeweiligen Tumorerkrankung genau zu verfolgen. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gemacht werden.

Obwohl die experimentelle Beweisführung für das EGFR-AGO2 Regulations-System sehr stichhaltig sind, hätte die Co-Immunpräzipitation von EGFR und AGO2 und ggf. eine Live-Mikroskopie der Interaktion von EGFR und AGO2 analog zu dem Experiment von Shen et al., 2013 mehr Klarheit gebracht. Bei dessen Untersuchungen wurden EGFR und AGO2 als Fusionsproteine exprimiert und so später aufgrund ihrer Interaktion ein gelb fluoreszierendes Molekül gebildet. [124]

Auch die Interaktion von miR-218 mit ihren Ziel-mRNAs, außer für EGFR, wurde nicht mit dem Luciferase-Test verifiziert, sondern lediglich mittels qRT-PCR Untersuchungen beschrieben.

Für zukünftige Projekte wäre es interessant, die neu validierten Ziel-mRNAs und deren Bedeutung in Zelllinien des Mammakarzinoms oder

des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms bezüglich der Tumorgenese und Tumorprogression näher zu charakterisieren. Dies könnte in Form von siRNA basierten transienten *Knock Down* Experimenten, analog zu der hier beschriebenen Zunahme an mitotischen Katastrophen nach miR-218 Überexpression erfolgen. Ebenfalls wäre es sehr interessant die Bedeutung der strahlenregulierten miRs für die Zellphysiologie zu untersuchen (vgl. Kapitel 3.3).

Auch bieten die Ergebnisse der Micro-Array Analyse weitere spannende Forschungsinhalte. Viele interessante miRs, die vermutlich dem EGFR-AGO2 Regelmechanismus unterliegen, wurden hier nicht weiter bestätigt und untersucht. Diese müssten entsprechend mittels qRT-PCR validiert und so bestätigt werden. Außerdem ergab die Micro-Array Analyse, dass es auch positiv strahlenregulierte miRs gibt. Solche Effekte sind zum Beispiel für humane Lymphoblasten bereits publiziert [22] und könnten auch im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom interessant sein. Im klinischen Zusammenhang könnte darüber hinaus interessant sein, ob sich die Therapie mit EGFR-spezifischen Antikörpern wie zum Beispiel Cetuximab oder Inhibitoren wie Lapatinib auf die miR-Expression auswirkt und wie man diesen Prozess optimieren kann.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass diese Arbeit die folgenden neuen Ergebnisse gezeigt hat:

- Es gibt einen Zusammenhang zwischen der EGFR und miR-218 Expression im Mammakarzinom.
- Birc5, Birc6, Decorin, EGFR, Notch2, Robo1, Tenascin C und Tob1 werden durch miR-218 reguliert und miR-218 nimmt so deutlichen Einfluss auf die Zellphysiologie in Form von Mitose, Zell-Motilität, -Invasivität, -Fläche und -Trockenmasse.

- Ein Regelmechanismus aus EGFR und AGO2, der hier erstmals gezeigt werden konnte, ist für die Strahlensensitivität verschiedener miRs verantwortlich.
- Die miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 unterliegen der EGFR-AGO2 Regulierung nach Bestrahlung im Mammakarzinom und im nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom. Diese Veränderungen haben das Potential, den Erfolg von Chemo- oder Strahlentherapie zu ungunsten des Patienten zu beeinflussen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- 1. Agelopoulos, K., Greve, B., Schmidt, H., Pospisil, H., Kurtz, S., Bartkowiak, K., Andreas, A., Wieczorek, M., Korsching, E., Buerger, H., & Brandt, B.** (2010). Selective regain of egfr gene copies in CD44+/CD24-/low breast cancer cellular model MDA-MB-468. *BMC Cancer, 10*, 1-10.

- 2. Alajez, N.M., Lenarduzzi, M., Ito, E., Hui, A.B., Shi, W., Bruce, J., Yue, S., Huang, S.H., Xu, W., Waldron, J., O'Sullivan, B., & Liu, F.F.** (2011). MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res, 71*, 2381-2391. In eng.

- 3. Altieri, D.C.** (2008). Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer, 8*, 61-70.

- 4. Andersson, E.R., & Lendahl, U.** (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling - are we there yet? *Nat Rev Drug Discov, 13*, 357-378.

- 5. Babashah, S.** (2014). MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis. *Springer International Publishing, Switzerland 2014*, 7-28.

- 6. Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y.M., & Mendelsohn, J.** (1998). Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res, 58*, 2825-2831.

- 7. Bettenworth, D., Lenz, P., Krausewitz, P., Bruckner, M., Ketelhut, S., Domagk, D., & Kemper, B.** (2014). Quantitative stain-free and continuous multimodal monitoring of wound healing in vitro with digital holographic microscopy. *PLoS One, 9*, e107317. In eng.

- 8. Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Collins, N.R., Thomson, M.J., Geistlinger, T.R., Carroll, J.S., Brown, M., Hammond, S., Srour, E.F., Liu, Y., & Nakshatri, H.** (2009). Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*, *37*, 4850-4861. In eng.
- 9. Bi, X.-L., & Yang, W.** (2013). Biological functions of decorin in cancer. *Chinese Journal of Cancer*, *32*, 266-269.
- 10. Brock, M., Trenkmann, M., Gay, R.E., Michel, B.A., Gay, S., Fischler, M., Ulrich, S., Speich, R., & Huber, L.C.** (2009). Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res*, *104*, 1184-1191. In eng.
- 11. Brosicke, N., van Landeghem, F.K., Scheffler, B., & Faissner, A.** (2013). Tenascin-C is expressed by human glioma in vivo and shows a strong association with tumor blood vessels. *Cell Tissue Res*, *354*, 409-430. In eng.
- 12. Buechner, J., Tomte, E., Haug, B.H., Henriksen, J.R., Lokke, C., Flaegstad, T., & Einvik, C.** (2011). Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma. *Br J Cancer*, *105*, 296-303. In eng.
- 13. Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q.V.** (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, *14*, 911-915. In eng.
- 14. Cailleau, R., Young, R., Olive, M., & Reeves, W.J., Jr.** (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*, *53*, 661-674. In eng.

- 15. Caldecott, K.W.** (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*, 9, 619-631.
- 16. Calin, G.A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Shimizu, M., Taccioli, C., Zanesi, N., Garzon, R., Aqeilan, R.I., Alder, H., Volinia, S., Rassenti, L., Liu, X., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., & Croce, C.M.** (2008). MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5166-5171. In eng.
- 17. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C.M.** (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15524-15529. In eng.
- 18. Catto, J.W., Miah, S., Owen, H.C., Bryant, H., Myers, K., Dudzic, E., Larre, S., Milo, M., Rehman, I., Rosario, D.J., Di Martino, E., Knowles, M.A., Meuth, M., Harris, A.L., & Hamdy, F.C.** (2009). Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res*, 69, 8472-8481. In eng.
- 19. Chandra, V., Kim, J.J., Mittal, B., & Rai, R.** (2016). MicroRNA aberrations: An emerging field for gallbladder cancer management. *World J Gastroenterol*, 22, 1787-1799. In eng.
- 20. Chang, P.H., Hwang-Verslues, W.W., Chang, Y.C., Chen, C.C., Hsiao, M., Jeng, Y.M., Chang, K.J., Lee, E.Y., Shew, J.Y., & Lee, W.H.** (2012). Activation of Robo1 signaling of breast cancer cells by Slit2 from stromal fibroblast restrains tumorigenesis via blocking PI3K/Akt/beta-catenin pathway. *Cancer Res*, 72, 4652-4661. In eng.

- 21. Chao, C.H., Chang, C.C., Wu, M.J., Ko, H.W., Wang, D., Hung, M.C., Yang, J.Y., & Chang, C.J.** (2014). MicroRNA-205 signaling regulates mammary stem cell fate and tumorigenesis. *J Clin Invest*, *124*, 3093-3106. In eng.
- 22. Chaudhry, M.A., Omaruddin, R.A., Brumbaugh, C.D., Tariq, M.A., & Pourmand, N.** (2013). Identification of radiation-induced microRNA transcriptome by next-generation massively parallel sequencing. *Journal of Radiation Research*, *54*, 808-822.
- 23. Chen, K., Fan, W., Wang, X., Ke, X., Wu, G., & Hu, C.** (2012). MicroRNA-101 mediates the suppressive effect of laminar shear stress on mTOR expression in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *427*, 138-142. In eng.
- 24. Chen, S., Wang, H., Ng, W.L., Curran, W.J., & Wang, Y.** (2011). Radiosensitizing effects of ectopic miR-101 on non-small-cell lung cancer cells depend on the endogenous miR-101 level. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *81*, 1524-1529. In eng.
- 25. Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R.** (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, *436*, 740-744.
- 26. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., & Croce, C.M.** (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*, 13944-13949. In eng.
- 27. Citri, A., & Yarden, Y.** (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*, 505-516.

- 28. Cummings, R.D., Soderquist, A.M., & Carpenter, G.** (1985). The Oligosaccharide Moieties of the Epidermal Growth-Factor Receptor in a-431 Cells - Presence of Complex-Type N-Linked Chains That Contain Terminal N-Acetylgalactosamine Residues. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 1944-1952. In English.
- 29. Dausend, J.** (2009). Aufnahmemechanismus und Wirkung chemotherapeutisch beladener Miniemulsions-Nanopartikel in Tumorzellen.
- 30. Davis, A.J., & Chen, D.J.** (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*, 2, 130-143. In Eng.
- 31. De Larco, J.E., & Todaro, G.J.** (1978). Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: Epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *Journal of Cellular Physiology*, 94, 335-342.
- 32. Dews, M., Fox, J.L., Hultine, S., Sundaram, P., Wang, W., Liu, Y.Y., Furth, E., Enders, G.H., El-Deiry, W., Schelter, J.M., Cleary, M.A., & Thomas-Tikhonenko, A.** (2010). The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res*, 70, 8233-8246. In eng.
- 33. Diaz-Beya, M., Navarro, A., Ferrer, G., Diaz, T., Gel, B., Camos, M., Pratcorona, M., Torrebadell, M., Rozman, M., Colomer, D., Monzo, M., & Esteve, J.** (2013). Acute myeloid leukemia with translocation (8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement harbors a distinctive microRNA signature targeting RET proto-oncogene. *Leukemia*, 27, 595-603. In eng.

- 34. Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Kehlbach, R., & Rodemann, H.P.** (2011). Nuclear epidermal growth factor receptor modulates cellular radio-sensitivity by regulation of chromatin access. *Radiother Oncol*, *99*, 317-322. In eng.
- 35. Doghman, M., El Wakil, A., Cardinaud, B., Thomas, E., Wang, J., Zhao, W., Peralta-Del Valle, M.H., Figueiredo, B.C., Zambetti, G.P., & Lalli, E.** (2010). Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*, *70*, 4666-4675. In eng.
- 36. Dong, X., Lin, D., Low, C., Vucic, E.A., English, J.C., Yee, J., Murray, N., Lam, W.L., Ling, V., Lam, S., Gout, P.W., & Wang, Y.** (2013). Elevated expression of BIRC6 protein in non-small-cell lung cancers is associated with cancer recurrence and chemoresistance. *J Thorac Oncol*, *8*, 161-170. In eng.
- 37. Donzelli, S., Cioce, M., Muti, P., Strano, S., Yarden, Y., & Blandino, G.** (2016). MicroRNAs: Non-coding fine tuners of receptor tyrosine kinase signalling in cancer. *Semin Cell Dev Biol*, *50*, 133-142. In eng.
- 38. Dubinsky, W.P., Mayorga-Wark, O., & Schultz, S.G.** (1999). Volume regulatory responses of basolateral membrane vesicles from *Necturus* enterocytes: role of the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*, 9421-9426. In eng.
- 39. Eggers, J.C., Martino, V., Reinbold, R., Schafer, S.D., Kiesel, L., Starzinski-Powitz, A., Schuring, A.N., Kemper, B., Greve, B., & Gotte, M.** (2016). microRNA miR-200b affects proliferation, invasiveness and stemness of endometriotic cells by targeting ZEB1, ZEB2 and KLF4. *Reprod Biomed Online*, *32*, 434-445. In eng.

- 40. Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J.** (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, *9*, 669-676.
- 41. Foulkes, W.D., Smith, I.E., & Reis-Filho, J.S.** (2010). Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, *363*, 1938-1948.
- 42. Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., & Bartel, D.P.** (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, *19*, 92-105. In eng.
- 43. Gao, Y., Zhang, Y., Lu, Y., Wang, Y., Kou, X., Lou, Y., & Kang, Y.** (2016). TOB1 Deficiency Enhances the Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Tendon-Bone Healing in a Rat Rotator Cuff Repair Model. *Cell Physiol Biochem*, *38*, 319-329. In eng.
- 44. Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., & Parks, W.P.** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, *51*, 1417-1423. In eng.
- 45. Greve, B., Sheikh-Mounessi, F., Kemper, B., Ernst, I., Gotte, M., & Eich, H.T.** (2012). Survivin, a target to modulate the radiosensitivity of Ewing's sarcoma. *Strahlenther Onkol*, *188*, 1038-1047. In eng.
- 46. Gupta, S.** (2013). Triple negative breast cancer: A continuing challenge. *Indian J Med Paediatr Oncol*, *34*, 1-2.
- 47. Gutierrez, C., & Schiff, R.** (2011). HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *135*, 55-62.

- 48. Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A.C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G.S., Dewell, S., Zavolan, M., & Tuschl, T.** (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, *141*, 129-141. In eng.
- 49. Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., & Kim, V.N.** (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, *18*, 3016-3027. In eng.
- 50. Hardwick, M., Cavalli, L.R., Barlow, K.D., Haddad, B.R., & Papadopoulos, V.** (2002). Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) gene amplification in MDA-MB-231 aggressive breast cancer cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *139*, 48-51.
- 51. Hashimi, S.T., Fulcher, J.A., Chang, M.H., Gov, L., Wang, S., & Lee, B.** (2009). MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood*, *114*, 404-414. In eng.
- 52. He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., & Hammond, S.M.** (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, *435*, 828-833. In eng.
- 53. Herbst, R.S., & Shin, D.M.** (2002). Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors. *Cancer*, *94*, 1593-1611.
- 54. Hirai, T., Kuwahara, M., Yoshida, K., Kagawa, Y., Hihara, J., Yamashita, Y., & Toge, T.** (1998). Clinical results of transhiatal esophagectomy for carcinoma of the lower thoracic esophagus according to biological markers. *Dis Esophagus*, *11*, 221-225.

- 55. Holdman, X.B., Welte, T., Rajapakshe, K., Pond, A., Coarfa, C., Mo, Q., Huang, S., Hilsenbeck, S.G., Edwards, D.P., Zhang, X., & Rosen, J.M.** (2015). Upregulation of EGFR signaling is correlated with tumor stroma remodeling and tumor recurrence in FGFR1-driven breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, *17*, 141.
- 56. Holliday, D.L., & Speirs, V.** (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, *13*, 215.
- 57. Hu, L., Ai, J., Long, H., Liu, W., Wang, X., Zuo, Y., Li, Y., Wu, Q., & Deng, Y.** (2016). Integrative microRNA and gene profiling data analysis reveals novel biomarkers and mechanisms for lung cancer. *Oncotarget*, *7*, 8441-8454. In eng.
- 58. Hu, Y., Xu, K., & Yague, E.** (2015). miR-218 targets survivin and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *151*, 269-280. In eng.
- 59. Hudson, R.S., Yi, M., Esposito, D., Glynn, S.A., Starks, A.M., Yang, Y., Schetter, A.J., Watkins, S.K., Hurwitz, A.A., Dorsey, T.H., Stephens, R.M., Croce, C.M., & Ambis, S.** (2013). MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer. *Oncogene*, *32*, 4139-4147. In eng.
- 60. Humblet, Y.** (2004). Cetuximab: an IgG1 monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *5:7*, 1621-1633.
- 61. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, É., Tuschl, T., & Zamore, P.D.** (2001). A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science*, *293*, 834-838.

- 62. Iorio, M.V., & Croce, C.M.** (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine*, *4*, 143-159.
- 63. Jamali, Z., Asl Aminabadi, N., Attaran, R., Pournagiazar, F., Ghertasi Oskouei, S., & Ahmadpour, F.** (2015). MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*, *51*, 321-331. In eng.
- 64. Jarvinen, T.A., & Prince, S.** (2015). Decorin: A Growth Factor Antagonist for Tumor Growth Inhibition. *Biomed Res Int*, *2015*, 654765. In eng.
- 65. Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., & Slack, F.J.** (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, *120*, 635-647. In eng.
- 66. Kauffmann, G.W.** (2011). *Radiologie bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz*. München: Elsevier.
- 67. Kemper, B., Bauwens, A., Vollmer, A., Ketelhut, S., Langehanenberg, P., Müthing, J., Karch, H., & von Bally, G.** (2010). Label-free quantitative cell division monitoring of endothelial cells by digital holographic microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *15*, 036009-036009-036006.
- 68. Kemper, B., Carl, D., Höink, A., von Bally, G., Bredebusch, I., & Schnekenburger, J.** (2006). Modular digital holographic microscopy system for marker free quantitative phase contrast imaging of living cells. 6191 (pp. 61910T-61910T-61918).

- 69. Kemper, B., & von Bally, G.** (2008). Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection. *Appl Opt*, *47*, A52-61. In eng.
- 70. Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S.D.** (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, *115*, 209-216. In eng.
- 71. Kim, M., Kim, J.H., Baek, S.J., Kim, S.Y., & Kim, Y.S.** (2016). Specific expression and methylation of SLIT1, SLIT2, SLIT3, and miR-218 in gastric cancer subtypes. *Int J Oncol*. In Eng.
- 72. Kim, V.N.** (2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends in Cell Biology*, *14*, 156-159.
- 73. Kim, V.N., Han, J., & Siomi, M.C.** (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*, 126-139.
- 74. Kouvaraki, M.A., Shapiro, S.E., Perrier, N.D., Cote, G.J., Gagel, R.F., Hoff, A.O., Sherman, S.I., Lee, J.E., & Evans, D.B.** (2005). RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid*, *15*, 531-544. In eng.
- 75. Kreienberg, A., Follmann, Kopp, Kühn, Wöckel, Zemmler** (2012). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. In German.
- 76. Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., & Zhao, X.** (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res*, *40*, 5795-5818. In eng.
- 77. Kunkel, T.A., & Erie, D.A.** (2005). DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*, *74*, 681-710. In eng.

- 78. KUO, L.J., & YANG, L.-X.** (2008). γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo*, 22, 305-309.
- 79. Lasfargues, E.Y., Coutinho, W.G., & Redfield, E.S.** (1978). Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 61, 967-978. In eng.
- 80. Lee, E.Y., & Muller, W.J.** (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003236. In eng.
- 81. Lee, H.S., Kundu, J., Kim, R.N., & Shin, Y.K.** (2015). Transducer of ERBB2.1 (TOB1) as a Tumor Suppressor: A Mechanistic Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 29815-29828.
- 82. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., & Ambros, V.** (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75, 843-854.
- 83. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., & Kim, V.N.** (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, 415-419. In eng.
- 84. Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R., & Kim, V.N.** (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journal*, 25, 522-532.
- 85. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., & Kim, V.N.** (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21, 4663-4670.

- 86. Leischner, H.** (2014). *Basics Onkologie*. München: Elsevier. In ger.
- 87. Lemmon, M.A., Bu, Z., Ladbury, J.E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D.M., & Schlessinger, J.** (1997). Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J*, *16*, 281-294.
- 88. Lemmon, M.A., & Schlessinger, J.** (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, *141*, 1117-1134.
- 89. Lewis, B.P., Shih, I.h., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., & Burge, C.B.** (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, *115*, 787-798.
- 90. Li, B.S., Liu, H., & Yang, W.L.** (2015). Reduced miRNA-218 expression in pancreatic cancer patients as a predictor of poor prognosis. *Genet Mol Res*, *14*, 16372-16378. In eng.
- 91. Li, J., & Yuan, J.** (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, *27*, 6194-6206.
- 92. Li, S., Fu, H., Wang, Y., Tie, Y., Xing, R., Zhu, J., Sun, Z., Wei, L., & Zheng, X.** (2009). MicroRNA-101 regulates expression of the v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS) oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *49*, 1194-1202. In eng.
- 93. Li, Z., Hosoi, Y., Cai, K., Tanno, Y., Matsumoto, Y., Enomoto, A., Morita, A., Nakagawa, K., & Miyagawa, K.** (2006). Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*, *341*, 363-368. In eng.

- 94. Liu, B., Tian, Y., Li, F., Zhao, Z., Jiang, X., Zhai, C., Han, X., & Zhang, L.** (2016). Tumor-suppressing roles of miR-214 and miR-218 in breast cancer. *Oncol Rep.* In Eng.
- 95. Liu, L.Z., Li, C., Chen, Q., Jing, Y., Carpenter, R., Jiang, Y., Kung, H.F., Lai, L., & Jiang, B.H.** (2011). MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS One*, *6*, e19139. In eng.
- 96. Liu, Q., Lv, G.D., Qin, X., Gen, Y.H., Zheng, S.T., Liu, T., & Lu, X.M.** (2012). Role of microRNA let-7 and effect to HMGA2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep*, *39*, 1239-1246. In eng.
- 97. Liu, Y., & Mueller, B.M.** (2006). Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *344*, 1263-1270.
- 98. Livak, K.J., & Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, *25*, 402-408. In eng.
- 99. Loven, J., Zinin, N., Wahlstrom, T., Muller, I., Brodin, P., Fredlund, E., Ribacke, U., Pivarcsi, A., Pahlman, S., & Henriksson, M.** (2010). MYCN-regulated microRNAs repress estrogen receptor-alpha (ESR1) expression and neuronal differentiation in human neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*, 1553-1558. In eng.
- 100. Lu, Y.F., Zhang, L., Wayne, M.M., Fu, W.M., & Zhang, J.F.** (2015). MiR-218 mediates tumorigenesis and metastasis: Perspectives and implications. *Exp Cell Res*, *334*, 173-182. In eng.

- 101. Lynam-Lennon, N., Maher, S.G., & Reynolds, J.V.** (2009). The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc*, *84*, 55-71. In eng.
- 102. Lytle, J.R., Yario, T.A., & Steitz, J.A.** (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 9667-9672.
- 103. Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., & Hoeijmakers, J.H.J.** (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*, 465-481.
- 104. Martinez-Carpio, P.A., Mur, C., Rosel, P., & Navarro, M.A.** (1999). Constitutive and regulated secretion of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in MDA-MB-231 breast cancer cell line in 11-day cultures. *Cell Signal*, *11*, 753-757. In eng.
- 105. Mathew, L.K., Huangyang, P., Mucaj, V., Lee, S.S., Skuli, N., Eisinger-Mathason, T.S.K., Biju, K., Li, B., Venneti, S., Lal, P., Lathia, J.D., Rich, J.N., Keith, B., & Simon, M.C.** (2015). Feedback circuitry between miR-218 repression and RTK activation in glioblastoma. *Science Signaling*, *8*, ra42-ra42.
- 106. Midwood, K.S., & Orend, G.** (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *3*, 287-310.
- 107. Mikels, A.J., & Nusse, R.** (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*, *25*, 7461-7468.
- 108. Moretti, F., Thermann, R., & Hentze, M.W.** (2010). Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA*, *16*, 2493-2502.

- 109. Ng, W.L., Yan, D., Zhang, X., Mo, Y.-Y., & Wang, Y.** (2010). Over-expression of miR-100 is responsible for the low-expression of ATM in the human glioma cell line: M059J. *DNA Repair*, *9*, 1170-1175.
- 110. Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X.H., Vanharanta, S., Tavazoie, S.F., Morris, P.G., Downey, R.J., Manova-Todorova, K., Brogi, E., & Massague, J.** (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med*, *17*, 867-874. In eng.
- 111. Pan, Q., Luo, X., & Chegini, N.** (2010). microRNA 21: response to hormonal therapies and regulatory function in leiomyoma, transformed leiomyoma and leiomyosarcoma cells. *Mol Hum Reprod*, *16*, 215-227. In eng.
- 112. Parray, A., Siddique, H.R., Kuriger, J.K., Mishra, S.K., Rhim, J.S., Nelson, H.H., Aburatani, H., Konety, B.R., Koochekpour, S., & Saleem, M.** (2014). ROBO1, a tumor suppressor and critical molecular barrier for localized tumor cells to acquire invasive phenotype: Study in African-American and Caucasian prostate cancer models. *International Journal of Cancer*, *135*, 2493-2506.
- 113. Patel, N., Garikapati, K.R., Pandita, R.K., Singh, D.K., Pandita, T.K., Bhadra, U., & Bhadra, M.P.** (2017). miR-15a/miR-16 down-regulates BMI1, impacting Ub-H2A mediated DNA repair and breast cancer cell sensitivity to doxorubicin. *Scientific Reports*, *7*, 4263.
- 114. Pichiorri, F., Suh, S.S., Ladetto, M., Kuehl, M., Palumbo, T., Drandi, D., Taccioli, C., Zanesi, N., Alder, H., Hagan, J.P., Munker, R., Volinia, S., Boccadoro, M., Garzon, R., Palumbo, A., Aqeilan, R.I., & Croce, C.M.** (2008). MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*, 12885-12890. In eng.

- 115. Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., & Lippincott-Schwartz, J.** (2007). *Cell Biology* Berlin u.a.: Spektrum. In eng.
- 116. Punnamoottil, B., Rinkwitz, S., Giacomotto, J., Svahn, A.J., & Becker, T.S.** (2015). Motor neuron-expressed microRNAs 218 and their enhancers are nested within introns of Slit2/3 genes. *genesis, 53*, 321-328.
- 117. Ransone, L.J., & Verma, I.M.** (1990). Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol, 6*, 539-557. In eng.
- 118. Reis-Filho, J.S., & Tutt, A.N.J.** (2008). Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology, 52*, 108-118. In English.
- 119. Richardson, K., Lai, C.Q., Parnell, L.D., Lee, Y.C., & Ordovas, J.M.** (2011). A genome-wide survey for SNPs altering microRNA seed sites identifies functional candidates in GWAS. *BMC Genomics, 12*, 504. In eng.
- 120. Robert-Koch-Institut** (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe.
- 121. Sampath, P., & Pollard, T.D.** (1991). Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry, 30*, 1973-1980. In eng.
- 122. Schulze, W.X., Deng, L., & Mann, M.** (2005). Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol, 1*, 2005 0008.
- 123. Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., & Haber, D.A.** (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer, 7*, 169-181. In eng.

- 124. Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y.B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S.-O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W.-C., Chen, C.-H., Hsu, J.L., Wu, Y., Lam, Y.C., James, B.P., Liu, X., Liu, C.-G., Patel, D.J., & Hung, M.-C.** (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature*, *497*, 383-387.
- 125. Sibilio, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B.M., Natarajan, A., Hecking, M., & Holcman, M.** (2007). The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation*, *75*, 770-787.
- 126. Simone, N.L., Soule, B.P., Ly, D., Saleh, A.D., Savage, J.E., Degraff, W., Cook, J., Harris, C.C., Gius, D., & Mitchell, J.B.** (2009). Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. *PLoS One*, *4*, e6377. In eng.
- 127. Song, L., Liu, S., Zhang, L., Yao, H., Gao, F., Xu, D., & Li, Q.** (2016). MiR-21 modulates radiosensitivity of cervical cancer through inhibiting autophagy via the PTEN/Akt/HIF-1alpha feedback loop and the Akt-mTOR signaling pathway. *Tumour Biol*, *37*, 12161-12168. In eng.
- 128. Song, Y., Zuo, Y., Qian, X.L., Chen, Z.P., Wang, S.K., Song, L., & Peng, L.P.** (2017). Inhibition of MicroRNA-21-5p Promotes the Radiation Sensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer Through HSMH2. *Cell Physiol Biochem*, *43*, 1258-1272. In eng.
- 129. Soria-Valles, C., Gutierrez-Fernandez, A., Guiu, M., Mari, B., Fueyo, A., Gomis, R.R., & Lopez-Otin, C.** (2014). The anti-metastatic activity of collagenase-2 in breast cancer cells is mediated by a signaling pathway involving decorin and miR-21. *Oncogene*, *33*, 3054-3063. In eng.

130. Sorkin Alexander, M.M., Sorkina Tatiana, Scotto Luigi, Beguinot Laura (1996). Epidermal Growth Factor Receptor Interaction with Clathrin Adaptors Is Mediated by the Tyr974-containing Internalization Motif. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 13377-13384.

131. Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D., Jr., Brenz, R., McGrath, C.M., Russo, J., Pauley, R.J., Jones, R.F., & Brooks, S.C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*, 50, 6075-6086. In eng.

132. Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 51, 1409-1416. In eng.

133. Sridharan, S., Mir, M., & Popescu, G. (2011). Simultaneous optical measurements of cell motility and growth. *Biomedical Optics Express*, 2, 2815-2820.

134. Sun, Q., Liu, T., Zhang, T., Du, S., Xie, G., Lin, X., Chen, L., & Yuan, Y. (2015). miR-101 sensitizes human nasopharyngeal carcinoma cells to radiation by targeting stathmin 1. *Molecular Medicine Reports*, 11, 3330-3336.

135. Sun, X., & Whittaker, G.R. (2007). Role of the actin cytoskeleton during influenza virus internalization into polarized epithelial cells. *Cell Microbiol*, 9, 1672-1682. In eng.

136. Tao, J., Lu, Q., Wu, D., Li, P., Xu, B., Qing, W., Wang, M., Zhang, Z., & Zhang, W. (2011). microRNA-21 modulates cell proliferation and sensitivity to doxorubicin in bladder cancer cells. *Oncol Rep*, 25, 1721-1729. In eng.

- 137. Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Kaneko, S., & Sugimachi, K.** (1990). Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res*, *50*, 7077-7080.
- 138. Thangavel, C., Boopathi, E., Ertel, A., Lim, M., Addya, S., Fortina, P., Witkiewicz, A.K., & Knudsen, E.S.** (2013). Regulation of miR106b cluster through the RB pathway: mechanism and functional targets. *Cell Cycle*, *12*, 98-111. In eng.
- 139. Thompson, L.H.** (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *751*, 158-246.
- 140. Trempe, G.L.** (1976). Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res*, 33-41. In eng.
- 141. Valerie, K., & Povirk, L.F.** (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, *22*, 5792-5812.
- 142. Velu, T.J., Beguinot, L., Vass, W.C., Willingham, M.C., Merlino, G.T., Pastan, I., & Lowy, D.R.** (1987). Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. *Science*, *238*, 1408-1410.
- 143. Venturutti, L., Cordo Russo, R.I., Rivas, M.A., Mercogliano, M.F., Izzo, F., Oakley, R.H., Pereyra, M.G., De Martino, M., Proietti, C.J., Yankilevich, P., Roa, J.C., Guzman, P., Cortese, E., Allemand, D.H., Huang, T.H., Charreau, E.H., Cidlowski, J.A., Schillaci, R., & Elizalde, P.V.** (2016). MiR-16 mediates trastuzumab and lapatinib response in ErbB-2-positive breast and gastric cancer via its novel targets CCNJ and FUBP1. *Oncogene*. In Eng.

- 144. Völler, D., Reinders, J., Meister, G., & Bosserhoff, A.K.** (2013). Strong reduction of AGO2 expression in melanoma and cellular consequences. *British Journal of Cancer*, *109*, 3116-3124.
- 145. Wannemacher, M.** (2013). *Strahlentherapie*. Berlin u.a.: Springer. In ger.
- 146. Weber, G.F.** (2007). *Molecular mechanisms of cancer*. Dordrecht: Springer. In eng.
- 147. Weidner, J., Cassens, U., Gohde, W., Wullenweber, J., & Greve, B.** (2013). A new triplex real time PCR which distinguishes between MRSA, MSSA, and mecA coagulase negative strains by means of melting point analysis using SYTO 9. *Clin Lab*, *59*, 795-804. In eng.
- 148. Wilson, K.J., Gilmore, J.L., Foley, J., Lemmon, M.A., & Riese, D.J., 2nd** (2009). Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther*, *122*, 1-8.
- 149. Wilson, V.G.** (2014). Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol*, *1195*, 33-41. In eng.
- 150. Woods, K., Thomson, J.M., & Hammond, S.M.** (2007). Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem*, *282*, 2130-2134. In eng.
- 151. Writing Group for the Women's Health Initiative, I.** (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*, *288*, 321-333.

- 152. Xia, W., Mullin, R.J., Keith, B.R., Liu, L.H., Ma, H., Rusnak, D.W., Owens, G., Alligood, K.J., & Spector, N.L.** (2002). Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene*, *21*, 6255-6263.
- 153. Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., & Rajewsky, K.** (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*, *9*, 405-414. In eng.
- 154. Yan, D., Ng, W.L., Zhang, X., Wang, P., Zhang, Z., Mo, Y.-Y., Mao, H., Hao, C., Olson, J.J., Curran, W.J., & Wang, Y.** (2010). Targeting DNA-PKcs and ATM with *miR-101* Sensitizes Tumors to Radiation. *PLoS ONE*, *5*, e11397.
- 155. Yang, J., & Weinberg, R.A.** (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, *14*, 818-829. In eng.
- 156. Yang, L., Xu, Q., Xie, H., Gu, G., & Jiang, J.** (2015). Expression of serum miR-218 in hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Clin Transl Oncol*. In Eng.
- 157. Yang, X.D., Xu, X.H., Zhang, S.Y., Wu, Y., Xing, C.G., Ru, G., Xu, H.T., & Cao, J.P.** (2015). Role of miR-100 in the radioresistance of colorectal cancer cells. *Am J Cancer Res*, *5*, 545-559. In eng.
- 158. Ye, W., Lv, Q., Wong, C.K., Hu, S., Fu, C., Hua, Z., Cai, G., Li, G., Yang, B.B., & Zhang, Y.** (2008). The effect of central loops in miRNA:MRE duplexes on the efficiency of miRNA-mediated gene regulation. *PLoS One*, *3*, e1719. In eng.

- 159. Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S., & Misra, A.** (2013). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials*, *34*, 8690-8707.
- 160. Yip, K.W., & Reed, J.C.** (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, *27*, 6398-6406.
- 161. Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., & Chédotal, A.** (2010). Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development*, *137*, 1939-1952.
- 162. Yu, S., Qin, X., Chen, T., Zhou, L., Xu, X., & Feng, J.** (2017). MicroRNA-106b-5p regulates cisplatin chemosensitivity by targeting polycystic kidney disease-2 in non-small-cell lung cancer. *Anticancer Drugs*, *28*, 852-860. In eng.
- 163. Zeng, K., Zheng, W., Mo, X., Liu, F., Li, M., Liu, Z., Zhang, W., & Hu, X.** (2015). Dysregulated microRNAs involved in the progression of cervical neoplasm. *Arch Gynecol Obstet*, *292*, 905-913. In eng.
- 164. Zhang, Y.G., Du, Q., Fang, W.G., Jin, M.L., & Tian, X.X.** (2008). Tyrphostin AG1478 suppresses proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Int J Oncol*, *33*, 595-602. In eng.
- 165. Zhang, Y.W., Nasto, R.E., Varghese, R., Jablonski, S.A., Serebriiskii, I.G., Surana, R., Calvert, V.S., Bebu, I., Murray, J., Jin, L., Johnson, M., Riggins, R., Ransom, H., Petricoin, E., Clarke, R., Golemis, E.A., & Weiner, L.M.** (2015). Acquisition of estrogen independence induces TOB1-related mechanisms supporting breast cancer cell proliferation. *Oncogene*.

166. Zhong, X., Chung, A.C., Chen, H.Y., Dong, Y., Meng, X.M., Li, R., Yang, W., Hou, F.F., & Lan, H.Y. (2013). miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, *56*, 663-674. In eng.

167. Zhou, X., Ren, Y., Moore, L., Mei, M., You, Y., Xu, P., Wang, B., Wang, G., Jia, Z., Pu, P., Zhang, W., & Kang, C. (2010). Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab Invest*, *90*, 144-155. In eng.

168. Zhu, K., Ding, H., Wang, W., Liao, Z., Fu, Z., Hong, Y., Zhou, Y., Zhang, C.Y., & Chen, X. (2016). Tumor-suppressive miR-218-5p inhibits cancer cell proliferation and migration via EGFR in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. In Eng.

6 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Universitäts-Professor Dr. med. Hans Theodor Eich bedanken, dass ich diese Arbeiten an Ihrer Klinik durchführen durfte. Ebenso gilt mein Dank Ihren ärztlichen und technischen Mitarbeitern, die die gewünschten Bestrahlungen der Zellen ermöglichten.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Martin Götte möchte ich für die Übernahme des Koreferates Danken sowie den stets interessanten Diskussionen als Hilfestellung. Außerdem gilt Ihrer ganzen Arbeitsgruppe, stellvertretend für alle Mitglieder, Frau Brigit Pers, ein herzliches Dankeschön.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. rer. nat. Burkhard Greve. Vielen Dank, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben diese interessanten Arbeiten in Ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen und sich immer Zeit für viele Diskussionen, Anregungen und die eine oder andere Hilfestellung genommen haben. Des Weiteren darf ich Herrn Dr. rer. medic. Jürgen Weidner und Herrn Timo Braun für Ihre Unterstützung und guten Diskussionen danken. Liebe Annette, vielen, vielen Dank, dass Du mich die letzten Jahre jeden Tag ertragen hast und mir immer hilfreich mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast!

Ohne meine Eltern hätte ich vermutlich nie Biologie studieren können und so niemals diese Arbeit anfertigen können. Vielen Dank!

Die letzten Dankesworte sind für die mittlerweile drei wichtigsten Menschen in meinem Leben, Imke, Clemens und Jakob. Meiner lieben Frau möchte ich sagen, DANKE, dass Du immer an mich geglaubt hast und mich nie hast Deine Unterstützung missen lassen. Clemens, entschuldige bitte, dass Du wegen meines teuren Hobbys -promovieren- schon so früh in die Kita musstest und nicht noch sorglos mit Mama zu Hause verweilen durftest. Ich liebe Euch drei!

7 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Franz-Josef Wischmann
Geburtsdatum: 25. März 1984
Geburtsort: Lippstadt

Hochschulausbildung:

Seit Mai 2012 – Promotionsstudium Medizinische Wissenschaften an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Oktober 2004 – April 2011 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt, Diplomarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie und Neurogenetik - Abschluss Diplom

Grundwehrdienst:

Juli 2003 – August 2004 Grundwehrdienst Bundeswehr

Schulbildung:

Juli 1994 – Juni 2003 Gymnasium Schloss Overhagen, Lippstadt
Abschluss Abitur

Juni 1990 – Juni 1994 Städtische Grundschule Benninghausen

Lippstadt, 03.11.2017

-Franz-Josef Wischmann-

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Nach der Ligandbindung dimerisiert EGFR und aktiviert nachgeschaltete Signalwege. Die Abbildung zeigt ein autoinhibiertes EGFR Molekül (1. v.l.). Bindet es seinen Liganden EGF richtet sich das Molekül um 130° auf (2. v.l.) und kann ein weiteres aktiviertes EGFR Molekül mit seinem Dimerisierungsarm (grün) binden (3. v.l.). Die EGFR Dimere phosphorylieren sich nun gegenseitig und können durch Phosphorylierung die nachgeschalteten Signalwege aktivieren (4. v.l.). (Verändert nach Pollard [115])..... 10

Abbildung 2: Die Transkription der pri-miR und das Spleißen der pre-miR finden im Nukleus statt. Aus den miR Genen werden durch die RNA-Polymerase II pri-miRs transkribiert und durch Drosha in pre-miRs gespleißt. Die pre-miRs werden durch Exportin 5 ins Cytoplasma entlassen. (Verändert nach Kim [73]) 16

Abbildung 3: Die pre-miR-218 besteht aus 112 Nukleotiden und nimmt die typische stem loop Sekundärstruktur ein. Das 5´ Ende ist oben links zu sehen und das 3´ Ende unten links. Der in hellblau hervorgehobene Bereich entspricht der späteren doppelsträngigen Sequenz der miR-218, der aus der pre-miR herausgeschnitten wird. 17

Abbildung 4: Die exportierte pre-miR wird im Zytoplasma aktiviert und kann so genregulatorisch wirken. Die Proteine Dicer, AGO und TRBP oder PACT bilden mit der pre-miR den RNA induced silencing complex (RISC). Diese drei Proteine prozessieren die pre-miR zur reifen miR, die dann mit der mRNA hybridisieren kann. (Verändert nach Kim [73]) 18

Abbildung 5: Gezeigt ist die Sequenz der reifen miR-218-5p. Die Auftragung von links nach rechts entspricht der 5´ nach 3´ Richtung. 19

- Abbildung 6:** Die miR-218 bildet bei der Hybridisierung mit der 3' UTR der EGFR mRNA eine 7mer seed site aus. Die thermodynamisch prognostizierten Bindungseigenschaften sind mit einem $p_{CT} < 0,1$ als schlecht anzusehen..... 19
- Abbildung 7:** Iosierende Strahlung verursacht DNA-Schäden wie den DSB. Die im fluoreszenzmikroskopischen Bild zu sehenden zwei SK-BR-3 Brustkrebszellen zeigen unmittelbar nach einer 2Gy Röntgen-Bestrahlung in ihren mit DAPI blau gefärbten Zellkernen, 15-20 γ H2AX-Foci (grün \leftarrow). γ H2AX-Foci gelten als molekularer Marker, wobei die Anzahl der Foci der Anzahl der DSBs pro Zellkern entspricht. 25
- Abbildung 8:** Gezeigt ist der Versuchsaufbau für die Bestrahlung von Zellen in well plates. Dazu nimmt der Strahlenkopf eine Öffnungsposition von 180° ein (links). Für eine homogene Bestrahlung sorgen unterhalb der Präparate 1,5cm Plexiglas und 2,0cm oberhalb des Präparates (rechts). 55
- Abbildung 9:** Gezeigt ist die Strukturformel des von Zygosporium mansonii gebildeten Mycotoxins Cytochalasin D, welches die Elongation von F-Aktin inhibiert..... 56
- Abbildung 10:** Gezeigt ist die Strukturformel des Tyrosin-Kinase Inhibitors Tyrphostin..... 56
- Abbildung 11:** Die verschiedenen Zelllinien zeigten eine breite Varianz in ihrer individuellen EGFR Expression. Die qRT-PCR Untersuchung diverser Zelllinien bezüglich ihrer EGFR Expression hat folgende fold change Werte in aufsteigender Reihenfolge ergeben: MCF-7 (1), BT474 (86,51), A549 (158,50), HaCat (261,06), MDA-MB-231 (365,14), SK-BR-3 (394,27), MCF-10 (1010,56), MDA-MB-468 (4471,65). (n=7, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) 64
- Abbildung 12:** Die verschiedenen Zelllinien zeigten eine breite Varianz in ihrer individuellen miR-218 Expression. Die qRT-PCR Untersuchung diverser Zelllinien bezüglich reifer miR-218 hat folgende fold change

Werte in aufsteigender Reihenfolge ergeben: MDA-MB-468 (0,02), SK-BR-3 (0,30), MCF-7(1), MCF-10 (2,50), BT474 (9,89), HaCat (10,14), A549 (10,34), MDA-MB-231 (27,52). (n=6, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).....65

Abbildung 13: Der Graph zeigt den Zusammenhang zwischen EGFR Expression und miR-218 Reifung. Für die Berechnung der linearen Regression wurden die Werte für MDA-MB-231 und MCF-7 nicht berücksichtigt. (n=6; r=0,63)66

Abbildung 14: Mittels Luciferase-Assay lässt sich die Bindung zwischen miR-218 und der EGFR mRNA beweisen. Die Luciferase-Aktivität in MDA-MB-231 Zellen nimmt signifikant 72h nach der Co-Transfektion des Plasmids und pre-miR-218 um 24,50% ab. (n=10, ** p<0,01)70

Abbildung 15: miR-218 reguliert sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressorgene. Die qRT-PCR Untersuchungen an mit pre-miR-218 transfizierten Zellen der Zelllinien MDA-MB-231, BT474 und A549 zeigten 24h nach Transfektion, dass miR-218 die mRNAs von Birc5, Birc6, Decorin, EGFR, Notch2, Robo1, TNC und Tob1 negativ post-transkriptional signifikant reguliert. (n=4, ** p<0,01)72

Abbildung 16: Der Einfluss von miR-218 ist auch auf Proteinebene deutlich. In der Western Blot Analyse ist klar zu erkennen, dass miR-218 72h nach der Transfektion zu einem deutlichen Rückgang von EGFR und Notch2 in MDA-MB-231, BT474 und A549 Zellen auf Proteinebene führt. (Repräsentative Abbildung, n=3).....73

Abbildung 17: Der Einfluss von miR-218 ist auch auf Proteinebene deutlich. Die Analysen mittels Durchflusszytometrie ergaben, dass sich die Transfektion von miR-218 nach 72h negative auf EGFR und Notch2 in MDA-MB-231 (■), BT474 (■) und A549 (■) auf Proteinebene auswirkte. (n=3, ** p<0,01, ***p<0,001)74

Abbildung 18: Durch den regulativen Einfluss von miR-218 auf EGFR wurden die nachgeschalteten Signalwege beeinflusst. Der Western Blot

zeigt deutlich, die verminderte Phosphorylierung von MAPK (phospho p44/42) in pre-miR-218 behandelten MDA-MB-231 Zellen 10min nach EGFR Aktivierung durch 100ng/ml EGF. Nach 20min ist dieser Effekt in den pre-miR-218 Proben wieder auf dem Ausgangsniveau, in den Kontroll-pre-miR Proben jedoch nicht. Die MAPK Grundform (p44/42) bleibt trotz der pre-miR-218 Transfektion und der EGF Applikation unverändert. (Repräsentative Abbildung, n=3).....75

Abbildung 19: Eine transiente Überexpression von miR-218 führt zu einer verminderten Motilität. Die Ergebnisse der Digitalen-Holographischen-Mikroskopie zeigten, dass sich MDA-MB-231 Zellen, die mit Kontroll-pre-miR behandelt wurden (A) durchschnittlich 62,51µm von ihrem Ursprungsort bewegten (C). Zellen die mit pre-miR-218 transfiziert wurden (B), bewegten sich signifikant weniger, durchschnittlich nur 41,50µm (C). (n=3, *p<0,05).....77

Abbildung 20: Eine transiente Überexpression von miR-218 führt zu einer Veränderung in Zelltrockenmasse und Zellgröße. Die Bilder der Digitalen-Holographischen-Mikroskopie lassen sich zusätzlich auf Veränderungen der projizierten Zelltrockenmasse und -fläche untersuchen. MDA-MB-231 Zellen die mit Kontroll-pre-miR transfiziert wurden vergrößerten ihre Trockenmasse von 6,45ng auf 11,14ng (A ■) und ihre Fläche nahm von 6059µm² auf 9961µm² zu (B ■). Zellen die mit pre-miR-218 behandelt wurden vergrößerten ihre Trockenmasse von 5,84ng auf nur 7,52ng (A ■) und ihre Fläche wuchs lediglich von 5924µm² auf 7192µm² (B ■). Die Digitale-Holographische Mikroskopie wurde in Kooperation mit dem Biomedizinischen Technologiezentrum des UKM durchgeführt. (n=3)79

Abbildung 21: Eine transiente Überexpression von miR-218 kann zu Komplikationen in der Mitose führen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, für die die DNA (Hoechst33342 ■) und Tubulin (■) gefärbt wurden, von MDA-MB-231 Zellen zeigen eine physiologische Mitose für Zellen mit Kontroll-pre-miR Transfektion, 24h vor der Beobachtung. Zellen die mit pre-miR-218 transfiziert wurden, sind häufig nicht in der

Lage die Mitose vollständig abzuschließen, da es ihnen nicht möglich ist die Chromosomen korrekt zu segregieren. Die Messung wurde in Kooperation mit dem Biomedizinischen Technologiezentrum des UKM durchgeführt. (Repräsentative Abbildung, n=3).....81

Abbildung 22: Eine transiente Überexpression von miR-218 führt zu einer Zunahme mitotischer Katastrophen. Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigt, dass miR-218 eine Erhöhung von mitotischen Katastrophen (D ■ DAPI, ■ Phalloidin-Alexa488) induziert. In MDA-MB-231 stieg der Anteil mitotischer Katastrophen um 5,59% (A ■), in BT474 um 3,07% (B ■) und in A549 um 4,26% (C ■). Durch einen transienten Birc5 Knock Down konnte dieser Phänotyp ebenfalls induziert werden (E ■ DAPI, ■ Phalloidin-Alexa488) und führte in MDA-MB-231 zu 5,66% mehr mitotischen Katastrophen (A ■), in BT474 zu 3,02% (B ■) und in A549 5,30% (C ■). (Repräsentative Abbildung in D und E, n=3, *p<0,05, **p<0,01) ..83

Abbildung 23: miR-218 vermindert die Agressivität von MDA-MB-231 Zellen. Der Invasions-Assay zeigt, dass miR-218 (C) die Fähigkeit von MDA-MB-231 zur Invasion signifikant auf 68% (A) gegenüber der Kontrolle (B) vermindert. Der Test wurde in Ko-operation mit dem Forschungslabor der Klinik für Frauenheilkunde des UKM durchgeführt. (Repräsentative Abbildung in B und C, n=3, ***p<0,001)84

Abbildung 24: Die Heat Map Darstellung der micro-Array Analyse, durchgeführt von der Firma Exiquon, zeigt die 50 miRs, die zueinander die größten Veränderungen in allen Proben aufwiesen. Die Proben der Gruppe A wurden nicht bestrahlt, aber mit Kontroll siRNA transfiziert. Mit EGFR siRNA wurden die Proben der Gruppe B behandelt. Gruppe B wurde ebenfalls nicht bestrahlt. Die Proben der Gruppe C wurden mit 2Gy bestrahlt und zuvor mit Kontroll siRNA transfiziert. Proben der Gruppe D wurde mit EGFR siRNA behandelt und mit 2Gy bestrahlt. (Ergebnis einer micro-Array Analyse, n=1; Validierung erfolgt in 3.4.1.1-3.4.1.4)86

Abbildung 25: Ionisierende Strahlung verändert die Expression bestimmter miRs. Mittels qRT-PCR wurden die miRs miR-19a, miR-15a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 in BT474 Zellen 4h nach einer 2Gy Bestrahlung quantifiziert. Die micro-Array Daten konnten hierdurch bestätigt werden. Die Kontroll siRNA behandelten Proben zeigten nach 2Gy eine Abnahme der getesteten miRs (■). Bei transientem EGFR Knock Down (■) konnte keine strahleninduzierte Reduktion nachgewiesen werden. (n=3).....88

Abbildung 26: Ionisierende Strahlung nimmt Einfluss auf den miR-Metabolismus. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten für die miRs miR-19a, miR-15a, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 eine Radiosensitivität in Form einer Herunterregulation 4h nach 5Gy Bestrahlung (■) in BT474 Zellen. Die miR-21 zeigt diesen Effekt nicht. Der transiente Knock Down von EGFR verhindert die miR Abnahme nach Bestrahlung (■). (n=3, * p<0,05)89

Abbildung 27: Die Exposition von ionisierender Strahlung veränderte die Reifung bestimmter miRs. Mittels qRT-PCR wurden die Veränderungen von miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 in A549 Zellen 4h nach einer Bestrahlung mit 2Gy untersucht. Zellen die mit Ktrl siRNA (■) 72h zuvor transfiziert wurden zeigten einen Rückgang der oben genannten miRs. Eine Transfektion mit EGFR siRNA (■) 72h vor Bestrahlung, inhibierte diesen Rückgang und führte im Fall von miR-15a und miR-106b zu einem deutlichen Anstieg. (n=3, *p<0,05, **p<0,01)91

Abbildung 28: Die miR Expression wurde durch ionisierende Strahlung verändert. Durch qRT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass in A549 Zellen die miRs miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218 4h nach einer Bestrahlung mit 5Gy herunterreguliert wurden (■). Proben mit EGFR siRNA (■) Behandlung wurden durch die Bestrahlung nicht negativ reguliert. (n=3, **p<0,01)92

Abbildung 29: Endozytose und die Funktionalität von Tyrosinkinase sind essentiell für den Einfluss von ionisierender Strahlung auf miRs. In BT474 führte die Inhibition der Endozytose oder der Tyrosinkinase dazu, dass die typische Strahlenantwort ausblieb. Es trat also kein Rückgang von miR-218 4h nach Bestrahlung in den mit Cytochalasin D (■) oder mit Tyrphostin (■) behandelten Proben ein. Die entsprechenden DMSO-Methanol-Kontrollen zeigten diesen Rückgang für miR-218 (■). (n=3, *p<0,05, **p<0,01)94

Abbildung 30: Ionisierende Strahlung veränderte die miR Expression nur, wenn Endozytose und Tyrosinkinase in ihrer Funktion nicht eingeschränkt sind. Die Inhibition von Endozytose mit Cytochalasin D (■) oder von Tyrosinkinase mit Tyrphostin (■) verhinderte den Rückgang von miR-218 4h nach Bestrahlung in A549 Zellen. Die DMSO-Methanol-Kontrollen (■) verhielten sich wie erwartet und zeigten einen Rückgang von miR-218. (n=3, *p<0,05)96

Abbildung 31: Ionisierende Strahlung verursachte eine Phosphorylierung von AGO2. Die Western Blot Analyse zeigte die Zunahme der Phosphorylierung von AGO2 in BT474 (A p-AGO2) und A549 (B p-AGO2) Zellen. Das Maximum war 1h nach einer 2Gy Bestrahlung mit ultraharter Röntgenstrahlung erreicht. In beiden Zelllinien hatte die Bestrahlung keinen Einfluss auf unphosphoryliertes AGO2. Die Subbande für p-AGO2 in der Zelllinie BT474 ist ohne Bedeutung und resultiert möglicherweise aus einer posttranslationalen Modifizierung. (Repräsentative Abbildung, n=5)98

Abbildung 32: Ionisierende Strahlung führte zu einer EGFR Translokation und einer erhöhten Endozytose-Aktivität. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung von mit 2Gy bestrahlten und unbestrahlten A549 Zellen, zeigte eine homogene EGFR Verteilung in der unbestrahlten Kontrolle (A ■) sowie einzelne frühe Endosomen (B ■). Ein Zusammenhang oder besondere Lokalisation zum Nukleus (C ■) war nicht zu erkennen. Die mit 2Gy bestrahlten Zellen zeigten 1h nach Bestrahlung eine Nukleus

assoziierte EGFR Akkumulation (D ■ →) und eine vermehrte
Aufkommen früher Endosomen (E ■), die vermehrt im Bereich der
Nukleus ständigen EGFR Akkumulation lokalisiert waren (F ■).
(Repräsentative Abbildung, n=5)..... 100

Abbildung 33: Eine Erhöhung der Endozytose-Aktivität und eine EGFR
Translokation konnten nach der Exposition von ionisierender Strahlung
beobachtet werden. Die konfokale fluoreszenzmikroskopische Analyse
der Immunfluoreszenzfärbung von bestrahlten und unbestrahlten
BT474 Zellen zeigte eine gleichmäßige EGFR Verteilung in den
unbestrahlten Kontrollen (A ■), mit geringer Endozytose Aktivität (B
■). Die Darstellung im Mehrkanalbild mit den DAPI gefärbten Nuklei
war unauffällig (C ■). BT474 Zellen die mit 2Gy bestrahlt wurden
zeigten nach 1h eine Akkumulation von EGFR (D ■ →) nahe der Nuklei
(F ■) und eine starke Endozytose-Aktivität (E ■). Die Endosomen
waren oft mit der EGFR Akkumulation co-lokalisiert. (Repräsentative
Abbildung, n=5)..... 103

Abbildung 34: Eine Bestrahlung führte nicht zu einer EGFR Neubildung.
Die Western Blot Analyse zeigte für keine der beiden Zelllinien, A549
(A) und BT474 (B), eine Veränderung der Gesamtmenge von EGFR
nach einer Bestrahlung mit 2Gy. Bei allen gemessenen Zeitpunkten
entsprach die relative Signalintensität der unbestrahlten Kontrolle.
(Repräsentative Abbildung, n=3)..... 104

Abbildung 35: EGFR wurde nach einer Strahlenexposition phosphoryliert.
Die Western Blot Analyse zeigt eine konstitutive Phosphorylierung von
EGFR in A549 Zellen in der unbestrahlten Kontrolle an Position Tyrosin-
1068. Zu den Zeitpunkten 20min, 30min und 1h nach einer
Bestrahlung mit 2Gy ist eine Zunahme von p-EGFR-Tyr-1068 zu
erkennen. Zu den Zeitpunkten davor und danach entspricht die
Signalstärke der Kontrolle. (Repräsentative Abbildung, n=5)..... 106

Abbildung 36: Eine Co-Lokalisation von EGFR und p-AGO2 ist eine Folge
von Bestrahlung. In den konfokalen fluoreszenzmikroskopischen

Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von mit 2Gy bestrahlten und unbestrahlten A549 Zellen 1h nach Bestrahlung zeigte sich deutlich die Phosphorylierung von AGO2 (C ■). Die Nukleus (D ■) assoziierte EGFR (D ■) Translokation war ebenfalls zu sehen. Der vergrößerte Ausschnitt von Bild D (□) zeigt die Co-Lokalisation von EGFR (■) und p-AGO2 (■). Die unbestrahlte Kontrolle zeigte ein schwaches AGO2 Signal (A ■) und eine homogene EGFR Verteilung (B ■). (Repräsentative Abbildung, n=5) 108

Abbildung 37: Ionisierende Strahlung führt zu einer Co-Lokalisation von p-AGO2 und EGFR. Auf den Bildern der konfokalen Laser Scan Mikroskopie der Immunfluoreszenz-färbung von mit 2Gy bestrahlten und unbestrahlten BT474 Zellen zeigte sich nach 1h in der 0Gy Kontrolle ein sehr schwaches p-AGO2 Signal (A ■). EGFR war in dieser Probe homogen verteilt (B ■). In der bestrahlten Probe zeigte sich eine Zunahme von p-AGO2, sowie eine Nukleus-ständige (D ■) EGFR (D ■) Akkumulation. Eine Vergrößerung von Bild D (□) zeigt die Co-Lokalisation von EGFR (■) und p-AGO2 (■) nach Bestrahlung. (Repräsentative Abbildung, n=5) 109

Abbildung 38: Internalisiertes EGFR inhibiert AGO2 durch Phosphorylierung als Strahlenantwort. Das neue Modell gibt schematisch den molekularen Ablauf der EGFR vermittelten Inhibition der miR Reifung nach Bestrahlung durch AGO2 Phosphorylierung wieder. Nach der Bestrahlung (A) wird strahlen-aktiviertes EGFR durch Endozytose internalisiert und phosphoryliert dabei AGO2 (B). p-AGO2 ist inaktiv und kann nicht mehr mit pre-miR, Dicer und TRBP den RISC bilden und es kommt zur Inhibition der miR Reifung (C)..... 119

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über die molekulare Klassifikation des Mammakarzinoms. [56]	5
Tabelle 2: Übersicht der EGFR überexprimierenden Tumorentitäten und das jeweilige prozentuale Auftreten der EGFR Überexpression. [53]	14
Tabelle 3: Pipettierschema für cDNA Synthese von total RNA Isolaten.	49
Tabelle 4: Pipettierschema für cDNA Synthese von total miR Isolaten..	50
Tabelle 5: Pipettierschema für einen PCR Ansatz.....	51
Tabelle 6: Pipettierschema für einen qPCR Ansatz mit SYTO9.	52
Tabelle 7: Pipettierschema für einen qPCR TaqMan® Assay Ansatz.	53
Tabelle 8: Pipettierschema für einen qPCR TaqMan® Assay Ansatz für mikro-RNAs.	54
Tabelle 9: Ergebnisse der Target Scan Human - Prediction of microRNA targets 6.2 Abfrage vom 12. September 2014.....	68
Tabelle 10: Übersicht über bereits experimentell validierte und publizierte Ziel mRNAs von miR-15a, miR-19a, miR-21, miR-100, miR-101, miR-106b und miR-218.....	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
κ	Kappa
λ	Lambda
π	Pi
A	Adenin
AGO2	Argonaut2
APS	Amoniumpersulfat
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutaed</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Birc	<i>Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMPR	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
BRCA1	Brustkrebs 1 (<i>Breast Cancer 1</i>)
BRCA2	Brustkrebs 2 (<i>Breast Cancer 2</i>)
C33	Bösartige Neubildung der Trachea
C34	Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge
C50	Bösartige Neubildung der Brüste
C	Cytosin
ca.	Circa
Casp7	Caspase7
cDNA	Komplementär-DNA (<i>complementary DNA</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DEPEC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
dNTP	Desoxy-Nukleotid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DHM	Digitale-Holographische Mikroskopie
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EEA1	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Groeth Factor Receptor</i>
ErbB	<i>Avian erythroblastosis oncogene B</i>
ESR	<i>Estrogen Receptor</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
G	Guanin
g	Gramm
Gy	Gray (1Gy = 1 Joule pro Kilogramm)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HR	Homologe Rekombination
HS3ST3B1	<i>Heparan Sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 3B1</i>
ICD10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IGF1R	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ktrl.	Kontrolle
kV	Kilovolt
L	Liter
LGR5	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5</i>
LSM	Laser Scan Mikroskop
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MeV	Megaelektronenvolt
mg	Milligramm
min	Minute
miR	mikro-RNA
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMP8	Matrixmetallopeptidase 8
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NFκB	<i>Nuclear Factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
NHEJ	<i>Non homologous End joining</i>
nM	Nanomolar

nt	Nukleotide
p53	Protein 53
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen	Penicillin
PFA	Para-Formaldehyd
pH	pons hydrogenium
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PLC γ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
r	Pearson Korrelationskoeffizient
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RB1	Retinoblastoma 1
RET	Rezeptor Tyrosin-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
Robo1	<i>Roundabout guidance receptor 1</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT3/5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3/5</i>
Strep	Streptavidin
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBST	TBS mit Tween20
TGF α	<i>Transforming Growth Factor α</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>

TGF- β -R	<i>Transforming Growth Factor β Receptor</i>
Tob1	<i>Transducer of ErbB-2 1</i>
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
U	Uracil
U	<i>Unit</i>
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
UKM	Universitätsklinikum Münster
UTP	Uracil-tri-Phosphat
UTR	Nicht translatierter Bereich (<i>un-translated region</i>)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/v	Gewicht/ Volumen (<i>weight/ volume</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität
z.B.	zum Beispiel