

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

**miR-142-3p – ein neuer Regulator der Invasivität und Motilität  
von MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Alexander Schwickert  
aus Haltern am See, Deutschland

2015

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Götte

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Burkhard Greve

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

Referent: Prof. Dr. Martin Götte

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Burkhard Greve

## **Zusammenfassung**

### **miR-142-3p – ein neuer Regulator der Invasivität und Motilität von MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen**

Schwickert, Alexander

Brustkrebs ist die in Deutschland häufigste bösartige Krebserkrankung der Frau. Die Ätiologie beruht sowohl auf endogenen Faktoren wie familiärer Häufung als auch auf exogenen Einflüssen. Im Zusammenhang mit der Pathogenese und einer möglichen Therapie von Brustkrebs werden unter anderem mikroRNAs, kleine, nicht-kodierende RNA-Moleküle, diskutiert. Diese Dissertation untersucht den Einfluss des miRNA-Moleküls miR-142-3p auf die Pathogenese von Brustkrebs. Um eine exogene Überexpression hervorzurufen, wurde die humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 mit einer Vorstufe von miR-142-3p transfiziert. Die so gewonnenen Proben konnten mittels verschiedener Gen- und Proteinexpressionsanalysen sowie funktioneller Assays untersucht werden. Dabei wurden Daten zu veränderten Eigenschaften der Invasivität, Migration und Proliferation erhoben, sowie die zugrundeliegenden Gene bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Hemmung von Invasivität und Motilität der MDA-MB-468-Zellen durch miR-142-3p. Unter den durch die miRNA regulierten Zielgenen war dabei *WASL* für die phänotypischen Veränderungen von besonderer Relevanz. Es kodiert für das Protein N-WASP, welches an der Signaltransduktion von Zelloberflächenrezeptoren zum Aktinzytoskelett beteiligt ist und daher für Tumorzellmigration und –invasivität von zentraler Bedeutung ist. Die negative Regulation des *WASL*-Gens durch miR-142-3p wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und 3'UTR-Luciferase-Assay bestätigt. Die Daten der vorliegenden Studie zeigen damit eine bislang unbekannte Rolle der mikroRNA miR-142-3p bei der Regulation der Invasivität und Motilität von Mammakarzinomzellen auf. Diese Ergebnisse könnten für zukünftige miRNA-basierte Therapien (triple negativer) Mammakarzinome von Bedeutung sein.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 2015

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„miR-142-3p – ein neuer Regulator der Invasivität und Motilität

von MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen“

in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,

unter Anleitung von Prof. Dr. Martin Götte:

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit 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.

Alexander Schwickert

Ort, Datum

Unterschrift

---

---

Für meine Familie.

*“Women are not dying because of diseases we cannot treat.*

*They are dying because societies have yet  
to make the decision that their lives are worth saving.”*

Dr. Mahmoud Fathala,

President of the International Federation of  
Gynaecology and Obstetrics (FIGO) from 1994 to 1997

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>4</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>Maßeinheiten</b> .....	<b>13</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>14</b>
1.1 Aufbau der weiblichen Brust .....	14
1.2 Das Mammakarzinom.....	14
1.2.1 Epidemiologie .....	15
1.2.2 Ätiologie .....	15
1.2.3 Lokalisation, Metastasierung und Rezidiv.....	16
1.2.4 Diagnose und Therapie des Primärtumors .....	18
1.2.5 Prognose und Prognosefaktoren .....	20
1.3 MDA-MB-468-Mammakarzinomzelllinie .....	21
1.4 Micro-RNA.....	21
1.4.1 Geschichte der microRNA .....	22
1.4.2 Biogenese.....	23
1.4.3 Beteiligung von microRNA an Pathogeneseprozessen.....	25
1.4.4 MicroRNA miR-142-3p.....	27
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>29</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>31</b>
3.1 Material .....	31
3.1.1 Materialien, Geräte und allgemeine Reagenzien .....	31
3.1.2 Zellkultur.....	32
3.1.3 Molekularbiologie, Immunhistochemie .....	33
3.1.4 Antikörper .....	36
3.1.5 Puffer und Lösungen.....	37
3.2 Methoden .....	40
3.2.1 Kultivierung der MDA-MB-468-Brustkrebszellen.....	41
3.2.2 Pre-mikro RNA Transfektion .....	41
3.2.3 Genexpressionsanalyse (1) - Quantitative Mikro Real-Time-PCR .....	42
3.2.4 Invasionsassay.....	46
3.2.5 Scratch-Assay .....	48

3.2.6	Proliferationsassay (MTT-Stoffwechselfest)	48
3.2.7	Zellgrößenbestimmung	49
3.2.8	Genexpressionsanalyse (2) - Quantitative Real-Time-PCR	50
3.2.9	Western Blots	52
3.2.10	3'UTR-Luciferase-Assay	58
3.2.11	Immunfluoreszenzmikroskopie	61
3.2.12	Statistik und Analytik	63
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
4.1	Überexpression der miR-142-3p – Quantitative Mikro Real-Time-PCR	64
4.2	Einfluss von miR-142-3p auf die Tumorzellinvasivität	65
4.3	Einfluss von miR-142-3p auf die Tumorzellmigration	68
4.4	Einfluss von miR-142-3p auf die Tumorzellproliferation	70
4.5	Einfluss von miR-142-3p auf die Tumorzellgröße	71
4.6	Genexpressionsanalysen zur Überprüfung der Regulation von Zielgenen	73
4.7	Expressionsanalyse der potenziell regulierten Zielgene auf Proteinebene	75
4.7.1	N-WASP	76
4.7.2	Integrin- $\alpha$ -V	77
4.7.3	Cofilin2, RAC1 und NOTCH1	78
4.8	Bestätigung der Regulation von N-WASP und Integrin- $\alpha$ V durch miR-142-3p	79
4.9	Immunfluoreszenzmikroskopie	81
4.9.1	N-WASP	81
4.9.2	Integrin- $\alpha$ -V	83
4.9.3	Vinculin	85
4.9.4	Cofilin2	86
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
5.1	miR-142-3p hemmt Invasivität und Motilität von MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen	88
5.2	Hauptzielgene und Wirkmechanismen von miR-142-3p	90
5.2.1	N-WASP ist essentiell für Aktinorganisation an Zonulae adhaerentes und für die Ausbildung von Invadopodien	90
5.2.2	Integrin- $\alpha$ V ist beteiligt an Migration, Invasion und Zellwachstum	94
5.3	Weitere potenzielle Zielgene von miR-142-3p	96
5.3.1	<i>RAC1</i> und <i>ROCK2</i> führen zu verminderter Zellgröße und veränderter Zellmorphologie	96
5.3.2	<i>KLF4</i> und <i>BOD1</i> : potenzielle Regulatoren der Proliferationsfähigkeit	98

5.3.3	<i>CFL2</i> und <i>NOTCH1</i> – zwei weitere Gene mit Bezug zu Migration und Invasivität.....	100
5.3.4	Nicht-zytoskelettassoziierte Proteine, die durch miR-142-3p reguliert werden.....	103
5.4	Kritische Beurteilung des Studienaufbaus.....	103
5.5	Fazit	106
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>133</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>134</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' untranslatierter Bereich
Abb.	Abbildung
<i>ADCY9</i>	Adenylate cyclase type 9
anti-miR	microRNA Inhibitor
APS	Ammoniumpersulfat
<b>BCA</b>	Bicinchoninic acid
BET	Brusterhaltende Therapie
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
<i>BOD1</i>	Biorientation of chromosomes in cell division 1
<b>CDC42</b>	cell division cycle 42
cDNA	copy desoxyribonucleid acid
<i>CFL2</i>	Cofilin 2
Cp	Crossing point
Ct	Cycle threshold
<i>COX1</i>	Cyclooxygenase-1
<b>DAPI</b>	4'6' Diamidin 2-phenylindol-dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	double distilled water/doppelt destilliertes Wasser
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Δ	Delta
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGF</i>	Epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	Et alii/und andere
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor
FKS	Fötales Kälberserum

<b>gDNA</b>	Genomic deoxyribonucleic acid
<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>GRB2</b>	growth factor receptor-bound protein 2
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>IF</b>	Immunfluoreszenzmikroskopie
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b><i>IL6ST</i></b>	Interleucin 6 signal transducer
<b>ITGAV</b>	Integrin- $\alpha$ V
<b><i>KLF4</i></b>	Krueppel-like factor 4
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleid acid
<b>miRNA</b>	micro ribonucleid acid
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
<b>n</b>	Stichprobenmenge
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NADH/NADPH</b>	Nicotinamidadenindinukleotid/-phosphat (reduzierte Formen)
<b>NaF</b>	Natriumfluorid
<b>NaVO<sub>3</sub></b>	Natriumvanadat
<b>NCK</b>	non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein
<b><i>NOTCH1</i></b>	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
<b>nt</b>	Nukleotidsequenzlänge der Aminosäuren
<b>N-WASP</b>	neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein
<b>O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub></b>	Sauerstoff/Kohlenstoffdioxid
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b><i>PGRMC2</i></b>	Progesterone receptor membrane component 2
<b>pH</b>	pondus/potentia Hydrogenii

pre-miR	precursor microRNA
pri-miR	primary microRNA
qPCR	quantitative Real-Time-PCR
<i>RAC1</i>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
<i>ROCK2</i>	Rho-associated protein kinase 2
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RISC	RNA induced silencing complex
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time Polymerasekettenreaktion
®	Copyright
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
<i>STS</i>	Steroid sulfatase
Taq	Thermus aquaticus
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
™	Unregistered Trade Mark
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like
WB	Western Blot
WIRE	WIp-RElated protein
z.B.	zum Beispiel

## Maßeinheiten

l	Liter
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
kg	Kilogramm
g	Gramm
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
ng	Nanogramm
m	Meter
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
h	Stunde
min	Minute
sek	Sekunde
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
M	Molar
mM	Millimolar
$\mu$ M	Mikromolar
mA	Milliampere
V	Volt
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
rpm	rounds per minute
Vol.	Volumen
%	Prozent

# **1 Einleitung**

## **1.1 Aufbau der weiblichen Brust**

Die voll ausgereifte weibliche Brustdrüse liegt dem M. pectoralis major auf und reicht von der dritten bis zur sechsten Rippe sowie vom Brustbein bis zur vorderen Axillarlinie. Sie entwickelt sich aus dem nicht zurückgebildeten Teil der paarigen embryonalen Milchleiste. Vom Brustmuskel ist sie durch die Muskelfaszie Fascia pectoralis sowie durch Fettgewebe getrennt. In ihrer Mitte befindet sich der mit Duftdrüsen (Glandulae areolares) versehene runde, pigmentierte Warzenhof (Areola mammae) mit der Brustwarze (Papilla mammae) im Zentrum.

Ein weißlicher Drüsenkörper, das Parenchym, bildet zusammen mit dem dazugehörigen Milchgangsystem die Brustdrüse. Diese ist von einem gelblichen Fettkörper umgeben. Kollagenes Stützgewebe erhält Form und Konsistenz der Brustdrüse und bildet zusammen mit ihr die Mamma.

Der Drüsenkörper wird in 15-24 Einzeldrüsen unterteilt (Lappen, Lobi), welche von Bindegewebe umgeben sind und sich weiter in Drüsenläppchen, sogenannte Lobuli, aufgliedern. Das sekretorische Organ sind die Drüsenendstücke (Acini), welche unter Einfluss des Hormons Prolactin Milch bilden. Die Ausführungsgänge der einzelnen Lobuli (Ductuli lactiferi) vereinigen sich zu 12-15 Hauptausführungsgängen (Ductus lactiferi), die auf der Brustwarze münden.

Der Lymphabfluss erfolgt hauptsächlich zur Achselhöhle über die Nodi lymphatici pectorales und interpectoriales (Level I), Nodi lymphatici axillares centrales und apicales (Level II) sowie die Nodi lymphatici infraclaviculares (Level III). Die Einteilung in Level I-III ist von Bedeutung für die Therapie des Mammakarzinoms.

## **1.2 Das Mammakarzinom**

Das Mammakarzinom ist ein bösartiger Tumor welcher vom Epithel der Drüsenlobuli oder der Milchgänge ausgeht. Je nach Ursprung spricht man von einem lobulären oder duktalem Karzinom [Stauber et al., 2005].

### **1.2.1 Epidemiologie**

Mit rund 70.000 Neuerkrankungen jährlich ist Brustkrebs in Deutschland die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau. Auf Basis der aktuellen Zahlen erkrankt rund jede achte Frau im Laufe ihres Lebens [Krebs in Deutschland 2009/2010]. Männer sind fast gar nicht betroffen. Nur einer von hundert Fällen betrifft männliche Individuen [Weiss et al., 2005]. Die Anzahl der brustkrebsbedingten Sterbefälle liegt bei 17.000 pro Jahr. Damit stellt Brustkrebs die häufigste Krebstodesursache bei Frauen in Deutschland dar. In Deutschland entfallen 32% der Malignomerkrankungen bei Frauen auf das Mammakarzinom. Dabei ist Brustkrebs eine Erkrankung, die im Vergleich zu anderen Tumoren relativ früh auftritt: ungefähr jede vierte betroffene Frau ist bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre, jede zehnte noch keine 45 Jahre alt [Krebs in Deutschland 2009/2010].

Mit zunehmendem Lebensalter steigt die Wahrscheinlichkeit zu erkranken. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 75%, die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 60%. Bei den 35- bis 55-jährigen Frauen (westliche Welt) ist Brustkrebs die häufigste Todesursache [Stauber et al., 2005].

Die in dieser Arbeit untersuchte triple-negative Form des Mammakarzinoms macht etwa 15%-20% aller Brustkrebsfälle aus. Im Falle des hereditären Mammakarzinoms steigt dieser Anteil sogar bis auf 75% [Brouckaert et al., 2012].

In mehreren Studien wurde herausgestellt, dass triple-negative Brustkrebsformen häufiger bei jüngeren Patientinnen sowie afrikanischstämmigen Amerikanerinnen und schwarzen Ethnien zu finden sind [Bauer et al., 2007; Carey et al., 2006; Lund et al., 2009; Morris et al., 2007; Stead et al., 2009].

### **1.2.2 Ätiologie**

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist nach wie vor nicht gänzlich geklärt. Es werden sowohl endogene Faktoren wie z.B. familiäre Häufung als auch exogene Faktoren diskutiert. Bisher sind zwei Tumorsuppressorgene bekannt, deren Mutation zu einem

höheren Erkrankungsrisiko führt. Das *BRCA1*-Gen befindet sich auf Chromosom 17q, das *BRCA2*-Gen liegt auf Chromosom 13q. In bis zu 80% aller Fälle von familiär vererbtem Brustkrebs findet sich eine Mutation im *BRCA1*-Gen [Stauber et al., 2005]. Neben der familiären Häufung von Mammakarzinomen ist aber auch das Auftreten von Ovarialkarzinomen in der Verwandtschaft als Risikofaktor belegt [Krebs in Deutschland 2009/2010].

Für die Mehrzahl der sporadischen Mammakarzinomfälle werden vorwiegend epidemiologische Risikofaktoren diskutiert. Dazu zählen vor allem Alter [Kessler, 1992], Geschlecht [Weiss et al., 2005], ethnische Zugehörigkeit [Devi et al., 2012] und sozioökonomische Faktoren [Carter Jones et al., 1989]. Eine Mastopathie, vor allem beim Auftreten von Atypien wie lobulären Neoplasien und atypischen duktalem Hyperplasien ist ebenso mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko verbunden. Auch eine frühe erste oder späte letzte Regelblutung, Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt werden mit einem höheren Risiko an Brustkrebs zu erkranken in Verbindung gebracht. In Studien konnte darüber hinaus ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei Übergewicht und Bewegungsmangel vor allem in der Postmenopause beobachtet werden. Ferner stellt Alkoholkonsum einen Risikofaktor dar. Zuletzt führt auch eine Hormonersatztherapie mit Östrogenen, alleine oder kombiniert mit Gestagenen, in und nach den Wechseljahren zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko [Krebs in Deutschland 2009/2010]. Hormonelle Kontrazeption beeinflusst es allerdings nur geringfügig [Cibula et al., 2010].

### **1.2.3 Lokalisation, Metastasierung und Rezidiv**

Das Mammakarzinom entsteht meist einseitig im oberen äußeren Quadranten der Brust (in 54% der Fälle). In 5-10% finden sich simultane Zweitkarzinome der kontralateralen Brust. Vom Entstehungsort breiten sich die Tumorzellen lokal-segmental in Milchgängen und Bindegewebssepten aus. Die weitere Ausbreitung findet über eine frühe hämatogene und lymphogene Aussaat statt. Das Mammakarzinom metastasiert dabei vor allem in die regionären Lymphknoten in der Axilla. Beim Nachweis von Lymphknotenabsiedlungen ist eine bereits erfolgte hämatogene Metastasierung

wahrscheinlich. Davon betroffen sind vor allem Skelettsystem, Pleura, Leber und Gehirn, in seltenen Fällen auch das Ovar. (Mikro-) Metastasen können lange Zeit unerkant bleiben und erst nach 15 oder mehr Jahren zu einer klinischen Symptomatik führen.

Beim Nachweis von Metastasen außerhalb der regionären Grenzen spricht man vom Stadium der Generalisation. Insbesondere zwischen Größe des Primärtumors, seiner Proliferationsfähigkeit und der Geschwindigkeit seiner metastatischen Ausbreitung besteht dabei eine positive Korrelation [Diedrich, 2007; Stauber et al., 2005]. Fernmetastasen treten bei ca. 10-15% der Mammakarzinompatientinnen innerhalb von drei Jahren nach Diagnosestellung auf, eine Manifestation ist allerdings auch zu späteren Zeitpunkten möglich [Heimann & Hellman, 2000]. Die Disseminierung von Tumorzellen erfolgt dabei in Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes [Acs et al., 2004], der Tumolvaskularisation und Angiogenese [Gasparini, 2001] sowie von Interaktionen mit der extrazellulären Matrix [Duffy et al., 2000; Wiczorek et al., 2012].

Rezidive werden in 5-10% der Fälle innerhalb von zehn Jahren nach Erstdiagnose beobachtet [Kreienberg et al., 2006]. Ihre Häufigkeit steht in Verbindung mit prognostischen Faktoren wie der Größe des Primärtumors, Lymphknotenbefall, histologischer Differenzierung und Hormonrezeptor-Status [Carter Allen et al., 1989; Elston & Ellis, 1991; Page et al., 1991].

Während Patientinnen mit Lokalrezidiven eine kurative Therapiechance besitzen, ist die Heilung von Brustkrebs im Stadium der Generalisierung nach heutigem Kenntnisstand nur im Ausnahmefall möglich [Heimann & Hellman, 2000].

Bedauerlicherweise befinden sich etwa zwei Drittel aller Mammakarzinome bei Diagnosestellung bereits im Stadium der Generalisierung. Dies wird vor allem auf okkulte Mikrometastasen und ins Knochenmark disseminierte Tumorzellen (DTC) zurückgeführt [Pierga et al., 2004].

#### **1.2.4 Diagnose und Therapie des Primärtumors**

Die Basis der Mammakarzinomdiagnostik bildet die Anamnese und klinische Untersuchung. Leitsymptom ist dabei der palpable Knoten, aber auch andere Symptome wie Hauteinziehungen (Plateauphänomen), intradermale Lymphödeme (Apfelsinenschalenphänomen), Mamillenretraktion oder blutige Sekretionen können so erfasst werden.

Weitere Untersuchungsmethoden sind die Sonographie der Brust oder die Mammographie. Letztere dient dem Erkennen von Mikrokalk als Hinweis auf ein Mammakarzinom und besitzt eine Sensitivität von 85-90% bei einer relativ geringen Spezifität. Sie ist Goldstandard bei der Früherkennung des Mammakarzinoms. Im Verdachtsfall kann hinzukommend eine Gewebeprobe per Stanzbiopsie entnommen werden um eine histologische Untersuchung anzuschließen [Stauber et al., 2005]. Eine bildgebende Diagnostik mittels MRT gehört nicht zur Routinediagnostik und wird nur in Einzelfällen zur Feststellung der lokoregionären Ausbreitung des Tumors genutzt [Kreienberg et al., 2012].

Die Therapie des Mammakarzinoms besteht aus einer Kombination von operativer und adjuvanter Therapie. In manchen Fällen findet darüber hinaus eine neoadjuvante Therapie ihre Anwendung [Gralow et al., 2008; Kreienberg et al., 2012].

Ziel der operativen Therapie ist dabei die vollständige Entfernung des Tumors im gesunden Gewebe. Sie wird entweder als brusterhaltende Therapie (BET) oder als modifizierte radikale Mastektomie (MRM) durchgeführt [Ho & Morrow, 2011]. Zusätzlich kann eine Lymphadenektomie durchgeführt werden. Diese wird heute regelhaft von dem Ergebnis einer Wächterlymphknotenbiopsie abhängig gemacht [Kreienberg et al., 2012; Kuehn et al., 2005].

Die adjuvante Therapie dient dazu, disseminierte Tumorzellen und okkulte Mikrometastasen zu zerstören, um so die Inzidenz von Rezidiv und Fernmetastasierung zu verringern [Kreienberg et al., 2006]. Sie gliedert sich in postoperative lokale Bestrahlung und systemische Therapie mittels Hormonen oder Zytostatika.

Die Radiotherapie kommt insbesondere bei pT3- oder pT4-Tumoren, Hautinfiltration und/oder Lymphangiosis zum Einsatz. Nach BET gilt sie zur Zeit als obligat [Kreienberg et al., 2012].

Grundsätzliche Kriterien für die Wahl zwischen endokriner Therapie und Chemotherapie stellen Menopausenstatus, Lymphknotenstatus, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, Tumorgröße sowie das histologische Grading dar [Stauber et al., 2005].

Das Wachstum von Mammakarzinomzellen wird durch Östrogen bzw. Progesteron reguliert, welche an die zugehörigen Rezeptoren binden. Daher ist der Östrogenentzug die wichtigste Methode der endokrinen Behandlung des Mammakarzinoms. Bei prämenopausalen Frauen werden Östrogene vor allem im Ovar produziert. Die Therapie basiert deshalb auf ovarieller Suppression durch Gabe von GnRH-Agonisten bzw. operativer ovarieller Ablation. Bei postmenopausalen Frauen wird der Hauptanteil der Östrogene durch Aromatisierung von Androgenen in Geweben wie Leber, Muskel oder vor allem im Fettgewebe synthetisiert. Daher werden in diesen Fällen Tamoxifen und Aromatase-Hemmer verwendet. Grundsätzlich stellt Tamoxifen die adjuvante Standardtherapie des (fraglich) endokrin ansprechbaren Mammakarzinoms dar.

Chemotherapie wird insbesondere bei starken Beschwerden, negativem Rezeptorstatus, rascher Progredienz der Tumorerkrankung oder Nichtansprechen auf endokrine Therapie in die Wege geleitet [Stauber et al., 2005].

Im Falle eines nodal-positiven Tumors oder eines nodal-negativen Tumors über 1cm Durchmesser mit Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (Her2/neu) werden die Patientinnen zusätzlich zur Chemotherapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab behandelt [Kreienberg et al., 2012].

Bei Brustkrebs mit negativem Östrogen-, Progesteron- sowie Her2/neu-Rezeptorstatus spricht man vom triple-negativen Mammakarzinom. Diese Form des Mammakarzinoms entzieht sich bisher der endokrinen Therapie und kann medikamentös nur mit Hilfe von Chemotherapeutika behandelt werden. Zurzeit laufen Studien mit Arzneimitteln, die über eine EGFR-Inhibition wirken oder deren Wirkmechanismen an der Poly(ADP-

ribose)-Polymerase oder Androgenrezeptoren angreifen. Bisher konnte in dieser Richtung allerdings noch keine wirksame und an unerwünschten Arzneimittelwirkungen arme Substanz gefunden werden [Hudis & Gianni, 2011].

### **1.2.5 Prognose und Prognosefaktoren**

Global betrachtet liegt die Heilungsrate von Brustkrebs bei ca. 40-45%. Die durch Früherkennungsprogramme in den letzten Jahren zugenommene Inzidenz wird dabei von einem Rückgang in der Mortalität der Erkrankung begleitet. Dieser ist bisher auf die verbesserte Therapie zurückzuführen. In Deutschland wird frühestens 2015 erkennbar sein, ob auch die Screening-Untersuchungen einen Teil zu der verminderten Sterblichkeit beitragen [Diedrich, 2007; Krebs in Deutschland 2009/2010].

Die anerkannten prognostischen Marker des Mammakarzinoms sind TNM-Status, axillärer Lymphknotenstatus, histologischer Subtyp und Grading sowie Hormonrezeptorstatus [Harris et al., 2007] und die immunhistochemische Wachstumsfraktion (Ki-67) [Banin Hirata et al., 2014]. Auch Alter [Van de Water et al., 2012] und Menopausenstatus [Pabalan et al., 2012] stellen klinisch bedeutsame Prognosefaktoren dar. Darüber hinaus sollte bei jeder Brustkrebspatientin der Her2/neu-Rezeptorstatus ermittelt werden, da dieser im positiven Falle sowohl mit einer schlechteren Prognose einhergeht als auch die Basis für eine nebenwirkungsarme Antikörpertherapie mit Trastuzumab darstellt [Harris et al., 2007].

Weitere diskutierte prognostische Marker umfassen zytometrische Parameter wie die Expression von E-Cadherin oder EGFR [Lostumbo et al., 2006] sowie molekularbiologische Marker wie den Verlust der Heterozygotie, Mikrosatelliten-Instabilität oder Chromosomenaberrationen [Kamat et al., 2012; Voegtly et al., 2012].

Die *American Society of Clinical Oncology* empfiehlt ferner die Marker CA 15-3, CA 27.29, Carcinoembryonales Antigen (CEA), Urokinase Plasminogen Aktivator, Urokinase Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 und einige Multiparameter-

Genexpressionsassays auf der Basis eines Reviews systematischer Reviews und Meta-Analysen publizierter Tumormarkerstudien [Harris et al., 2007].

### **1.3 MDA-MB-468-Mammakarzinomzelllinie**

MDA-MB-468-Zellen sind humane Mammakarzinomzellen des triple-negativen Subtyps [Giricz et al., 2012], die 1977 aus dem Pleuraerguss einer schwarzen 51 Jahre alten Patientin gewonnen wurden. Der Erguss trat einen Monat nach einer simplen Mastektomie mit nachfolgender Strahlentherapie der Brustwand und Lymphknotenareale auf. Zu diesem Zeitpunkt waren drei Monate seit dem letzten Zyklus der neoadjuvanten Chemotherapie vergangen. Im Anschluss erfolgte erneut Chemotherapie, die Patientin verstarb im März 1978, zwei Jahre nach Tumordiagnosestellung [Brinkley et al., 1980].

Die Zellen wurden von uns in DMEM *high glucose* kultiviert, das mit 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FKS supplementiert war (37 °C, 7,5% CO<sub>2</sub>). Sie wurden von Prof. B. Brandt (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

### **1.4 Micro-RNA**

MicroRNAs (miRNA) sind eine Familie von nicht-kodierenden RNAs mit einer Länge von jeweils 21 bis 25 Nukleotiden. Die miRNAs mit bisher charakterisierten Targets regulieren die Genexpression sequenzspezifisch negativ auf posttranskriptionaler Ebene [He & Hannon, 2004].

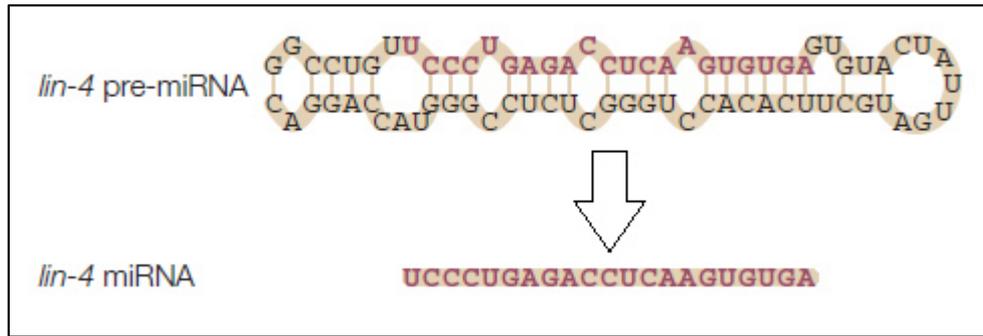
Man geht davon aus, dass alleine im menschlichen Organismus etwa 1000 miRNAs 30% der Aktivität aller proteinkodierenden Gene regulieren [Kurreck, 2009].

Dadurch ist es wahrscheinlich, dass miRNAs in fast jeden biologischen Prozess involviert sind. Nachweislich spielen sie unter anderem wie folgend beschrieben eine Rolle in der Karzinogenese verschiedener Organe. Die Möglichkeit durch Applikation synthetischer miRNA- oder miRNA-Inhibitor-Moleküle in den Stoffwechsel

eingzugreifen bietet eine faszinierende Aussicht auf ein zukünftig besseres Verständnis der komplexen Funktion dieser Moleküle und damit auf ihre Bedeutung für Diagnostik, Prognose und Therapie verschiedener Erkrankungen [Iorio et al., 2011].

#### **1.4.1 Geschichte der microRNA**

Mit ihrer Entdeckung vor 20 Jahren gehören miRNAs zu einem relativ neuen Kapitel der molekularbiologischen Forschung. Die zwei ersten miRNAs wurden ursprünglich in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* gefunden, wo sie für die zeitliche Regulation von Entwicklungsvorgängen verantwortlich sind. Zunächst stieß man 1993 bei einem Mutagenese-Screening auf die nichtkodierende RNA *lin-4* (Abb. 1), welche partiell komplementär zu sieben Abschnitten der 3'UTR des *lin-14*-Gens ist [Lee et al., 1993; Wightman et al., 1991]. Die Erkenntnis, dass die Expression des *lin-14*-Gens negativ durch die miRNA *lin-4* reguliert wird, gab die Inspiration für weitere Grundlagenstudien, die sich mit dem genauen Regulationsmechanismus beschäftigten [Ha et al., 1996; Olsen & Ambros, 1999; Wightman et al., 1993]. Sieben Jahre später, im Jahre 2000, wurde dann die zweite miRNA, *let-7*, gefunden [He & Hannon, 2004]. Ähnlich wie *lin-4* übernimmt auch *let-7* regulatorische Funktionen; es hemmt die Expression des *lin-41* Gens [Vella et al., 2004]. Nachdem *let-7* auch in Säugetieren nachgewiesen wurde, erhärtete sich der Verdacht, dass die Genregulation durch miRNAs einen in vielen multizellulären Organismen vorkommenden Mechanismus darstellt [Wienholds & Plasterk, 2005]. Seitdem sind hunderte microRNAs in fast allen Metazoengenomen identifiziert worden. Dazu zählen neben Würmern auch Fliegen, Pflanzen und Säugetiere [He & Hannon, 2004]. Die geschätzte Anzahl von miRNA-Genen entspricht damit rund 1% der vorhergesagten proteinkodierenden Gene jeder Spezies [Bartel, 2004].



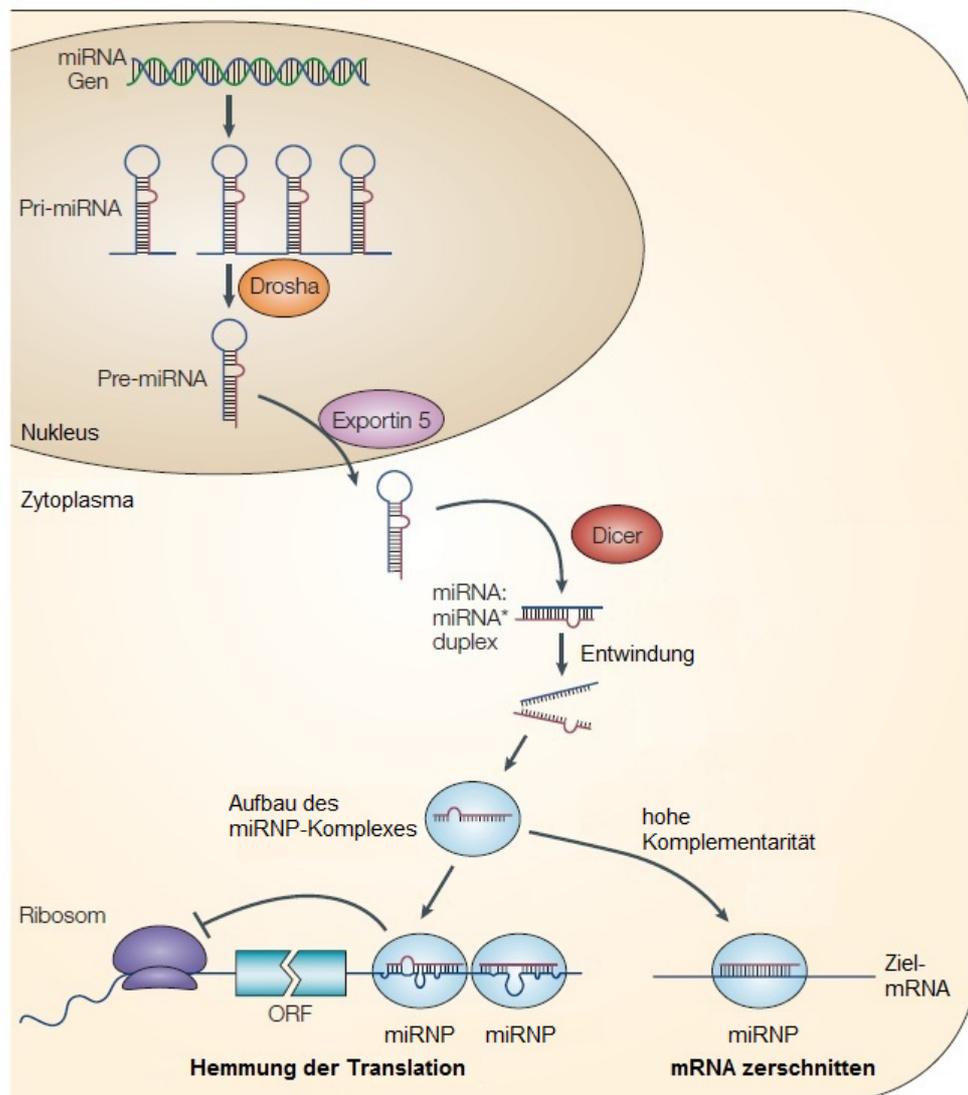
**Abb. 1** Beispielhafte Darstellung der reifen microRNA *lin-4* und ihrer pre-miRNA-Vorstufe (modifiziert nach He & Hannon, 2004)

Trotz vieler Forschung an microRNAs ist die genaue Rolle vieler dieser Moleküle in der Regulation der Genexpression bislang nicht vollständig geklärt. Insbesondere die Wirkmechanismen und Beziehungen von miRNAs, siRNAs und den Proteinkomponenten der RNA-Interferenz waren lange Zeit wenig beschrieben [He & Hannon, 2004]. Mittlerweile gehören miRNAs zu den am meisten untersuchten nicht-kodierenden RNA-Molekülen [Ling et al., 2013].

### 1.4.2 Biogenese

Die miRNA-Gene werden von RNA Polymerase II transkribiert. Es entstehen Primärtranskripte (*primary* microRNA, pri-miRNA), welche ein 5'-Cap und eine 3'-Polyadenylierung besitzen und sich zu einer Schleife zusammenlagern [Kim & Nam, 2006]. Die Gene befinden sich sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Introns von Hostgenen. Man nimmt daher an, dass die miRNA-Genexpression in diesen Fällen durch die Promotoren der Hostgene gesteuert werden kann [He & Hannon, 2004]. Das Primärtranskript wird von dem Ribonuklease III-Enzym *Drosha* zerschnitten (Abb. 2). Somit entsteht eine ca. 70 nt-lange miRNA-Vorstufe (*precursor* miRNA, pre-miRNA), welche mit Hilfe des Transporters Exportin 5 aus dem Nukleus heraustransportiert wird [He & Hannon, 2004]. Die pre-miRNA bildet eine charakteristische Haarnadelstruktur aus („*hairpin*“) und wird im Zytoplasma von der Ribonuklease III *Dicer* erneut in 21 – 25nt lange ds-miRNAs geschnitten. Das Produkt dieses Vorgangs ist ein miRNA-Duplex aus einer reifen miRNA und einem komplementären miRNA\*-Strang. Die reife miRNA wird in einen

Ribonukleoproteinkomplex aufgenommen (miRNP). Dieser wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zum RISC-Komplex der RNA-Interferenz auch als *miRNA-containing RNA-induced silencing complex (miRISC)* bezeichnet [Kim & Nam, 2006]. Er erkennt seine Ziel-mRNA durch unperfekte Basenpaarung und führt meistens zu Inhibition der Translation bzw. zu einer Destabilisierung der Ziel-mRNA. Hohe Komplementarität führt sogar zum Zerschneiden der mRNA durch den miRNP-Komplex [Wienholds & Plasterk, 2005].



**Abb. 2** Schematische Darstellung von Biogenese und posttranskriptionaler Hemmung bzw. mRNA-Abbau der microRNAs (modifiziert nach He & Hannon, 2004)

### **1.4.3 Beteiligung von microRNA an Pathogenese Prozessen**

Seit der Entdeckung von miRNAs in *Caenorhabditis elegans* wurden immer mehr Hinweise darauf gefunden, dass miRNAs wichtige regulative Rollen in molekularbiologischen Prozessen unterschiedlicher Organismen spielen. Sie nehmen dabei Einfluss auf Entwicklungs-, Differenzierungs-, Proliferations- und Apoptosevorgänge und sind daher an physiologischer Entwicklung beteiligt. Ihre abnorme Expression kann zur Pathogenese verschiedener Krankheiten beitragen. Erst jetzt beginnen wir die Mechanismen ihrer regulativen Funktion und damit ihre Bedeutung für die Physiologie verschiedener Organismen genauer zu verstehen [Erson & Petty, 2008].

Bisher konnten Einflüsse von miRNAs auf viele unterschiedliche Organsysteme des menschlichen Körpers nachgewiesen werden. Ob Angiogenese, Hämatopoiese, oder Lungenentwicklung: an diesen und vielen anderen Prozessen sind miRNAs beteiligt. Betrachtet man die vielen Orte, an denen miRNAs in die Funktion lebender Organismen eingreifen, ist es schnell verständlich, dass ihre Fehlexpression zur Entstehung von Krankheiten beitragen kann. Somit spielen die um die 20 Nukleotide langen Moleküle angefangen bei kardialer Hypertrophie, über die Pathogenese von Viruserkrankungen wie EBV oder HIV hinaus, bis hin zu neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle. Insbesondere bei der Kanzerogenese verschiedener Organe wurden veränderte miRNA-Expressionslevels festgestellt [Sayed & Abdellatif, 2011].

In einer vergleichenden Studie konnte ein Zusammenhang zwischen 15 überexprimierten und 17 unterexprimierten miRNAs und der Lymphknotenmetastasierung verschiedener Tumoren, inklusive des Mammakarzinoms hergestellt werden. Die Schlussfolgerung der Autoren ist nicht nur, dass miRNAs direkt in das Metastasierungsverhalten von Tumoren involviert sein können, sondern dass sie auch einen möglichen Weg der Charakterisierung von Zielgenen metastatischer Krebsleiden darstellen können [Baffa et al., 2009].

Dass auch die Verabreichung von miRNAs in die Blutbahn einen Effekt auf den Stoffwechsel eines Organismus haben kann, wurde unter anderem 2008 von der Arbeitsgruppe um Joacim Elmén gezeigt. Durch die intravenöse Applikation eines

chemisch modifizierten inhibitorischen miR-122-Antagonisten erreichten sie die Ausschaltung von miR-122 in der Leber von grünen Meerkatzen. Es kam so zu einer stabilen Verringerung des Cholesterinspiegels im Blut über zwei Monate [Elmén et al., 2008]. Vier Jahre später konnte gezeigt werden, dass die Gabe eines synthetischen miR-155-Antagonisten zu einer signifikanten Hochregulierung mehrerer Zielgene von miR-155 *in vivo* führt. Das Wachstum von in Mäusen transplantierten Lymphomzellen wurde so signifikant gesenkt [Yong Zhang et al., 2012]. Auch die Ausbreitung von Mammakarzinomzellen in Form von Lungenmetastasen konnte durch miR-10b-Antagonisten *in vivo* inhibiert werden [Ma et al., 2010].

Beim Mammakarzinom sind verschiedene miRNAs fehlreguliert [Tang et al., 2012]. Eine vergleichende Untersuchung der microRNA-Expression in gesundem Brustgewebe (n=10 (34 gepoolte Proben)) und in Mammakarzinomen (n=76) ergab signifikant veränderte Expressionslevels von 29 miRNAs und eine Gruppe von 15 miRNAs, anhand welcher man mit 100%iger Genauigkeit die Art des Gewebes (Tumor oder gesundes Brustgewebe) vorhersagen konnte. Ferner korrelierte die Expression einiger miRNAs mit Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, vaskulärer Infiltration, Proliferation sowie Lymphknotenstatus und damit der Prognose der Erkrankung [Iorio et al., 2005].

In einer weiteren Studie wurde der Zusammenhang zwischen metastasierenden Krebsformen und deren miRNA-Expression untersucht. Beim Mammakarzinom wurde in Metastasengewebe eine Hochregulation der Expression von miR-450a, miR-148a, miR-30b, miR-150 und miR-155 gefunden. MiR-99b, miR-125b, miR-205, miR-130b, miR-24, miR-99a waren hingegen herunterreguliert [Baffa et al., 2009].

Andere Studien zeigten eine Unterexpression der miR-200-Familie (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 und miR-429) sowie von miR-205 in Mammakarzinomzellen eines mesenchymalen Phänotyps [Gregory et al., 2008]. Die auch an der Frauenklinik in Münster untersuchte miR-10b wird stark von metastatischen Brustkrebszellen exprimiert und reguliert Zellmigration und Invasionsverhalten [Ma et al., 2007]. Nach wie vor werden miRNAs untersucht, von deren Verständnis man sich einen Nutzen für die Behandlung von Brustkrebs verspricht [Luo et al., 2014].

Die Erforschung der Rolle von microRNAs im Pathomechanismus des Mammakarzinoms ist insbesondere aus drei Gründen interessant: Erstens lässt sie sich aufgrund bestimmter miRNA-Expressionsmuster theoretisch in der Differentialdiagnostik von Primärtumoren und deren Metastasen nutzen. Zweitens kann sie bei der Prognoseeinschätzung der Erkrankung helfen und drittens ist sie die Basis von miRNA-basierten Therapieansätzen im Sinne einer individuellen Medizin [Baffa et al., 2009; Tang et al., 2012, Kurisetty et al., 2014].

#### **1.4.4 MicroRNA miR-142-3p**

MiR-142-3p ist ein 23 Nukleotide-langer Ausschnitt von miR-142 mit der Sequenz:

UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA

(NCBI-Datenbank, Gene ID: 406934)

Sie befindet sich auf Chromosom 17q22. Nach ihrer Erstbeschreibung [Brown et al., 2006] wurde diese microRNA neben Endometriose [Ohlsson Teague et al., 2009] vor allem im Rahmen von hämatopoietischer Stammzellendifferenzierung [Bissels et al., 2011], Immunsystem [Huang et al., 2009] und hämatookologischer Forschung untersucht [Flamant et al., 2010; Ju et al., 2009]. Insbesondere im Jahr 2012 sind weitere Felder potenzieller regulativer Aktivität dieser miRNA erforscht worden. Darunter Kardiomyopathie [Bagnall et al., 2012; Sharma et al., 2012], allergische Reaktionen [Lu et al., 2012], Depressionen [Smalheiser et al., 2012] sowie das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) [Gottwein, 2012].

In Verbindung mit der Karzinogenese verschiedener Organe ist miR-142-3p beim klarzelligen Nierenkarzinom [Juan et al., 2010], nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) [Hennessey et al., 2012], hepatozellulären Karzinom [Wu et al., 2011], Kolonkarzinom [Schepeler et al., 2008], Schilddrüsenkarzinom [Marini et al., 2011], Osteosarkom [Lulla et al., 2011] und bei Tumoren des Urogenitaltraktes [Li et al., 2011] beschrieben worden. MiR-142-3p wurden dabei in unterschiedlichen Publikationen sowohl Tumorsuppressor- als auch als onkogene Eigenschaften zugewiesen.

Die Rolle von miR-142-3p bei der Pathogenese des Mammakarzinoms ist bisher wenig beschrieben. In einer Untersuchung von Operationsbiopsaten konnte gezeigt werden, dass die Expression von miR-142-3p mit dem triple-negativen Subtyp des Mammakarzinoms korreliert [Janssen et al., 2010]. Es handelt sich dabei um eine besonders aggressive Tumorentität welche aufgrund eines Mangels an Steroidhormonrezeptoren und einer fehlenden Her2/neu-Expression immun gegen verschiedene neue Therapien ist [Teng et al., 2011].

Eine weitere Studie an MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen zeigte eine Hochregulation von miR-142-3p in hoch knocheninvasiven Karzinomzellen im Vergleich zu den ursprünglichen MDA-MB-231-Zellen [Pollari et al., 2012].

Die Arbeitsgruppe um Stefano Volinia spricht miR-142-3p aufgrund einer Studie an 80 Biopsien des invasiven duktales Karzinoms (IDC), acht des duktales Karzinoms in situ (DCIS) und sechs von gesundem Brustgewebe eine inverse Beziehung zum Invasionsrisiko von Mammakarzinomen zu. Sie führen dies allerdings auf die Funktion der miRNA als intrazellulären Bestandteil von Leukozyten zurück [Volinia et al., 2012].

Insgesamt liegt ein Zusammenhang zwischen der Pathogenese des Mammakarzinoms und einer fehlregulierten Expression von miR-142-3p nahe. Bisher wurden allerdings noch keine *in vitro*-Experimente zur Quantifizierung der Einflussnahme von miR-142-3p sowie der zugrundeliegenden Mechanismen durchgeführt.

Vorläufige Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass miR-142-3p die Motilität und Invasivität von Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 moduliert. Dabei wurden als erste Zielstrukturen die GTPase *RAC1* und die Integrin-Untereinheit *Integrin- $\alpha$ V* identifiziert.

*RAC1* ist dabei eine kleine GTPase die die Ausbildung von Filopodien reguliert [Fukata et al., 2003], während *Integrin- $\alpha$ V* eine Untereinheit eines membrangebundenen Matrixrezeptors darstellt, welcher die Zellmotilität beeinflusst [Hou et al., 2011; Yoshioka et al., 2010].

Studien an weiteren Zelllinien bzw. Hinweise auf andere Zielstrukturen lagen zum Zeitpunkt der Arbeit nicht vor.

## 2 Fragestellung

Nachdem ein Zusammenhang von Tumorgenese des Mammakarzinoms und Fehlregulation verschiedener miRNAs bekannt ist, stellt sich die Frage nach den konkreten molekularbiologischen Mechanismen, die der Einflussnahme von miRNAs zugrunde liegen. In der Arbeitsgruppe der Frauenklinik in Münster wurde in der Vergangenheit an den Einflüssen von miR-142-3p in MDA-MB-231- und MCF-7-Mammakarzinomzellen geforscht. Es zeigte sich ein reproduzierbarer Einfluss auf Proteinsynthese und Zellverhalten. Wir gehen daher davon aus, dass miR-142-3p auch in MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen über ähnliche Mechanismen in die Modulation des Zytoskeletts eingreift.

Das Ziel dieser Studie ist daher eine molekulare Charakterisierung der Rolle von miR-142-3p bei der Regulation von Zellinvasivität, -motilität und -proliferation in Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-468 mit Hilfe eines ektopen *in vitro*-Überexpressionsansatzes. Dabei soll anhand von pre-miR-142-3p-, Kontroll-miRNA-sowie mit einer inhibitorischen anti-miR-142-3p-transfizierten MDA-MB-468-Zellen herausgefunden werden, welche Zielgene und Zielproteine in ihrer Expression durch miR-142-3p reguliert werden. Die funktionellen Studien werden zur Identifizierung und Bestätigung von miR-142-3p-*Targets* mittels qPCR und Western Blotting validiert. Vorausgesagte Zielgene sind dabei *RAC1* und *Integrin- $\alpha$ V*, welche sich in vorangegangenen Studien reguliert gezeigt haben sowie weitere potenzielle Zielgene, die mit Hilfe einer *Affymetrix Genarray*-Analyse von MDA-MB-231-Zellen ermittelt wurden. Zur Bestätigung direkter Regulation ermittelter *Targets* werden 3'-UTR-Luciferase-Aktivierungs-Assays benutzt.

Der Einfluss von miR-142-3p auf die differenzielle Genexpression und damit auf die zytoskelettale Morphologie und Funktion wird mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie beleuchtet. Es ist davon auszugehen, dass sich das Potential von miR-142-

3p in Bezug auf eine mögliche Anwendung in der Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms durch diese Untersuchungen besser einschätzen lässt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Materialien, Geräte und allgemeine Reagenzien

Konfokales Lasermikroskop Leica DMIRE2	Leica, Solms
Fluoreszenzmikroskop Leica DMLB	Leica, Solms
Block Heater	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
Mini PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad, München
Trans-Blot SD semi-dry Transfer cell	Bio-Rad, München
Magnetrührer (beheizbar)	Ikamag® Ret, Ika-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Axiovert-100	Zeiss, Jena
SafeLock-Tubes 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
PCR Gefäß 0,5ml	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktor (Real-Time-PCR)	7300 Real-Time-PCR System Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler TGradient, TPersonal	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Zellkultur Multifuge 3 S-R	Kendro-Heraeus, Berlin
Zentrifuge Biofuge fresco	Kendro-Heraeus, Berlin
Inkubator	WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen
Messpipette costar® STRIPETTE® (5ml, 10ml)	Corning New York, USA
Vortex-2 Genie	Scientific Industries, New York, USA
Eppendorf Research-Kolbenhubpipetten (20, 50, 100, 200, 1000, 5000µl)	Eppendorf, Hamburg
2µl-Kolbenhubpipette	Gilson, Middleton, USA
Achtfach-Pipette	Eppendorf Research, Hamburg
Accu-jet®-Pipettierhelfer (5, 10ml)	Brand, Wertheim
Menzel-Gläser Objektträger	Thermo scientific, Braunschweig

Runde Menzel-Deckgläser 12mm	Thermo scientific, Braunschweig
Einschlussmittel Eukitt®	O. Kindler GmbH, Freiburg
ELISA-Reader VersaMax® Microplate	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Feinwaage TE 214S-oCE	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophorese-Spannungsquelle (max. 300 V) PowerPac® 200	Bio-Rad, München
Vectashield Einbettungsmedium	Vector Laboratories, Burlingame, Canada
Inkubator BB6060	Kendro-Heraeus, Berlin
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Photometer-Küvetten UVette®	Eppendorf, Hamburg
Thermo Mixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Dulbecco's PBS (10x)	PAA, Pasching, Österreich
TrisHCl	Roth, Karlsruhe
1-Butanol	Merck, Darmstadt

### 3.1.2 Zellkultur

DMEM <i>high glucose</i> (4,5 g/l)	PAA, Pasching, Österreich
DMEM <i>high glucose</i> (4,5 g/l) ohne Phenolrot	PAA, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100-fach)	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA (0,05%, einfach)	PAA, Pasching, Österreich
Petrischale 60mm x 15mm	SPL Life sciences
Zellkulturschale 100mm x 20mm	Corning®, NY, USA
Mediumflasche Tissue Culture Flask 75cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Newton, USA
Zellschaber	Costar® Zellschaber, Vitaris AG, Baar
Falcon-Tube	Corning®, NY, USA
Tissue culture plate (6-, 24-, 96-well)	Sarstedt, Newton, USA

Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zählkammer nach Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

### 3.1.3 Molekularbiologie, Immunhistochemie

#### 3.1.3.1 miRNA-Transfektion

hsa-miR-142-3p pre-miR®™ miRNA Precursor	Ambion, Darmstadt
hsa-miR-142-3p anti-miR™ miRNA	Ambion, Darmstadt
Pre-miR™ negative control #2	Ambion, Darmstadt
RNAse-freies Wasser	analytikjena, Jena
Dharmafect Transfektionsreagenz	Thermo scientific, Braunschweig
Opti-MEM®	Gibco, New York, USA

#### 3.1.3.2 RNA-Isolation, Umschreiben in cDNA und Real Time quantitative PCR

innuPREP RNA Mini Kit zur RNA-Isolation	analytikjena, Jena
First Strand cDNA Synthesis Kit #K1612	Fermentas, St. Leon-Rot
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, Canada
TaqMan® 2xPCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, Canada

#### 3.1.3.3 TaqMan®-Sonden für die Real Time quantitative PCR

Die TaqMan-Sonden für die Real Time quantitative PCR wurden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) bezogen. Detaillierte Sequenzinformationen zu den einzelnen Sonden sind unter der Adresse [www.appliedbiosystems.de](http://www.appliedbiosystems.de) erhältlich.

**mRNA**                      **Sondenbezeichnung**

<i>I8S</i>	Hs99999901_s1
<i>ADCY9</i>	Hs00181599_m1
<i>RAC1</i>	Hs01902432_s1
<i>ROCK2</i>	Hs00153074_m1
<i>EGF</i>	Hs00153181_m1
<i>ITG<math>\alpha</math>V</i>	Hs00233808_m1
<i>KLF4</i>	Hs00358836_m1
<i>IL6ST</i>	Hs00174360_m1
<i>NOTCH1</i>	Hs00413187_m1
<i>PGRMC2</i>	Hs01128672_m1
<i>STS</i>	Hs00165853_m1
<i>COX1</i>	Hs00377721_m1
<i>WASL</i>	Hs00187614_m1
<i>CFL2</i>	Hs01071313_g1
<i>BOD1</i>	Hs00825888_mH

**miRNA**                      **Sondenbezeichnung**

Hsa-mir-142-3p	TM 000464
<i>RNU6B</i>	TM 001093

**3.1.3.4 MTT-Assay**

MTT-Pulver

Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.1.3.5 Invasionsassay

Invasionsassays BD BioCoat® Matrigel® Invasion Chamber	Becton & Dickinson Biosciences, Heidelberg
Diff-Quick Färbeset (Färbelösung I,II, Fixierlösung)	Medio Diagnostics, Düringen, Schweiz

### 3.1.3.6 Proteinlyse und Western Blot

Zellschaber	Sarstedt, Newton, USA
Pierce® BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Rockford, USA
BSA, bovine serum albumin	PAA, Pasching, Österreich
Acrylamidlösung 30%	Bio-Rad, München
TEMED	Bio-Rad, München
Butanol	Merck, Darmstadt
Blotting Papier	Albet LabScience, Dassel
β-Mercaptoethanol	Merck-Schuchard, Hohenbrunn
Marker	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Amersham™ Hybond™-ECL	
Verdünnungspuffer für prim. AK (Skim Milk)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau-S Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Rockford, USA
TritonX-100	Merck, Darmstadt
Pierce® ECL-Lösungen	Thermo Scientific, Rockford, USA
Super Signal® West Pico Trial Kit	
Hypercassette™	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Entwickler	AGFA, Mortsel, Belgien
Fixierer	AGFA, Mortsel, Belgien
CL-XPosure™ Film 18x24cm	Thermo Scientific, Rockford, USA

1%ige Essigsäure

### 3.1.3.7 Luciferase-Genexpressionskontrolle

LucPair™ miR Dual Luciferase (Firefly and Renilla) Assay Kit GeneCopoeia, Rockville, USA  
Plasmid: miRNA Target sequence 3'UTR expression clone 378ng/ul GeneCopoeia, Rockville, USA  
Luminometer: MicroLumat Plus LB 96V Berthold Technologies, Bad Wildbad

### 3.1.4 Antikörper

#### 3.1.4.1 Primäre Antikörper

Spezifität	Typ	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Tubulin	Monoklonal, Maus	1:4 000 WB	Sigma-Aldrich, Steinheim
Notch1 (C-20)	Polyklonal, Ziege	1:1 000 WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Rac1	Monoklonal, Maus	1:1 000 WB	BD Transduction Laboratories
ITGαV	Polyklonal, Kaninchen	1:1 000 WB	Cell Signaling, Billerica, USA
Cofilin2	Polyklonal, Ziege	1: 1 000 WB 1:100 IF	abcam, Cambridge, UK
N-WASP	Monoklonal, Kaninchen	1: 1 000 WB 1:100 IF	Cell Signaling, Billerica, USA
Vinculin	Monoklonal, Maus	1:100 IF	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.1.4.2 Sekundäre Antikörper für Western Blots

Spezifität	Konjugat	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Rabbit anti-goat IgG	Peroxidase konjugiert	1:10 000	Calbiochem, Darmstadt
Goat anti-rabbit IgG	Peroxidase konjugiert	1:2 000	Calbiochem, Darmstadt
Goat anti-mouse IgG	Peroxidase konjugiert	1:10 000	Calbiochem, Darmstadt

### 3.1.4.3 Sekundärreagentien für Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Spezifität	Konjugat	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
goat-anti-rabbit IgG	Alexa Fluor® 488 (grüne Fluoreszenz)	1:500	Invitrogen, Eugene, USA
rabbit-anti-goat IgG	Alexa Fluor® 488 (grüne Fluoreszenz)	1:500	Invitrogen, Eugene, USA
donkey-anti-mouse IgG	Alexa Fluor® 488 (grüne Fluoreszenz)	1:500	Invitrogen, Eugene, USA
Phalloidin	Alexa Fluor® 568 (rote Fluoreszenz)	1:1000	Invitrogen, Eugene, USA

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

RIPA-Puffer (Gesamtvolumen 50ml)

20mM	TrisHCl pH7,4
137mM	NaCl
1%	Triton X-100
2mM	EDTA

Inhibitoren kurz vor Benutzung zugeben (für 1ml RIPA-Puffer):

10µl	Proteinase-Inhibitorcocktail	[Sigma-Aldrich, Steinheim]
10mM	NAF	[Sigma-Aldrich, Steinheim]
1mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	[Sigma-Aldrich, Steinheim]
10mM	β-Glycerolphosphat	[Sigma-Aldrich, Steinheim]

5x SDS-Additiv-Lösung (Gesamtvolumen 10ml)

1ml	1M TrisHCl, pH 6,8	
2,5ml	Glycerol	
5ml	10% SDS	
1,5ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	
0,5mg	0,1% Bromphenolblau	Merck

MTT-Assay-Stopp-Puffer (pH 4,7)

10%	SDS	
50%	N.N-Dimethylformamid	

Blockierlösung für Immunfluoreszenz-Mikroskopie

1:10 BSAc Aurion in PBS

Antikörper-Verdünnungslösung für Immunfluoreszenz-Mikroskopie

1%BSA in PBS

Laufpuffer (5x-Stammlösung, 1L, pH 8,8)

0,5M	TrisHCl	
1,92M	Glycin	
0,5%	SDS	

Für Elektrophorese auf 1x verdünnt

Blockingpuffer

100ml	1x TBST	
2,5%	Magermilchpulver (Skim Milk)	

Blottingpuffer (10x-Stammlösung, 1L, pH 8,4)

0,25M TrisHCl

1,92M Glycin

1x Blottingpuffer: 100ml Stock + 200ml Methanol + 700ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Strippinglösung (1L, pH 2,5)

0,1M Glycin

0,15M NaCl

1L H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Verdünnungspuffer für primären Antikörper

10ml 1x TBST

0,5% BSA

TBS (10x-Stammlösung, pH 7,6)

10mM TrisHCl

150mM NaCl

Zum Gebrauch auf 1x verdünnt und mit 0,1% Tween 20 versetzt (TBST)

Trenngelpuffer (2,5fach, Gesamtvolumen 100ml, pH 8,9)

1,875M TrisCl

0,25% SDS

Sammelgelpuffer (5fach, Gesamtvolumen 100ml, pH 6,7)

0,3M TrisCl

0,5% SDS

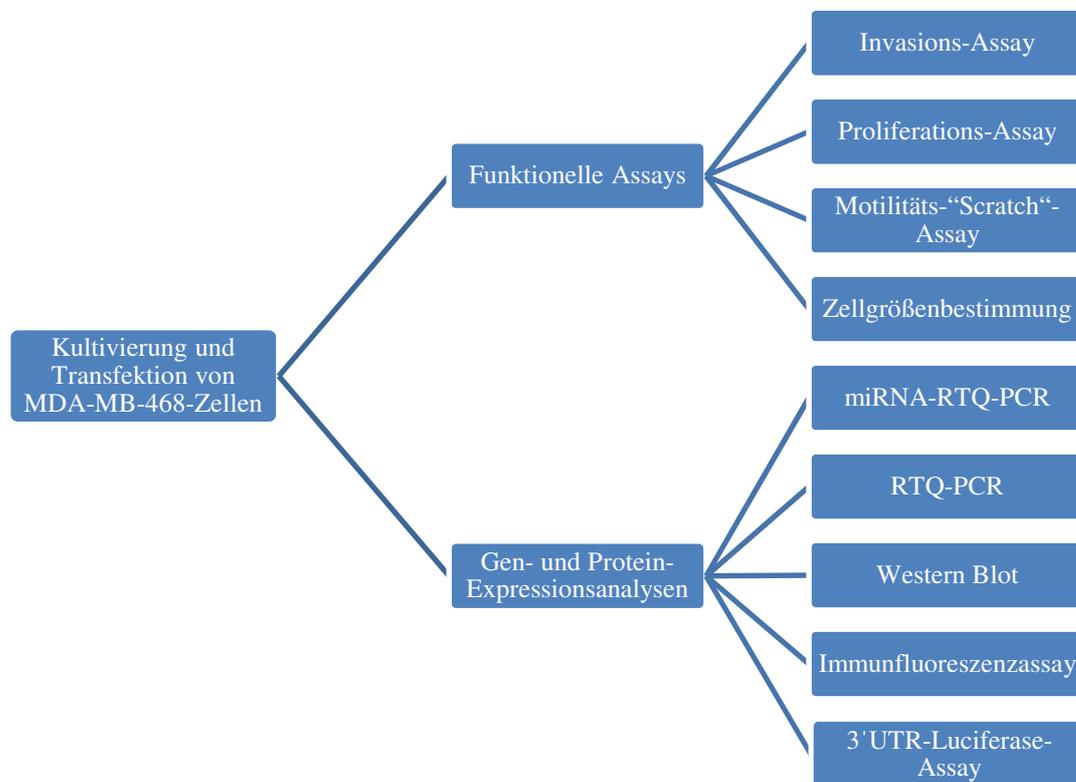
Ammoniumpersulfat (APS) 10%

1g Ammoniumpersulfat

Auf 1ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

### 3.2 Methoden

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit ist die Analyse der Wirkung der microRNA miR-142-3p auf die Brustkrebszelllinie MDA-MB-468. Alle Experimente wurden zum Vergleich mit einer Negativkontrolle sowie einer inhibitorischen anti-miR-142-3p durchgeführt. Um RNA- und Proteinproben aus den Zellen zu gewinnen, wurden die Zellen kultiviert und mit der jeweiligen *precursor* miR transfiziert. Die Durchführung der verschiedenen Methoden sowie die verwendeten Materialien sind im Folgenden beschrieben.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der durchgeführten Experimente dieser Dissertation.** Ausgehend von Kultivierung und Transfektion wurden jeweils funktionelle Assays oder Gen- und Proteinexpressionsanalysen der untersuchten Mammakarzinomzellen angeschlossen

### 3.2.1 Kultivierung der MDA-MB-468-Brustkrebszellen

Als Nährmedium für die Zelllinie MDA-MB-468 wurde DMEM *high glucose* (4,5g/L Glucose, [+] L-Glutamin, [-] Pyruvat) eingesetzt, welches mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde.

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 70-80% aufwiesen, wurden sie durch Trypsinisierung passagiert. Zunächst wurde das Medium verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden zum Ablösen 2,5ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%) auf die Zellen in der 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche gegeben. Es wurde 5 Minuten bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachdem sich die Zellen vollständig vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurde die Trypsin/EDTA-Lösung mit 5ml PBS/10% FKS inaktiviert und die Zellen 5 Minuten bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde im Sinne einer 1:5 Passage wieder ausgesät. Mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops wurden das Wachstum und die Morphologie der Zelllinie visuell überwacht.

### 3.2.2 Pre-mikro RNA Transfektion

Nach dem Ablösen der MDA-MB-468-Brustkrebszellen wurde die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt. Dazu wurden 10µl in einem 1:5 Verhältnis mit Trypanblau-Lösung [Sigma] in einer 96-Well-Zellkulturplatte gemischt, woraufhin mithilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro ml bestimmt werden konnte.

Als Vorbereitung zur Transfektion wurden die Zellen in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/2ml in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und für 24h bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die dicht, aber nicht konfluent wachsenden Zellen wurden nach der Kultivierung transfiziert. Pro Ansatz der 6-Well-Zellkulturplatte wurden folgende miRNA-Endkonzentrationen verwendet:

- 5nM hsa-miR-142-3p pre-miR®™ miRNA Precursor
- 5nM hsa-miR-142-3p anti-miR™ miRNA

- 5nM Pre-miR<sup>TM</sup> negative control #2

Aus den bei -80°C lagernden Stammlösungen wurden je 5µl der jeweiligen miRNA in 195µl Opti-MEM® bzw. 5µl der Negativ-Kontrolle in 195µl Opti-MEM® aufgenommen. Pro Ansatz wurde eine weitere Suspension aus 5µl DharmaFECT-Transfektionsreagenz und 195µl Opti-MEM® hergestellt. Die Mengenangaben beziehen sich auf je einen Ansatz einer 6-Well-Zellkulturplatte.

Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die miRNA-Lösungen mit den Transfektionsreagenzlösungen vermischt. Während der folgenden Inkubation über 20 Min. bei RT, wurde das DMEM-Medium der zuvor ausgesäten Zellen abgenommen und durch 840µl erwärmtes Opti-MEM® ersetzt. Nach der Inkubation wurden unter Schwenken der Zellkulturplatte je 160µl des Transfektionsreagenz tropfenweise zu den Ansätzen hinzugegeben.

Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> erfolgte ein Mediumwechsel. Nachdem das bei längerer Inkubationsdauer potenziell schädliche Transfektionsreagenz abgenommen worden war, wurde mit PBS gewaschen und je 1,5ml DMEM *high glucose* Medium mit 10% FKS und 1% Pen/Strep in jedes *Well* gefüllt. RNA- und Proteinlysate wurden drei Tage nach der Transfektion gewonnen.

### 3.2.3 Genexpressionsanalyse (1) - Quantitative Mikro Real-Time-PCR

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, wurden die MDA-MB-468-Zellen kultiviert, in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und transfiziert. Für dieses Experiment wurde ein Dreifachansatz mit der *precursor* microRNA pre-miR-142-3p (5nM), der inhibitorischen anti-miR-142-3p (5nM) und der *pre-miR precursor negative control* #2 (5nM) gewählt.

Ziel war es zu zeigen, dass die durch die Transfektion induzierte Überexpression von miR-142-3p funktioniert und die inhibitorische anti-miRNA die Expression der miR-142-3p verringert. Somit konnte die Voraussetzung für die weiteren Experimente geschaffen werden.

### 3.2.3.1 RNA-Präparation

Die Präparation und Isolation der RNA erfolgt nach Anleitung mithilfe des innuPREP RNA Mini Kits [analytikjena]. Dieses ist in der Lage, alle Arten von RNA, inklusive RNAs, die kleiner als 200nt lang sind, wie z.B. siRNA und miRNA, zu isolieren.

Drei Tage nach der Transfektion (Kapitel 3.2.2) wurde das Medium von den Zellen abgenommen und verworfen. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen und danach je Ansatz 400µl Lysis Solution RL aus dem innuPREP RNA Mini Kit hinzugegeben. Mit einer Pipettenspitze wurden dann die lysierten Zellen vom Boden abgekratzt und in ein 1,5ml Eppendorf Tube überführt. Das Lysat wurde bei -20°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

Das Lysat wurde zwei Minuten bei RT inkubiert und nach einem kurzen Durchmischen erneut drei Minuten bei RT inkubiert. Dann wurde die Suspension in den Spin Filter D gegeben, welcher auf einem Receiver Tube platziert wurde. Beim Zentrifugieren bei 12.000rpm über zwei Minuten wurde die gDNA selektiv entfernt. Daraufhin wurde der Spin Filter D verworfen und 400µl 70%-Ethanol zum Filtrat gegeben. Das Filtrat wurde in den Spin Filter R gegeben, welcher auf einem weiteren Receiver Tube platziert erneut bei 12.000rpm über zwei Min zentrifugiert wurde, um eine selektive Bindung der RNA hervorzurufen.

Anschließend wurde mit 500µl Washing Solution HS und 750µl Washing Solution LS gewaschen und jeweils für eine Minute bei 12.000rpm zentrifugiert. Die Filtrate wurden jeweils verworfen und der Spin Filter R auf ein neues Receiver Tube gesetzt.

Um das Ethanol zu entfernen wurde der Spin Filter R ein weiteres Mal auf einem leeren Receiver Tube für drei Minuten bei 12.000rpm zentrifugiert.

Zuletzt wurde die RNA eluiert. Dazu wurde Spin Filter R auf ein 1,5ml Eppendorf Tube gesetzt und 30µl RNase-freies Wasser in den Filter gegeben. Nach einer einminütigen Inkubation wurde noch einmal bei 8.000rpm für eine Minute zentrifugiert.

Die Menge an RNA in den Proben wurde mit Hilfe eines Photometers quantifiziert. Hierzu wurden je 3µl der Proben mit 57µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die Messung erfolgte in den für das Photometer vorgesehenen Küvetten.

Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert oder zum Teil direkt weiterverarbeitet.

### 3.2.3.2 Reverse Transkription der miRNA in cDNA

Die gewonnene miRNA wurde mit Hilfe des *TaqMan*<sup>®</sup> *miRNA Reverse Transcription Kit* und der *TaqMan*<sup>®</sup> *miRNA Assay* mit den Primern *RNU6B* und miR-142-3p in cDNA umgeschrieben. Dies ist der notwendige Schritt, um die isolierte RNA in cDNA-Form mit Hilfe der Real-Time-PCR quantifizieren zu können.

*RNU6B* zählt zu den sogenannten „Haushaltsgenen“, welche unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen auf die Zellen exprimiert werden [San José-Enériz et al., 2009]. Es wurde daher in diesem Experiment als Kontrollsonde eingesetzt. Im Bereich der microRNA-Forschung wird *RNU6B* häufig als eine von mehreren möglichen internen Kontrollen eingesetzt [Ratert et al., 2012].

Zu Beginn wurde 1µl der zuvor extrahierten RNA je nach Ausgangskonzentration mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 2ng/µl vorverdünnt.

Als Mastermix wurde je Probe ein Ansatz bestehend aus 0,15µl dNTP 100mM-Lösung, 1µl MultiScribe Reverse Transkriptase, 1,5µl 10xBuffer, 0,19µl RNase Inhibitor und 4,16µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O hergestellt. Dieses Gesamtvolumen von 7µl wurde in einem 0,5ml PCR Reaktionsgefäß [Eppendorf] vorgelegt. Hinzugefügt wurden 5µl der verdünnten RNA und 3µl des jeweiligen Primers *RNU6B* oder 142-3p. Diese Mischung wurde kurz zentrifugiert, fünf Minuten auf Eis gestellt und anschließend mithilfe eines Thermocyclers in den folgenden Schritten in cDNA umgeschrieben:

- 30 Minuten bei 16°C
- 30 Minuten bei 42°C
- 5 Minuten bei 85°C

Die Proben konnten direkt weiterverarbeitet werden oder bei -20°C gelagert werden.

### 3.2.3.3 Durchführung und Ablauf der Real Time quantitativen PCR

Die Methode der Real Time quantitativen PCR ist an das Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion angelehnt. Sie ermöglicht allerdings während der Messung bereits eine Quantifizierung der DNA-Kopien beruhend auf einer zusätzlichen Fluoreszenz-Messung. Die vorhandene DNA-Menge kann so während der

exponentiellen Phase der PCR aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion festgestellt werden. Die verwendeten TaqMan®-Sonden besitzen an ihrem 5'-Ende einen sogenannten *Quencher*, am anderen Ende sitzt ein fluoreszierendes *Reporter*-Oligonukleotid.

Durch die Nähe zueinander hemmt der *Quencher* die Fluoreszenzemission des *Reporters*. Diesen Effekt bezeichnet man als sogenannten FRET-Mechanismus (*Förster resonance energy transfer*), [Cheng, 2006]. Da die Taq-Polymerase jedoch eine zusätzliche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, wird am Ende jedes Zyklus die Sonde am 5'-Ende abgespalten. Durch den Verlust der Nähe zwischen *Quencher* und fluoreszierendem *Reporter*-Oligonukleotid wird die Hemmung der Fluoreszenz-Emission aufgehoben. Diese Emission einer bestimmten Wellenlänge steigt proportional zur Menge der synthetisierten DNA und kann von entsprechenden Detektoren im Real-Time-PCR-Gerät gemessen werden [Essentials of Real-Time-PCR, 2013].

Es wurden die TaqMan® miRNA Assay Sonden RNU6B und miR-142-3p verwendet und je 1µl pro Probe mit 10µl TaqMan® 2xPCR Master Mix und 7,67µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O angesetzt. Dieses Volumen von 18,67µl wurde mit 1,33µl cDNA der jeweiligen Probe in Doppelwerten in eine 96-Well-PCR Reaktionsplatte pipettiert. Das Gesamtvolumen für die PCR betrug somit 20µl. Nachdem bei dem PCR-Gerät das von der Firma Applied Biosystems für die verwendeten Sonden voroptimierte Programm eingestellt wurde, durchliefen die Proben 40 Zyklen, wobei jeder Zyklus, anders als bei der herkömmlichen PCR, aus jeweils 2 Schritten besteht:

- Initiale Aktivierung bei 95°C (10 Min.), Denaturierung/*Melting* bei 95°C (15 Sec.)
- Primerhybridisierung/*Annealing* und Elongation/*Extending* bei 60°C (1 Min.)

#### 3.2.3.4 Auswertungsmethode der quantitativen Real-Time-PCR

Um die untersuchten Zielgene zu quantifizieren, wurde während der laufenden Real-Time-PCR der Ct-Wert (*Cycle threshold*) jeder Probe bestimmt. Dieser Wert beschreibt den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve. Dieses ist der Zeitpunkt, auch *Crossing Point* (CP-Wert) genannt, an dem die Fluoreszenz der zu analysierenden

DNA-Moleküle einen gewissen Schwellenwert („Hintergrund-Fluoreszenz“) übersteigt. Um die Möglichkeit für einen Vergleich der verschiedenen Proben untereinander zu schaffen, wurde aus den Ct-Werten der  $\Delta$ Ct-Wert ermittelt, indem die untersuchten Gene jeder Probe in Relation zu einem „Housekeeping-Gen“ (miRNA: RNU6B [San José-Enériz et al., 2009]; mRNA: 18S [Bas et al., 2004]), gesetzt wurden [ $\Delta$ Ct<sub>Gen</sub> = Ct<sub>Gen</sub> - Ct<sub>housekeeping-Gen</sub>].

Um schließlich das Verhältnis der mit pre-miR-142-3p überexprimierten Proben zu den Negativkontrollproben aufzuzeigen, und somit das Maß einer Hoch- bzw. Herunterregulierung in der Genexpression quantifizieren zu können, wurde der „Fold change“-Wert ermittelt:  $Fold\ Change = 2^{-[\Delta Ct_{Gen(miR-142-3p)} - \Delta Ct_{Gen(Kontrolle)}]}$  [Livak & Schmittgen, 2001].

### 3.2.4 Invasionsassay

Die MDA-MB-468-Brustkrebszellen wurden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben kultiviert, für den Invasionsassay in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und am Tag darauf in Doppelwerten transfiziert (Kapitel 3.2.2).

Einen Tag nach Transfektion wurde das Transfektionsreagenz verworfen und es erfolgte ein Mediumwechsel gegen das MDA-MB-468-Nährmedium (DMEM *high glucose*, 10% FKS, 1% Pen/Strep). Im Anschluss wurden die Zellen mit je 500µl Trypsin/EDTA-Lösung (1x, 0,05% in PBS) vom Boden der 6-Well-Zellkulturplatte abgelöst, zentrifugiert, in Nährmedium resuspendiert und gezählt. Für den Invasionsassay wurden industriell hergestellte, mit einer Matrigel Matrix beschichtete Invasionskammern mit einer Porengröße von 8µm verwendet. Die Matrigel Matrix besteht unter anderem aus Laminin-111, Typ4 Kollagen, Entactin, Heparansulfat-Proteoglykan und Wachstumsfaktoren [Benton et al., 2011].

Pro Invasionskammer wurden 25.000 Zellen in einem Volumen von 500µl (DMEM *high glucose*, 10% FKS, 1% Pen/Strep) ausgesät und für die Adhäsionsphase von ca. 24h bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium oberhalb der Membran gegen 500µl serumfreies Medium (DMEM, 1% Pen/Strep) ausgetauscht. In die Kompartimente der 24-Well-Zellkulturplatte wurden je 750µl des Nährmediums

(DMEM *high glucose*, 10% FKS, 1% Pen/Strep) gegeben und jeweils eine Invasionskammer in einem *Well* platziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen an der Membran befinden, die die Zellinvasion beeinflussen können.

Durch ein Konzentrationsgefälle des wachstumsfaktorhaltigen fetalen Kälberserums, wurden die Zellen angeregt, aktiv entlang des chemotaktischen Gradienten durch die Membran zu migrieren. Nach 48h Invasionszeit wurde der Assay gestoppt, indem die Invasionskammern aus den Kompartimenten der 24-well-Zellkulturplatte entfernt wurden. Die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran wurden umgehend fixiert, gefärbt und im Anschluss quantifiziert. Das Fixieren und Färben erfolgte mithilfe des Diff-Quik®-Färbesets, welches aus zwei Färbelösungen und einer Fixierlösung besteht. Es wurde je 600µl der Lösungen in eine 24-Well-Zellkulturplatte vorgelegt und die Invasionsfilter nacheinander erst 5 Min. in die Fixierlösung, dann 1 Min. in die Färbelösung I und abschließend 7 Min. in die Färbelösung II gesetzt. Danach wurden die Filter in Wasser gewaschen und die obere Seite der Membran mit einem Wattestäbchen gesäubert. Dadurch konnten Zellen, die den Filter nicht durchdrungen hatten, entfernt werden. Die Filter trockneten bei Raumtemperatur. Für die Analyse und Auswertung wurden die getrockneten Membranen mit einem Skalpell aus dem Filter präpariert und mit Eukitt® auf einen Objektträger aufgebracht. Diese Schritte dienten zur Vorbereitung der Quantifizierung durch die Membran gewandelter Zellen mit Hilfe des Computerprogramms AxioVision 4.3 [Zeiss, Jena] nachdem sie mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops fotografiert wurden.

Es wurden jeweils zwei Fotos in 50facher Vergrößerung pro Membran erstellt, ohne dass dabei der Membranrand abgelichtet wurde, da das Invasionsverhalten der Zellen dort weniger homogen ist.

Die durch die Membran gewanderten Zellen wurden mit Hilfe der Software quantifiziert. So konnte das Invasionsverhalten der mit pre-miR-142-3p und der anti-miR-142-3p transfizierten Zellen mit dem der Kontrollzellen verglichen werden.

Dargestellt wurde die relative prozentuale Veränderung der Invasivität in Bezug auf die Negativkontrolle (100%).

### 3.2.5 Scratch-Assay

Für den Scratch-Assay zur Motilitätsanalyse der Zellen wurden die MDA-MB-468-Zellen kultiviert und in Doppelwerten in einer 6-Well-Platte mit der Kontroll-miRNA sowie *precursor* miR142-3p und *precursor* anti-miR142-3p transfiziert (Kapitel 3.2.1. und 3.2.2.).

Nachdem sich nach 48h ein dichter Zellrasen in den *Wells* gebildet hatte, wurde mit einer Pipettenspitze ein Kreuz in die Mitte jedes Zellrasens gekratzt („*scratch*“), so dass sich auf diesem Teil des Bodens keine Zellen befanden. Im Anschluss wurde mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops und der Computersoftware AxioVision 4.3 [Zeiss, Jena] ein Foto des Zellrasens mit den eingebrachten Wundflächen gemacht.

Es wurde die nahezu zellfreie Fläche in der Mitte des Bildes in  $\mu\text{m}^2$  gemessen und die Werte nach 6h und 24h jeweils in Bezug zu den Startwerten nach 0h (100%) gesetzt. So konnte die Geschwindigkeit der Zellen bei der Migration in die zellfreie „*Scratch*“-Fläche quantifiziert werden.

### 3.2.6 Proliferationsassay (MTT-Stoffwechseltest)

Der Proliferationsassay, auch MTT-Test oder Zytotoxizitäts-Test genannt, diente dazu festzustellen, inwiefern die Transfektion der MDA-MB-468-Brustkrebszellen mit der *precursor* microRNA miR-142-3p (5nM) in Bezug auf die Negativ-Kontrolle Einfluss auf die Zellproliferation hat. Dazu wurden die MDA-MB-468-Zellen zunächst in eine 6-Well-Zellkulturplatte mit  $3 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und wie oben beschrieben transfiziert. 72h nach der Transfektion wurden die Zellen mithilfe der Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und gezählt. Je Probe wurden in Dreifachwerten  $10 \times 10^3$  Zellen in einem Volumen von 100 $\mu\text{l}$  in einer 96-Well-Zellkulturplatte wieder ausgesät, und zur Kontrolle je drei *Wells* mit 100 $\mu\text{l}$  Medium als Leerwert gefüllt.

Die *Wells* wurden mit Medium (DMEM *high glucose* Medium farblos mit 10% FKS und 1% Pen/Strep) auf jeweils 200 $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach einer Adhäsionszeit von 72h bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> wurden 20 $\mu\text{l}$  MTT-Lösung (250mg MTT-Pulver in 50ml PBS,

steril filtriert) zu den Proben gegeben und erneut für 4h bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

MTT ist ein Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), ein gelber wasserlöslicher Farbstoff, welcher zelltoxisch wirkt. Die Farbreaktion beruht auf dem Nachweis der Zellvitalität bzw. dem Anteil lebender Zellen, indem MTT intrazellulär hauptsächlich unter Verbrauch von NADH und NADPH durch spezielle Enzyme des endoplasmatischen Retikulums zu einem violett-blauen, wasserunlöslichen Formazan-Produkt umgewandelt wird. Dabei ist die Menge des umgesetzten Farbstoffes linear vom Maß der Zellaktivität/Glykolyserate abhängig [Vistica et al., 1991].

Nach der Inkubationszeit wurde die Farbreaktion durch Zugabe eines Stopp-Puffers (100µl, 10% SDS, 50% N,N-Dimethylformamid in destilliertem H<sub>2</sub>O, pH 4,7) beendet, außerdem diente dieser dem wasserunlöslichen Formazan-Produkt als Lösungsmittel. Nach einer Inkubationszeit von 20h im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Absorptionswerte der Proben im ELISA-Reader mit einer Wellenlänge von 595nm photometrisch gemessen. Durch Abzug des Blank-Wertes von jedem Messwert wurden die Daten normiert und somit vergleichbar gemacht. Die Proliferation der pre-miR-142-3p-transfizierten Zellen wurde als Prozentsatz der Proliferationswerte der Kontroll-miRNA-transfizierten Zellen angegeben. Dargestellt wurden die Auswertungen der Daten mit einer Zellzahl von 10 x 10<sup>3</sup> Zellen/100µl.

Bei der Interpretation des MTT-Tests ist zu bedenken, dass Veränderungen des MTT-Umsatzes nicht nur durch eine veränderte Zellzahl, sondern auch durch eine veränderte metabolische Aktivität der Zellen bedingt sein können.

### **3.2.7 Zellgrößenbestimmung**

Zur Bestimmung der Zellgröße wurden die wie oben beschrieben transfizierten MDA-MB-468-Zellen (Kapitel 3.2.2) in einer Konzentration von 20 000 Zellen/1ml in eine 24-Well-Platte überführt (jeweils ein Well für Kontrollzellen, pre-miR-142-3p-, sowie anti-miR-transfizierte Zellen).

Sie wurden im Anschluss mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops und der Software AxioVision 4.3 [Zeiss, Jena] in der 24-Well-Platte fotografiert und am Computer die Zellfläche in  $\mu\text{m}^2$  von jeweils mindestens 70 Kontrollzellen, sowie pre-miR-142-3p- und anti-miR142-3p-transfizierten Zellen gemessen. So konnten die Mittelwerte miteinander verglichen werden.

### **3.2.8 Genexpressionsanalyse (2) - Quantitative Real-Time-PCR**

Wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.2.1) wurden die MDA-MB-468-Brustkrebszellen kultiviert, in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und transfiziert. Für dieses Experiment wurde ein Doppelansatz aus Kontrolle, pre-miR-142-3p- sowie anti-miR142-3p-transfizierten Zellen gewählt.

Ziel war es aufzuzeigen, inwiefern die Überexpression von miR-142-3p und die des miR-142-3p-Inhibitors die Expression ausgewählter Gene beeinflusst.

Die potenziell durch die miR-142-3p regulierten Zielgene wurden den Ergebnissen des *Affymetrix-Screenings* der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 entnommen. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich Veränderungen im mRNA-Expressionsmuster von über 20.000 Genen untersuchen [Auer et al., 2009; Graham et al., 2011]. Da es sich bei MDA-MB-231 wie auch bei der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinie MDA-MB-468 um triple-negative Adenokarzinome der Mamma handelt [Giricz et al., 2012; Lacroix & Leclercq, 2004], wurde darauf geschlossen, dass miR-142-3p wahrscheinlich bei beiden Zelllinien auf ähnliche Art und Weise Einfluss auf das Zellverhalten nimmt.

Untersucht wurde die Genexpression mit den in Kapitel 3.2.8.2 beschriebenen 14 Sonden. Diese wurden auf der Basis ihrer vergleichsweise starken Regulation durch miR-142-3p im *Affymetrix-Screening* sowie ihres potenziellen Einflusses auf das veränderte Zellverhalten von Mammakarzinomzellen ausgewählt (Kapitel 4.2 – 4.5).

Die RNA-Präparation erfolgte dabei wie bereits unter Punkt 3.2.3.1 beschrieben. Es wurden dieselben RNA-Lysate wie zur Analyse der microRNA-Expression verwendet.

### 3.2.8.1 Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Für das Umschreiben der mRNA in cDNA wurde das *First Strand cDNA Synthesis Kit* verwendet. Zu Beginn wurden 1 µg der RNA-Proben in ein 0,5ml PCR Gefäß pipettiert und mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die vorverdünnte Probe wurde mit 1 µl Random Hexamer Primer gemischt und 5 Min. bei 65°C im Thermocycler inkubiert. In diesem Zeitraum wurde der Mastermix für die reverse Transkription angesetzt. Er bestand je Probe aus 4 µl 5xReaction Buffer, 1 µl Ribonuclease Inhibitor (20U/µl), 2 µl dNTP-Mix (10mM) und 2 µl M-MuLV Reverse Transcriptase (20U/µl).

Nach Ende der Inkubationszeit wurden je 9 µl des Mastermixes zu den Proben gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand. Die Proben wurden dann nach folgendem Schema inkubiert:

- 5 Minuten bei 25°C
- 60 Minuten bei 37°C
- 5 Minuten bei 70°C

Nach Abschluss der reversen Transkription wurden zusätzlich 80 µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O zu den Proben hinzugefügt, so dass das Endvolumen 100 µl betrug. Die Proben wurden direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

### 3.2.8.2 Durchführung und Ablauf der Real-Time-PCR

Es wurden spezielle Sonden aus den TaqMan® Gene Expression Assays [Applied Biosystems] verwendet. Die Kontrollsonde stellte immer die 18S rRNA TaqMan®-Sonde (hs 99999901\_s1) dar, welche als RNA-Komponente der Ribosomen ebenfalls zu den sogenannten „*Housekeeping-Genen*“ zählt [Bas et al., 2004].

Die mit pre-miR-142-3p und der Inhibitor-miR-142-3p transfizierten Proben und die jeweiligen Kontrollproben wurden mit folgenden Sonden untersucht:

- *ADCY9* Adenylate cyclase type 9
- *BOD1* Biorientation of chromosomes in cell division 1
- *CFL2* Cofilin 2
- *COX1* Cyclooxygenase-1
- *EGF* Epidermal growth factor
- *IL6ST* Interleucin 6 signal transducer
- *ITGαV* Integrin-αV
- *KLF4* Krueppel-like factor 4
- *NOTCH1* Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
- *PGRMC2* Progesterone receptor membrane component 2
- *RAC1* Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
- *ROCK2* Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2
- *STS* Steroid sulfatase
- *WASL* Wiskott-Aldrich syndrome-like

Für eine cDNA-Probe wurde je Sonde ein Ansatz aus 1,25µl der jeweiligen TaqMan®-Sonde, 12,5µl TaqMan® 2xPCR Master Mix und 8,75µl Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Dieses Volumen von 22,5µl wurde mit 2,5µl der jeweiligen cDNA-Probe in Doppelwerten in eine 96-Well-PCR Reaktionsplatte pipettiert. Das Gesamtvolumen für die Real-Time-PCR betrug 25µl.

Methodik, Ablauf und Auswertung der Real-Time-PCR erfolgten analog zu den Beschreibungen in den Kapiteln 3.2.3.3 und 3.2.3.4.

### 3.2.9 Western Blots

Die Western Blot-Analyse dient dem Nachweis und der Quantifizierung von Proteinen. Im Anschluss an die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen sowie der vergleichenden Expressionsanalyse der transfizierten MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen auf mRNA-Ebene wurden hierfür fünf Gene ausgewählt. Dabei stand neben einer

signifikanten Regulation durch die microRNA auch der potenzielle Einfluss auf Invasions- und Migrationseigenschaften der Zellen im Vordergrund.

Die MDA-MB-468-Brustkrebszellen wurden kultiviert, in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit der *precursor microRNA miR-142-3p* (5nM) und der *pre-miR precursor negative control 2* (5nM) sowie mit dem *microRNA miR142-3p-Inhibitor* (5nM) in Mehrfachwerten.

Folgende Primärantikörper (AK) wurden zur Detektion verschiedener Proteinexpressionsmuster verwendet:

- Monoklonaler mouse-anti-RAC1
- Polyklonaler goat-anti-NOTCH1
- Monoklonaler rabbit-anti-N-WASP
- Polyklonaler goat-anti-CFL2
- Polyklonaler rabbit-anti-ITG $\alpha$ V

Als Referenzprotein wurde Tubulin eingesetzt („loading control“). Dieses zu den *housekeeping proteins* zählende Molekül ist 55kDa groß und wird in allen Zellen gleich stark exprimiert [N.-K. Liu & Xu, 2006]. So konnte ein Vergleichswert der Proben untereinander geschaffen werden um den *Blot* richtig interpretieren zu können. Zur Detektion wurde der monoklonale Mouse-anti-Tubulin-Antikörper verwendet.

### 3.2.9.1 Proteinlyse und -quantifizierung

Um die Genexpression der untersuchten Zellen auf Proteinebene zu bestimmen, wurden zunächst die Proteine aus den kultivierten Zellen gewonnen und isoliert. Dabei erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis um ein vorzeitiges Denaturieren der Proteine zu verhindern.

Zu Beginn wurde das Nährmedium der transfizierten Zellen verworfen und diese zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 200 $\mu$ l RIPA-Puffer auf die Zellen gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zelllysate vom Boden der 6-Well-Zellkulturplatten abgelöst und in ein 1,5ml Eppendorf Tube überführt. Anschließend

wurden die Proben für 20 Min. bei 1.300 rpm und 4°C schüttelnd inkubiert und dann bei 13.000 rpm und 4°C 10 Min. lang zentrifugiert. Das Zellpellet am Boden wurde verworfen, der Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorf Tube überführt. Das Protein-Lysat konnte direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert werden.

Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der Proteinmenge in den Proben in Bezug auf einen Blank-Wert (RIPA-Puffer ohne Protein) in Doppelwerten mit Hilfe des Pierce BCA™ Protein Assays.

Dazu wurden in eine 96-Well-Zellkulturplatte für eine 1:5 Verdünnung je 20µl ddH<sub>2</sub>O vorgelegt und 5µl der jeweiligen Proteinprobe bzw. des RIPA-Puffers als Blank hinzugefügt. Daraufhin wurden 200µl der BCA™ Protein Assay-Reagenzien in einem Mischverhältnis von 1ml Reagenz A zu 20µl Reagenz B in die Wells zu den verdünnten Proben gegeben und dann 30 Min. bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte mithilfe des ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 562nm. Aus den gemessenen Dichten der Proteinlysate konnte dann auf die jeweilige Proteinmenge geschlossen werden.

### 3.2.9.2 SDS-PAGE Elektrophorese

Die SDS-PAGE Elektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Molekülen nach ihrer jeweiligen Größe (d.h. ihrem molekularen Gewicht in kDa). Die aufzutrennenden Moleküle wandern entlang eines elektrischen Gradienten durch ein Polyacrylamidgel, wobei die Porengröße des Gels und der Teilchenradius für das individuelle Trennmuster verantwortlich sind. Abhängig von der Größe des untersuchten positiv geladenen Proteins lagern sich unterschiedlich viele negativ geladene Natriumdodecylsulfationen an das Molekül (je größer das Protein desto negativer wird seine Ladung). Je größer ein Molekül bzw. je kleiner die Porengröße desto eher stagniert die Wanderung der durch das SDS negativ geladenen und denaturierten Teilchen in Richtung Pluspol [Blank et al., 1982].

Als Vorbereitung für die SDS-PAGE Elektrophorese wurden mithilfe des Bio-Rad®-Systems Polyacrylamidgele gegossen. Die Gele bestanden aus je einer Trenngel- und Sammelgelphase.

Die Trenngele wurden aus 30% Acrylamid/Bis Solution, Trenngelpuffer 2,5fach, ddH<sub>2</sub>O, sowie TEMED und APS hergestellt (genaue Mengenangaben, Tabelle 1). Je nach untersuchter Proteingröße wurden Trenngele mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt verwendet.

	<b>12% Acrylamid</b>	<b>10% Acrylamid</b>	<b>7,5% Acrylamid</b>
<b>Acrylamid</b>	1,65ml	1,39ml	1,04ml
<b>2,5x Trenngelpuffer</b>	1,65ml	1,65ml	1,65ml
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	0,83ml	1,11ml	1,46ml
<b>APS</b>	29µl	29µl	29µl
<b>TEMED</b>	3,8µl	3,8µl	3,8µl
<b>Untersuchtes Protein</b>	RAC1, CFL2	N-WASP	NOTCH1, ITGαV

**Tabelle 1** Verwendete Volumina für je ein Trenngel in Abhängigkeit von dem untersuchten Protein

Nach dem Herstellen der Gellösungen wurden diese zwischen die Elektrophorese-Glasplatten zu  $\frac{3}{4}$  hoch gefüllt. Um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten, wurde gesättigtes 1-Butanol auf das Gel gegeben. Nachdem das Gel polymerisiert war (Dauer: ca. 30 Min.) wurde das Butanol von der Trenngelphase verworfen, mit Wasser gespült und die Restflüssigkeit mit Filterpapier aufgesaugt.

Im Anschluss wurde das Sammelgel aus 280µl Acrylamid, 330µl Sammelgelpuffer 5fach (0,3M TrisCl pH 6,7 [Roth], 0,5% SDS pH 6,7 [Sigma]), 1ml ddH<sub>2</sub>O, 2µl TEMED und 15µl APS hergestellt und auf die Trenngelphase gegeben. Um die Taschen für die Proteinproben zu erstellen, wurde ein spezieller Kunststoffkamm zwischen die Glasplatten eingesetzt. Nach einer Aushärtephase von wiederum ca. 30 Min. wurde der Kamm entfernt und die Gelplatten in das Mini-PROTEAN® Tetra System eingesetzt und das System mit 1-fach Laufpuffer aufgefüllt. Für die SDS-PAGE Gelelektrophorese wurde eine Proteinkonzentration von 30µg eingesetzt.

Die Proteinproben wurden wie oben beschrieben quantifiziert und in der passenden Konzentration mit 1/5 ihres Volumens an 5fachem SDS-Additiv (1M TrisCl pH 6,8, 25% Glycerin, 50% SDS, 0,5mg Bromphenolblau [Merck]) und mit 1/3 des Volumens von SDS-Additiv an  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Das SDS-Additiv sorgt für eine Denaturierung der Proteine und deren hohe negative Ladung, während das Mercaptoethanol die Disulfidbrückenbindung aufbricht. Die so präparierten Proben wurden 5 Min. bei 95°C denaturiert und danach kurz bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Sammelgeltaschen wurden dann mit den Proteinlösungen beladen. Als Marker wurden 3 $\mu$ l des PageRuler™ Prestained Protein Ladder Marker neben den aufgetragenen Proben eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte für ein Gel bei 10mA in der Sammelgelphase und bei 30mA in der Trenngelphase, bis die Proben das gesamte Gel durchlaufen hatten. Bei zwei Gelen betrug die Stromstärke 20mA in der Sammelgelphase bzw. 50mA in der Trenngelphase.

### 3.2.9.3 Transfer der Proteine auf eine Membran („Blotting“)

Für das sogenannte *Blotting* des Gels wurde das Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell System verwendet. Hierzu wurden die *Blotting* Papiere und die Nitrozellulosemembran vorbereitet, indem die Membran zuvor für zwei Minuten in ddH<sub>2</sub>O aktiviert und mit dem Papier für zehn Min. bei 4°C in Blottingpuffer inkubiert wurde. Im Anschluss wurden zuerst vier *Blotting* Papiere und die Membran in die *Blotting* Apparatur geschichtet, darauf dann das SDS-PAGE-Gel gelegt, mit vier weiteren *Blotting* Papieren abgedeckt und glattgestrichen. Das Glattstreichen der einzelnen Schichten diente dem Entfernen von Luftblasen, die den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran verhindern können. *Gebロットet* wurde je nach Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins zwischen 25 und 70 Minuten bei 16V. Durch diesen Vorgang wurden die negativ geladenen Proteine aus dem SDS-PAGE-Gel auf die Membran transferiert. Nach der Entnahme der Membran aus dem System konnten mithilfe von Ponceau-S Lösung die nun auf der Membran befindlichen Proteine angefärbt werden. Dieser Test diente dem Nachweis des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die Membran. Danach wurde die Membran mit ddH<sub>2</sub>O wieder entfärbt und für 1h bei RT mit Skim-Milk in 100ml 1fach TBST blockiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Min. mit

TBST wurde der Primärantikörper in der benötigten Verdünnung (Kapitel 3.1.4.1) in 10ml eines 2,5%igen BSA-haltigen Puffers (Bovine Serum Albumin) gelöst, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde der Primärantikörper verworfen und die Membran dreimal für jeweils 5 Min. mit TBST gewaschen. Anschließend wurde der Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper in Skim Milk verdünnt auf die Membran gegeben und für 1h unter Schwenken bei RT inkubiert (Kapitel 3.1.4.2).

Nach der Inkubationszeit wurde die Membran erneut dreimal 5 Min. mit TBST gewaschen und zum Entwickeln vorbereitet.

#### 3.2.9.4 Entwickeln und Strippen der Membran

Zur Entwicklung wurde die Membran 1 Min. lang mit dem Pierce® Enhanced Chemoluminescence (ECL) Western Blot Substrate behandelt, welches aus einer 1:1 Mischung aus SuperSignal® Peroxid Solution und SuperSignal® Enhancer Solution zusammengesetzt ist. Durch die Peroxidaseaktivität des zweiten Antikörper-Konjugats kommt es hierbei zu einer ECL-Reaktion, mit deren Hilfe ein Röntgenfilm geschwärzt werden kann. Der Schwärzungsgrad des Röntgenfilms gibt dann Aufschluss über die Menge an Proteinen auf der Membran. Hierzu wurde die Membran mit einer Klarsichtfolie in einer Hyperkassette™ fixiert. Alle nun folgenden Schritte wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt. Ein passend großer Röntgenfilm wurde auf die Membran gelegt und für eine dem nachzuweisenden Protein entsprechend optimierte Zeit belichtet (Tubulin: 1Min., ITGαV: 70Min., N-WASP: 15Min., notch1: 60Min., Rac1: 70Min., CFL2: 5Min.). Der Film wurde nach der Belichtung entwickelt und fixiert. Dazu wurde er zuerst ca. 30 Sek. in Entwicklerlösung, dann nacheinander kurz in ddH<sub>2</sub>O, in 1%ige Essigsäure und abschließend in Fixierlösung getaucht. Nach dem Waschen des Films in Wasser konnte er mithilfe heißer Luft getrocknet und beschriftet werden.

Nach erfolgtem Nachweis der relevanten Proteine auf der jeweiligen Membran wurde anschließend eine Untersuchung der Tubulin-Immunreaktivität („*Loading control*“) durchgeführt.

Dazu wurde zunächst das “*Stripping*“-Verfahren angewendet. Dabei werden die an die auf der Membran befindlichen Antigene gebundenen Antikörperkomplexe durch den niedrigen pH-Wert der *Stripping*-Lösung denaturiert und dadurch entfernt. Hierzu wurde die Membran unter Schwenken zweifach je 5 Min., danach einmalig 20 Min. mit *Stripping*-Lösung behandelt. Es folgten drei je 5-minütige Waschgänge mit TBST, woraufhin die Membran für 1h mit Skim Milk bei RT blockiert wurde. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde erneut mit TBST gewaschen. Nun konnte die Membran mit dem Tubulin-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Sie wurde am darauffolgenden Tag für eine Stunde in eine Lösung mit dem Sekundärintikörper gegeben und danach wie oben beschrieben entwickelt.

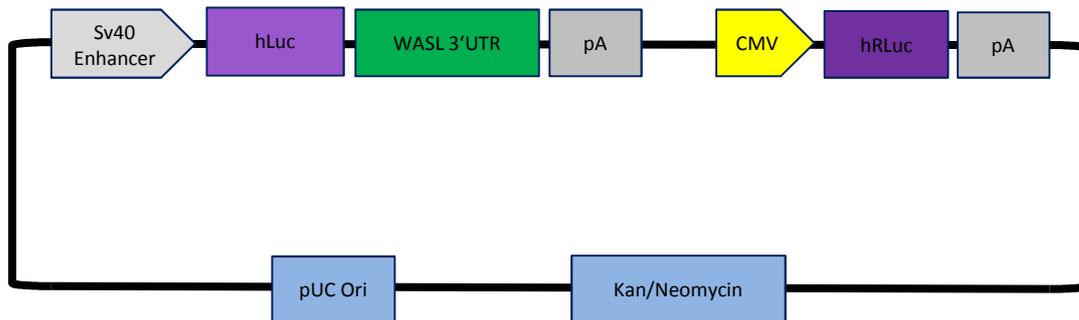
### 3.2.9.5 Auswertung der Western Blots

Anhand des PageRuler™ Prestained Protein Ladder Markers konnten die nachzuweisenden Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in kDa auf den entwickelten Western Blot Bildern identifiziert werden. Die entsprechenden Banden wurden durch Einscannen digitalisiert und mit dem Programm *Image J Software* [NIH, Bethesda, USA] quantifiziert. Dabei wurden die Fläche sowie der Schwärzungsgrad des Röntgenfilms einer Bande in einem definierten Raum gemessen. Diese Messwerte wurden jeweils mit der dazugehörigen Tubulinbande in Beziehung gesetzt, so dass vergleichbare Werte entstanden.

## 3.2.10 3'UTR-Luciferase-Assay

### 3.2.10.1 Funktionsprinzip

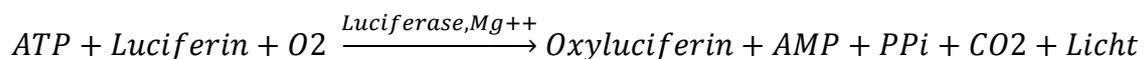
Um die Ergebnisse der *WASL*- und *ITGAV*-Genexpressionsanalyse und Proteinquantifizierung (Kapitel 4.6, 4.7) zu bestätigen und nachzuweisen, dass miR-142-3p die Expression von *WASL* bzw. *ITGAV* über die 3'UTR der mRNA reguliert, wurde eine Genexpressionskontrolle mittels Luciferase-Assay durchgeführt. Dazu wurde das LucPair™ miR Dual Luciferase (*firefly and renilla*) Assay Kit der Firma GeneCopoeia verwendet.



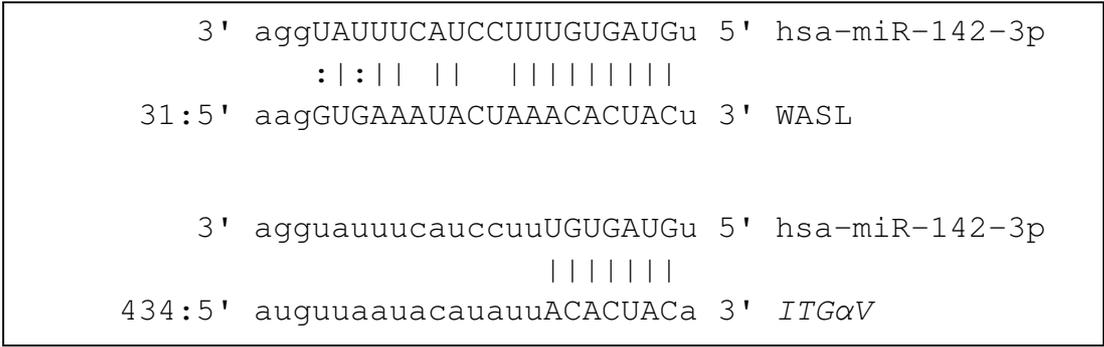
**Abb. 4 Die 3'UTR von WASL ist ein Ziel für transkriptionale Regulation durch miR-142-3p. MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen wurden mit Plasmid pEZX-MT01-WASL-3'UTR transfiziert.** Dieses exprimiert Leuchtkäfer-Luciferase (hLuc) unter Kontrolle eines SV40 Enhancers und der 3'UTR des humanen WASL-Gens sowie Renilla-Luciferase (hRLuc) unter der konstitutiven Kontrolle eines Cytomegalievirus-Promotors. Die Zellen wurden jeweils mit Kontroll-miRNA oder *precursor* miR142-3p sowie dem Plasmid kotransfiziert und anschließend 72h nach Transfektion auf ihre Luciferase-Aktivität untersucht. pA = poly-A-Schwanz, pUC Ori = origin of replication, Kan/Neomycin = Antibiotika-Resistenzgene. Das Plasmid pEZX-MT01-ITGAV-3'UTR ist analog aufgebaut.

Die Methode basiert auf einem Plasmid [miRNA Target sequence 3'UTR expression clone 378ng/ul], welches in die Mammakarzinomzellen eingebracht wird und zwei Gene enthält, die für Luciferase-Enzyme kodieren (Abb. 4). Beide Enzyme katalysieren chemische Reaktionen bei denen Licht entsteht, welches luminometrisch erfasst werden kann.

Die Leuchtkäfer-Luciferase katalysiert die Reaktion:

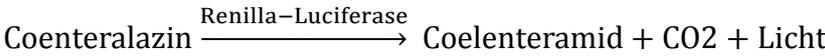


Im Fall von WASL ist die für dieses Enzym kodierende Sequenz dabei an einen DNA-Abschnitt gekoppelt, welcher identisch mit der 3'UTR des WASL-Gens ist. Sollte dieses Gen tatsächlich ein Ziel der miR-142-3p sein, so erwartet man, dass es bei Kotransfektion von Plasmid und miR-142-3p im Vergleich zur Kontrolle zu einer Herunterregulation der Luciferase-Produktion durch die miRNA und damit zu einem verringerten Leuchtsignal kommt.



**Abb. 5** beispielhaftes Alignment von miR-142-3p und jeweils einem Ausschnitt aus der Genomsequenz des *WASL*- sowie des *ITGAV*-Gens [siehe Anhang, Vorhersage von Zielgenen von miR-142-3p].

Der für die Renilla-Luciferase kodierende Genomabschnitt ist nicht auf diese Weise reguliert. Die Luciferase der Korallenart *Renilla reniformis* katalysiert daher miRNA-unabhängig die Reaktion:



Die Messung erfolgt dabei in CPS (*counts per second*), das entspricht der Anzahl an emittierten Photonen pro Sekunde. Für die Auswertung wurde der Wert RLU (*relative light units*) herangezogen. Dieser entspricht der Menge tatsächlich emittierter Photonen, abzüglich des Hintergrunds. Die Aktivitäten der beiden Luciferasemoleküle werden nacheinander im Luminometer ermittelt. Das Signal der Renilla-Luciferase kann dann als konstitutive Kontrolle benutzt werden um Unterschiede in der Transfektionseffizienz auszugleichen.

Die *ITGAV*-Genexpressionskontrolle mit Hilfe des Plasmids pEZX-MT01-*ITGAV*-3'UTR erfolgt analog zu dem Versuch mit dem *WASL*-Plasmid.

**3.2.10.2 Durchführung**

Für die Genexpressionskontrolle mittels Luciferase-Assay wurden die MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, kultiviert, je 300.000 Zellen

in zwei *Wells* einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und 24h später transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit der *precursor* microRNA miR-142-3p (5nM) und der *pre-miR precursor negative control #2* (5nM). Im Unterschied zur vorher beschriebenen Transfektion (Kapitel 3.2.2) beinhaltete die Transfektionsreagenzlösung 2µl DharmaFECT-Transfektionsreagenz und 78µl Opti-MEM® je Ansatz einer 6-Well-Zellkulturplatte. Der miRNA-Lösung wurden je Ansatz neben 4µl pre-miR-142-3p bzw. Kontroll-miRNA und 74,7µl Opti-MEM® noch 1,3µl des Luciferase-Plasmids zugegeben. Somit erfolgte eine Kotransfektion mit der jeweiligen miRNA und dem Plasmid.

Die nachfolgenden Schritte der Transfektion inklusive Auffüllen der *Wells* auf 1ml mit Medium und Mediumwechsel nach 24h erfolgten analog zu den in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Durchführungen. Am zweiten Tag nach Transfektion wurden dann mit dem MicroLumat Plus LB 96V-Luminometer die Aktivitäten der Leuchtkäfer- und Renilla-Luciferasen gemessen und mit dem Computerprogramm WinGlow [Berthold Technologies, Bad Wildbad] ausgewertet.

### **3.2.11 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung kann basierend auf den Ergebnissen der quantitativen Real-Time-PCR (Kapitel 4.6) sowohl eine veränderte Proteinexpression bestätigt werden, als auch Rückschlüsse auf die räumliche Verteilung des betreffenden Proteins in den MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen gezogen werden.

#### **3.2.11.1 Fixieren und Permeabilisieren der Zellen**

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben kultiviert, in eine 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit der *precursor* microRNA miR-142-3p (5nM), der inhibitorischen anti-miR-142-3p (5nM) und der *pre-miR precursor negative control #2* (5nM). Am darauffolgenden Tag fand der

Mediumwechsel statt. Am zweiten Tag nach Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt und in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen/ml in eine 24-Well-Zellkulturplatte, in deren Kompartimente zuvor runde Deckgläschen eingelegt wurden, wieder ausgesät. Nach einer Adhäsionszeit von ca. 48h wurden die Zellen je Ansatz für 10 Min. mit 500µl 3,7%igem Formaldehyd fixiert. Die Fixierlösungen wurden daraufhin verworfen und die Zellen wurden für eine Minute mit 300µl PBS/0,1% TritonX-100 inkubiert, einem nicht-ionischen Tensid. Dies diente dem Permeabilisieren der Zellmembranen, einem notwendigen Schritt für den Zugang der Antikörper. Nach zweimaligem Waschen mit PBS konnten die Proben weiterverwendet oder bei 4°C gelagert werden.

### 3.2.11.2 Immuncytochemische Färbung

Um die Zellen auf die Färbung vorzubereiten wurden sie für einen Zeitraum von 30 Min. bei RT mit 10%igem Aurion BSAc™ (*bovine serum albumin*) in PBS geblockt, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde der Primärantikörper in PBS/1%BSA 1:100 verdünnt auf die Zellen gegeben und 1h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurden folgende Primärantikörper verwendet:

- Monoklonaler rabbit-anti-N-WASP
- Polyklonaler rabbit-anti-ITGαV
- Monoklonaler mouse-anti-Vinculin
- Polyklonaler goat-anti-Cofilin2

Am darauffolgenden Tag wurde der Primärantikörper verworfen und dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen, bevor der fluoreszierende Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben werden konnte. Die folgenden Sekundärantikörper wurden 1:500 in PBS/1%BSA verdünnt:

- Alexa Fluor® 488 goat-anti-rabbit IgG (grüne Fluoreszenz)
- Alexa Fluor® 488 rabbit-anti-goat IgG (grüne Fluoreszenz)
- Alexa Fluor® 488 goat-anti-mouse IgG (grüne Fluoreszenz)

Zusätzlich zum Sekundärantikörper wurde der PBS/1%BSA-Lösung Alexa Fluor® 568-markiertes Phalloidin (rote Fluoreszenz, 1:1000) zur Aktinfärbung hinzugegeben. Alle Schritte wurden ab diesem Zeitpunkt im Dunkeln durchgeführt, um die Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Antikörper nicht zu beeinträchtigen. Es wurde je 300µl Sekundärantikörperlösung auf die Zellen gegeben und für 30 Min. bei RT inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit und dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 Min. wurden die Deckgläschen in der 24-Well-Zellkulturplatte mithilfe einer Pinzette vorsichtig aus den Wells herausgenommen und mit Vectashield® Einbettungsmedium auf einem Objektträger mit den angefärbten Zellen nach unten eingebettet und fixiert. Sie wurden dann im Dunkeln kurzfristig bei 4°C oder längerfristig bei -20°C aufbewahrt.

Die Analyse der auf den Objektträgern fixierten, die gefärbten Zellpräparate enthaltenden Deckgläser erfolgte durch ein Leica DMLB Fluoreszenzmikroskop mit einer Leica DC300F Kamera (Integrin- $\alpha$ V, Vinculin), bzw. durch ein konfokales Lasermikroskop Leica DMIRE2 (N-WASP, Cofilin2). So konnten Abbildungen der fluoreszierenden Zellen erstellt und semiquantitativ optisch ausgewertet werden.

### **3.2.12 Statistik und Analytik**

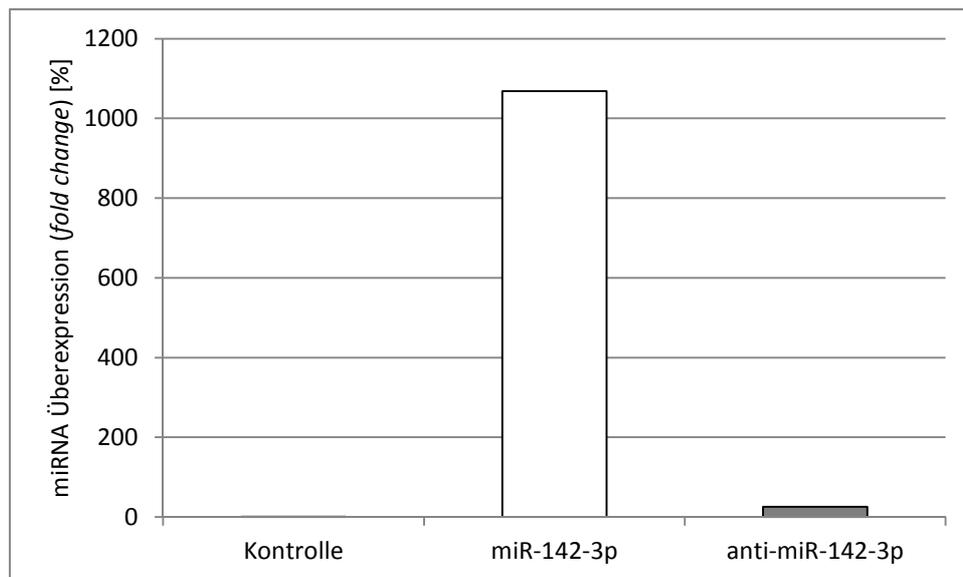
Jedes der Experimente dieser Arbeit wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die grundsätzliche Überprüfung der Daten hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz erfolgte mithilfe des t-Tests (Excel, Microsoft®). Für den Vergleich der Daten untereinander wurden aus n unabhängigen Versuchen die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) ermittelt. Bei unterschiedlicher Fallanzahl n innerhalb eines Experimentes wurde zur Normierung der SD zusätzlich der Standardfehler des

Mittelwertes (SEM) errechnet und angegeben. Die Datenanalyse und Auswertung der verschiedenen Experimente erfolgte entweder direkt anhand der vorliegenden Datenreihen oder wurden wie in den entsprechenden Methodenkapiteln beschrieben durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überexpression der miR-142-3p – Quantitative Mikro Real-Time-PCR

Zur Analyse der miRNA-Überexpression wurde eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Die für die einzelnen Proben ermittelten *fold change*-Werte wurden im Vergleich zur Kontrolle aufgetragen. Der *fold change*-Wert ist ein Maß für die Überexpression der miR-142-3p im Vergleich zur Negativkontrolle. Letztere wurde gleich eins gesetzt. Das Experiment wurde in Doppelwerten durchgeführt.



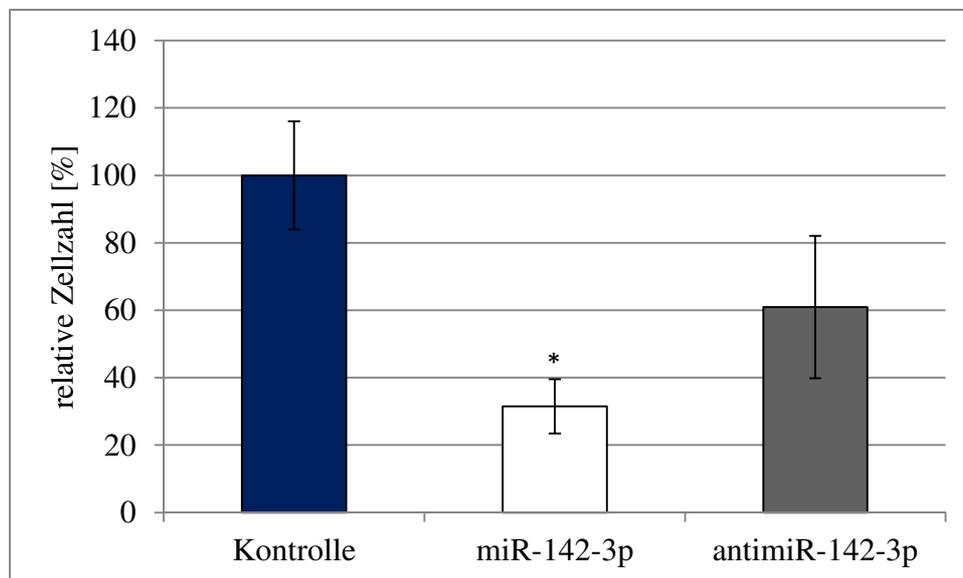
**Abb. 6 Relative Überexpression der miR-142-3p in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468.**  
Kontrollansatz = 1 gesetzt, n=1, Doppelwerte.

In der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich eine etwa tausendfache Überexpression der miR-142-3p in den transfizierten Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 (Abb. 6). Dieses Ergebnis bestätigt die erfolgreiche Transfektion mit der miRNA. Es kann somit davon

ausgegangen werden, dass die transfizierten Zellen eine signifikant veränderte Menge an miR-142-3p aufweisen.

#### 4.2 Einfluss von miR-142-3p auf die Tumorzellinvasivität

Die Auswertung des Effekts der Transfektion auf die Invasivität der Mammakarzinomzellen erfolgte mit Hilfe des Matrigel-Invasionsassays. Die lichtmikroskopische Quantifizierung der durch die Invasionsmembranen gewanderten Zellen ergab eine auf ein Drittel verringerte Invasivität der mit pre-miR-142-3p transfizierten Zellen (Abb. 7,  $p=0,03$ ). Das Experiment wurde fünfmal in Doppelwerten durchgeführt.

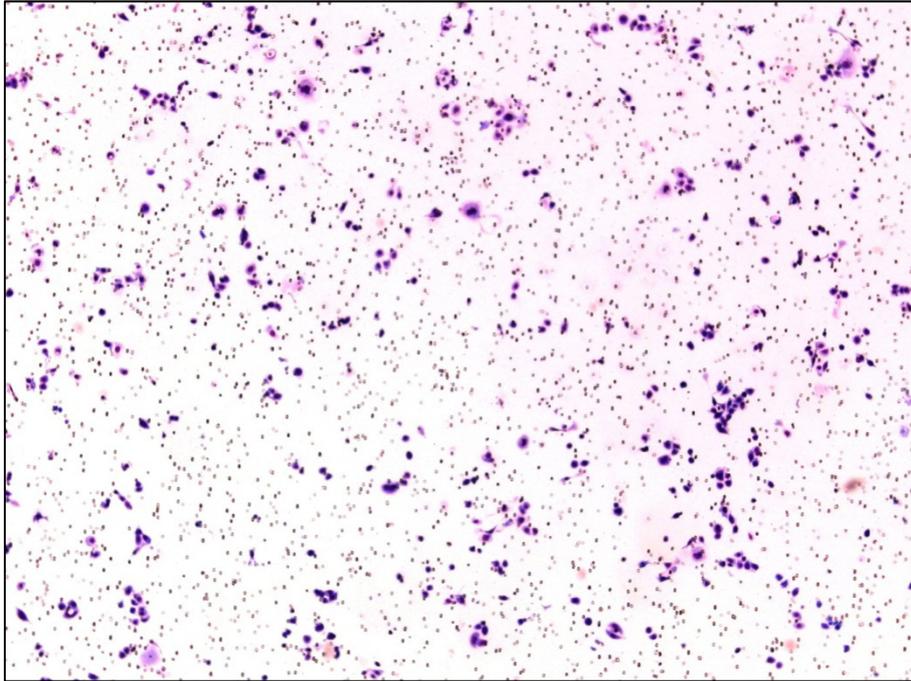


**Abb. 7 Invasionsassay: durch den Filter gewanderte Anzahl von MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen**

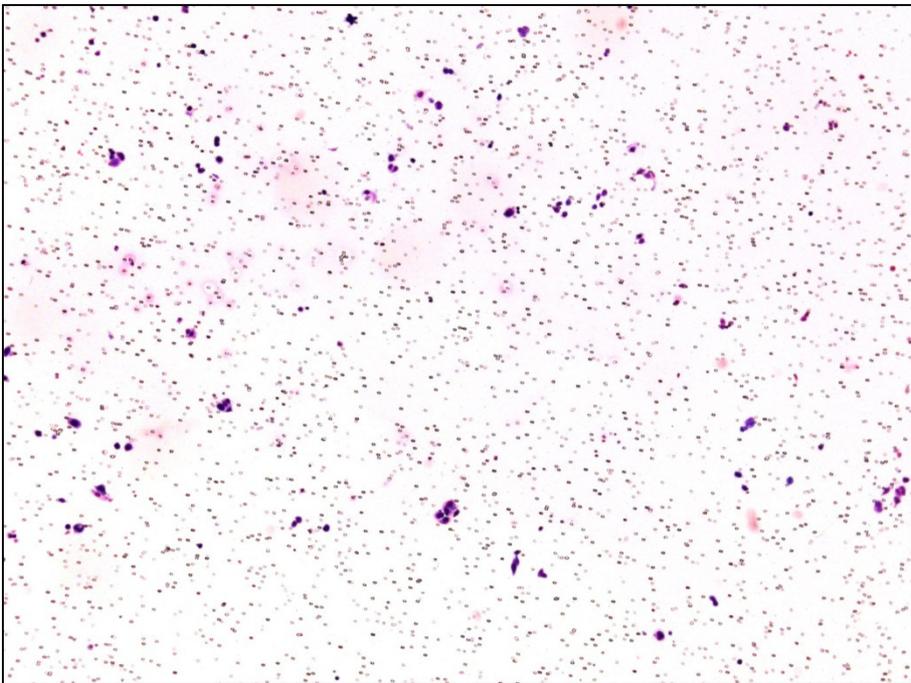
Kontrollansatz = 100% gesetzt, \* =  $p<0,05$ ,  $n = 5$

Bei den mit der anti-miR-142-3p-transfizierten Zellen wurde eine um 40% verringerte Invasivität beobachtet, allerdings schwankte die Anzahl der invasiven Zellen so stark, dass das Ergebnis trotz fünffacher Versuchsdurchführung nicht signifikant ist ( $p=0,16$ ).

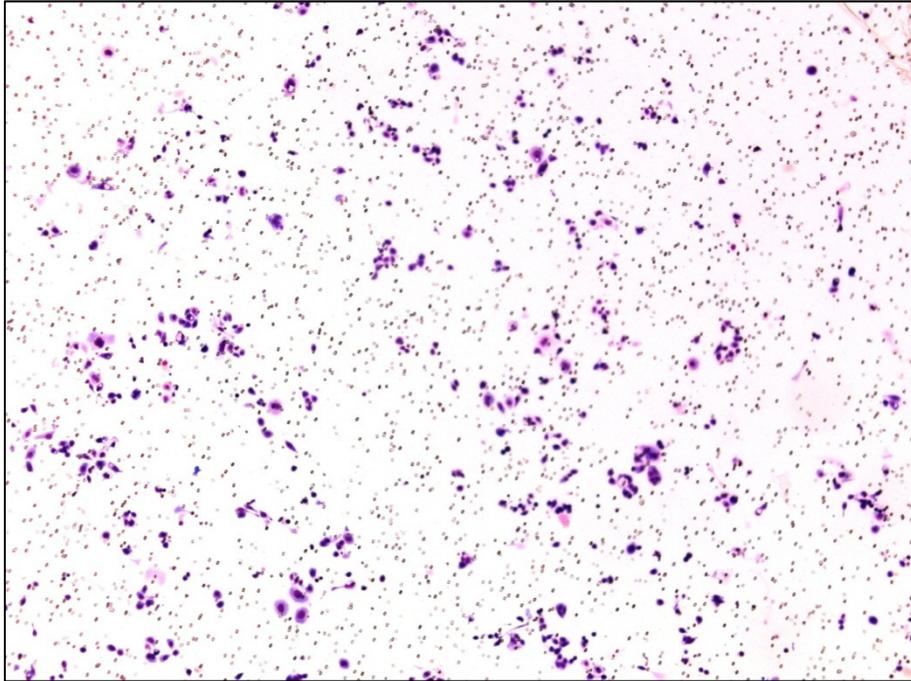
Im Folgenden sind die Ergebnisse durch repräsentative Bilder der verschiedenen Invasionsassay-Membranen veranschaulicht.



**Abb. 8 Invasionsassay mit MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen nach Transfektion mit der Negativkontrolle.** Die invasiven Zellen sind lila gefärbt (Diff-Quik®-Färbeset), außerdem sind Poren der Membran (deutlich kleinere dunkle Punkte) zu erkennen. Foto mit 50facher Vergrößerung aufgenommen.



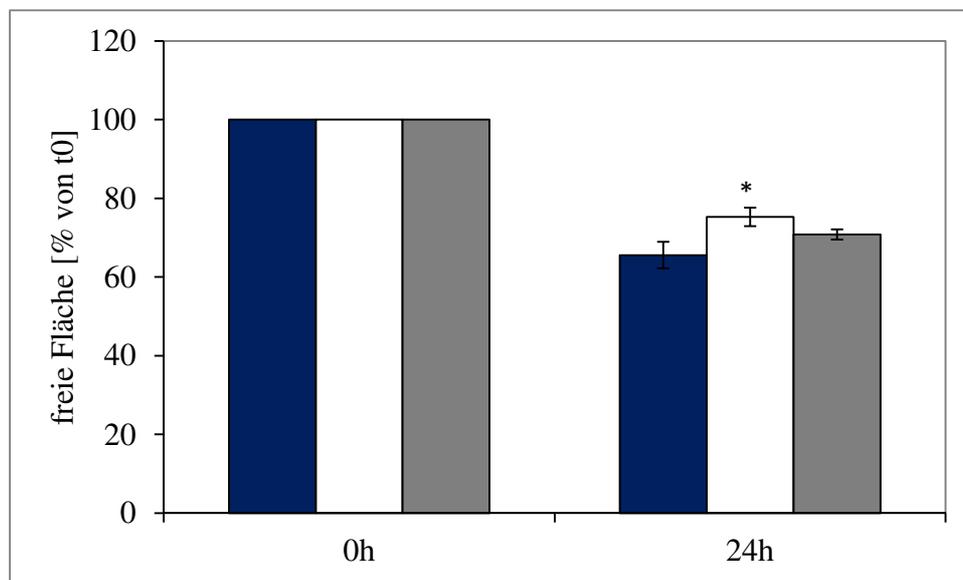
**Abb. 9 Invasionsassay mit MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen nach Transfektion mit der pre-miR-142-3p.** Die invasiven Zellen sind lila gefärbt (Diff-Quik®-Färbeset), außerdem sind Poren der Membran (deutlich kleinere dunkle Punkte) zu erkennen. Foto mit 50facher Vergrößerung aufgenommen.



**Abb. 10** Invasionsassay mit MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen nach Transfektion mit der **antimiR-142-3p**. Die invasiven Zellen sind lila gefärbt (Diff-Quik®-Färbeset), außerdem sind Poren der Membran (deutlich kleinere dunkle Punkte) zu erkennen. Foto mit 50facher Vergrößerung aufgenommen.

### 4.3 Einfluss von miR-142-3p auf die Tumorzellmigration

Das Migrationsverhalten der MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen wurde mit Hilfe des Scratch-Assays untersucht (Kapitel 3.2.5). Um den Einfluss der miR-142-3p-Überexpression auf die Zellen zu ermitteln wurden zu Beginn des Experiments sowie nach sechs und 24h Fotos von dem zellfreien Kreuz auf dem Boden jedes Kompartiments der 6-Well-Zellkulturplatten gemacht. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt und jeweils in Doppelwerten durchgeführt.

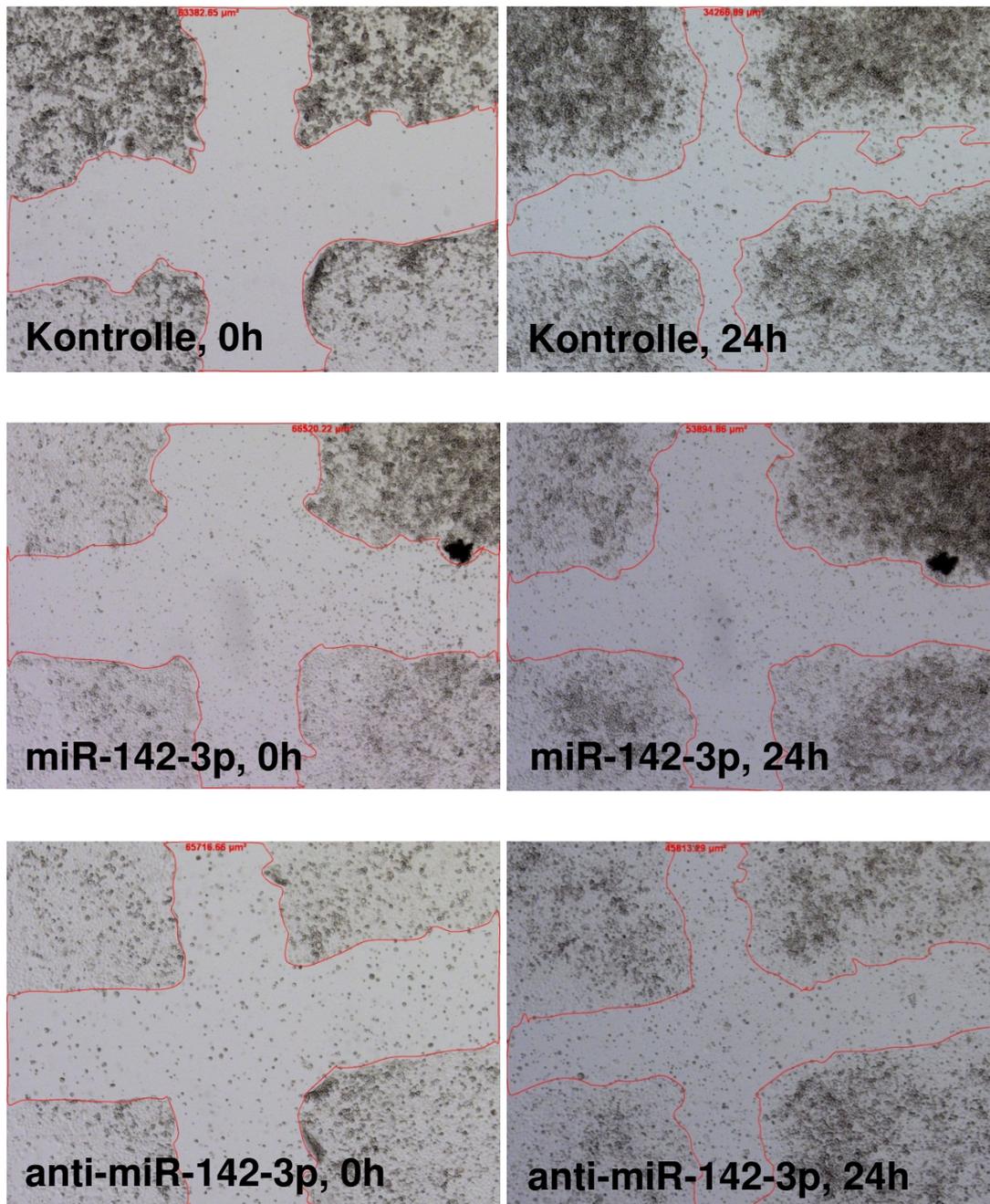


**Abb. 11 Migrationsassay mit MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen nach Transfektion mit der Negativkontrolle (blauer Balken), der pre-miR-142-3p (weißer Balken) und der anti-miR-142-3p (grauer Balken).** Dargestellt ist die Größe der zellfreien Fläche des in den Boden der Zellkulturplatte gekratzten Kreuzes zu Versuchsbeginn (0h) und nach 24h, \* =  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ .

Festgestellt wurde eine verringerte Motilität bei den mit pre-miR-142-3p-transfizierten Zellen. Hinweis dafür war das um 28% verringerte Einwandern der Zellen in die zellfreie Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0,04$ ).

Auch bei diesem Experiment wurde mit den anti-miR-142-3p-transfizierten Zellen kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe nachgewiesen. Die zellfreie Fläche betrug nach 24h im Durchschnitt 70,8% der Ausgangsfläche ( $p=0,19$ ).

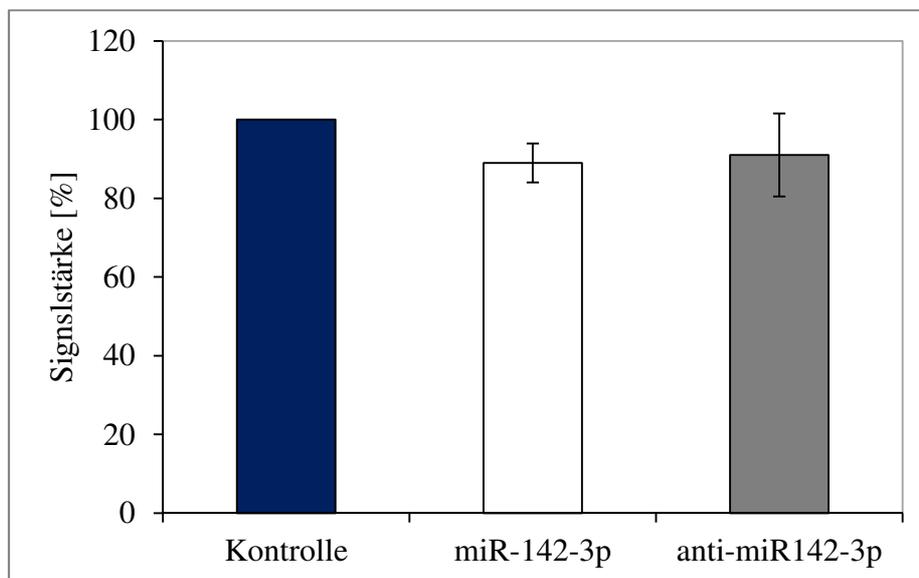
Nachfolgend sind im Vergleich repräsentative Bilder der zellfreien Kreuze zu Versuchsbeginn sowie nach 24 Stunden im Vergleich dargestellt.



**Abb. 12** Migrationsassay mit MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen nach Transfektion mit der Negativkontrolle (oben), der pre-miR-142-3p (Mitte), sowie der anti-miR-142-3p (unten). Dargestellt ist die zellfreie Fläche des in den Boden der Zellkulturplatte gekratzten Kreuzes zu Versuchsbeginn (0h, links) und nach 24h (rechts).

#### 4.4 Einfluss von miR-142-3p auf die Tumorzellproliferation

Mit Hilfe des MTT-Stoffwechsellassays wurde der Einfluss der Transfektion mit pre-miR-142-3p auf die Proliferation der MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen untersucht (Kapitel 3.2.6). Die Messung der Absorption der jeweiligen Menge an umgesetztem Farbstoff erfolgte am ELISA-Reader. Da die Menge an Farbstoff Rückschlüsse auf die Zellmenge in den *Wells* erlaubt, konnten so die Proliferationsraten der mit der pre-miR transfizierten Zellen mit denen der Kontrollzellen verglichen werden.



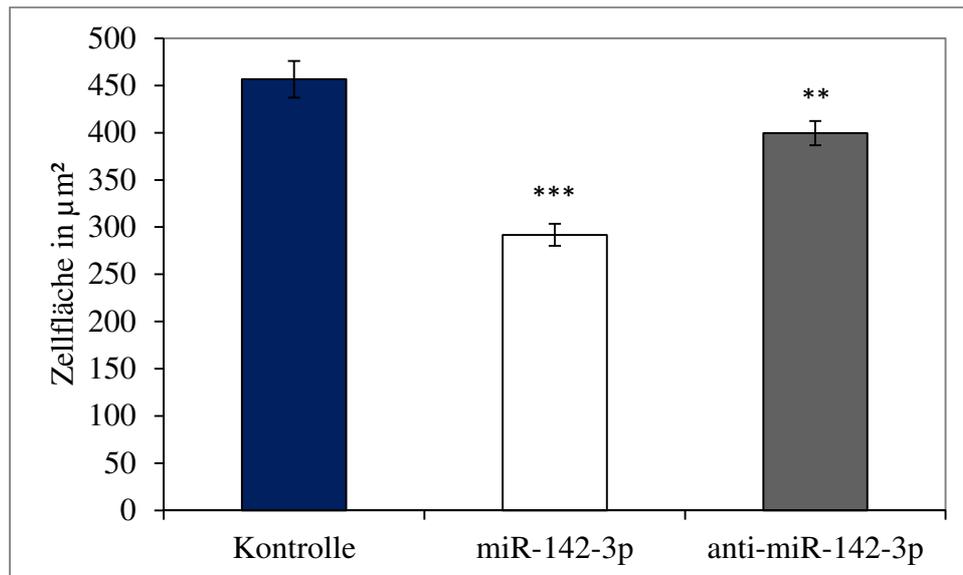
**Abb. 13** Proliferationsassay mit MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen nach Transfektion mit der Negativkontrolle, der pre-miR-142-3p, und der anti-miR-142-3p unter Einsatz von 10 000 Zellen/100 $\mu$ l. Gemessen nach einer Proliferationszeit von 72h. Dargestellt ist die im ELISA-Reader gemessene Signalstärke. Diese erlaubt Rückschlüsse auf die Zellmenge und damit die Proliferationsrate der Mammakarzinomzellen, n=4.

Das Experiment wurde viermal durchgeführt und in Dreifachwerten untersucht. Es wurde eine um 11% herabgesetzte Signalstärke und damit Zellteilungsaktivität der pre-miR-142-3p-transfizierten Zellen beobachtet, welche jedoch nicht signifikant war ( $p=0,10$ ).

Die mit der anti-miR-142-3p transfizierten Zellen zeigten ebenfalls eine tendenziell verringerte Signalstärke, diese war noch weniger signifikant ( $p=0,44$ ).

#### 4.5 Einfluss von miR-142-3p auf die Tumorzellgröße

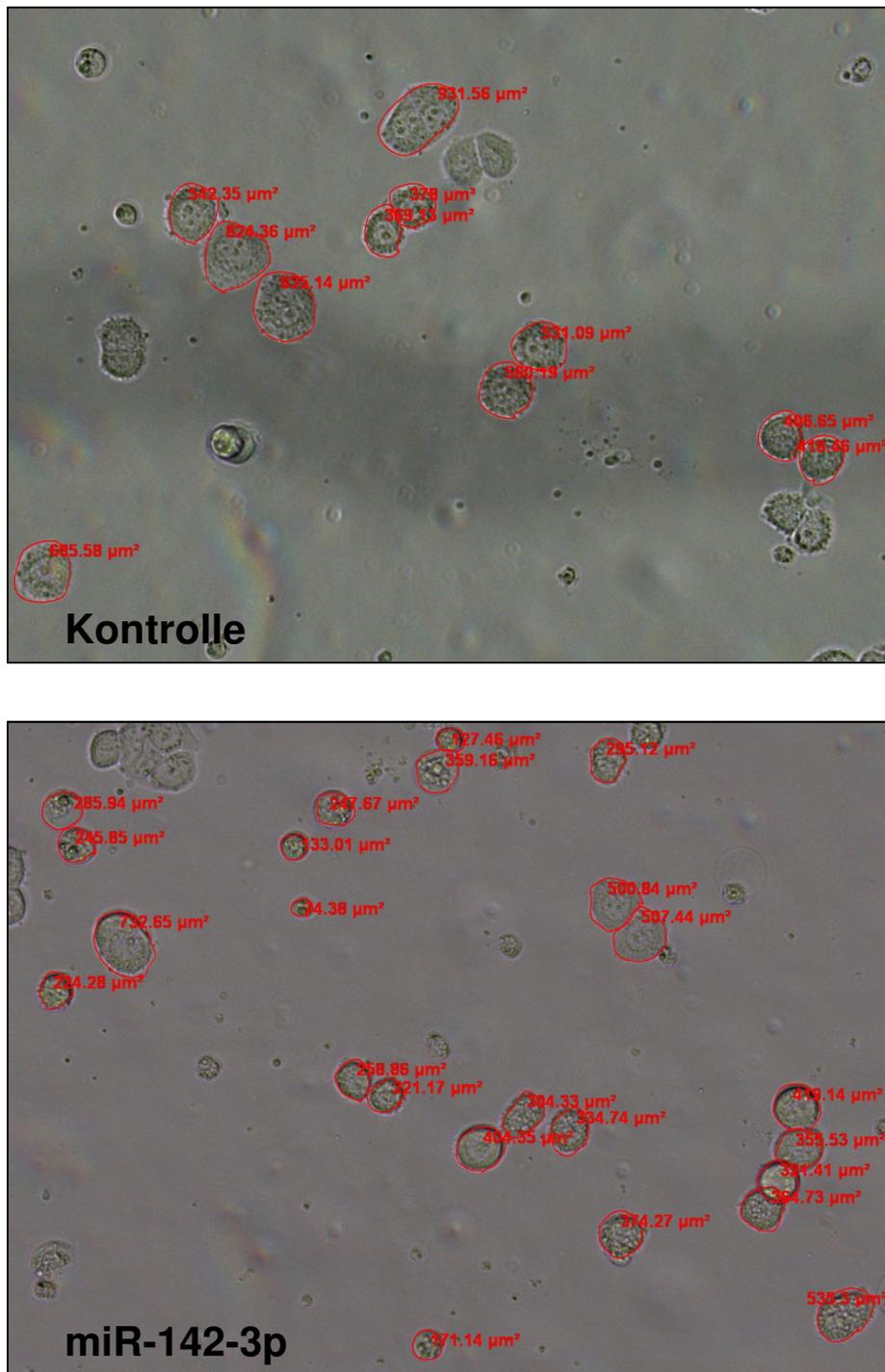
Die Zellgrößen der Mammakarzinomzellen wurden 4 Tage nach der Transfektion mit Hilfe der Software AxioVision 4.3 [Zeiss, Jena] ermittelt (Kapitel 3.2.7).



**Abb. 14** Gemessene Zellgrößen der MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen nach Transfektion mit der Negativkontrolle (blauer Balken), der pre-miR-142-3p (weißer Balken) sowie der anti-miR-142-3p (grauer Balken). Die Zellgröße der miR-142-3p-transfizierten Zellen ist um 36% geringer als die der Kontrollzellen (\*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ,  $n=2$ ).

Dabei wurde bei den mit pre-miR-142-3p-transfizierten Mammakarzinomzellen eine im Mittel um 36% erniedrigte Zellfläche gemessen ( $p=2,5 \times 10^{-9}$ ). Bei den Zellen, welche mit der anti-miR-142-3p transfiziert wurden, zeigte sich eine um 12,5% verringerte Zellgröße ( $p=0,002$ ).

Nachfolgend sind zwei exemplarische Abbildungen von Kontrollzellen sowie miR-142-3p-transfizierten Zellen dargestellt.

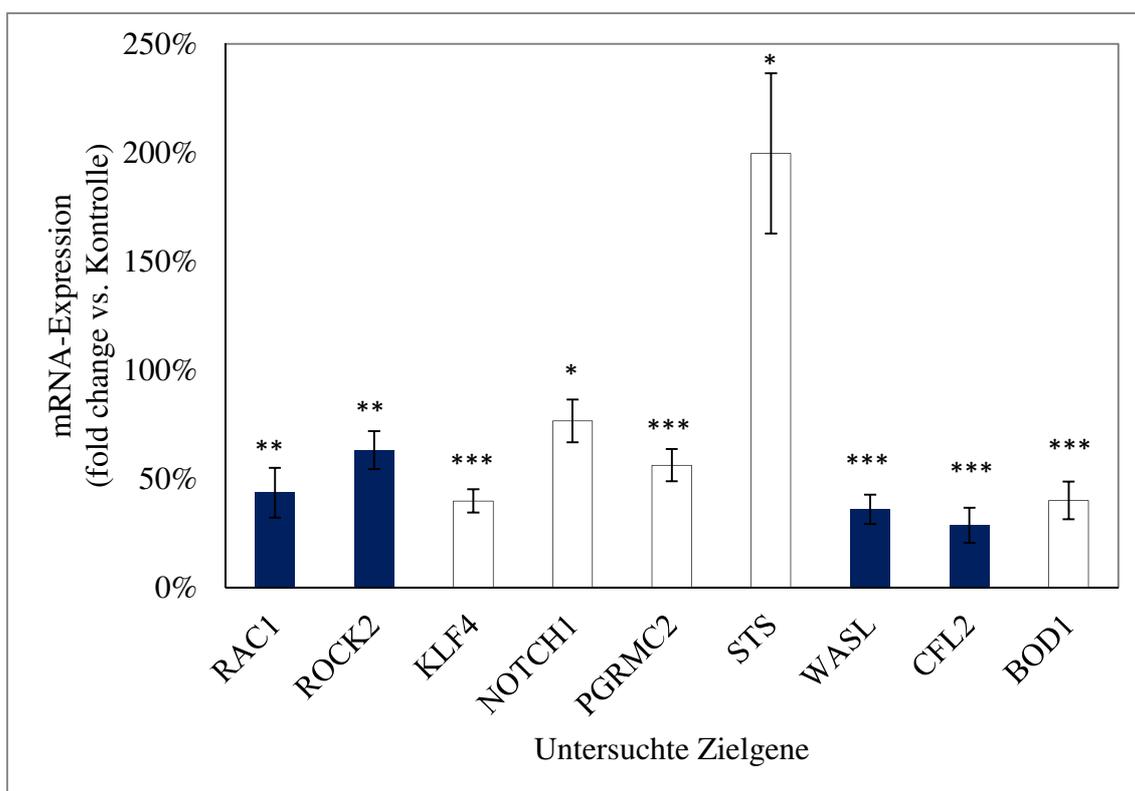


**Abb. 15** Fotografierte MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen nach Transfektion mit der Negativkontrolle (oben) und der pre-miR-142-3p (unten). Die Zellfläche der miR-142-3p-transfizierten Zellen ist im Mittel um 36% geringer als die der Kontrollzellen.

#### 4.6 Genexpressionsanalysen zur Überprüfung der Regulation von Zielgenen

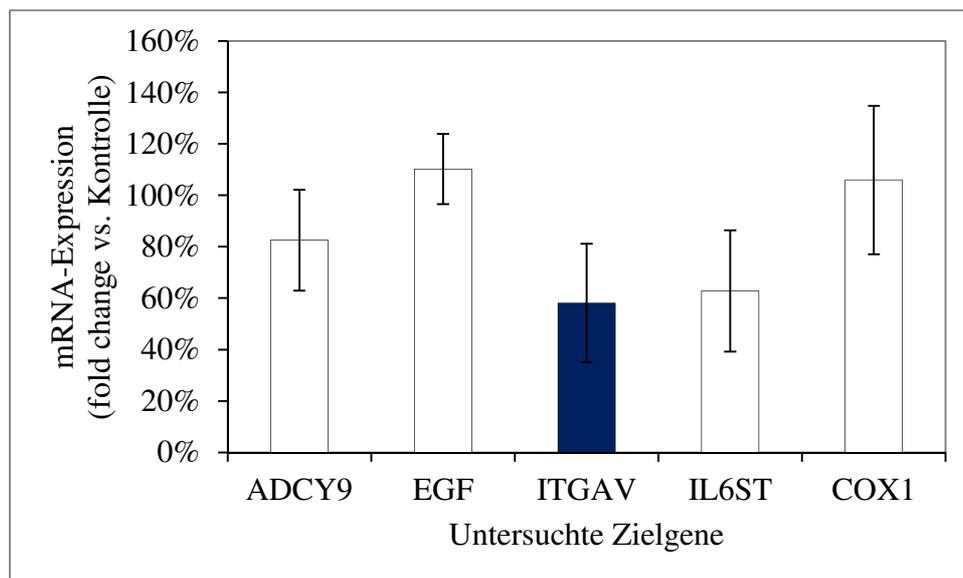
Zur Analyse der Expression möglicher Zielgene wurde die mRNA aus den transfizierten Mammakarzinomzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Menge letzterer konnte dann mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR gemessen werden. Dieser Vorgang erlaubte den Rückschluss auf die ursprüngliche Menge an mRNA in den Zellen (Kapitel 3.2.8), und somit potenziell veränderte Genexpressionslevels der pre-miR-142-3p-transfizierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle.

Das Experiment wurde drei bzw. viermal jeweils in Doppelwerten durchgeführt. Analog zur Analyse der miRNA-PCR in Kapitel 4.1 wurden auch bei der mRNA-PCR die von dem PCR-Gerät ausgegebenen Ct-Werte in die vergleichbaren *fold change*-Werte umgerechnet. Der *fold change*-Wert der Kontrolle wurde dabei gleich 100% gesetzt.



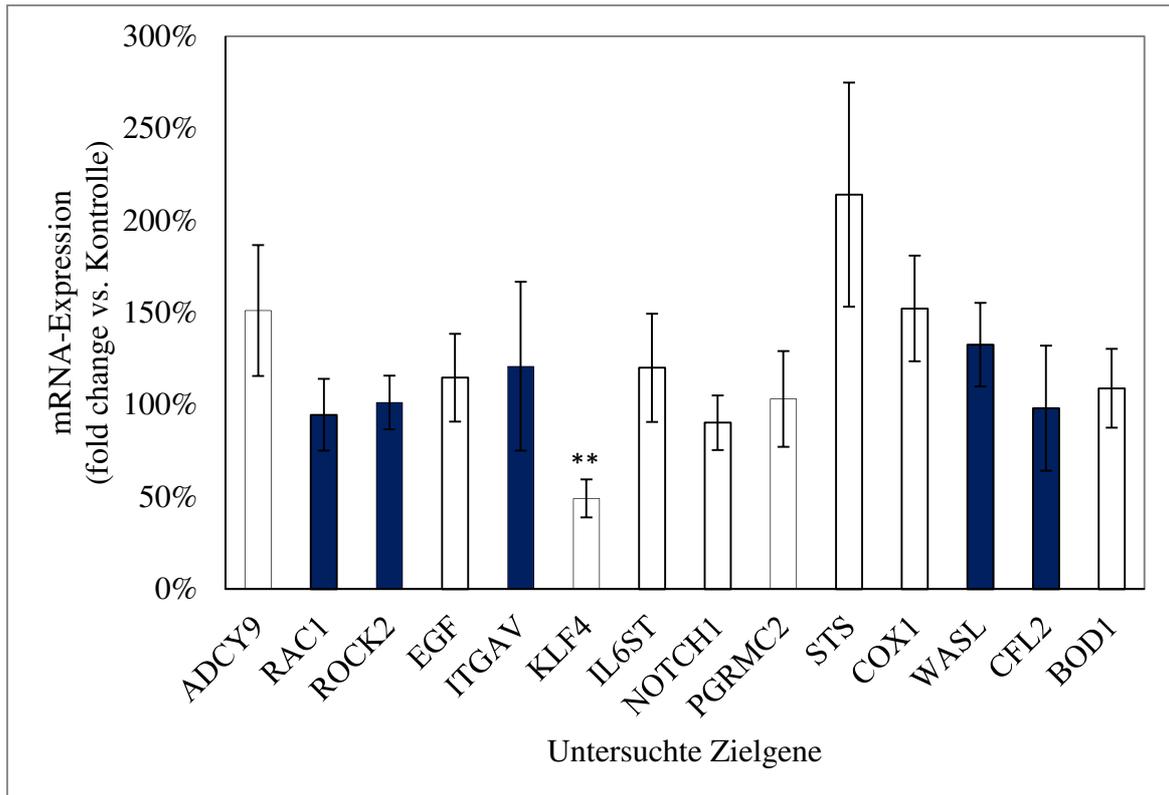
**Abb. 16 Signifikant durch die miR-142-3p regulierte Gene.** 100% entspricht der Expression der jeweiligen mRNA in den Kontrollzellen (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ). Blau markierte Balken entsprechen mit dem Zytoskelett assoziierten Proteinen,  $n \geq 3$ .

Abbildung 16 zeigt die ermittelten *fold change*-Werte der neun signifikant regulierten Gene in den mit pre-miR-142-3p-transfizierten Zellen. Dabei sind die Gene *RAC1*, *ROCK2*, *KLF-4*, *NOTCH1*, *PGRMC2*, *WASL*, *CFL2* und *BOD1* im Vergleich zur Negativkontrolle herunterreguliert, das *STS*-Gen ist hochreguliert. Auffällig im Sinne der Arbeitshypothese ist die Regulation der Gene mehrerer Zytoskelettproteine: *RAC1*, *ROCK2*, N-WASP (Gen: *WASL*), *CFL2* und Integrin- $\alpha$ V (Abb. 17).



**Abb. 17 Nicht signifikant durch die miR-142-3p regulierte Gene.** 100% entspricht der Expression der jeweiligen mRNA in den Kontrollzellen. Der blau markierte Balken des Proteins Integrin- $\alpha$ V markiert seine Eigenschaft als Zytoskelettprotein,  $n \geq 3$ .

Abbildung 17 zeigt die bei diesem Experiment zum größten Teil nicht signifikant durch die anti-miR-142-3p regulierten Gene. Darunter das *Integrin- $\alpha$ V*-Gen ( $p=0,12$ ), welches mit dem Zytoskelett assoziiert ist und sich in vorangegangenen Versuchen mit MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen signifikant durch miR-142-3p reguliert gezeigt hat [Gespräch mit Prof. Dr. M. Götte im November 2012].



**Abb. 18 Genregulation durch anti-miR-142-3p.** 100% entspricht der Expression der jeweiligen mRNA in den Kontrollzellen (\*\* =  $p < 0,01$ ). Blau markierte Balken entsprechen Proteinen des Zytoskeletts,  $n \geq 3$ .

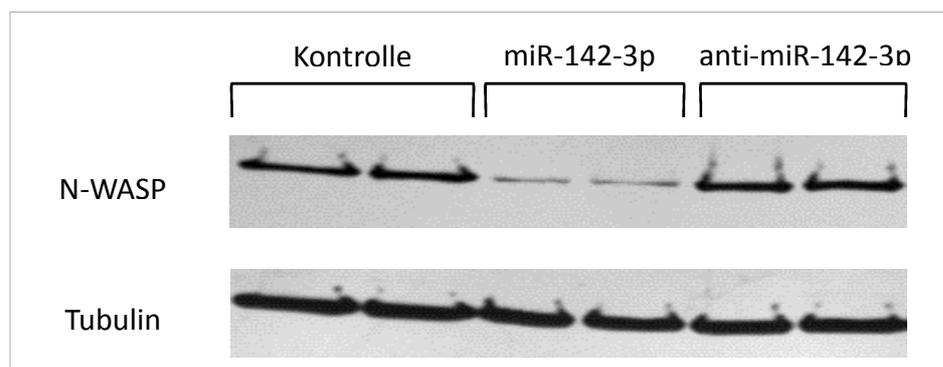
Die in Abbildung 18 dargestellte Regulation der untersuchten Zielgene durch die anti-miR-142-3p ergab bis auf das an Zellproliferation und Differenzierung beteiligte Protein KLF-4 keine signifikanten Ergebnisse. Tendenziell lässt sich im Vergleich zum Effekt der miR-142-3p eher eine Hochregulation der Genexpression erkennen.

#### 4.7 Expressionsanalyse der potenziell regulierten Zielgene auf Proteinebene

Für die Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot wurden fünf Proteine ausgewählt. Die Auswahl erfolgte anhand der Ergebnisse der mRNA-Real-Time-PCR sowie des potenziellen Einflusses der Proteine auf Invasions- und Motilitätseigenschaften der MDA-MB-468-Zellen:

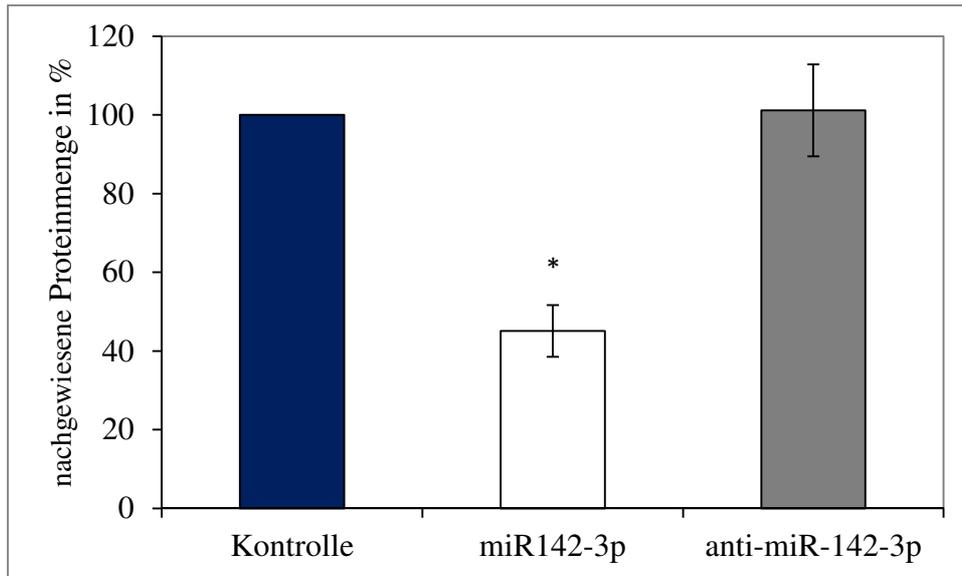
- N-WASP Signaltransduktion von Zelloberflächenrezeptoren zum Aktinzytoskelett (Gen: *WASL*)
- Integrin- $\alpha$ V Zell-Zell-Kontakte, Zell-Matrix-Kontakte
- Cofilin2 bindet an Aktin, Reorganisation der Filamente
- RAC1 Kontrolle von Zellwachstum und zytoskeletaler Reorganisation
- NOTCH1 Transmembranprotein, reguliert u.a. die Synthese des Zellkontaktproteins E-Cadherin

#### 4.7.1 N-WASP



**Abb. 19 Proteinexpressionsanalyse potenziell von der miR-142-3p regulierter Zielgene.** Als Referenzprotein dient Tubulin (55 kDa), die spezifische Bande des N-WASP liegt bei 65 kDa.

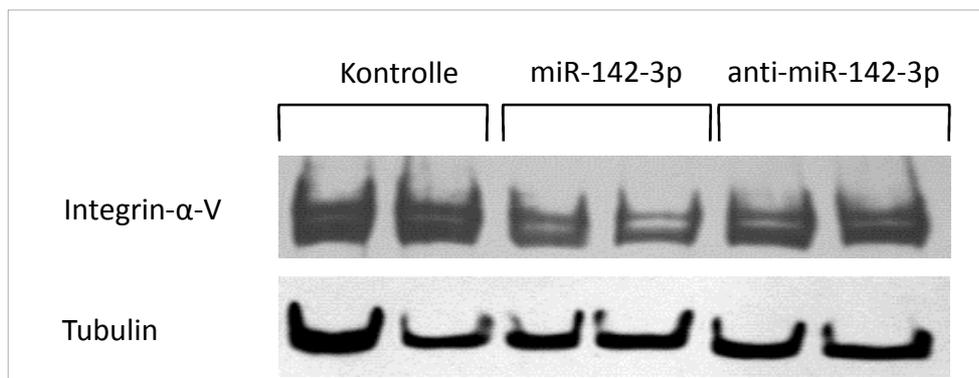
Die Expressionsanalyse des Proteins N-WASP ergab die stärksten Veränderungen nach Transfektion mit pre-miR-142-3p (Abb. 19). Die Menge an Protein in den transfizierten Zellen zeigte sich als um mehr als die Hälfte (55%) erniedrigt. Transfektion mit anti-miR-142-3p zeigte keine signifikante Änderung des Expressionsmusters (Abb. 20).



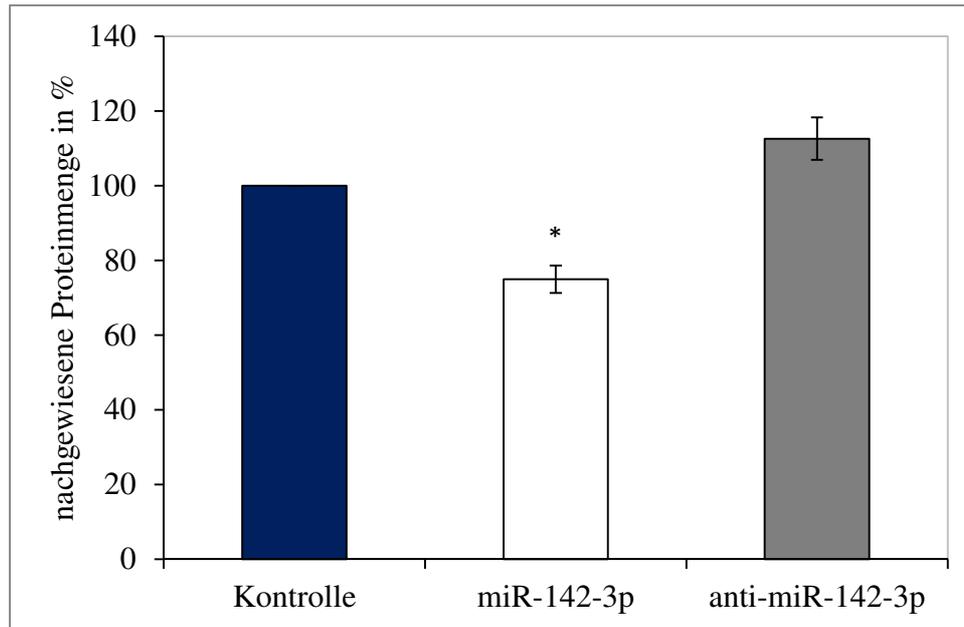
**Abb. 20** Nachgewiesene Proteinmenge von N-WASP nach Transfektion mit der Negativkontrolle, pre-miR-142-3p und anti-miR-142-3p. Die Menge an N-WASP ist in den mit pre-miR-142-3p-transfizierten Zellen um 55% erniedrigt (\* =  $p < 0,05$ ).

#### 4.7.2 Integrin- $\alpha$ V

Die Expressionsanalyse des Proteins Integrin- $\alpha$ V zeigte ähnlich wie N-WASP eine verminderte Expression nach Transfektion mit pre-miR-142-3p. Die Menge an Protein in den transfizierten Zellen zeigte sich signifikant als um mehr als die Hälfte (25%) erniedrigt. Transfektion mit anti-miR-142-3p zeigte keine signifikante Änderung des Expressionsmusters (Abb. 21, 22).



**Abb. 21** Proteinexpressionsanalyse potenziell von der miR-142-3p regulierter Zielgene. Als Referenzprotein dient Tubulin (55 kDa), die spezifischen Banden des Integrin- $\alpha$ V liegen bei 135 und 140 kDa



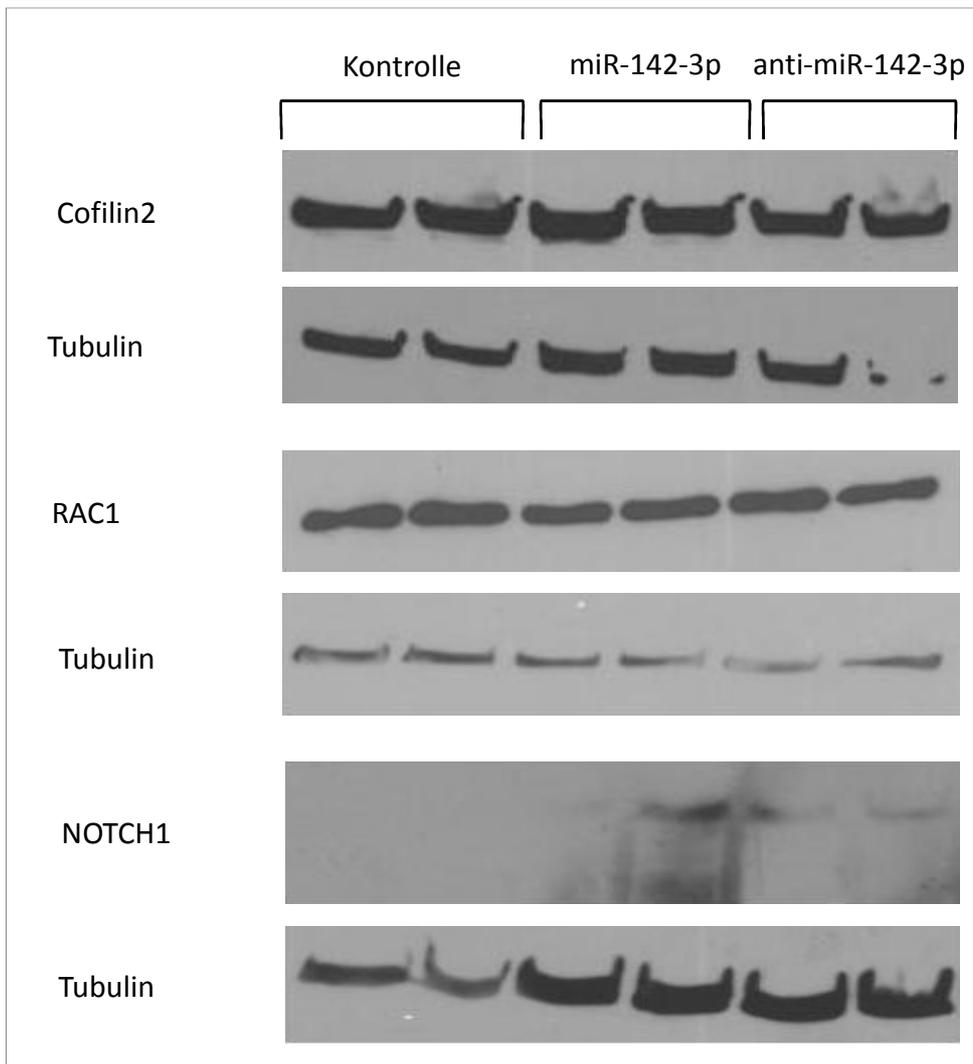
**Abb. 22** Nachgewiesene Proteinmenge von Integrin- $\alpha$ -V nach Transfektion mit der Negativkontrolle, pre-miR-142-3p und anti-miR-142-3p. Die Menge an Integrin- $\alpha$ -V ist in den mit pre-miR-142-3p-transfizierten Zellen um 25% erniedrigt.

#### 4.7.3 Cofilin2, RAC1 und NOTCH1

Neben N-WASP und Integrin- $\alpha$ V wurden die Expressionsmuster der Proteine Cofilin2, RAC1 und NOTCH1 untersucht.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse erwiesen sich nach mehrfacher Versuchsdurchführung allerdings als nicht signifikant bzw. nicht reproduzierbar (Abb. 23). Hier sind exemplarisch einige Western Blot-Aufnahmen gezeigt.

Insbesondere bei der Analyse des NOTCH1-Expressionsmusters zeigte sich unter unterschiedlichen Bedingungen wiederholt ein nur sehr schwaches Signal sowie ein sehr starkes Hintergrundrauschen.

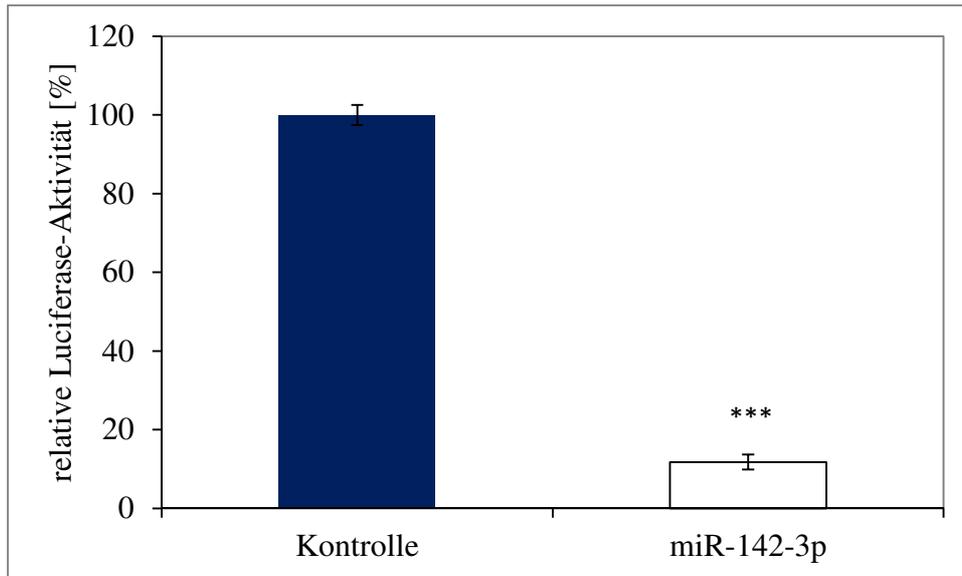


**Abb. 23 Proteinexpressionsanalyse potenziell von der miR-142-3p regulierter Zielgene.** Als Referenzprotein dient Tubulin (55 kDa), die spezifische Bande des Cofilin liegt bei 18 kDa, RAC1 bei 21 kDa und NOTCH1 bei 120 kDa. Die fehlende Tubulinbande im Cofilin2-Experiment ist mit hoher Wahrscheinlichkeit als technisches Artefakt zu werten.

#### 4.8 Bestätigung der Regulation von *WASL* und *Integrin- $\alpha$ V* durch miR-142-3p

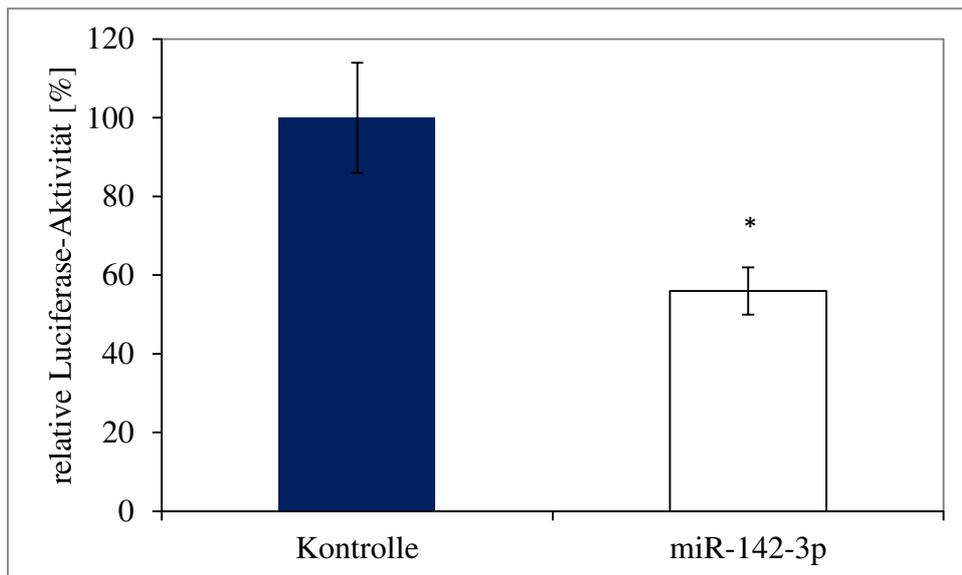
Der Luciferase-Assay wurde durchgeführt, um den Verdacht der Herunterregulation der Expression des *WASL*- sowie des *Integrin- $\alpha$ V*-Gens durch die miR-142-3p zu bestätigen.

Es zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle um 88% reduzierte *WASL*-spezifische Luciferaseaktivität in den Mammakarzinomzellen, welche mit pre-miR-142-3p transfiziert worden waren (Abb. 24). Das hochsignifikante Ergebnis ( $p=0,0008$ ) unterstützt die zuvor beschriebenen Ergebnisse (Kapitel 4.6, 4.7.1).



**Abb. 24** Luciferaseassay zur Bestätigung der Regulation von *WASL* durch *miR-142-3p* mittels Bindung an die 3'UTR. Pre-*miR-142-3p*-Transfektion induzierte eine signifikante 88%ige Reduktion der *WASL*-spezifischen normalisierten Leuchtkäfer-Luciferaseaktivität (n=3, \*\*\* = p <0,001).

Ebenso bei der *ITGAV*-Genexpressionsanalyse zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzierte *ITGAV*-spezifische Luciferaseaktivität in den Mammakarzinomzellen, welche mit pre-*miR-142-3p* transfiziert worden waren (Abb. 25).

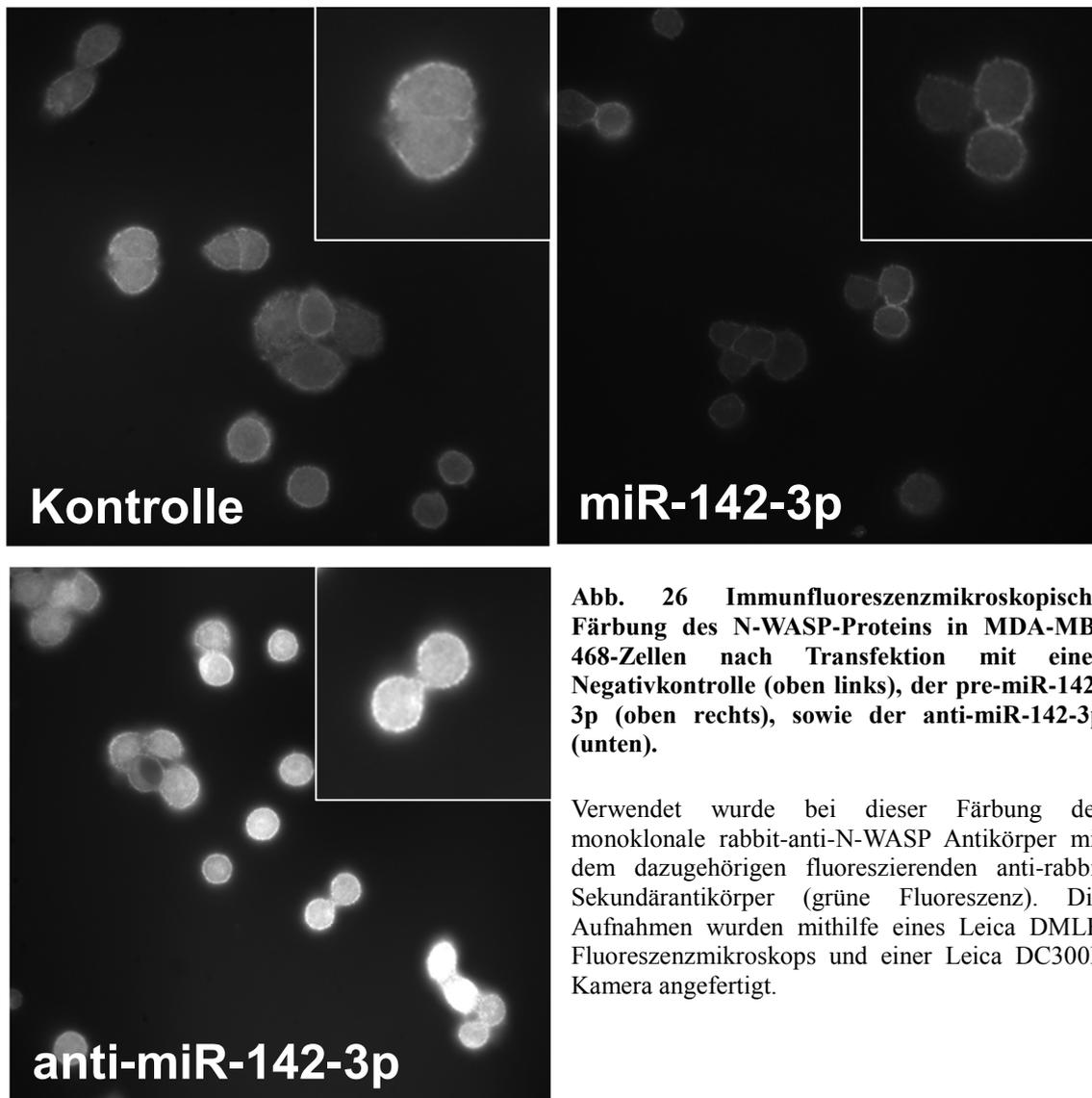


**Abb. 25** Luciferaseassay zur Bestätigung der Regulation von *ITGAV* durch *miR-142-3p* mittels Bindung an die 3'UTR. Pre-*miR-142-3p*-Transfektion induzierte eine signifikante Reduktion der *WASL*-spezifischen normalisierten Leuchtkäfer-Luciferaseaktivität (n=3, \* = p <0,05).

## 4.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der Immunfluoreszenzexperimente wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops Abbildungen der immunhistologisch angefärbten Zellen erstellt. Diese können wie folgt rein visuell ausgewertet werden.

### 4.9.1 N-WASP



**Abb. 26 Immunfluoreszenzmikroskopische Färbung des N-WASP-Proteins in MDA-MB-468-Zellen nach Transfektion mit einer Negativkontrolle (oben links), der pre-miR-142-3p (oben rechts), sowie der anti-miR-142-3p (unten).**

Verwendet wurde bei dieser Färbung der monoklonale rabbit-anti-N-WASP Antikörper mit dem dazugehörigen fluoreszierenden anti-rabbit Sekundäntikörper (grüne Fluoreszenz). Die Aufnahmen wurden mithilfe eines Leica DMLB Fluoreszenzmikroskops und einer Leica DC300F Kamera angefertigt.

Bei der qualitativen Auswertung der Bilder fiel eine geringere Expression von N-WASP in den mit pre-miR-142-3p transfizierten Zellen auf (Abb. 26). Das Signal der Fluoreszenzsonden war verringert. Die mit der anti-miR transfizierten

Mammakarzinomzellen wiesen ein stärkeres Signal auf, welches auf eine erhöhte N-WASP-Synthese hindeutet.

Insgesamt zeigte sich N-WASP dabei als ein vor allem in der Zellperipherie lokalisiertes Protein.

#### 4.9.2 Integrin- $\alpha$ V

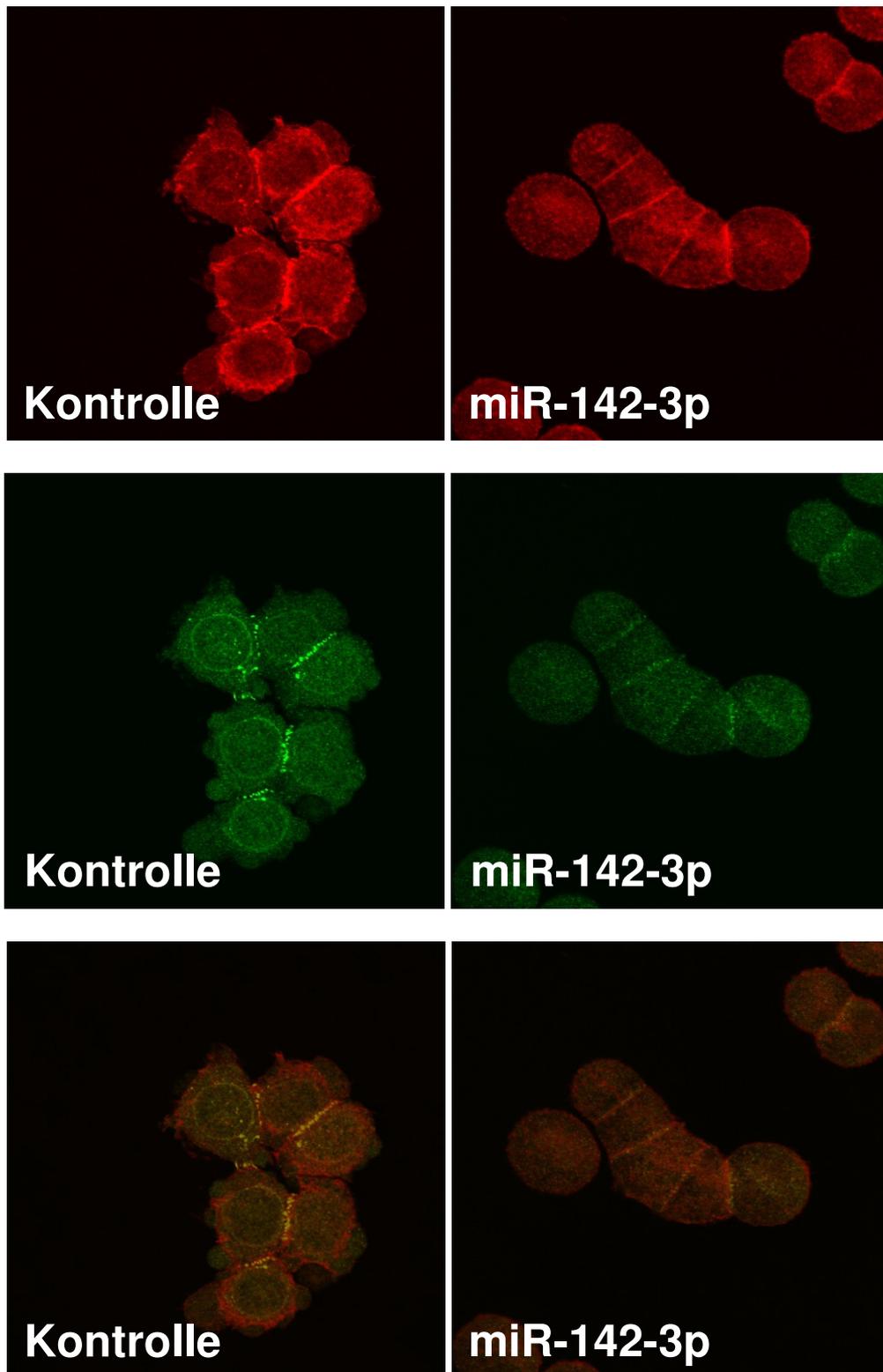
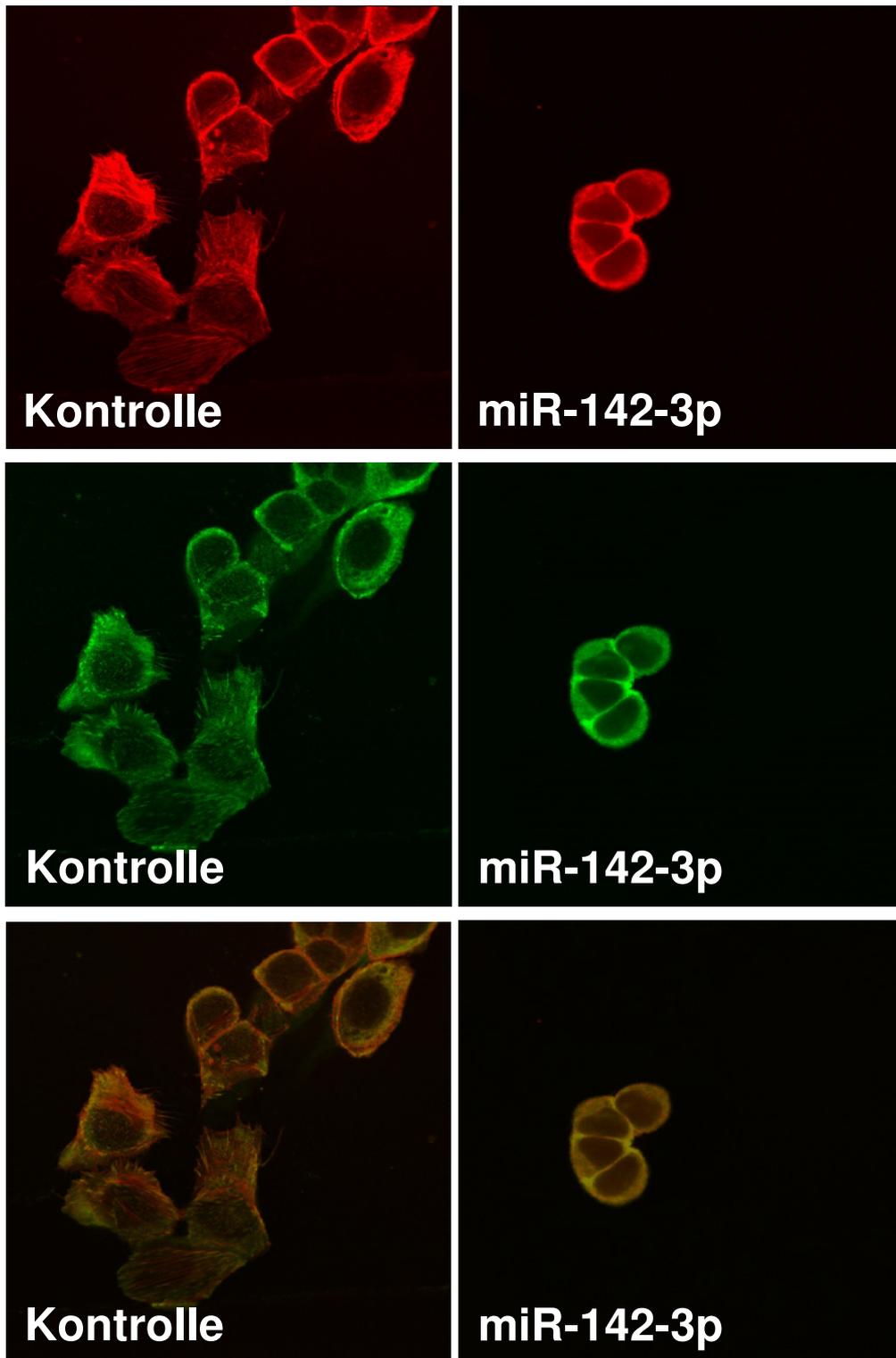


Abb. 27 Immunfluoreszenzmikroskopische Färbung von Integrin- $\alpha$ V und Aktin-Filamenten in MDA-MB-468-Zellen nach Transfektion mit einer Negativkontrolle (links) sowie der pre-miR-142-3p (rechts). Gefärbt wurden Phalloidin (rot) und Integrin- $\alpha$ V (grün). In der unteren Reihe wird die Kolokalisation (gelb) der gefärbten Zellbestandteile durch Bilderfusion untersucht.

Ähnlich dem fluoreszenzgefärbten Protein N-WASP war auch in der Integrin- $\alpha$ V-Färbung ein geringeres Signal bei den mit miR-142-3p transfizierten MDA-MB-468-Zellen zu erkennen (Abb. 27). Darüber hinaus zeigte sich ein besonders starkes Signal in der Zellperipherie sowie an den Zell-Zellgrenzen. Dies spiegelt die Eigenschaft der Integrine wieder, Zellen miteinander und mit der extrazellulären Matrix zu verbinden sowie an der Signalübermittlung zwischen Zellen beteiligt zu sein [Evans & Calderwood, 2007]. Eine Kolokalisation von Integrin- $\alpha$ V und phalloidingefärbten Aktinfilamenten fällt vor allem an Zell-Zellgrenzen auf. Diese ist stärker in der Kontrolle ausgebildet als in mit miR-142-3p transfizierten Zellen. In letzteren überwiegt das diffuse intrazelluläre Kolokalisationsmuster (hier gelb dargestellt).

Insgesamt imponieren die Kontrollzellen mit einem Färbemuster, welches sich auch über die Zellmembran hinaus fortsetzt und Pseudopodien entsprechen könnte. Aktin und Integrin- $\alpha$ V treten dort kolokalisiert auf. In den miR-142-3p-transfizierten Zellen sind diese Zellausstülpungen nicht zu sehen, die Zellen hängen glatt begrenzt und wurmähnlich aneinander.

### 4.9.3 Vinculin



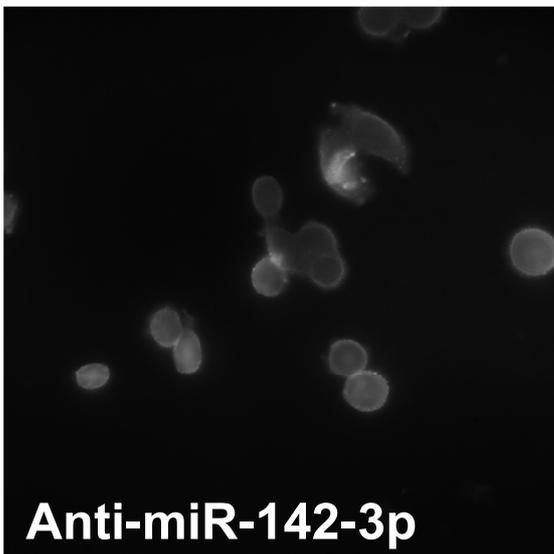
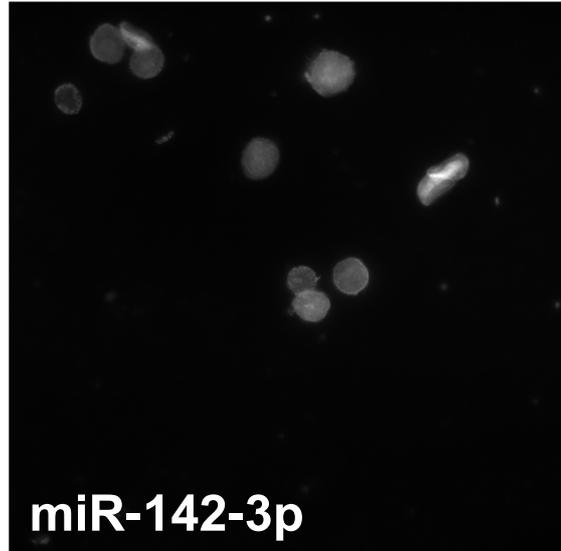
**Abb. 28** Immunfluoreszenzmikroskopische Färbung von Vinculin und Aktin-Filamenten in MDA-MB-468-Zellen nach Transfektion mit einer Negativkontrolle (links) sowie der pre-miR-142-3p (rechts). Gefärbt wurden Phalloidin (rot) und Vinculin (grün). In der unteren Reihe wird die Kolokalisation (gelb) der gefärbten Zellbestandteile durch Bilderfusion untersucht.

Zur unterstützenden Analyse des Effekts der miR-142-3p-Transfektion auf die Architektur des Zytoskeletts der MDA-MB-468-Zellen wurden in einem weiteren Experiment Aktin und Vinculinstrukturen angefärbt (Abb. 28). Vinculin als an Zell-Zellkontakten und fokalen Adhäsionen mit der extrazellulären Matrix beteiligtes Molekül zeigte sich dabei vor allem in Zellperipherie und in Zellausstülpungen [Ziegler et al., 2006]. An diesen Stellen war es auch mit Aktinfilamenten kolokalisiert. Intrazelluläre Aktinfilamente zeigten sich deutlich in den Kontrollbildern, diese waren aber nicht zusammen mit Vinculinsignalen anzutreffen.

Bei den mit der miR-142-3p transfizierten Zellen ließ sich zwar eine deutliche Kolokalisation der beiden untersuchten Moleküle erkennen, es fielen aber weder ausgeprägte intrazelluläre Aktinfilamente noch Pseudopodien auf. Morphologisch entsprachen die Befunde den in Kapitel 4.8.3. geschilderten wurmähnlichen Zusammenschlüssen mehrerer miR-142-3p-transfizierter Zellen.

#### **4.9.4 Cofilin2**

Aufgrund der Assoziation des Proteins Cofilin2 mit dem Aktinzytoskelett und des Verdachts der Regulation durch miR-142-3p wurde es auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei zeigten sich allerdings keine reproduzierbaren Ergebnisse. Zwar schien es tendenziell eher in der Zellperipherie lokalisiert (Abb. 29), ein Effekt der Transfektion konnte jedoch in wiederholenden Experimenten nicht bestätigt werden. Nachfolgend sind repräsentative Bilder aufgeführt.



**Abb. 29** Immunfluoreszenzmikroskopische Färbung von Cofilin2 in MDA-MB-468-Zellen nach Transfektion mit einer Negativkontrolle (oben links), der pre-miR-142-3p (oben rechts), sowie der anti-miR-142-3p (unten).

Verwendet wurde bei dieser Färbung der polyklonale goat-anti-Cofilin2 Antikörper mit dem dazugehörigen fluoreszierenden anti-goat Sekundärantikörper (grüne Fluoreszenz). Die Aufnahmen wurden mithilfe eines Leica DMLB Fluoreszenzmikroskops und einer Leica DC300F Kamera angefertigt.

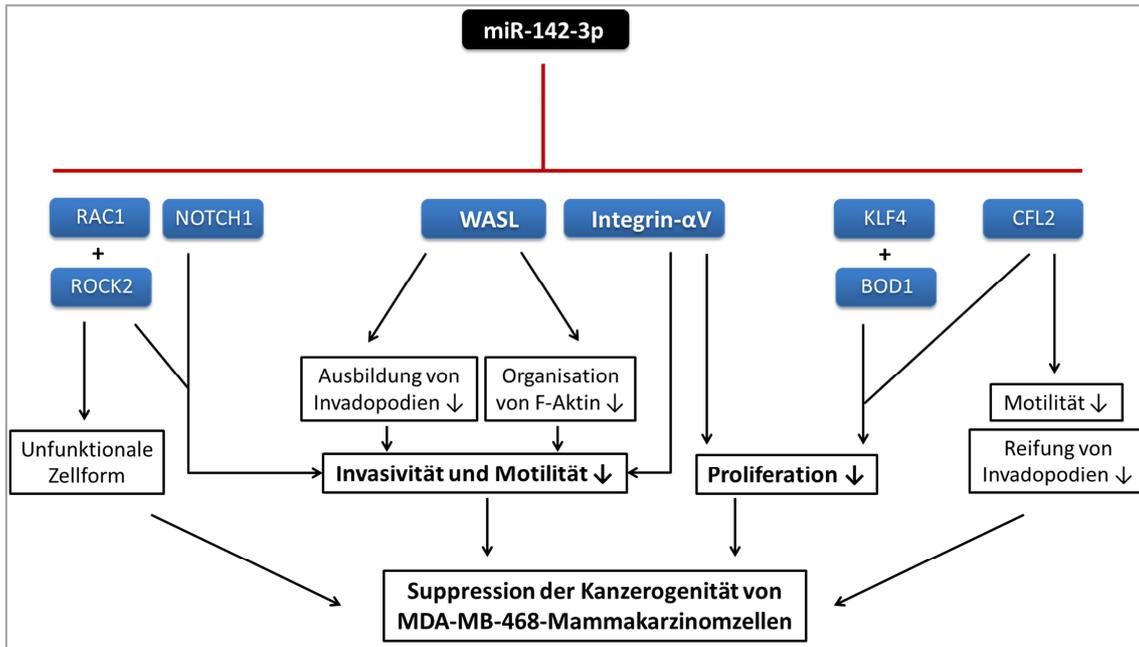
## 5 Diskussion

Metastasierung beschreibt das Vorhandensein von Tumorgewebe fernab vom Primärherd einer Malignomerkrankung aufgrund einer Ausbreitung von Tumorzellen. Fast 90% aller malignomassoziierten Todesfälle sind auf derartige Vorgänge zurückzuführen [Crnic & Christofori, 2004]. Beim Mammakarzinom sind verschiedene miRNA-Moleküle bekannt, denen eine Auswirkung auf das Metastasierungsverhalten zugeschrieben wird [L. Wang & Wang, 2012].

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war die molekulare Charakterisierung der Rolle von miR-142-3p bei der Regulation von Zellinvasivität, -motilität und -proliferation in Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-468 mit Hilfe eines ektopen *in vitro*-Überexpressionsansatzes. Vor dem Hintergrund dass sich miR-142-3p in der Vergangenheit in Mammakarzinombiopsien auffällig verändert exprimiert gezeigt hatte (Kapitel 1.4.4), sollte die Basis für eine potenzielle therapeutische Bedeutung dieser miRNA erforscht werden.

### 5.1 miR-142-3p hemmt Invasivität und Motilität von MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen

Die mit pre-miR-142-3p transfizierten Zellen zeigten im *Invasionsassay* eine auf ein Drittel (31,5%,  $p=0,03$ ) verringerte Invasivität beim Durchwandern einer mit Matrigel Matrix beschichteten Membran (Kapitel 4.2). Auch im *Scratch-Assay* zeigte sich eine verringerte Motilität im Sinne einer um 28% verminderten Migrationsgeschwindigkeit in die zellefreie Wundfläche ( $p=0,04$ , Kapitel 4.3).



**Abb. 29 Schematische Darstellung der Funktion von miR-142-3p in MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen.** miR-142-3p hemmt posttranskriptionell die Expression verschiedener Gene (blaue Kästen). Dies führt zu funktionellen Einbußen der Krebszellen (weiße Kästen) und mündet in einer durch die miRNA hervorgerufenen verringerten Kanzerogenität. Im Mittelpunkt steht dabei der Effekt auf die Gene *WASL* (Protein: N-WASP) und *Integrin-αV*, welche auf Proteinebene signifikant reguliert waren.

Diese Ergebnisse deuten auf einen hemmenden Effekt der transfizierten miRNA auf die tumorigenen Eigenschaften der MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen hin. Auch die im Folgenden diskutierten Effekte von miR-142-3p auf die Proliferation der untersuchten Zellen weisen in eine ähnliche Richtung (Kapitel 5.3.2).

Auf der Basis der oben beschriebenen Effekte lässt sich konstatieren, dass die in den Experimenten dieser Arbeit beobachteten Einflüsse von miR-142-3p in Bezug auf Mammakarzinomzellen Tumorsuppressor-ähnliche Eigenschaften nahelegen (Abb. 29). Dies bestätigt die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe aus Experimenten an MDA-MB-231- und MCF-7-Mammakarzinomzellen [Gespräch mit Prof. Dr. M. Götte im November 2012].

Insbesondere interessant im Rahmen dieser Ergebnisse ist eine Publikation aus der Forschungsgruppe um Lifen Wu. Dort konnte gezeigt werden, dass miR-142-3p über eine Regulation des *RAC1*-Moleküls für eine verringerte Invasivität und Motilität von

hepatozellulären Karzinomzellen sorgt [L. Wu et al., 2011]. Auch in unseren Analysen war das *RAC1*-Gen herunterreguliert, es konnte lediglich keine Regulation auf Proteinebene nachgewiesen werden (Kapitel 4.6, 4.7.3). Eine ähnliche miRNA-Funktionsweise in unterschiedlichen Krebsarten spricht allerdings für die vielversprechende Aussicht, auf ein verbreitetes Wirkprinzip gestoßen zu sein. Laut Wu et al. besteht der Verdacht, dass Tumorzellen gezielt Tumorsuppressorgene, die beispielsweise für miRNAs kodieren, herunterregulieren.

Bei den im Folgenden diskutierten Zielgenen handelt es sich mit Ausnahme von NOTCH1 um sogenannte „*Predicted Targets*“, für welche mit Hilfe von Algorithmen wie microRNA.org mögliche Sequenzalignments berechnet wurden. Die Untersuchung der Expressionsregulation von NOTCH1 stützt sich auf die vielversprechenden Ergebnisse des durchgeführten *Affymetrix-Screenings* (siehe Anhang).

## **5.2 Hauptzielgene und Wirkmechanismen von miR-142-3p**

### **5.2.1 N-WASP ist essentiell für Aktinorganisation an Zonulae adhaerentes und für die Ausbildung von Invadopodien**

Um in einen motilen Phänotyp überzugehen, finden in Brustkrebszellen Änderungen zugunsten hochdynamischer Strukturen in Form von Aktinfilamenten und zytoplasmatischen Mikrotubulikomplexen statt [Insall & Jones, 2006; Parsons et al., 2005]. Neben Zellausstülpungen wie Filopodien und Lamellipodien bilden invasive Tumorzellen sogenannte Invadopodien aus. Mit Hilfe dieser Strukturen können sie extrazelluläre Matrix abbauen und sich so in physiologischem Gewebe ausbreiten [Yamaguchi et al., 2005]. Zusätzlich können auch unterschiedliche Komponenten von *Tight Junctions* direkt oder indirekt an Fortschreiten und Ausbreitung von Krebserkrankungen beteiligt sein [Arshad et al., 2010; Martin et al., 2011; Turunen et al., 2009].

Beim neuralen Wiskott-Aldrich Syndrom Protein N-WASP handelt es sich um ein Protein, welches ubiquitär in Säugerzellen exprimiert wird und in die Signaltransduktion von Rezeptoren der Zelloberfläche zum Aktinzytoskelett involviert

ist [Escudero-Esparza et al., 2012]. Es wird vom *WASP*-Gen kodiert und ist vor allem an Zell-Zellgrenzen wie *Zonulae adhaerentes* und *Tight Junctions* lokalisiert. An der Ausbildung letzterer ist es maßgeblich beteiligt [Ivanov et al., 2005; Kovacs et al., 2011]. Auch in Podosomen, Lamellipodien und Invadopodien von Tumorzellen wurde es bisher beschrieben [Osiak et al., 2005; Takahashi & Suzuki, 2011; Yamaguchi et al., 2005]. Dort kann es durch verschiedene Signaltransduktionsmoleküle wie NCK, GRB2, WIRE, CDC42 oder Phosphoinositide aus seiner auto-inhibierten Konformation aktiviert werden [Yamaguchi et al., 2005] und tritt darauf in Interaktion mit anderen Molekülen [Dovas & Cox, 2010]. Seine Funktion besteht darin, die homöostatische Aktinansammlung (d.h. An- und Abbau) an den *Zonulae adhaerentes* zu regulieren. Neben der Organisation des Aktins im Ruhezustand werden dabei insbesondere neugebildete F-Aktinfilamente stabilisiert und in apikale Ringe eingebaut, welche von hoher Bedeutung für die Integrität der *Zonulae adhaerentes* sind [Kovacs et al., 2011].

Aufgebaut sind die Proteine der WASP-Familie aus einer (konservierten) C-terminalen Region, die sich *verprolin homology* nennt, einer zentralen *cofilin homology* und einer aziden Domäne. Die *verprolin homology* Domäne kann direkt mit Aktin in Kontakt treten während die *cofilin homology azide region* mit dem Arp2/3-Komplex (*actin-related protein*) interagiert. Dies geschieht auf Signale hin, welche die Zellmigration induzieren [Sarmiento et al., 2008].

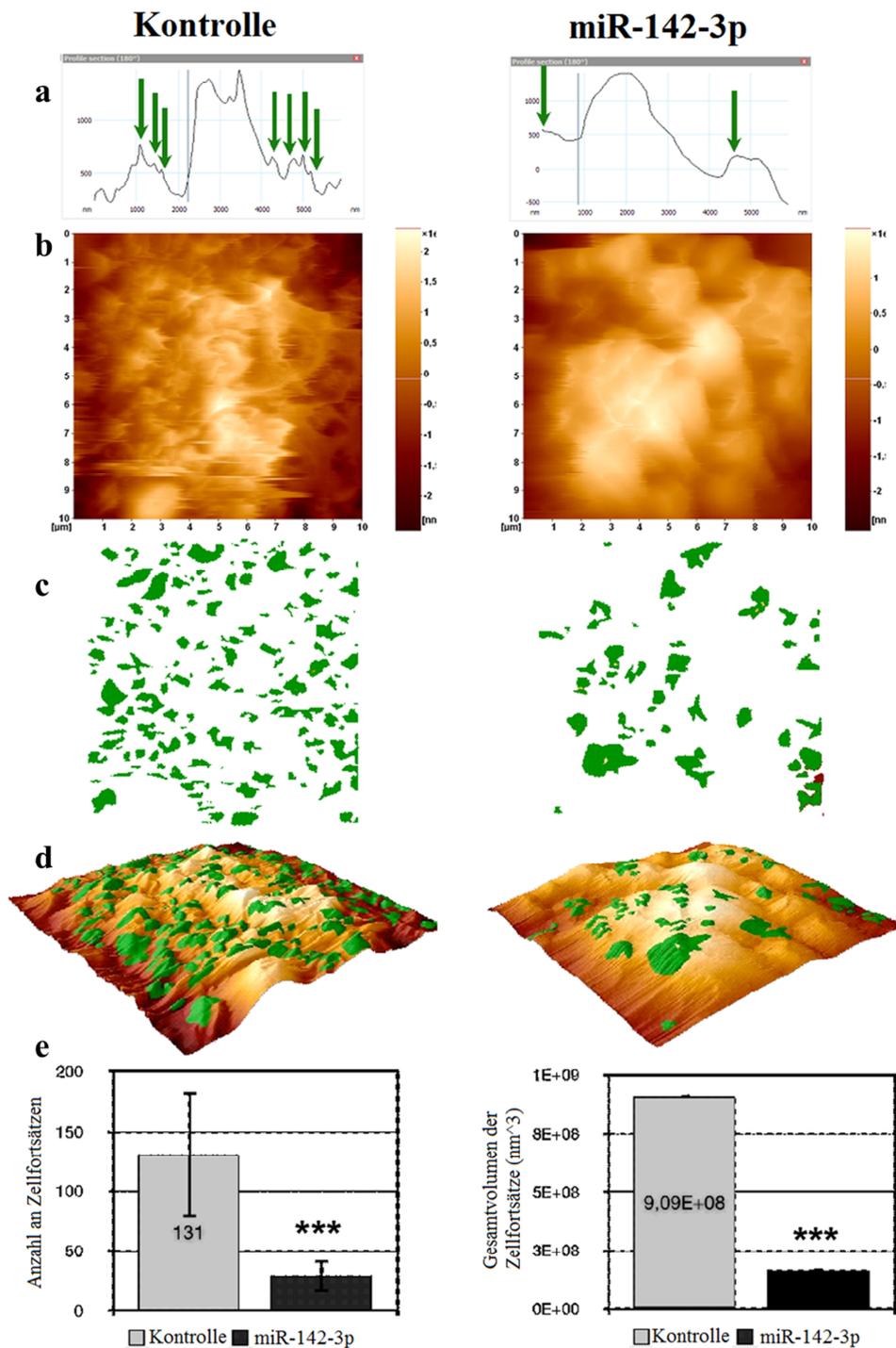
Auf seine Aktivierung durch N-WASP hin [Jaffe & Hall, 2005], lagert sich der Arp2/3-Komplex an bestehende Aktinfilamente an und ist direkt an der Polymerisierung weiterer Aktinmonomere beteiligt [Suetsugu et al., 2002]. Er organisiert diese daraufhin in verzweigten Zytoskelettnetzwerken. Zu diesem Zweck besitzt er eine Aktinfilamentbindestelle [Mullins et al., 1997]. Die Verlängerung von Filamenten im dendritischen Netzwerk führt so zu einer Druckkraft, welche für Zellfortsätze essentiell ist [Mogilner & Oster, 2003].

Laut der Forschungsgruppe um Kovacs funktioniert ein weiterer bedeutender physiologischer Effekt zur Unterstützung der Integrität von *Zonulae adhaerentes* des Cadherin-abhängigen N-WASP über einen Signalübertragungsweg, welcher der Aktinpolymerisierung nachgeschaltet ist: die Organisation und Stabilisierung von F-

Aktinfilamenten. Dieser scheint unabhängig von der oben beschriebenen Arp2/3-Aktivierung zu sein. Es handelt sich dabei um eine Interaktion von N-WASP mit dem Aktinregulatorprotein WIRE (*Wip-RElated*, auch bekannt als *WIPF2* oder *WICH*), einem Mitglied der WIP-Familie (*WAS/WASL interacting protein*). Dieses bindet direkt an die sogenannte WH1-Domäne von N-WASP und wird so zum E-Cadherin der Zonulae adhaerentes rekrutiert [Kovacs et al., 2011]. Dass WIRE direkt mit F-Aktin und G-Aktinbestandteilen des Zytoskeletts interagieren kann, wurde bereits gezeigt [Kato & Takenawa, 2005].

Es zeigt sich ein enger Zusammenhang zwischen E-Cadherinadhäsion und junktionaler Organisation sowie zytoskeletaler Regulation mit dem N-WASP/WIRE-Komplex im Zentrum. Während die Aktinfilamentbildung dabei weitgehend Arp2/3-vermittelt ist, erscheint die Verbindung von N-WASP und WIRE vor allem für Stabilisierung und Organisation der Filamente innerhalb der Zonulae adhaerentes zuständig zu sein [Kovacs et al., 2011].

In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich die Proteinexpression von N-WASP nach dem Einbringen von miR-142-3p um 55% vermindert ( $p=0,03$ ). Da N-WASP einen integralen Bestandteil der Organisation von Aktinfilamenten darstellt, geht seine Ausschaltung mit einer gehemmten Zellmotilität und Invasivität einher (Abb. 29). Dies zeigte sich in den funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit (Kapitel 5.1). Insbesondere bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie in der Phalloidinfärbung der MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen fällt ein Strukturverlust der intrazellulären Aktinfilamente auf (Kapitel 4.9.3). Auch die natürlichen Zellfortsätze sind in den mit pre-miR-142-3p transfizierten Zellen stark verkümmert. Sie erinnern an die in der Literatur beschriebenen Podosomen oder Invadopodien, welche für die Migration und Invasion von Tumorzellen *in vivo* essentiell sind und N-WASP-abhängig ausgebildet werden [Osiak et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005]. Im Rahmen einer *Nano-texture*-Analyse, welche von der Forschungsgruppe der Münsteraner Frauenklinik in Auftrag gegeben wurde, zeigte sich ebenfalls sowohl Anzahl als auch Volumen von Zellausstülpungen von MDA-MB-468-Zellen nach Transfektion mit pre-miR-142-3p hochsignifikant verringert (Abb. 30).



**Abb. 30 Nano-texture-Analyse.** MDA-MB-468-Zelloberflächen ohne (linke Spalte) und mit Behandlung mit miR-142-3p wurden mit *Atomic Force Microscopy* in Nanometerauflösung dargestellt. Gezeigt werden (a) repräsentative Höhenprofile, (b) Topografie-Rohdaten eines (10µm)<sup>2</sup> Scans, (c) Zellfortsätze (grün), (d) die Überlagerung von (a) und (b) in einer dreidimensionalen Karte und (e) die Anzahl an Zellfortsätzen bzw. deren Gesamtvolumen (Summe der einzelnen Volumina pro Bild). Gezeigt werden Mittelwerte +/- Standardabweichung pro Bild (n=5, \*\*\* = p<0,001). Vielen Dank an Dr. Christoph Riethmüller (SerendIP, CenTech Münster) für das freundliche Zur Verfügung Stellen der Daten.

Die Immunfluoreszenzuntersuchung von N-WASP selbst ergab zwar keine Änderung der Lokalisation des Proteins, bestätigte aber seine Lokalisation in der Zellperipherie (Kapitel 4.9.1) sowie den quantitativen Einfluss der Transfektion, welcher zuvor schon in der quantitativen Real-Time-PCR und im Western Blot gezeigt wurde.

Die direkte Hemmung der N-WASP-Synthese durch eine posttranskriptionale Bindung an die 3'UTR der N-WASP-mRNA durch miR-142-3p wurde im Rahmen dieser Arbeit im 3'UTR-Luciferase-Assay überprüft und bestätigt. Somit unterstützen diese Ergebnisse eindeutig die bisherige Forschungslage bezüglich der Funktion von N-WASP.

Eine im Rahmen der Aussagen dieser Arbeit diskussionswürdige Studie stammt von einer Forschungsgruppe, die behauptet, dass N-WASP in der triple-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 sehr gering exprimiert wird. Sie schlagen eine Tumorsuppressorfunktion von N-WASP vor. Diese Behauptung passt jedoch weder zu den Ergebnissen dieser Arbeit noch zu der oben diskutierten Funktion von N-WASP als Organisationsmolekül von Aktinumbauvorgängen, welche essentiell für Tumorzelleigenschaften sind. Die Forscher erwähnen aber auch die Überlegung, dass sehr hohe oder niedrige N-WASP-Expressionslevels denselben Effekt hervorrufen können [Martin et al., 2008]. In metastatischen Läsionen eines kolorektalen Karzinoms wurde N-WASP beispielsweise hochreguliert gefunden, was seine Bedeutung für die Tumorzellmigration unterstreicht [Yanagawa et al., 2001].

### **5.2.2 Integrin- $\alpha$ V ist beteiligt an Migration, Invasion und Zellwachstum**

Der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition ist ein wichtiger Schritt in der Metastasierung von Krebszellen. Dabei gehen Zell-Zellkontakte sowie die Zellverankerung in der extrazellulären Matrix verloren und Zellen nehmen einen migratorischen Phänotyp an [Götte, 2010]. Dass Integrin- $\alpha$ V bei diesen Prozessen eine Rolle spielt, wurde bereits beschrieben [Mamuya & Duncan, 2012].

Grundsätzlich sind Integrine Transmembranproteine, die Zellen miteinander verbinden sowie an der Signalübermittlung zwischen Zellen und ihrer Umgebung beteiligt sind

[Evans & Calderwood, 2007]. Sie bestehen aus nichtkovalent-verbundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten. Diese sind Typ1-Transmembranglykoproteine mit einem relativ langen extrazellulären Teil, einer die Zellmembran durchquerenden Helix sowie einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz [Hynes, 2002]. Ihnen wird eine zentrale Rolle in Zelladhäsion, -wachstum sowie bei Proliferation und Migration zugesprochen. Dabei sind sie beteiligt an der Aufrechterhaltung von Stabilität in Epithelien und ermöglichen Krebszellen, die sie umgebende extrazelluläre Matrix zu erkennen [Escudero-Esparza et al., 2012].

Insbesondere bei Karzinomzellen wurde eine abnorme Expression beobachtet, welche mit Apoptoseinhibition, Induktion der Zellproliferation, *Remodeling* der extrazellulären Matrix, Angiogenese und Metastasierung in Verbindung gebracht wurde [Felding-Habermann et al., 2001; Moschos et al., 2007]. All diese Effekte gelten auch für Integrine mit einer  $\alpha$ V-Untereinheit [Hou et al., 2011; Weis & Cheresch, 2011; Yoshioka et al., 2010]. Besonders interessant für die Einschätzung der Ergebnisse dieser Arbeit sind drei Studien, in denen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte, dass das Ausschalten von Integrin- $\alpha$ V mit Hilfe spezifischer anti-Integrin- $\alpha$ V-Antikörper zu verminderter Migration, Invasion, Angiogenese, Metastasierung und verringertem Zellwachstum von humanen Brustkrebszellen führte [Brooks et al., 1995; Qiming Chen et al., 2008; Y. J. Wu et al., 2012]. Selbst mit einem miRNA-Molekül, miR-31, gelang die Eindämmung der Metastasierung von Brustkrebszellen *in vitro* wie *in vivo* durch Herunterregulation des *Integrin- $\alpha$ V*-Gens [Valastyan et al., 2009].

Zwar zeigte sich Integrin- $\alpha$ V in den Experimenten dieser Arbeit auf Genebene zunächst nicht signifikant durch miR-142-3p reguliert ( $p=0,12$ , Kapitel 4.6). Eine Analyse der Regulation auf Proteinebene ergab allerdings signifikante Ergebnisse (Kapitel 4.7.2). Der Verdacht einer Regulation durch miR-142-3p wurde dann im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mit einem 3'UTR-Luciferase-Assay bestätigt. Hier war eine signifikante Reduktion der ITGAV-Expression nach Transfektion mit pre-miR-142-3p zu beobachten (Kapitel 4.8). In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich Integrin- $\alpha$ V darüber hinaus wie zu erwarten vor allem an den Zell-Zellgrenzen lokalisiert. In den mit pre-miR-142-3p transfizierten Zellen war die Signalstärke der Herunterregulation durch miR-142-3p entsprechend vermindert (Kapitel 4.9.2). Die diffuse Verteilung der

Integrin- $\alpha$ V-Aktivität auf das Zellinnere der sonst fortsatzlosen Zellen deutet auf seine Beteiligung an der Ausbildung eines migratorischen Phänotyps hin. Auch das an Integrin gekoppelte Adapterprotein Vinculin, welches die Kommunikation von ersterem mit dem Aktinzytoskelett vermittelt [Zamir & Geiger, 2001], zeigt sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie weniger an Aktinfilamenten orientiert, sondern lediglich auf die Zellperipherie beschränkt (Kapitel 4.9.3). Es ist daher davon auszugehen, dass die in den Experimenten dieser Arbeit gezeigten Phänomene zum Teil durch die signifikante Herunterregulation der Proteinexpression von Integrin- $\alpha$ V durch miR-142-3p erklärt werden können (Abb. 29).

### **5.3 Weitere potenzielle Zielgene von miR-142-3p**

#### **5.3.1 *RAC1* und *ROCK2* führen zu verminderter Zellgröße und veränderter Zellmorphologie**

Koordinierte Regulation des Aktinzytoskeletts ist eine wichtige Voraussetzung für Zellmotilität, Invasivität und Metastasierung. In der Analyse der MDA-MB-468-Zellmorphologie zeigte sich eine um 36% verminderte Zellgröße bei den Zellen welche mit miR-142-3p transfiziert worden waren ( $p=2,5 \times 10^{-9}$ ). Darüber hinaus zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung von Integrin- $\alpha$ V und Vinculin eine bläschenförmige Zellform, welche sich deutlich von der zellfortsatzreichen Form der Kontrollzellen unterschied (Kapitel 4.9.2/4.9.3). Gründe für diese veränderte Morphologie können am Einfluss von miR-142-3p auf das Zytoskelett liegen.

Durch seine Beteiligung an der Organisation des Zytoskeletts ist ein Einfluss auf Zellgröße und Morphologie durch das auf Proteinebene signifikant regulierte N-WASP-Protein anzunehmen (Kapitel 5.2.1). Auswirkungen auf Zellform, -größe und Migrationseigenschaften haben aber auch Regulatoren der Signaltransduktion (Abb. 29). Dazu zählen die Familie der Rho-GTPasen und die mit ihnen assoziierte Moleküle [Jaffe & Hall, 2005; Jiang et al., 2010]. In der Genexpressionsanalyse der mit pre-miR-142-3p transfizierten Mammakarzinomzellen zeigten sich *RAC1* (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) und *ROCK2* (*Rho-associated protein kinase 2*) herunterreguliert.

## *RAC1*

RAC1 ist ein Enzym aus der *Rho*-Familie der GTPasen. Diese werden häufig als molekulare Schalter bezeichnet, welche Signaltransduktionswege regulieren und somit eine Vielzahl von Zellfunktionen beeinflussen. RAC1 ist dafür bekannt, dass es in verschiedene Aspekte der Kanzerogenese, Tumorprogression, Angiogenese, Invasion und Metastasierung von Krebszellen involviert ist. Dabei ist es zumeist zwar nicht selbst mutiert, jedoch häufig überaktiv oder überexprimiert [Bryan & D'Amore, 2007; Hernández et al., 2010]. Seinen Einfluss übt es über eine Regulation von Zellwachstum, zytoskeletaler Reorganisation und der Aktivierung von Proteinkinasen aus [Ridley, 2006]. Vor allem bei der Ausbildung von Filopodien [Fukata et al., 2003] und Lamellipodien [Hernández et al., 2010] in (Brust)Krebszellen wurde eine Beteiligung von RAC1 nachgewiesen. Diese flachen Zellmembranausstülpungen bestehen aus polymerisiertem Aktin und unterstützen die Zellmigration mittels Ausbildung adhäsiver Kontakte [Jaffe & Hall, 2005]. In weiteren Studien führte die Inhibition der RAC1-Expression zu verringertem Wachstum, Migrationsfähigkeit und Invasivität von (Mamma)Karzinomzellen [L. Wu et al., 2011; Yoshida et al., 2010].

Interessant für die Einschätzung der Ergebnisse dieser Studie ist die Erkenntnis, dass miR-142-3p die RAC1-Expression in Zellen des hepatozellulären Karzinoms direkt über 3'UTR-Bindung negativ reguliert. Dies konnte mit Hilfe eines *Fluorescent Reporter Assays* nachgewiesen werden [L. Wu et al., 2011]. Der Gedanke, dass diese Ergebnisse auf Zellen des triple-negativen Mammakarzinoms übertragen werden können, liegt somit nahe.

## *ROCK2*

Bei ROCK2 handelt es sich um ein Enzym aus der Gruppe der Serin-Threonin-Kinasen, welches ein Effektormolekül der Rho-GTPasen darstellt. Es wirkt vor allem durch eine Regulation des Zytoskeletts auf Form und Bewegung von Zellen. Dabei hat es Auswirkungen auf Aktinfilamentstabilisierung, Zellkontraktilität und Zellgröße [Riento & Ridley, 2003]. Auch ein positiver Effekt auf Invasivität und Zellmigration wurde bereits beschrieben [Fu et al., 2008], während die Ausschaltung von ROCK2 eine reduzierte Migrationspolarität zur Folge hatte [Vega et al., 2011]. Die Herunter-

regulation des ROCK2-Gens durch miR-142-3p würde daher zum verkleinerten bläschenförmigen Phänotyp der hier untersuchten Zellen passen [Jiang et al., 2010]. Auch bei Brustkrebszellen der Zelllinie MDA-MB-231 wurde ein signifikanter Einfluss auf Invasivität und Motilität herausgestellt [Lane et al., 2008].

Trotz dieser Erkenntnisse liegt es jedoch nahe, dass die Ergebnisse bezüglich Motilität und Invasivität aus dieser Arbeit primär auf die eingeschränkte Funktion des Proteins N-WASP zurückgeführt werden können, da das Protein RAC1 nicht signifikant auf Proteinebene reguliert war, und somit sein Beitrag zu den funktionellen Versuchsergebnissen als eher gering einzustufen ist. In Zukunft könnte es jedoch von Interesse sein, ROCK2 auf Proteinebene zu untersuchen, um einen etwaigen Einfluss seiner Regulation am hier beobachteten Phänotyp herauszustellen.

### **5.3.2 *KLF4* und *BOD1*: potenzielle Regulatoren der Proliferationsfähigkeit**

Der Proliferationsassay (MTT-Assay, Zytotoxizitätstest) gibt Aufschluss über Zellstoffwechselaktivität und Vitalität einer Zelle. Detektiert werden dabei lebende Zellen. Da die Menge des umgesetzten Farbstoffes linear vom Maß der jeweiligen Zellaktivität bzw. Glykolyserate abhängig ist [Vistica et al., 1991], kann bei Einsatz einer Zelllinie mit konstanter Stoffwechselaktivität aller Proben auf die Menge an Zellen in der untersuchten Lösung geschlossen werden.

In den Experimenten zeigte sich die Signalstärke der pre-miR-142-3p-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Zellen der Negativkontrolle um 11% herabgesetzt (p=0,10, Kapitel 4.4). Gründe für dieses Phänomen kann die Auswirkung der Transfektion mit pre-miR-142-3p auf die Expression der *BOD1*- und *KLF4*-Gene darstellen. Beide Gene zeigten sich in den Experimenten zur Genexpressionsanalyse dieser Studie negativ reguliert.

## *BOD1*

Das Protein BOD1 (*biorientation of chromosomes in cell division 1*) ist ein Bestandteil der mitotischen Kinetochore, welcher zum ersten Mal im Jahre 2007 beschrieben wurde. Es handelt sich um einen Faktor, welcher für die korrekte Chromosomenauftrennung während der Mitose benötigt wird. In *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten von BOD1 mit Hilfe von siRNA zu einer erhöhten Apoptoseneigung und einem Austritt von Zellen aus dem Mitosevorgang führt [Porter et al., 2007]. Diese Ergebnisse passen zu der leicht verringerten Zellteilung in den Experimenten dieser Arbeit nach Transfektion mit miR-142-3p. Ein Grund für die insignifikanten Ergebnisse kann daran liegen, dass sich die Effekte einer möglichen Regulation der Proliferation durch miR-142-3p erst nach einigen Zellteilungen zeigen. Der Zeitpunkt der Proliferationsanalyse nach 72h könnte daher etwas zu früh gewählt sein. Signifikante Ergebnisse wären unter Umständen nach einer längeren Inkubationszeit bzw. in *in vivo*-Experimenten zu erwarten.

## *KLF4*

KLF4 (*Krüppel-like factor 4*, auch bekannt als *gut-enriched Krüppel-like factor [GKLF]*) ist ein Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der Zinkfingerproteine. Diese regulieren eine hohe Zahl an Genen mit GC-reichen (Guanin, Cytosin) Promotorenregionen. Dabei können sie sowohl Aktivator- als auch Repressorfunktionen übernehmen und beeinflussen somit Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung und neoplastische Transformation [Kaczynski et al., 2003]. Insbesondere KLF4 wurde bisher als ein Promotor von Brustkrebszellwachstum beschrieben [Chu et al., 2011; Foster et al., 2000; Pandya et al., 2004]. Es ist dabei Bestandteil der Signalkaskade des Östrogenrezeptors von Mammakarzinomzellen [Hu et al., 2012]. Darüber hinaus wurde ihm auch eine Beteiligung an Migration und Invasion von MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkrebszellen zugesprochen [Yu et al., 2011]. Dennoch wird seine Rolle kontrovers diskutiert, da es in der Literatur unter anderem auch als Tumorsuppressor beschrieben wurde [Rowland et al., 2005]. Seine

vielfach beschriebenen onkogenen Eigenschaften unterstützen allerdings die Ergebnisse dieser Arbeit.

Da sich diese Forschungsarbeit vor allem mit dem Einfluss von miR-142-3p auf Invasivität und Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen beschäftigt, wurden bezüglich der leicht veränderten Proliferationsrate der untersuchten MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen keine weiteren Experimente durchgeführt. Da das Zellwachstum analog zu den anderen karzinogenen Eigenschaften vermindert ist (wenn auch insignifikant), könnte es interessant sein, sich in Zukunft mit der Frage zu beschäftigen, inwiefern miR-142-3p auch auf Prozesse der Zellteilung regulierend wirkt und welche Rolle die *BOD1*- und *KLF4*-Gene dabei spielen. In diesem Fall könnten miR-142-3p-basierte Therapien neben einer Inhibition von Ausbreitung und Metastasenbildung auch eine Hemmung des Tumorwachstums mit einschließen.

### **5.3.3 *CFL2* und *NOTCH1* – zwei weitere Gene mit Bezug zu Migration und Invasivität**

#### *CFL2*

Cofilin2 (*CFL2*) ist ein Protein der AC Familie (*actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin family*). Es bindet und depolymerisiert F-Aktinfilamente und verhindert pH-abhängig den Filamentaufbau aus monomeren G-Aktinmolekülen [Gillett et al., 1996]. Durch das Zertrennen der Aktinfilamente kommt es zu einer Zunahme von sogenannten freien *barbed ends* an denen erneut Aktinpolymerisation und damit eine Verlängerung von Filamenten stattfinden kann [Ghosh et al., 2004]; der Umsatz an Filamenten wird dadurch erhöht [Didry et al., 1998]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Auf- und Abbaus von Aktinfilamenten ist die Depolymerisation [Maciver & Hussey, 2002].

Dass Cofilin2 damit einen Effekt auf das Verhalten von Zellen hat, konnte bereits gezeigt werden. Zellen, denen Cofilinmoleküle fehlen, weisen eine eingeschränkte Zellmotilität auf [J. Chen et al., 2001], während sich Zellen mit einer Cofilin-

Überexpression stärker motil zeigten [Aizawa et al., 1996]. Neben der Beeinflussung der Migrationsfähigkeit von Zellen ist Cofilin auch am Prozess der Zytokinese beteiligt, wo es den kontraktilen Ring zwischen den entstehenden Tochterzellen depolymerisiert [Chen & Pollard, 2011; Nagaoka et al., 1995; Ono, 2007]. Seine gestörte Funktion führte in Studien an *Drosophila melanogaster* zu einer defizitären Zytokinese [Gunsalus et al., 1995].

In Tumorzellen konnte darüber hinaus auch eine Beteiligung von Cofilin an der Reifung von Invadopodien beobachtet werden. Diese waren nach Suppression von Cofilin kleiner, weniger invasiv und weniger langlebig. In Lamellipodien arbeitet Cofilin dabei synergistisch mit dem Arp2/3-Komplex [Desmarais et al., 2009; Yamaguchi et al., 2005]. In invasiven Mammakarzinomen wurde das Expressionslevel von Cofilin bereits als erhöht beschrieben [W. Wang et al., 2004]. Auf Proteinebene und in der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten sich bei Cofilin2 keine reproduzierbaren Ergebnisse (Kapitel 4.7.3, 4.9.4). Lediglich eine Konzentration der Cofilin2-Aktivität in der Zellperipherie konnte festgestellt werden. Dies passt zum bisherigen Kenntnisstand, nach dem es sich bei Cofilin-Proteinen um Moleküle handelt, welche vor allem in Zellmembrannähe lokalisiert sind, wo ein großer Aktinfilamentumsatz lokalisiert ist [Maciver & Hussey, 2002]. Vor diesem Hintergrund besteht die Möglichkeit, dass Cofilin2 ein weiteres interessantes Target von miR-142-3p in Mammakarzinomzellen darstellt.

### *NOTCH1*

Bei NOTCH1 handelt es sich um ein Transmembranprotein zur Signaltransduktion welches bisher vor allem in der hämatoonkologischen Forschung beschrieben wurde [H. Liu et al., 2011; Roti & Stegmaier, 2011]. Das Molekül NOTCH1 ist dabei Teil des *Notch*-Signaltransduktionsweges, welcher die Reaktion von Zellen auf äußere Signale vermittelt.

Obwohl die genaue Funktionsweise von NOTCH1 noch nicht geklärt ist, wurde seine Rolle in der Migration und Invasivität von Mammakarzinomzellen bereits bestätigt. In *NOTCH1-Knockdown*-Zellen wurde eine gestörte F-Aktin-Polymerisierung und Adhäsionsfähigkeit der untersuchten Zellen festgestellt. Die Phosphorylierung der

Zellbestandteile PAK, Akt, FAK, Integrin- $\beta$ 1, ICAM-1 und  $\beta$ -Catenin war dabei gestört [J. Wang et al., 2011]. In einer Studie von Parr C et al. wurde eine positive Korrelation von NOTCH1-Expression, niedrig differenziertem Mammakarzinom und schlechter Prognose herausgestellt. Die Autoren schreiben *NOTCH1* daher onkogene Eigenschaften zu [Parr et al., 2004]. Dies wurde in einer weiteren Studie bestätigt [Reedijk et al., 2005]. Auch ein Einfluss von NOTCH1 auf Tumorstammzellen ist in der Literatur beschrieben worden [Mak et al., 2012; Prud'homme, 2012]. Eine Untersuchung seiner Rolle in diesem Gebiet könnte sich in zukünftigen Studien als lohnenswert erweisen.

Der in dieser Arbeit gezeigte regulatorische Einfluss von miR-142-3p auf MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen könnte somit auch über den *NOTCH1*-Signalweg Einfluss auf Pathogenese und Progression des Mammakarzinoms nehmen. Zwar ließen sich keine reproduzierbaren Ergebnisse auf Proteinebene erzielen, die Genexpression war jedoch signifikant um ca. 27% verringert (Kapitel 4.6 & 4.7.3).

*NOTCH1* wurde in dieser Studie aufgrund der Ergebnisse des vorangegangenen *Affymetrix-Screenings* untersucht. Die Tatsache, dass es nicht zu den *Predicted Targets* von miR-142-3p zählt, deutet darauf hin, dass seine Expression unter Umständen indirekt reguliert wird. Ferner wäre es denkbar, dass miR-142-3p nicht an die 3'UTR der *NOTCH1*-mRNA bindet. Die gängigen Suchalgorithmen beziehen sich auf ein Alignment mit der 3'UTR [Breving & Esquela-Kerscher, 2010]. In der Literatur sind aber auch Fälle von miRNAs beschrieben, welche an Introns oder das 5'Ende bestimmter mRNAs binden [Barrett et al., 2012; Sacco & Masotti, 2012]. Sollte es sich bei der Regulation von NOTCH1 um ein solches Phänomen handeln würde das erklären, warum es in den Datenbanken bislang nicht mit miR-142-3p in Verbindung gebracht wurde.

### **5.3.4 Nicht-zytoskelettassoziierte Proteine, die durch miR-142-3p reguliert werden**

Neben den bisher diskutierten Proteinen war auch die Expression von *STS* (*steroid sulfatase*), und *PGRMC2* (*progesterone receptor membrane component 2*) auf Genebene durch den Einfluss von miR-142-3p verändert (Kapitel 4.6). STS ist dabei ein Protein, welches eine Rolle bei der Bildung biologisch aktiver Steroide spielt [Purohit et al., 2011], während PGRMC2 einen Regulator der Zytochrom P450-Aktivität [Wendler & Wehling, 2012] darstellt. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf Zielgenen mit direktem Bezug zur Regulation des Zytoskeletts liegt, wurden sie nicht weiter untersucht.

## **5.4 Kritische Beurteilung des Studienaufbaus**

Aus den in dieser Dissertation durchgeführten Studien konnten valide Ergebnisse hinsichtlich der Expression verschiedener Zielgene in den mit pre-miR-142-3p transfizierten MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen gewonnen werden. Das regulatorische Potential von miR-142-3p wurde in den verschiedenen Untersuchungen verdeutlicht, die wiederum den Ausgangspunkt für weitere Studien darstellen.

In dieser Arbeit zeigte sich N-WASP als das wichtigste, da am stärksten von miR-142-3p regulierte Zielgen. Dies konnte mithilfe verschiedener experimenteller aufeinander aufbauender Verfahren im Verlauf der Studie bestätigt werden. Daher stellt N-WASP den Hauptgegenstand dieser Ausführungen dar.

Zu diskutieren bleiben aber trotz signifikanter Ergebnisse Schwachstellen und Optimierungsmöglichkeiten der hier behandelten Studienergebnisse.

Zunächst lässt sich feststellen, dass die Regulation von N-WASP durch miR-142-3p in MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen zwar zum großen Teil zum hier beobachteten Phänotyp beiträgt, einzelne miRNAs wie vielfach beschrieben aber unterschiedliche Zielgene haben können. An den Ergebnissen der funktionellen Experimente dieser Arbeit können daher noch andere Wirkmechanismen beteiligt sein. Hierfür kommen sowohl andere hier behandelte als auch bisher nicht identifizierte Zielgene infrage. Da die Proteinsynthese nicht nur auf Genomebene reguliert ist, sondern auch posttranskriptionell modifiziert werden kann, wäre es denkbar, dass Gene, deren

Expression durch miR-142-3p nur auf Genebene verändert schien, wie *RAC1*, *ROCK2*, *CFL2* und *NOTCH1*, in den hier verwendeten Zellen posttranskriptionell reguliert wurde und so im *Western Blot* kein signifikantes Ergebnis erzielten. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, dass die oben genannten Proteine einen niedrigen *Turnover* besitzen und daher eine längere Inkubationszeit mit der miRNA nötig wäre, bis sich Effekte auf die Proteinmenge möglicherweise sehr langlebiger Proteine auswirken.

Unter diesem Gesichtspunkt wäre es sicherlich von Interesse, eine Analyse auf Proteinebene mit den Zielgenen durchzuführen, welche hier auf Genebene verändert erschienen, jedoch nicht weiter untersucht wurden: *BOD1*, *KLF-4*, *PGRMC2* und *STS* (Kapitel 4.6). Auch in dieser Studie von miR-142-3p insignifikant regulierte Zielgene wie *ADCY9*, *COX1*, *EGF* oder *IL6ST* könnten bei weiteren Wiederholungen (Erhöhung der N-Zahl mit möglicherweise daraus resultierender statistischer Signifikanz) oder Expressionsanalysen mit MDA-MB-468-verwandten Zelllinien in den Fokus gerückt werden.

Die Experimente dieser Arbeit wurden lediglich an der Zelllinie MDA-MB-468 durchgeführt. Im Sinne der Übertragbarkeit sind im Labor der Frauenklinik des Universitätsklinikums Münster allerdings analoge Experimente an den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 durchgeführt worden, welche ähnliche, die Thesen dieser Arbeit unterstützende Ergebnisse lieferten [Gespräch mit Prof. Dr. M. Götte im November 2012].

Während in den Experimenten mit miR-142-3p viele signifikante Ergebnisse erzielt wurden, zeigten sich die Ergebnisse der anti-miR-142-3p-Transfektion durchweg insignifikant. Ausnahmen sind die leicht verringerte Zellgröße von mit anti-miR-142-3p transfizierten Zellen (Kapitel 4.5) sowie deren signifikant reduzierte Expression des KLF-4-Proteins (Kapitel 4.6). Ein Grund hierfür könnte eine niedrige Expression von miR-142-3p in Mammakarzinomzellen sein. Eine ohnehin geringe miRNA-Expression durch Einbringen einer inhibitorischen anti-miRNA noch weiter zu hemmen, führt erwartungsgemäß zu uneindeutigen Ergebnissen. Hinzukommend sind heterogene Daten in Bezug auf die Wirkung von anti-miR-Transfektion Erfahrung des hiesigen

Labors [Gespräch mit Prof. Dr. M. Götte im November 2012]. Aus diesen Gründen ist in dieser Arbeit auf eine weitere Diskussion der anti-miR-Ergebnisse verzichtet worden.

Bisher wurde die Regulation des wichtigsten Proteins dieser Arbeit, N-WASP, durch ein 3'UTR-Luciferase-Assay bestätigt. Um über das 3'UTR-Luciferase-Assay hinaus die Spezifität der Bindung von miR-142-3p an die N-WASP-mRNA zu überprüfen, wäre es auch möglich das Experiment mit einer im Genom mutierten Bindungsstelle der miRNA durchzuführen. Bei vorhergesagter Regulation über die 3'UTR der N-WASP-mRNA würde sich kein Unterschied in der Luciferase-Aktivität zwischen Kontrollgruppe und mit pre-miR-142-3p-transfizierten Zellen zeigen. In weitergehenden Studien könnte es auch von Interesse sein, die anderen identifizierten *Targets* ebenso mit Hilfe des 3'UTR-Luciferase-Assays zu validieren.

Des Weiteren sind die bisherigen Ergebnisse auf *in vitro*-Experimente limitiert gewesen. Hier sind zwar molekulare Details nach der initialen *Target*-Auswahl mittels *Affymetrix Screening* (siehe Anhang) leichter zu untersuchen, andere Zellen und Faktoren wie der Prozess der Angiogenese blieben dabei jedoch zunächst unberücksichtigt. Um weitere Erkenntnisse bezüglich der Interaktion von miR-142-3p mit gesundem Gewebe zu gewinnen, wäre die Erprobung ihrer Funktion in einem Tiermodell ein spannender Ansatz. *In vivo*-Metastasierungsmodelle können der Komplexität des Tumors besser gerecht werden. Dort stellt sich auch die Frage nach der Applikationsart, da ja eine Manipulation des Tumors mit weitgehender Aussparung anderen Gewebes gewünscht wäre.

Wie bereits erwähnt, fügen sich die Ergebnisse dieser Arbeit kongruent in den wissenschaftlichen Hintergrund anderer publizierter Studien ein. Dies umfasst sowohl Ergebnisse zur Wirkweise von miR-142-3p [L. Wu et al., 2011] als auch über N-WASP veröffentlichte Ergebnisse (Kapitel 5.2.1). Auch weitere Studien der Forschungsgruppe um Prof. Dr. M. Götte an MDA-MB-468-verwandten Brustkrebszelllinien zeigen ähnliche Ergebnisse.

Kontroverse Fragen werden von Studien aufgeworfen, in denen miR-142-3p in Gewebeproben triple-negativer Mammakarzinome bzw. in Metastasenbiopsien hochreguliert gefunden wurde [Pollari et al., 2012; Volinia et al., 2012]. Dies scheint

gegensätzlich zu der hier formulierten These, dass miR-142-3p Tumorsuppressoreigenschaften innehat (Kapitel 5.1). Eine mögliche Erklärung kann die Durchmischung unterschiedlicher Zellen in Biopsien sein. In der Nähe von Tumorzellen halten sich häufig Leukozyten auf, welche nachgewiesenermaßen ein vergleichsweise hohes Expressionsniveau an miR-142-3p aufweisen und somit zu fälschlicherweise hohen miRNA-Konzentrationen in Lysaten von Tumorbiopsaten führen können [Merkerova et al., 2008]. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit würde man eher geringe miR-142-3p-Konzentrationen in Mammakarzinomzellen erwarten. Eine weitere Erklärung könnte auch die Wirkstärke der tumorsuppressorgenen miR-142-3p darstellen. Selbst in endogen überexprimierter Menge besteht die Möglichkeit, dass andere karzinogene Prozesse oder Zelleigenschaften für eine stärkere Beeinflussung des Phänotyps jener untersuchten Brustkrebsformen geführt haben.

## 5.5 Fazit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass miR-142-3p über die negative Regulation der Expression verschiedener Proteine vor allem zu einer verringerten Zellmotilität und -invasivität von MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen führt (Abb. 29).

Verantwortlich für diese Effekte ist vor allem die Herunterregulation der Expression von N-WASP, einem Protein, welches an der Signaltransduktion von Zelloberflächenrezeptoren zum Aktinzytoskelett beteiligt ist. In einem etwas geringeren Maße scheint die negative Regulation von Integrin- $\alpha$ V, einem Transmembranprotein, zu den Ergebnissen beigetragen zu haben. Es verbindet Zellen miteinander und ist an der Signalübermittlung zwischen Zellen und ihrer Umgebung beteiligt.

Weitere regulierte Gene umfassen *RAC1*, *ROCK2*, *NOTCH1*, *CFL2*, *KLF-4* und *BOD1*. Dabei besteht der Verdacht, dass *CFL2*, *KLF-4* und *BOD1* auch für die leicht verringerte Proliferationsgeschwindigkeit der untersuchten MDA-MB-468-Zellen verantwortlich sind.

Insgesamt besitzt miR-142-3p aufgrund ihrer negativen Regulation von Zytoskelett-assoziierten Proteinen die Eigenschaften eines Tumorsuppressors.

Aus klinischer Sicht wäre es interessant, ihre mögliche Bedeutung für zukünftige miRNA-basierte Brustkrebstherapien zu erforschen. Einen nächsten Schritt könnten dabei Tiermodelle darstellen, in denen die Wirkung von miR-142-3p im gesunden Organismus untersucht werden kann. Aufgrund potenzieller Nebenwirkungen wäre hierbei vor allem die Art der Applikation zu überlegen, um unerwünschte Wirkungen zu vermeiden. Eine Mikrovessel-vermittelte intravenöse Gabe könnte hierbei einen Weg darstellen, der in der Literatur bereits beschrieben ist [Akao et al., 2011; Yujing Zhang et al., 2010]. Ferner wurde eine Applikation mittels viraler Vektoren, diverser nichtviraler Trägermoleküle oder eine lokale Gabe im Rahmen einer sogenannten *Targeted Delivery* beschrieben. Mögliche Herausforderungen können dabei unter anderem Mechanismen wie der Abbau der applizierten miRNAs durch Nukleasen, eine fehlerhafte Endozytose durch die Zielzellen sowie eine vorzeitige renale Filtration darstellen [Pereira et al., 2012]. Hinzukommend sollten mögliche unerwünschte Wirkungen der applizierten miRNA in Betracht gezogen werden. Dazu zählen ein Auslösen der Immunantwort des Körpers sowie eine mögliche Ausschaltung von Nichtzielgenen in gesunden Geweben des Körpers [Singh et al., 2011]. Neben diversen in Tiermodellen bereits erfolgreich eingesetzten miRNA-basierten Therapien gibt es sogar schon ein LNA-antimir-122-basiertes Arzneimittel, welches in Phase II der klinischen Studien eingetreten ist.

Auch ein potenzieller Nutzen von miR-142-3p als Marker in der Brustkrebsdiagnostik könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. In Verbindung mit dem Mammakarzinom sind bereits einige potenzielle Biomarker-miRNAs in der Literatur beschrieben worden [Cortez et al., 2012; Ng et al., 2013].

## 6 Anhang

### Vorhersage von Zielgenen der miR-142-3p

Zur Vorhersage von Zielgenen der in dieser Arbeit behandelten miR-142-3p wurden zwei Programme genutzt:

1. microRNA.org – Der MiRanda-Algorithmus liefert eine Vorhersage von wahrscheinlichen Zielgenen einer miRNA anhand eines Vergleichs des Alignments der 3'UTR der miRNA mit möglichen *Target sites* der jeweiligen mRNA. Hier aufgeführt sind die bekannten *Alignments* der in dieser Arbeit untersuchten Zytoskelettgene:

- *WASL*, drei Bindestellen, mirSVR score:-0.9046, -0.3047, -0.7483

```
3' aggUAUUUCAUCCUUGUGAUGu 5' hsa-miR-142-3p
      |:|| || |||
31:5' aagGUGAAAUACUAAACACUACu 3' WASL
```

```
3' aggUAUUUCAUCCU-UUGUGAUGu 5' hsa-miR-142-3p
      | || ||| | |:|
384:5' aaaAAAAUCUAGUAUAGCACUACa 3' WASL
```

```
3' agguuuucauccuuUGUGAUGu 5' hsa-miR-142-3p
      |||
1208:5' uuucuuugccucucuACACUACa 3' WASL
```

- *ITGaV*, eine Bindestelle, mirSVR score:-0.9501

```

3' agguauuucauccuuUGUGAUGu 5' hsa-miR-142-3p
      |||||
434:5' auguaauacauuuACACUACa 3' ITGaV

```

- *RAC1*, eine Bindestelle, mirSVR score:-1.0160

```

3' agGUAUUUCAUCCUU---UGUGAUGu 5' hsa-miR-142-3p
      :| :|||:| :| |||||
729:5' aaUACGAAGUGGAGAUUUACACUACa 3' RAC1

```

- *CFL2*, eine Bindestelle, mirSVR score:-0.3642

```

3' cgacucUCACAUC-----UACAAAUGu 5' hsa-miR-30c
      ||||| |||||
675:5' ugaauaAGUGUAGGAGUUUAUGUUUACc 3' CFL2

```

- *NOTCH1*; kein Alignment bei MiRanda

2. pictar.mdc-berlin.de – der Pictar Algorithmus funktioniert analog zum MiRanda Algorithmus. Hier sind die ermittelten Pictar-Scores aufgeführt, welche für eine Regulation des Gens durch die miRNA sprechen:

<i>WASL</i>	keine Vorhersage zum WASL-Gen
<i>ITGaV</i>	1,82
<i>RAC1</i>	5,99
<i>CFL2</i>	5,68
<i>NOTCH1</i>	kein Alignment bei Pictar

## Affymetrix-Screening

Einen zusätzlichen Hinweis auf die zu analysierenden Kandidatengene stellte das Affymetrix-Screening der Zelllinie MDA-MB-231 dar. Diese ähnelt der Zelllinie MDA-MB-468, da es sich bei beiden um triple-negative Brustkrebszelllinien handelt [Lacroix & Leclercq, 2004]. Es ergaben sich folgende *fold change*-Werte in der Analyse des Alignments von miRNA und Zielgen:

<i>WASL</i>	-2,97926
<i>ITGAV</i>	-1,44822
<i>COFILIN2</i>	-2,07492
<i>RAC1</i>	-1,29472
<i>NOTCH1</i>	-1,01830

Alle Werte sprechen für eine Herunterregulation durch miR-142-3p.

## 7 Literaturverzeichnis

- Acs G, Chen M, Xu X, Acs P, Verma A, Koch CJ (2004) Autocrine erythropoietin signaling inhibits hypoxia-induced apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer letters*, 214(2): 243–251
- Aizawa H., Sutoh K, Yahara I (1996) Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling, and cell movement in Dictyostelium. *The Journal of cell biology*, 132(3): 335–344
- Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Itoh Y, Ohtsuki Y, Naoe T (2011) Microvesicle-mediated RNA Molecule Delivery System Using Monocytes/Macrophages. *Molecular Therapy*, 19(2): 395–399
- Arshad F, Wang L, Sy C, Avraham S, Avraham HK (2010) Blood-brain barrier integrity and breast cancer metastasis to the brain. *Pathology research international*, 2011: 920509
- Auer H, Newsom DL, Kornacker K (2009) Expression Profiling Using Affymetrix GeneChip Microarrays. In D. U. Bilitewski (Hrsg.), *Microchip Methods in Diagnostics*. Humana Press: 35–46
- Baffa R, Fassan M, Volinia S, O’Hara B, Liu CG, Palazzo JP, Gardiman M, Rugge M, Gomella LG, Croce CM, Rosenberg A (2009) MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *The Journal of Pathology*, 219(2): 214–221
- Bagnall RD, Tsoutsman T, Shephard RE, Ritchie W, Semsarian C (2012) Global MicroRNA Profiling of the Mouse Ventricles during Development of Severe Hypertrophic Cardiomyopathy and Heart Failure. *PloS one*, 7(9): e44744
- Banin Hirata BK, Oda JMM, Losi Guembarovski R, Ariza CB, de Oliveira CEC, Watanabe MAE (2014) Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior. *Disease markers*, 2014: 513158

- Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(21): 3613–3634
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281–297
- Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*, 59(6): 566–573
- Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V (2007) Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*, 109(9): 1721–1728
- Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I (2011) Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 128(8): 1751–1757
- Bissels U, Wild S, Tomiuk S, Hafner M, Scheel H, Mihailovic A, Choi YH, Tuschl T, Bosio A (2011) Combined characterization of microRNA and mRNA profiles delineates early differentiation pathways of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 29(5): 847–857
- Blank A, Sugiyama RH, Dekker CA (1982) Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Analytical biochemistry*, 120(2): 267–275

- Breving K, Esquela-Kerscher A (2010) The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(8): 1316–1329
- Brinkley BR, Beall PT, Wible LJ, Mace ML, Turner DS, Cailleau, RM (1980) Variations in Cell Form and Cytoskeleton in Human Breast Carcinoma Cells in Vitro. *Cancer Research*, 40(9): 3118–3129
- Brooks PC, Strömblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA (1995) Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *Journal of Clinical Investigation*, 96(4): 1815–1822
- Brouckaert O, Wildiers H, Floris G, Neven P (2012) Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *International journal of women's health*, 4: 511–520
- Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L (2006) Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nature medicine*, 12(5): 585–591
- Bryan BA, D'Amore PA (2007) What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 64(16): 2053–2065
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21): 2492–2502
- Carter CL, Allen C, Henson DE (1989) Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, 63(1): 181–187
- Carter CL, Jones DY, Schatzkin A, Brinton LA (1989) A prospective study of reproductive, familial and socioeconomic risk factors for breast cancer using NHANES I data. *Public health reports (Washington, D.C.: 1974)*, 104(1): 45–50

- Chen J, Godt D, Gunsalus K, Kiss I, Goldberg M., Laski FA (2001) Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and oogenesis. *Nature cell biology*, 3(2): 204–209
- Chen Q, Pollard TD (2011) Actin filament severing by cofilin is more important for assembly than constriction of the cytokinetic contractile ring. *The Journal of cell biology*, 195(3): 485–498
- Chen Q, Manning CD, Millar H, McCabe FL, Ferrante C, Sharp C, Shahied-Arruda L, Doshi P, Nakada MT, Anderson GM (2008) CNTO 95, a fully human anti alpha v integrin antibody, inhibits cell signaling, migration, invasion, and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Clinical & experimental metastasis*, 25(2): 139–148
- Cheng PC (2006) The Contrast Formation in Optical Microscopy. In J. B. Pawley (Hrsg.), *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. Springer US: 162–206
- Chu PY, Hsu NCH, Liao AT, Yeh, KT, Hou MF, & Liu CH (2011) Elevated Krüppel-like factor 4 transcription factor in canine mammary carcinoma. *BMC veterinary research*, 7: 58
- Cibula D, Gompel A, Mueck AO, La Vecchia C, Hannaford PC, Skouby, SO, Zikan M, Dusek L (2010) Hormonal contraception and risk of cancer. *Human reproduction update*, 16(6): 631–650
- Cortez MA, Welsh JW, Calin, GA (2012) Circulating microRNAs as noninvasive biomarkers in breast cancer. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer*, 195: 151–161
- Crnic I, Christofori G (2004) Novel technologies and recent advances in metastasis research. *The International journal of developmental biology*, 48(5-6): 573–581
- Desmarais V, Yamaguchi H, Oser M, Soon L, Mouneimne G, Sarmiento C, Eddy R, Condeelis J (2009) N-WASP and cortactin are involved in invadopodium-

dependent chemotaxis to EGF in breast tumor cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, 66(6): 303–316

Devi CR B, Tang TS, Corbex M (2012) Incidence and risk factors for breast cancer subtypes in three distinct South-East Asian ethnic groups: Chinese, Malay and natives of Sarawak, Malaysia. *International journal of cancer*, 131(12): 2869–2877

Didry D, Carlier MF, Pantaloni D (1998) Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *The Journal of biological chemistry*, 273(40): 25602–25611

Diedrich K (2007) Gynäkologie und Geburtshilfe (2., völlig neu bearb. Aufl.). *Springer Medizin Verlag Heidelberg*: 10-18

Dovas A, Cox D (2010) Regulation of WASP by phosphorylation: Activation or other functions? *Communicative & integrative biology*, 3(2): 101–105

Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O’Higgins N (2000) Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast cancer research: BCR*, 2(4): 252–257

Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjärn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S (2008) LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, 452(7189): 896–899

Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5): 403–410

Erson A, Petty E (2008) MicroRNAs in development and disease. *Clinical Genetics*, 74(4): 296–306

Escudero-Esparza A, Jiang WG, Martin TA (2012) Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 31: 43

Essentials of Real-Time-PCR.

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generalddocuments/cms\\_039996.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generalddocuments/cms_039996.pdf) (Abfragedatum: 12.02.2013)

Evans EA, Calderwood DA (2007) Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5828): 1148–1153

Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, Hughes PE, Pampori N, Shattil SJ, Saven A, Mueller BM (2001) Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4): 1853–1858

Flamant S, Ritchie W, Guilhot J, Holst J, Bonnet ML, Chomel JC, Guilhot F, Turhan AG, Rasko JEJ (2010) Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 95(8): 1325–1333

Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, Lin CY, Engler JA, Grizzle WE, Ruppert JM (2000) Increase of GKLf messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer research*, 60(22): 6488–6495

Fu XD, Giretti MS, Baldacci C, Garibaldi S, Flamini M, Sanchez AM, Gadducci A, Genazzani AR, Simoncini T (2008) Extra-nuclear signaling of progesterone receptor to breast cancer cell movement and invasion through the actin cytoskeleton. *PloS one*, 3(7): e2790

Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K (2003) Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Current opinion in cell biology*, 15(5): 590–597

- Gasparini G (2001) Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 37(2): 97–114
- Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS (2004) Cofilin Promotes Actin Polymerization and Defines the Direction of Cell Motility. *Science*, 304(5671): 743–746
- Gillett GT, Fox MF, Rowe PS, Casimir CM, Povey S (1996) Mapping of human non-muscle type cofilin (CFL1) to chromosome 11q13 and muscle-type cofilin (CFL2) to chromosome 14. *Annals of Human Genetics*, 60(3): 201–211
- Giricz O, Calvo V, Pero SC, Krag DN, Sparano JA, Kenny PA (2012) GRB7 is required for triple-negative breast cancer cell invasion and survival. *Breast cancer research and treatment*, 133(2): 607–615
- Götte M (2010) MicroRNAs in breast cancer pathogenesis. *Minerva ginecologica*, 62(6): 559–571
- Gottwein E (2012) Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus microRNAs. *Frontiers in Microbiology*, 3(165): 1-13
- Graham NS, May ST, Daniel ZC, Emmerson ZF, Brameld JM, Parr T (2011) Use of the Affymetrix Human GeneChip array and genomic DNA hybridisation probe selection to study ovine transcriptomes. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 5(6): 861–866
- Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi G N, Gianni L, Von Minckwitz G, Buzdar AU, Smith IE, Symmans WF, Singh B, Winer EP (2008) Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(5): 814–819
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall, GJ (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate

- epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology*, 10(5): 593–601
- Gunsalus KC, Bonaccorsi S, Williams E, Verni F, Gatti M, Goldberg ML (1995) Mutations in twinstar, a Drosophila gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 131(5): 1243–1259
- Ha I, Wightman B, Ruvkun G (1996) A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for Caenorhabditis elegans lin-14 temporal gradient formation. *Genes & development*, 10(23): 3041–3050
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC (2007) American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(33): 5287–5312
- He L, & Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7): 522–531
- Heimann R, Hellman S (2000) Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *European Journal of Cancer*, 36(13): 1631–1639
- Hennessey PT, Sanford T, Choudhary A., Mydlarz WW, Brown D, Adai AT, Ochs MF, Ahrendt SA, Mambo E, Califano JA (2012) Serum microRNA Biomarkers for Detection of Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*, 7(2): e32307
- Hernández E, De La Mota-Peynado A, Dharmawardhane S, Vlaar CP (2010) Novel inhibitors of Rac1 in metastatic breast cancer. *Puerto Rico health sciences journal*, 29(4): 348–356
- Ho A, Morrow M (2011) The evolution of the locoregional therapy of breast cancer. *The oncologist*, 16(10): 1367–1379

- Hou CH, Yang RS, Hou SM, Tang CH (2011) TNF- $\alpha$  increases  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin expression and migration in human chondrosarcoma cells. *Journal of cellular physiology*, 226(3): 792–799
- Hu D, Zhou Z, Davidson NE, Huang Y, Wan Y (2012) Novel Insight into KLF4 Proteolytic Regulation in Estrogen Receptor Signaling and Breast Carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17): 13584–13597
- Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, Zhang GM, Feng ZH (2009) miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25– T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Reports*, 10(2): 180–185
- Hudis CA, Gianni L (2011) Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *The Oncologist*, 16(Supplement 1): 1–11
- Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6): 673–687
- Insall RH, Jones GE (2006) Moving matters: signals and mechanisms in directed cell migration. *Nature cell biology*, 8(8): 776–779
- Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Braccioli L, Tagliabue E (2011) Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. *The Breast*, 20, Supplement 3(0): S63–S70
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM (2005) MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Research*, 65(16): 7065–7070
- Ivanov AI, Hunt D, Utech M, Nusrat A, Parkos CA (2005) Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Molecular biology of the cell*, 16(6): 2636–2650

- Jaffe AB, Hall A (2005) RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1): 247–269
- Janssen EAM, Slewa A, Gudlaugsson E, Jonsdottir K, Skaland I, Sjøiland H, Baak JPA (2010) Biologic profiling of lymph node negative breast cancers by means of microRNA expression. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23(12): 1567–1576
- Jiang L, Liu X, Kolokythas A, Yu J, Wang A, Heidbreder CE, Shi F, Zhou X (2010) Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 127(3): 505–512
- Ju X, Li D, Shi Q, Hou H, Sun N, Shen B (2009) Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Hematology-Oncology*, 26(1): 1–10
- Juan D, Alexe G, Antes T, Liu H., Madabhushi A, Delisi C, Ganesan S, Bhanot G, Liou LS (2010) Identification of a MicroRNA Panel for Clear-cell Kidney Cancer. *Urology*, 75(4): 835–841
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R (2003) Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology*, 4(2): 206
- Kamat N, Khidhir MA, Jaloudi M, Hussain S, Alashari MM, Al Qawasmeh KH, Rannug U (2012) High incidence of microsatellite instability and loss of heterozygosity in three loci in breast cancer patients receiving chemotherapy: a prospective study. *BMC cancer*, 12: 373
- Kato M, Takenawa T (2005) WICH, a member of WASP-interacting protein family, cross-links actin filaments. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(4): 1058–1066
- Kessler LG (1992) The relationship between age and incidence of breast cancer. Population and screening program data. *Cancer*, 69(7 Suppl): 1896–1903

- Krebs in Deutschland 2009/2010 (2013) 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013: 64-67
- Kim VN, Nam JW (2006) Genomics of microRNA. *Trends in Genetics*, 22(3): 165–173
- Kovacs EM, Verma S, Ali RG, Ratheesh A, Hamilton NA, Akhmanova A, Yap AS (2011) N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway. *Nature cell biology*, 13(8): 934–943
- Kreienberg R, Jonat W, Volm T, Möbus V, Alt D (2006) Management des Mammakarzinoms: Onkologie aktuell (3., vollst. überarb. u. erw. Aufl.). Springer Berlin Heidelberg
- Kreienberg R, Kopp I, Albert US, Bartsch HH, Beckmann MW, Berg, D. (2012). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Zuckschwerdt-Verlag
- Kuehn T, Bembenek A, Decker T, Munz DL, Sautter-Bihl ML, Untch M, Wallwiener D (2005) A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer*, 103(3): 451–461
- Kurisetty, VV, Lakshmanaswamy R, Damodaran C (2014) Pathogenic and therapeutic role of miRNAs in breast cancer. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 19: 1–11
- Kurreck J (2009) RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(8): 1378–1398
- Lacroix M, Leclercq G (2004) Relevance of Breast Cancer Cell Lines as Models for Breast Tumours: An Update. *Breast Cancer Research and Treatment*, 83(3): 249–289

- Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG (2008) The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *International journal of oncology*, 33(3): 585–593
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5): 843–854
- Li X, Chen J, Hu X, Huang Y, Li Z, Zhou L, Tian Z, Ma H, Wu Z, Chen M, Han Z, Peng Z, Zhao X, Liang C, Wang Y, Sun L, Chen J, Zhao J, Jiang B, Yang H, Gui Y, Cai Z, Zhang X (2011) Comparative mRNA and microRNA Expression Profiling of Three Genitourinary Cancers Reveals Common Hallmarks and Cancer-Specific Molecular Events. *PLoS ONE*: 6(7): e22570
- Ling H, Fabbri M, Calin GA (2013) MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(11): 847–865
- Liu H, Chiang MY, Pear WS (2011) Critical roles of NOTCH1 in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *International journal of hematology*, 94(2): 118–125
- Liu NK, Xu XM (2006) beta-tubulin is a more suitable internal control than beta-actin in western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury. *Journal of neurotrauma*, 23(12): 1794–1801
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4): 402–408
- Lostumbo A, Mehta D, Setty S, Nunez R (2006) Flow cytometry: a new approach for the molecular profiling of breast cancer. *Experimental and molecular pathology*, 80(1): 46–53

- Lu S, Mukkada VA, Mangray S, Cleveland K, Shillingford N, Schorl C, Brodsky AS, Resnick MB (2012) MicroRNA Profiling in Mucosal Biopsies of Eosinophilic Esophagitis Patients Pre and Post Treatment with Steroids and Relationship with mRNA Targets. *PLoS ONE*, 7(7): e40676
- Lulla RR, Costa FF, Bischof JM, Chou PM, De F. Bonaldo M, Vanin EF, Soares MB (2011) Identification of Differentially Expressed MicroRNAs in Osteosarcoma. *Sarcoma 2011*: 732690
- Lund MJ, Trivers KF, Porter PL, Coates RJ, Leyland-Jones B, Brawley OW, Flagg EW, O'Regan RM, Gabram SG, Eley JW (2009) Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA. *Breast cancer research and treatment*, 113(2): 357–370
- Luo Q, Wei C, Li X, Li J, Chen L, Huang Y, Song H, Li D, Fang L (2014) MicroRNA-195-5p is a potential diagnostic and therapeutic target for breast cancer. *Oncology reports*, 31(3): 1096–1102
- Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcusson E, Teruya-Feldstein J, Bell GW, Weinberg RA (2010) Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nature biotechnology*, 28(4): 341–347
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 449(7163): 682–688
- Maciver SK, Hussey, PJ (2002) The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome biology*, 3(5): reviews3007
- Mak VCY, Siu MKY, Wong OGW, Chan KKL, Ngan HYS, Cheung ANY (2012) Dysregulated stemness-related genes in gynecological malignancies. *Histology and histopathology*, 27(9): 1121–1130
- Mamuya FA, Duncan, MK (2012)  $\alpha$ V integrins and TGF- $\beta$ -induced EMT: a circle of regulation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(3): 445–455

- Marini, F, Luzi E, Brandi ML (2011) MicroRNA Role in Thyroid Cancer Development. *Journal of thyroid research*, 2011: 407123
- Martin TA, Mason MD, Jiang WG (2011) Tight junctions in cancer metastasis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 16: 898–936
- Martin TA, Pereira G, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG (2008) N-WASP is a putative tumour suppressor in breast cancer cells, in vitro and in vivo, and is associated with clinical outcome in patients with breast cancer. *Clinical & experimental metastasis*, 25(2): 97–108
- Merkerova M, Belickova M, Bruchova H (2008) Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *European Journal of Haematology*, 81(4): 304–310
- Mogilner A, Oster G (2003) Force generation by actin polymerization II: the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophysical journal*, 84(3): 1591–1605
- Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, Schwartz GF, Park PK, Rosenberg AL, Brill K, Mitchell EP (2007) Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*, 110(4): 876–884
- Moschos SJ, Drogowski LM, Reppert SL, Kirkwood JM (2007) Integrins and cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 21(9 Suppl 3): 13–20
- Mullins RD, Stafford WF, Pollard TD (1997) Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *The Journal of cell biology*, 136(2): 331–343
- Nagaoka R, Abe H, Kusano K, Obinata T (1995) Concentration of cofilin, a small actin-binding protein, at the cleavage furrow during cytokinesis. *Cell motility and the cytoskeleton*, 30(1): 1–7

- Ng EKO, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CPH, Ma ES, Pang R, Chua D, Chu KM, Law WL, Law SY, Poon RT, Kwong A (2013) Circulating microRNAs as Specific Biomarkers for Breast Cancer Detection. *PloS one*, 8(1): e53141
- Ohlsson Teague EMC, Van der Hoek KH, Van der Hoek, MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson, SA, Print CG, Hull LM (2009) MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 23(2): 265–275
- Olsen PH, Ambros V (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental biology*, 216(2): 671–680
- Ono S (2007) Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *International review of cytology*, 258: 1–82
- Osiak AE, Zenner G, Linder S (2005) Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Experimental cell research*, 307(2): 342–353
- Pabalan N, Jarjanazi H, Sung L, Li H, Ozcelik H (2012) Menopausal status modifies breast cancer risk associated with the myeloperoxidase (MPO) G463A polymorphism in Caucasian women: a meta-analysis. *PloS one*, 7(3): e32389
- Page DL, Kidd TE, Dupont WD, Simpson JF, Rogers LW (1991) Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. *Human pathology*, 22(12): 1232–1239
- Pandya AY, Talley LI, Frost AR, Fitzgerald TJ, Trivedi V, Chakravarthy M, Chhieng DC, Grizzle WE, Engler JA, Krontiras H, Bland KI, LoBuglio AF, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM (2004) Nuclear Localization of KLF4 Is Associated with an Aggressive Phenotype in Early-Stage Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(8): 2709–2719

- Parr C, Watkins G, Jiang WG (2004) The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. *International journal of molecular medicine*, 14(5): 779–786
- Parsons M, Monypenny J, Ameer-Beg SM, Millard TH, Machesky LM, Peter M, Keppler MD, Schiavo G, Watson R, Chernoff J, Zicha D, Vojnovic B, Ng T (2005) Spatially Distinct Binding of Cdc42 to PAK1 and N-WASP in Breast Carcinoma Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5): 1680–1695
- Pereira DM, Rodrigues PM, Borralho PM, Rodrigues CMP (2012) Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug discovery today*, 18(5-6): 282-9
- Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, De Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thiery JP, Magdelénat H (2004) Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(4): 1392–1400
- Pollari S, Leivonen SK, Perälä M, Fey V, Käkönen SM, Kallioniemi O (2012) Identification of microRNAs inhibiting TGF- $\beta$ -induced IL-11 production in bone metastatic breast cancer cells. *PloS one*, 7(5): e37361
- Porter IM, McClelland SE, Khoudoli GA, Hunter CJ, Andersen JS, McAinsh AD, Blow JJ, Swedlow JR (2007) Bod1, a novel kinetochore protein required for chromosome biorientation. *The Journal of Cell Biology*, 179(2): 187–197
- Prud'homme GJ (2012) Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. *Current pharmaceutical design*, 18(19): 2838–2849
- Purohit A, Woo LWL, Potter BVL (2011) Steroid sulfatase: a pivotal player in estrogen synthesis and metabolism. *Molecular and cellular endocrinology*, 340(2): 154–160

- Ratert N, Meyer HA, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Miller K, Kilic E, Erbersdobler A, Weikert S, Jung K (2012) Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas. *PloS one*, 7(6): e39309
- Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCready DR, Lockwood G, Egan SE (2005) High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer research*, 65(18): 8530–8537
- Ridley AJ (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in cell biology*, 16(10): 522–529
- Riento K, Ridley AJ (2003) ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(6): 446–456
- Roti G, Stegmaier K (2011) Targeting NOTCH1 in hematopoietic malignancy. *Critical reviews in oncogenesis*, 16(1-2): 103–115
- Rowland BD, Bernards R, Peeper DS (2005) The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nature cell biology*, 7(11): 1074–1082
- Sacco LD, Masotti A (2012) Recent Insights and Novel Bioinformatics Tools to Understand the Role of MicroRNAs Binding to 5' Untranslated Region. *International journal of molecular sciences*, 14(1): 480–495
- San José-Enériz E, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Garate L, Martin V, Cordeu L, Vilas-Zornoza A, Rodríguez-Otero P, Calasanz MJ, Prósper F, Agirre X (2009) MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations. *Molecular Cancer*, 8(1): 69
- Sarmiento C, Wang W, Dovas A, Yamaguchi H, Sidani M, El-Sibai M, Desmarais V, Holman HA, Kitchen S, Backer JM, Alberts A, Condeelis J (2008) WASP family

members and formin proteins coordinate regulation of cell protrusions in carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology*, 180(6): 1245–1260

Sayed D, Abdellatif M (2011) MicroRNAs in Development and Disease. *Physiological Reviews*, 91(3): 827–887

Schepeler T, Reinert JT, Ostensfeld MS, Christensen LL, Silahtaroglu AN, Dyrskjøt L, Wiuf C, Sørensen FJ, Kruhøffer M, Laurberg S, Kauppinen S, Ørntoft TF, Andersen CL (2008) Diagnostic and Prognostic MicroRNAs in Stage II Colon Cancer. *Cancer Research*, 68(15): 6416–6424

Sharma S, Liu J, Wei J, Yuan H, Zhang T, Bishopric NH (2012) Repression of miR-142 by p300 and MAPK is required for survival signalling via gp130 during adaptive hypertrophy. *EMBO Molecular Medicine*, 4(7): 617–632

Singh S, Narang AS, Mahato RI (2011) Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA. *Pharmaceutical research*, 28(12): 2996–3015

Smalheiser NR, Lugli G, Rizavi HS, Torvik VI, Turecki G, Dwivedi Y (2012) MicroRNA Expression Is Down-Regulated and Reorganized in Prefrontal Cortex of Depressed Suicide Subjects. *PLoS ONE*, 7(3): e33201

Stauber M, Weyerstahl T, Hormann J (2005) Gynäkologie und Geburtshilfe (2., aktualis. A.). Thieme, Stuttgart.

Stead LA, Lash TL, Sobieraj JE, Chi DD, Westrup JL, Charlot M, Blanchard RA, Lee JC, King TC, Rosenberg CL (2009) Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. *Breast cancer research: BCR*, 11(2): R18

Suetsugu S, Miki H, Takenawa T (2002) Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 51(3): 113–122

- Takahashi K, Suzuki K (2011) WAVE2, N-WASP, and mena facilitate cell invasion via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent local accumulation of actin filaments. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(11): 3421–3429
- Tang J, Ahmad A, Sarkar FH (2012) The Role of MicroRNAs in Breast Cancer Migration, Invasion and Metastasis. *International journal of molecular sciences*, 13(10): 13414–13437
- Teng YHF, Thike AA, Wong NS, Tan PH (2011) Therapeutic targets in triple negative breast cancer - where are we now? *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 6(2): 196–209
- Turunen M, Talvensaaari-Mattila A, Soini Y, Santala M (2009) Claudin-5 overexpression correlates with aggressive behavior in serous ovarian adenocarcinoma. *Anticancer research*, 29(12): 5185–5189
- Valastyan S, Benaich N, Chang A, Reinhardt F, Weinberg RA (2009) Concomitant suppression of three target genes can explain the impact of a microRNA on metastasis. *Genes & development*, 23(22): 2592–2597
- Van de Water W, Bastiaannet E, De Craen AJM, Westendorp RGJ, Van de Velde CJH, Liefers GJ (2012) [Worse prognosis for older breast cancer patients]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 156(33): A5074
- Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ (2011) RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *The Journal of Cell Biology*, 193(4): 655–665
- Vella MC, Choi EY, Lin SY, Reinert K, Slack FJ (2004) The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes & development*, 18(2): 132–137

- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR (1991) Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research*, 51(10): 2515–2520
- Voegtly LM, Mamula K, Campbell JL, Shriver CD, Ellsworth RE (2012). Molecular Alterations Associated with Breast Cancer Mortality. *PLoS ONE*, 7(10): e46814
- Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K, Croce CM (2012) Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8): 3024–3029
- Wang J, Fu L, Gu F, Ma Y (2011) Notch1 is involved in migration and invasion of human breast cancer cells. *Oncology reports*, 26(5): 1295–1303
- Wang L, Wang J (2012) MicroRNA-mediated breast cancer metastasis: from primary site to distant organs. *Oncogene*, 31(20): 2499–2511
- Wang W, Goswami S, Lapidus K, Wells A.L, Wyckoff JB, Sahai E, Singer RH, Segall JE, Condeelis JS (2004) Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer research*, 64(23): 8585–8594
- Weis SM, Cheresh DA (2011)  $\alpha$ v Integrins in Angiogenesis and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1): a006478
- Weiss JR, Moysich KB, Swede H (2005) Epidemiology of male breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(1): 20–26
- Wendler A, Wehling M (2013) PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity. *Steroids*, 78(6): 555-558

- Wieczorek E, Reszka E, Gromadzinska J, Wasowicz W (2012) Genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in breast cancer. *Neoplasia*, 59(3): 237–247
- Wienholds E, Plaster RHA (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters*, 579(26): 5911–5922
- Wightman B, Bürglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G (1991) Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes & development*, 5(10): 1813–1824
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5): 855–862
- Wu, L., Cai, C., Wang, X., Liu, M., Li, X., & Tang, H. (2011). MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *FEBS letters*, 585(9), 1322–1330
- Wu YJ, Muldoon, LL, Gahramanov S, Kraemer DF, Marshall DJ, Neuwelt EA (2012) Targeting  $\alpha$ V-integrins decreased metastasis and increased survival in a nude rat breast cancer brain metastasis model. *Journal of neuro-oncology*, 110(1): 27–36
- Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, Segall J, Eddy R, Miki H, Takenawa T, Condeelis J (2005) Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *The Journal of cell biology*, 168(3): 441–452
- Yanagawa R, Furukawa Y, Tsunoda T, Kitahara O, Kameyama M, Murata K, Ishikawa O, Nakamura Y (2001) Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 3(5): 395–401
- Yoshida T, Zhang Y, Rivera Rosado LA, Chen J, Khan T, Moon SY, Zhan B (2010) Blockade of Rac1 activity induces G1 cell cycle arrest or apoptosis in breast

cancer cells through downregulation of cyclin D1, survivin, and X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Molecular cancer therapeutics*, 9(6): 1657–1668

Yoshioka T, Nishikawa Y, Ito R, Kawamata M, Doi Y, Yamamoto Y, Yoshida M, Omori Y, Kotanagi H, Masuko T, Enomoto K (2010) Significance of integrin  $\alpha\beta 5$  and erbB3 in enhanced cell migration and liver metastasis of colon carcinomas stimulated by hepatocyte-derived heregulin. *Cancer science*, 101(9): 2011–2018

Yu F, Li J, Chen H, Fu J, Ray S, Huang S, Zheng H, Ai W (2011) Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene*, 30(18): 2161–2172

Zamir E, Geiger B (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*, 114(20): 3583–3590

Zhang Y, Roccaro AM, Rombaoa C, Flores L, Obad S, Fernandes SM, Sacco A, Liu Y, Ngo H, Quang P, Azab AK., Azab F, Maiso P, Reagan M, Brown JR, Thai T H, Kauppinen S, Ghobrial IM (2012) LNA-mediated anti-miR-155 silencing in low-grade B-cell lymphomas. *Blood*, 120(8): 1678–1686

Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY (2010) Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular cell*, 39(1): 133–144

Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR (2006) The structure and regulation of vinculin. *Trends in cell biology*, 16(9): 453–460

## Danksagung

Meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Martin Götte danke ich für die Überlassung dieses hochspannenden Themas, seine intensive Betreuung und ständige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion, seine kritische Durchsicht meiner Manuskripte sowie für die großzügige Möglichkeit, die Ergebnisse meiner Arbeit publizieren zu dürfen. Ebenso danke ich Herrn PD Dr. Burkhard Greve für die Abnahme der Prüfung.

Des Weiteren möchte ich dem Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik in Münster danken, die mir mit ihrer Expertise mit Rat und Tat zur Seite standen. Professor Dr. med. Ludwig Kiesel danke ich für die Unterstützung der Arbeit; Birgit Pers, Kathrin Brüggemann und Cornelia Schneider für ihre hervorragende Einführung in die Laborarbeit, ihre Assistenz bei der Durchführung meiner Versuche sowie die Tatsache dass ich mich zu jedem Zeitpunkt mit meinen Fragen an sie wenden konnte. Ohne sie wäre die Arbeit so nicht möglich gewesen. Auch Heba Tallah Hassan, Sherif Ibrahim, Archana Vijaya Kumar und Sampath Kumar Katakam möchte ich dafür danken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und wir viele gemeinsame Stunden zusammen im Labor verbracht haben, die ich nicht vergessen werde. Vielen Dank auch an Herrn Dr. Christoph Riethmüller (SerendIP, CenTech Münster) für das freundliche Zur Verfügung Stellen der Daten der *nano-texture*-Analyse.

Der herzlichste und umfassendste Dank jedoch gilt meiner Familie für ihre stete Unterstützung, Rücksichtnahme und Ermutigung.





