

**Alterationen des microRNA-Expressionsmusters unter Hypoxie-
Tumorbiologische und molekularbiologische Untersuchungen**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
- Biowissenschaften -
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl.-Biochem. Thomas Greither

geb. am 09.03.1980 in Memmingen

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert

2. Prof. Dr. rer. nat. Elmar Wahle

3. Dr. rer. nat. Gunter Meister

Datum der Abgabe: 27.03.2009

Datum der Verteidigung: 02.10.2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Tumorbiologie	1
1.1.1. Mammakarzinom	2
1.1.2. Weichteilsarkome	4
1.1.3. Pankreaskarzinom	7
1.2. Hypoxie	10
1.2.1. Molekularbiologische Grundlagen der Hypoxie	10
1.2.2. Tumorphypoxie	14
1.3. microRNAs	16
1.3.1. Biologische Funktionen	16
1.3.2. microRNAs in Tumoren	19
1.4. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material	23
2.1. Patientengut und Zelllinien	23
2.2. Vektoren, Primer und Oligonukleotide	24
2.3. Antikörper	26
2.4. Kits und TaqMan-microRNA-Assays	26
2.5. Chemikalien und Reagenzien	27
2.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
2.7. Puffer und Lösungen	31
3. Methoden	33
3.1. Zellzüchtung	33
3.2. Transfektionsversuche	34
3.2.1. Lipotransfektion von Antagomirs/Oligonukleotiden	34
3.2.2. Transfektion von Expressionsvektoren/Luciferasevektoren	35
3.3. Zellkoloniebildungstest	35
3.4. mRNA- und microRNA-Expressionsanalysen	36
3.4.1. RNA-Isolation und –messung	36
3.4.2.1. cDNA-Synthese zur mRNA-Expressionsanalyse	37

3.4.2.2. cDNA-Synthese zur microRNA-Expressionsanalyse	37
3.4.3. quantitative real-time-PCR	38
3.5. Protein-Expressionsanalyse	40
3.5.1. Proteinisolation und –messung	40
3.5.2. Western-Blot-Analyse	40
3.6. Erstellung der microRNA-Expressionsvektoren und Luciferase-Vektoren	41
3.6.1. PCR	41
3.6.2. Agarose-Gelelektrophorese und cDNA-Aufreinigung	41
3.6.3. Restriktionsverdau	42
3.6.4. Ligation	43
3.6.5. Klonierung	43
3.6.6. Plasmidisolation und – aufreinigung	44
3.6.7. Sequenzierung	44
3.7. Luciferase-Assay	45
3.8. Immunfluoreszenz	46
3.9. Suchalgorithmen für microRNA-Proteintargets	47
3.10. Statistische Analysen	47
4. Ergebnisse	49
4.1. microRNA-Expression unter Hypoxie	49
4.1.1. Generelle Veränderungen der microRNA-Expression unter Hypoxie	49
4.1.2. Stark unter Hypoxie verändert exprimierte microRNAs	51
4.1.3. Expression der hsa-miR-210 und hsa-miR-325 unter Hypoxie in weiteren Zelllinien	53
4.2. Effekte der Inhibierung bzw. Überexpression der hsa-miR-210 und hsa-miR-325 auf das klonogene Zellüberleben	54
4.2.1. Konstruktion von microRNA-Expressionsvektoren	55
4.2.2. Effekte der Überexpression von hsa-miR-181a, hsa-miR-200a, hsa-miR-324-5p und hsa-miR-325 auf das klonogene Zellüberleben unter Hypoxie	56
4.2.3. Auswirkungen der Inhibierung von hsa-miR-210 auf das klonogene Zellüberleben	59
4.2.4. Kombination von hsa-miR-210 und hsa-miR-137-Antagomirs und deren Auswirkungen auf das klonogene Zellüberleben	60
4.2.5. Kombination von hsa-miR-210-Antagomirs und Chemotherapeutika	62

4.3. in-silico Identifizierung von Proteintargets für hsa-miR-210 und hsa-miR-325	63
4.4. Verifizierung der putativen Proteintargets EFNA3 und EphA3	67
4.4.1. Quantitative real-time-PCR	68
4.4.2. Luciferase-Assay	69
4.4.3. Western-Blot-Analysen	70
4.4.4. Immunfluoreszenz-Analysen	73
4.5. microRNA-Expression in Tumoren und deren Assoziation zu prognostischen Faktoren	76
4.5.1. hsa-miR-210 und hsa-miR-325 in Weichteilsarkomen	76
4.5.2. Prognoserelevanz der hsa-miR-210 und anderer microRNAs im PDAC	81
5. Diskussion	84
5.1. Hypoxie-regulierte microRNAs – hsa-miR-210 und hsa-miR-325	84
5.2. Effekte der modulierten Expression der hsa-miR-210 und hsa-miR-325	86
5.3. hsa-miR-210 und hsa-miR-325 und das Ephrin/Eph-Rezeptor-System	91
5.4. Prognostische Relevanz der untersuchten microRNAs in Tumoren	95
6. Zusammenfassung und Ausblick	98
7. Literatur	100
8. Anhang	I
8.1. Abkürzungsverzeichnis	I
8.2. Liste der microRNA-Expressionsänderungen unter Hypoxie	V
8.3. Klinische Daten der Weichteilsarkompatienten	VII
8.4. Klinische Daten der PDAC-Patienten	VIII
8.5. Kaplan-Meier-Analysen und 5-Jahres-Überleben im Weichteilsarkom	IX
8.6. Kaplan-Meier-Analysen und 5-Jahres-Überleben im PDAC	XIII
8.7. Putative Proteintargets der hsa-miR-155, hsa-miR-203 und hsa-miR-222	XIX
Danksagung	
Erklärung	
Curriculum Vitae	
Publikationsliste	

1. Einleitung

1.1. Tumorbiologie

Maligne Tumoren sind nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache der westlichen Welt. Nach Daten der Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister in Deutschland e.V., die in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut Berlin erhoben wurden, betrug die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2004 436.500 Fälle (Männer: 230.500; Frauen: 206.000). Häufigste Tumorarten sind dabei beim Mann Prostatakarzinome (58.570 Neuerkrankungen im Jahr 2004), Darmkrebs (37.250 Neuerkrankungen) und Bronchialkarzinome (32.850 Neuerkrankungen), bei Frauen Mammakarzinome (57.230 Neuerkrankungen), Colonkarzinome (36.000 Neuerkrankungen) und Bronchialkarzinome (13.190 Neuerkrankungen) (Robert-Koch-Institut, 2008). Nach Berechnungen des Statistischen Bundesamtes verursachten im Jahr 2004 bösartige Neubildungen 25,6% aller Todesfälle (Männer: 111.013; Frauen: 98.316).

Bösartige Tumorzellen zeichnen sich durch eine ungehemmte Proliferation, eine zunehmende Entdifferenzierung und die Fähigkeit zur Bildung von Metastasen aus. Sechs charakteristische Eigenschaften müssen dazu erworben werden: Insensitivität gegen proliferationsinhibitorische Signale, Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Depletion der Apoptose, unbegrenztes replikatives Potential, selbstgelenkte Angiogenese sowie Gewebeinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000).

Diese Eigenschaften erwerben die Tumorzellen aufgrund von Mutationen in ihrem Genom. Diese Mutationen können bereits in der Keimbahn vorliegen, treten aber in den meisten Fällen spontan, etwa durch das Einwirken von Umweltfaktoren (ionisierende Strahlung, chemische Substanzen oder onkogene Viren), auf. Sie können dazu führen, dass proliferationsfördernde Gene wie Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, G-Proteine oder nukleäre Transkriptionsfaktoren konstitutiv oder in einem ständig aktivierten Zustand exprimiert werden (Onkogene). Ebenso können aber auch wachstumshemmende Gene wie DNA-Reparaturgene, Zellzykluskontrollgene oder Apoptose-Induktionsgene inaktiviert werden (Tumorsuppressorgene).

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit als Modellzelllinien (Mammakarzinome) oder Patientenkohorten untersuchten Tumorarten (Weichteilsarkome und Pankreaskarzinome) näher beschrieben.

1.1.1 Mammakarzinom

In dieser Arbeit wurden die Zellsysteme MCF (Michigan Cancer Foundation)-7 und MCF-10 genutzt. Beide Linien leiten sich vom Mamma-Epithel ab. MCF-10-Zellen sind eine Subklasse von spontan immortalisierten Epithelzellen, die aus einer Mastektomieprobe einer Patientin mit einer fibrozystischen Erkrankung hervorgingen (Tait et al., 1990). Die MCF-7-Zelllinie entstammt einer 69jährigen Frau, die sich wegen eines Mammakarzinoms zweier Mastektomien innerhalb von 5 Jahren unterziehen musste. Die Zellen wurden einer pleuralen Effusion der Brustwand entnommen und später als nicht-invasives Mammakarzinom klassifiziert (Soule et al., 1973; Dickson et al., 1986).

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorart bei Frauen. In Deutschland erkranken über 570.000 Frauen jährlich daran, was 27,8% aller Krebserkrankungen entspricht (Robert-Koch-Institut, 2008). In den USA wurden für das Jahr 2008 184.450 Neuerkrankungen an einem Mammakarzinom und 40.930 Todesfälle geschätzt. 98,9 % der an einem Mammakarzinom erkrankten Patienten sind Frauen (Jemal et al., 2008).

Anerkannte Risikofaktoren sind ein hohes Lebensalter, eine familiäre Mammakarzinomvorbelastung, die Einnahme östrogen- und progesteronhaltiger Ovulationshemmer, eine Hormontherapie im Klimakterium und Übergewicht. Darüber hinaus sind auch gynäkologische Faktoren, wie etwa eine frühe Menarche (<12 Jahren), ein hohes Alter bei der Erstgeburt, eine kurze Laktationsdauer und ein später Eintritt in das Klimakterium mit der Entstehung von Mammakarzinomen assoziiert (Goerke et al., 2002; Robert-Koch-Institut 2008). Außerdem kann Folsäuremangel oder übermäßiger Alkoholgenuß zu einer abnormen DNA-Synthese, -Reparatur und aberranter DNA-Methylierung führen und damit die Entstehung von Mammakarzinomen begünstigen (Miller et al., 2008).

Bei der histologischen Klassifikation nach WHO-Kriterien wird zwischen nicht-invasiven und invasiven Mammakarzinomen und dem Pagetkarzinom der Mamille unterschieden. Das invasive duktales Karzinom ist mit etwa 65 - 80% die häufigste Form des Mammakarzinoms. Es entstammt dem Epithel der terminalen Milchgänge und stellt sich als uniforme Zellmasse mit geringer Mitoserate dar (Rosen 2001). Das invasive lobuläre Mammakarzinom leitet sich vom Azinusepithel der Drüsenläppchen ab und liegt bei 10-15% der Patienten vor (Rosen 2001). Darüber hinaus gibt es noch weitere Differenzierungsformen des invasiven Mammakarzinoms, darunter das tubuläre Mammakarzinom (2-3% der Fälle), das medulläre Mammakarzinom (5-7% der Fälle) und das muzinöse Mammakarzinom (1-7% der Fälle)

(Rosen 2001). Noch seltener treten Mammakarzinome mit Metaplasie, squamöse Karzinome mit durchweg keratinisierten Zellen und manchmal spindelzellförmigen Anteilen, papilläre Mammakarzinome mit intraduktalen Wachstumsfoci, adenoid-zystische Karzinome oder apokrine Karzinome auf (Rosen 2001). Mammakarzinome metastasieren vorwiegend in regionale Lymphknoten, Knochen, Leber, Gehirn und Lunge.

In Mammakarzinomen liegen häufig genetische Veränderungen vor. Für die familiäre Form, die Ursache für etwa 10% der auftretenden Mammakarzinome ist, sind in der Regel Mutationen der DNA-Reparaturgene BRCA1 und BRCA2 verantwortlich (Brody et al., 1998; McPherson et al. 2000). Bei sporadischen Tumoren sind Amplifikationen der Onkogene myc, ErbB2 (Her2/Neu) und INT2 mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert (Berns et al., 1992). Eine besondere Rolle bei der Entwicklung, aber auch der Therapie von Mammakarzinomen spielt das Östrogen und der Östrogenrezeptor (ER). So wurde nachgewiesen, dass ein erhöhter Östrogenspiegel bei jungen Frauen mit einem verringerten Mammakarzinomrisiko einhergeht (Berkey et al., 1999). Dieses reduzierte Risiko resultiert aus der östrogen-induzierten Aktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene wie BRCA1 und BRCA2 (Spillman et al., 1996) oder p53 (Hurd et al., 1997). Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich wirksam, solange einzelne Zellen in der Brust noch keine maligne Transformation durchlaufen haben. Hat wiederum eine solche Transformation stattgefunden, kann Östrogen das Wachstum der transformierten Zellen induzieren. Wenn in der transformierten Zelle dann bereits eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie etwa BRCA1 oder p53 stattgefunden hat, kann es zur Tumorinitiation kommen (Hilakivi-Clarke, 2000). Der Östrogenrezeptor ist der Vermittler der Östrogenwirkung. Etwa 70% aller Mammakarzinome sind ER-positiv und damit für eine endokrine Therapie zugänglich (Yamashita 2008). Mittels ER-Antagonisten wie Tamoxifen (auch „selective estrogen receptor modulators“ genannt), die an den ER binden und seine transkriptionsaktivierende Wirkung inhibieren können, kann das Wachstum von ER-positiven Tumorzellen inhibiert und eventuell sogar eine Regression des Tumors erreicht werden (Meggiolini et al., 2008; Tawakalitu et al., 2008).

Auf dieselbe Weise können gegen ErbB2 (Her2/Neu) gerichtete Antikörper wie Trastuzumab zu einer verbesserten Therapie von chemotherapeutikaresistenten Mammakarzinomen führen (Goldenberg 1999; Ishida et al., 2008). Etwa 25% aller Mammakarzinom überexprimieren ErbB2 (Dean-Colomb et al., 2008), und die Inhibierung dieser Rezeptortyrosinkinase ohne eigene Ligandbindungsdomäne führt zu einer Hemmung der Proliferation der Tumorzellen und somit zur Inhibierung des Tumorwachstums (Burgess, 2008).

1.1.2. Weichteilsarkome

Eine weitere in dieser Arbeit untersuchte Klasse von Tumoren, die Weichteilsarkome, sind eine heterogene Gruppe von malignen Neoplasien, die Gewebe mesenchymalen Ursprungs entstammen. Darunter fallen alle nichtepithelialen und extraskelletalen Gewebe des Körpers, wie etwa das Fettgewebe, die quergestreifte und glatte Muskulatur oder auch das Bindegewebe. Per Definition werden Tumoren, die sich aus dem peripheren Nervensystem entwickeln, ebenfalls zu den Weichteilsarkomen gerechnet. Ausnahmen bilden das retikuloendotheliale System, die Glia und das Stützgewebe parenchymatöser Organe (Weiss und Goldblum, 2007). Sie werden nach den Gewebetypen, die sie histologisch nachbilden, in verschiedene Entitäten differenziert, von denen die wichtigsten in Tabelle 1.1. aufgeführt sind. Insgesamt werden derzeit 150 Subtypen in 20 Sarkomarten unterschieden (Weiss und Goldblum, 2007).

Tumorentität	Histologie ähnlich zu	relative Häufigkeit	
		Hashimoto 1992	Herzog 2005
Liposarkom	Fettgewebe	11,6%	11%
Malignes fibröses Histiozytom	Histiozyten (Bindegewebszellen)	25,1%	18%
Leiomyosarkom	glatter Muskulatur	9,1%	20%
Rhabdomyosarkom	quergestreifte Muskulatur	9,7%	6%
Neurogene Sarkom	Nervenscheidengewebe des peripheren Nervensystems	5,9%	2%
Synoviale Sarkom	Membrana synovialis	6,5%	6%
Fibrosarkom	Bindegewebe	5,2%	2%
Angiosarkom	Blutgefäßzellen	<1%	5%
Nicht klassifiziert		26,9%	22%

Tab. 1.1. Die häufigsten Weichteilsarkomentitäten und ihre Charakteristika (nach Hashimoto, 1992 in Enzinger und Weiss, 1995 und Herzog 2005).

Weichteilsarkome umfassen nur etwa 1% der jährlich diagnostizierten bösartigen Tumorerkrankungen. Bei Kindern und Jugendlichen jedoch beträgt ihr Anteil etwa 8,5% der malignen Tumorfälle (Herzog 2005). Ihre Inzidenzrate liegt bei 1,4 pro 100.000 Einwohner je

Jahr (Weiss und Goldblum, 2007). Benigne Weichteilneoplasien hingegen zeigen eine Inzidenz von 300 pro 100.000 Einwohner. Auf dieser Basis wurden für das Jahr 2000 8.100 neue Weichteilsarkomfälle in den Vereinigten Staaten prognostiziert (Weiss und Goldblum, 2007) und für das Jahr 2008 10.390 neue Fälle (Jemal et al., 2008). Insgesamt ist der Anteil an männlichen Patienten etwas höher als der an weiblichen. Der bereits in den 90iger Jahren beobachtete Anstieg der Weichteilsarkomfälle setzt sich damit fort. Dieser beobachtete Anstieg resultiert aus den verbesserten Diagnosemöglichkeiten, aus der Alterszunahme der Bevölkerung und aus einem häufigeren Auftreten des mit AIDS assoziierten Kaposi-Sarkoms (Weiss und Goldblum, 2007).

Im Körper treten Weichteilsarkome zu etwa 45% in den unteren Extremitäten auf, 15% in den oberen Extremitäten, 15% im Retroperitoneum, 10% im Kopf- und Halsbereich und der Rest im Rumpfbereich (Weiss und Goldblum, 2007). Ihre Häufigkeit folgt damit der prozentualen Verteilung mesenchymalen Gewebes im menschlichen Körper. Patienten mit Tumoren, die im Kopf-Hals-Bereich oder im Retroperitoneum auftreten, haben eine schlechtere Überlebensrate als solche mit Tumoren in den Extremitäten (Gross et al. 2005). Die Verteilung der verschiedenen histologischen Subtypen ist altersabhängig. Sie können auf dieser Basis in drei Gruppen eingeteilt werden (erste Prozentzahl in Klammern: Anteil an den Gesamtfällen über alle Altersgruppen/zweite Prozentzahl: Anteil an den Fällen der unter 29jährigen).

1. Sarkome mit hoher Häufigkeit, die selten bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen (<29 Jahre) auftreten, wie Leiomyosarkome (20%/7%), MFH (18%/5%) oder Liposarkome (11%/5%).
2. Sarkome mit geringer Häufigkeit, die gehäuft bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auftreten, wie Rhabdomyosarkome (6%/15%), synoviale Sarkome (6%/16%) oder neurogene Sarkome (2%/5%).
3. Sarkome mit geringer Häufigkeit, die auch selten bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auftreten, wie Angiosarkome (5%/4%) oder Fibrosarkome (2%/3%) (Herzog 2005)

Essentiell für die Therapie und die Prognose eines Weichteilsarkoms bleibt neben der Einteilung in einen histologischen Subtyp die Frage nach dem Grading. Dabei wird vor allem anhand von Parametern wie der Mitoseaktivität und dem Ausmaß von Nekrosen, ebenso wie Zellreichtum, Zellpleomorphie und dem Differenzierungsgrad des Primärtumors, histopathologisch der Grad der Malignität abgeschätzt (Weiss und Goldblum, 2007). Zudem

kann durch die Einteilung der Erkrankung in verschiedene Stadien („Staging“) die Prognose eines individuellen Tumors besser vorausgesagt werden. Dabei finden auch Tumorgröße, Tumortiefe, Lymphknotenbefall sowie das Vorliegen von Fernmetastasen Berücksichtigung (Weiss und Goldblum, 2007). In Stadium I liegt das 5-Jahres-Überleben bei mehr als 90%, in Stadium II fällt es auf etwa 60%, in Stadium III auf unter 25% und beträgt in Stadium IV nur noch 2-5%. (Weiss und Goldblum, 2007)

Da Weichteilsarkome meist beschwerdefrei wachsen und darüber hinaus sehr selten sind, werden sie oft erst spät diagnostiziert. 20% der Patienten haben zu diesem Zeitpunkt bereits nachweisbare Fernmetastasen, die vor allem die Lunge betreffen (Weiss und Goldblum, 2007). Die häufigste Therapiemethode bleibt bis heute die radikale chirurgische Resektion des Tumors, die aber großflächig durchgeführt werden muss, um Rezidivbildung zu vermeiden (Weiss und Goldblum, 2007). Irresektabilität des Tumors ist die Hauptursache für eine nichterfolgte Therapie (Farshadpour et al., 2004). Gegen Chemo- und Strahlentherapie zeigen Weichteilsarkome oft eine ausgeprägte Resistenz.

Faktoren für die Entstehung eines Weichteilsarkoms können chemischer, physikalischer, genetischer und immunologischer Natur sein. So erhöht die Berührung mit Phenoxyacetat-haltigen Herbiziden die Gefahr um ein Sechsfaches, ebenso ist Vinylchlorid eindeutig mit der Ausbildung von Angiosarkomen korreliert (Elliot et al., 1997). Ionisierende Strahlung, wie sie auch bei der Radiotherapie angewandt wird, erhöht die Inzidenz des Weichteilsarkoms um 0,03-0,8% (Amendola et al., 1989). Als Beispiel für ein durch einen erworbenen Immundefekt verursachtes Sarkom kann das Kaposi-Sarkom angesehen werden, das wahrscheinlich vom humanen Herpes-Virus 8 initiiert wird (Übersicht Cathomas, 2003). Hereditäre Ursachen in der Weichteilsarkomentstehung existieren beim Li-Fraumeni-Syndrom (p53-Mutation in der Keimbahn und daraus resultierend unter anderem eine Neigung zu familiären Sarkomen), bei der Neurofibromatose Typ I/II von Recklinghausen (Mutation des NF1 beziehungsweise NF2-Gens und damit Neigung zur Bildung von Neurofibromen, die mit 1-5% zu neurogenen Sarkomen entarten) und beim erblichen Retinoblastom (Mutation im Rb1-Gen, die mit der Entstehung von Osteosarkomen assoziiert sein kann) (Weiss und Goldblum, 2007).

Genetische Alterationen nicht-hereditärer Art sind ebenso in Weichteilsarkomen zu finden. So ist in vielen Tumorarten die Amplifikation einer Sequenz wechselnder Länge auf dem Chromosomenarm 12q stark erhöht. In dieser Sequenz wurden die Zellzyklus-regulierenden Gene CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) und der negative Regulator des Tumorsuppressorgens p53, MDM2 (murine double minute 2), gefunden (Weiss und Goldblum, 2007). Aber auch Alterationen in der mRNA-Expression von Zellzyklusregulatoren wie Survivin und Stamm-

Zellfaktoren wie Hiwi oder hTERT sind in Weichteilsarkomen prognostisch relevant (Taubert et al., 2007).

1.1.3. Pankreaskarzinom

Im Jahr 2008 werden für Pankreaskarzinome in den USA 37.680 Neuerkrankungen und 34.290 Todesfälle geschätzt (Jemal et al., 2008). Die jährliche Inzidenzrate für Pankreaskarzinome beträgt dabei etwa 9 Fälle je 100.000 Einwohner, was diese Art von Tumoren zur elfthäufigsten macht (Greenley et al., 2001). Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung beträgt 60 bis 65 Jahre (Ahlgren, 1996).

Die Prognose von unbehandelten Pankreaskarzinom-Patienten ist schlecht. Werden alle Stadien kombiniert, liegt das 1-Jahres-Überleben bei 19%, das 5-Jahres-Überleben bei 4% (Greenley et al., 2001). Die Prognose ist relativ ungünstig, weil erst im späten Krankheitsverlauf klinische Symptome auftreten, sodass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits 80% der Tumoren Metastasen entwickelt haben. Die chirurgische Entfernung des Tumors (falls kein Lymphknotenbefall vorliegt und eine vollständige Resektion des Tumors erfolgt ist) bietet die beste Heilungschance für ein Pankreaskarzinom. Die 5-Jahres-Überlebensrate erhöht sich dabei auf 40% (Sohn et al., 2004).

Die Gefahr, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, ist stark altersabhängig. Allerdings wurden auch weitere Risikofaktoren identifiziert, so Aktiv- und Passivrauchen und Exposition von Chemikalien. Ätiologische Risikofaktoren sind unter anderem Diabetes mellitus, Pankreatitis oder eine vorherige Cholezystektomie (Ahlgren 1996; Gold et al., 1998; Silverman et al., 1999; Lowenfels et al., 2006; Landi 2008). Weiterhin haben auch einige Kohortenstudien ein erhöhtes Risiko, eine Pankreaskarzinom zu entwickeln, für Personen gezeigt, deren Familiengeschichte bereits einige Pankreaskarzinomfälle aufweist (Tersmette et al., 2001). Sechs genetische Syndrome, die insgesamt für etwa 10% der familiären Häufungen verantwortlich sind, konnten bisher identifiziert werden (zitiert nach Yeo et al., 2002):

1. Träger einer BRCA2 Keimbahn-Mutation haben ein 3,5-10fach erhöhtes Risiko, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Murphy et al., 2002). 17% der Pankreaskarzinompatienten mit einer Pankreaskarzinomfamiliengeschichte tragen eine BRCA2-Mutation (Goggins et al., 1996).

2. Patienten mit einer p16-Keimbahn-Mutation haben ein 12- bis 20fach erhöhtes Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Borg et al., 2000; Lynch et al., 2002).
3. Patienten mit einem Peutz-Jeghers-Syndrom haben ein 130fach erhöhtes Risiko, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Giarodella et al., 1988).
4. Patienten, die an dem hereditären nichtpolypösen colorektalen Karzinom (HNPCC)-Syndrom mit Keimbahn-Mutationen in einem der DNA-mismatch Reparaturgenen (hMSH1, hMSH2) leiden, haben ein erhöhtes Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Lynch et al., 1985; Goggins et al., 1998).
5. Patienten mit hereditärer Pankreatitis verursacht durch Keimbahn-Mutationen im PRSS1-Gen (cationic trypsinogen gene 1) haben ein 50fach erhöhtes Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Whitcomb et al., 1996; Lowenfels et al., 1997).
6. Patienten, die an Ataxia telangiectasia leiden, zeigen aufgrund einer Keimbahn-Mutation des ATM-Gens eine erhöhte Anfälligkeit für Leukämien und Tumoren der Brust, der Ovarien, des Magens und in seltenen Fällen des Pankreas (Hruban et al., 1998).

Etwa 75% aller malignen Pankreasneoplasien sind duktale Adenokarzinome (PDAC). Diese Neoplasien sind weiß-gelbliche, feste Massen, die früh lymphogen und hämatogen streuen. Darüber hinaus infiltrieren PDACs oft perineurale, lymphatische und vaskuläre Räume. Lymphknotenmetastasen werden in den meisten resezierten Adenokarzinomen gefunden. Es werden verschiedene Läsionen des Pankreas unterschieden, die je nach Grad ihrer Malignität zu Pankreaskarzinomen entarten können. Diese sind die intraepithelialen Neoplasien (PanINs), die muzinösen zystischen Neoplasien (MCNs) und die intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMNs). Darüber hinaus gibt es noch andere Subtypen des Pankreaskarzinoms, z.B. Pankreasblastome (juveniles Pankreaskarzinom), azinare Zellkarzinome (Pankreaskarzinome mit azinärer Differenzierung) oder solide pseudopapilläre Neoplasmen (vorwiegend in weiblichen Patienten im Alter zwischen 30 und 40 Jahren auftretendes Pankreaskarzinom).

Neben den oben genannten genetischen Faktoren sind weitere Alterationen im Pankreaskarzinom gut beschrieben. Etwa 95% aller Pankreaskarzinome haben eine aktivierende Punktmutation im K-Ras-Onkogen (Hruban et al., 1993; Almoguerra et al., 1998). Die meisten dieser Veränderungen betreffen das Codon 12 und bewirken einen Austausch der Aminosäure Glycin durch Aspartatsäure oder Valin. Darüber hinaus treten seltener auch Mutationen im Codon 13 oder 61 auf. Diese Mutationen inhibieren die K-Ras-spezifische GTPase-Funktion und führen zu einer konstitutiv aktiven Signaltransduktion

(Hruban et al., 1993; Deramaudt und Rustgi, 2005). In 95% der Pankreastumoren ist das p16-Tumorsuppressorgen inaktiviert. Es inhibiert in normalen Geweben die CyclinD-abhängige Kinase 4 (CDK4), welche verschiedene Zellzyklus-Kontrollpunkt-Faktoren wie etwa z.B. das Retinoblastom-1-Protein (Rb-1) phosphoryliert (Caldas et al., 1994; Yu et al., 1999). Ein weiteres in etwa 75% aller Pankreaskarzinomen mutiertes Tumorsuppressorgen ist das Gen p53, das Aufgaben in der Zellzyklusregulation und Apoptoseinduktion nach genotoxischem Stress ausübt (Yu et al., 1999). In 55% aller Pankreaskarzinome kommt es weiterhin zu einer Mutation im Deleted in pancreatic carcinoma 4-Protein (DPC4 oder SMAD4), ein DNA-bindendes Tumorsuppressorgen, das als transkriptioneller Aktivator bzw. Repressor im TGF- β -pathway fungiert (Hahn et al., 1996; Zawel et al., 1998). Eine Übersicht der genetischen Alterationen in Pankreaskarzinomen wird in Tabelle 1.2. gegeben.

Gen-Name	Lokalisation	Mutationshäufigkeit	Referenz
<i>Onkogene</i>			
K-Ras	12p	95%	Hruban et al., 1993
AKT2	19q	10-20%	Cheng et al., 1996
MYB	6q	10%	Wallrapp et al., 1997
<i>Tumorsuppressorgene</i>			
p16/Rb1	9q/13q	95%	Caldas et al., 1994
p53	17p	75%	Yu et al., 1999
DPC4/SMAD4	18q	55%	Hahn et al., 1996
LKB1/SKT11	19p	5%	Su et al., 1998
MKK4	17p	4%	Su et al., 1999
ALK4	12q	2%	Su et al., 2001
<i>DNA-Reparaturgene</i>			
BRCA2	13q	7-10%	Goggins et al., 1996
MSI ⁺ / TGF β R2	3p	3%	Goggins et al., 1998
MLH1	3p	3%	Wilentz et al., 2000

Tab. 1.2. Genetische Alterationen in Pankreaskarzinomen (modifiziert nach Su und Kern, 2000)

In einer vergleichenden Literaturstudie zeigen Garcea et al. auch die Relevanz von Apoptose-regulierenden Genen wie BCL2 und Survivin und Angiogenese-induzierenden Genen wie dem „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) oder dem „platelet-derived endothelial

growth factor“ für ein vorgeschrittenes Tumorstadium und eine verschlechterte Prognose von Pankreaskarzinompatienten (Garcea et al., 2005).

1.2. Hypoxie

Hypoxie beschreibt eine verringerte Sauerstoffzufuhr in Geweben, was unter anderem eine Hemmung physiologischer Prozesse der Zelle zur Folge hat. Dieser verringerte Sauerstoffpartialdruck kann während akuter oder chronischer Gefäßerkrankungen, pulmonären Erkrankungen oder auch in soliden Tumoren auftreten. So liegt der mittlere Sauerstoffpartialdruck in normalem Brustgewebe bei 65 mm Hg (8,6 % O₂), ist aber in Mammakarzinomen im Mittel auf 30 mm Hg (3,9 % O₂) reduziert (Vaupel et al., 1991). Obwohl Hypoxie sowohl für normale wie auch für Tumorzellen toxisch ist, können letztere genetische und adaptive Veränderungen durchlaufen, die es ihnen erlauben, in hypoxischem Milieu nicht nur zu überleben, sondern sogar zu proliferieren. In jedem Fall jedoch ruft ein niedriger (hypoxischer) O₂-Gehalt Stresssituationen in den Zellen hervor (Brahimi-Horn et al., 2007).

1.2.1. Molekularbiologische Grundlagen der Hypoxie

Ein wesentlicher Faktor für die Regulation von Hypoxie-induzierten Stoffwechselwegen ist der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1). Viele Hypoxie-induzierte Gene, die Einfluss auf Prozesse wie die Glukoseaufnahme und –metabolisierung, Zellproliferation, Angiogenese und Apoptose haben, werden durch HIF-1 reguliert (Semenza 2003 und 2008). Es sind zurzeit drei HIF-Proteine (HIF-1, HIF-2 und HIF-3) bekannt. Sie alle regulieren transkriptionelle Vorgänge als Reaktion auf einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck (Übersichten bei Semenza et al., 1996, 2003 und 2008). Es handelt sich um Mitglieder der PAS-Superfamilie (PER-ARNT-SIM) der Transkriptionsfaktoren, die als Heterodimere aus einer Sauerstoffsensitiven α -Einheit und einer konstitutiv exprimierten β -Einheit aufgebaut sind (Wang et al., 1995). Das erste identifizierte HIF-Protein war HIF-1 (Wang et al., 1995). HIF-1 gilt als genereller Regulator der zellulären Hypoxie-Antwort, da es im Gegensatz zu HIF-2 und HIF-3 ubiquitär exprimiert wird und die Expression vieler Hypoxie-assoziiierter Gene induziert (Wenger et al., 1996; Semenza 2003 und 2008).

Bei einem normalen zellulären Sauerstoffpartialdruck wird HIF-1 α durch den von Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressor für den proteosomalen Abbau ubiquitinyliert. Daher trägt

die Halbwertszeit des HIF-1 α -Proteins in einer normoxischen Zelle nur etwa 10 – 20 Minuten (Chun et al., 2002; Bardos et al., 2004). Die Bindung zwischen VHL und HIF-1 α wird dabei durch die Hydroxylierung von zwei konservierten Prolin-Resten in der HIF-1 α ODD-Domäne („oxygen-dependent degradation domain“) vermittelt (Jaakola et al., 2001; Ivan et al., 2001; Kaelin et al., 2008). Die diese Hydroxylierung katalysierende Prolyl-4-Hydroxylase benötigt O₂ als Substrat.

Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α stabilisiert und in den Nukleus transloziert, wo es mit HIF-1 β (ARNT) heterodimerisiert. In dieser Konstitution bindet HIF-1 an kurze DNA-Bereiche, sogenannte „hypoxie-responsive elements“ (HRE), die in den Promotorbereichen von etwa 70 Hypoxie-sensitiven „target“-Genen lokalisiert sind (Semenza 2003 und 2008). Nach der Bindung rekrutiert HIF die Co-Aktivatoren CBP und p300 und bindet den entstandenen Komplex (Arany et al., 1996). Auf diese Weise kann der entstandene Transkriptionskomplex verschiedene Gene in ihrer Expression regulieren, die für Angiogenese, Invasion und Migration sowie Zelltod/Zellüberleben verantwortlich sind (Forsythe et al., 1996; Lee et al., 1997; Semenza et al., 2003; Brahimi-Horn et al., 2007).

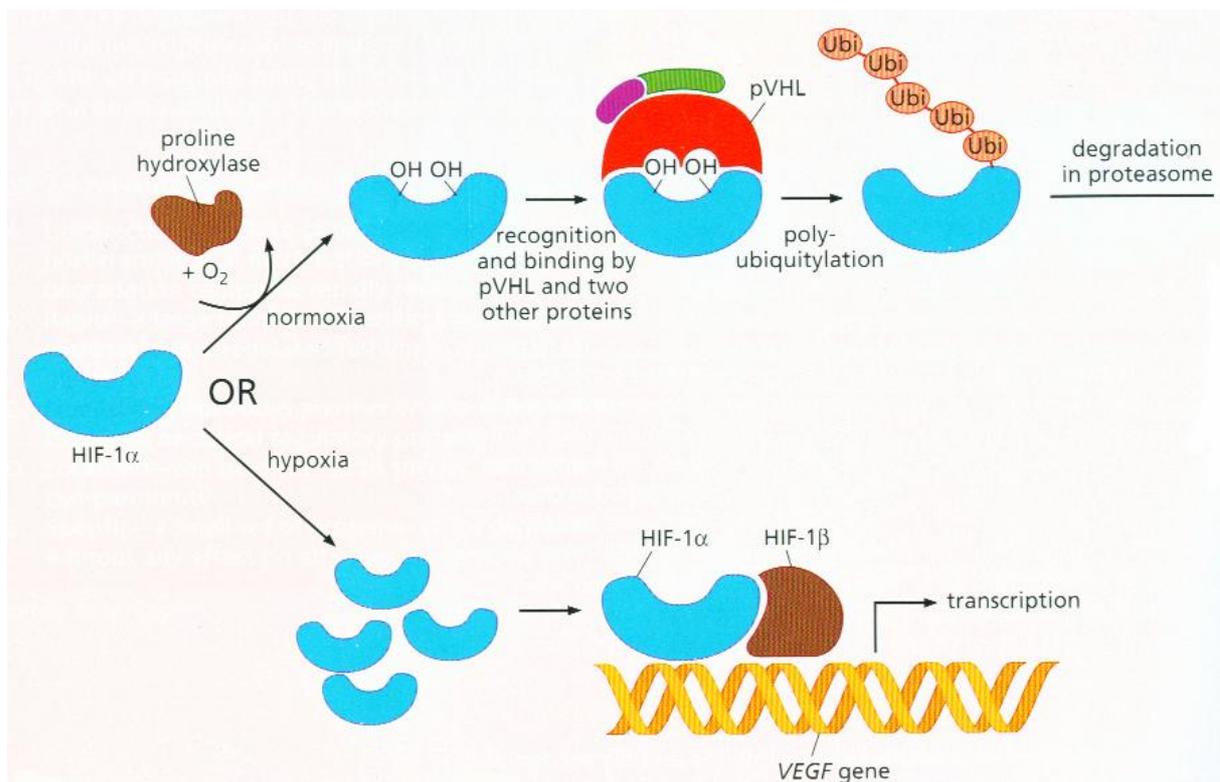


Abb. 1.1. Modell der HIF-1-Wirkung unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen (aus Weinberg, 2007)

Von HIF-1 aktivierte Faktoren zur Induktion von Angiogenese sind unter anderem der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), die VEGF-Rezeptoren FLT-1 und FLK-1, der Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1), Angiopoietine (ANG-1 und -2) der platelet-derived growth factor B (PDGF-B) und die Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und -9 (Hickey et al., 2006). Vor allem VEGF ist in diesem Zusammenhang von Interesse, da es ein wichtiger Faktor für die Bildung neuer Blutgefäße, die Neoangiogenese, darstellt. Die Sezernierung von Angiopoietinen und Matrix-Metalloproteinasen führt zur Degradation der Extrazellulärmembran und somit zu einer Lockerung des Zellverbandes. VEGF und andere Moleküle sind dann an der anschließenden Migration der Endothelzellen in Richtung des hypoxischen Bereichs, deren Versorgung und Proliferation beteiligt. Um die Sauerstoffversorgung des Bereichs sicher zu stellen, erfolgt eine VEGF-Ausschüttung durch Zellen am Rand von hypoxischen und nekrotischen Geweben, damit die Neoangiogenese voranschreitet (Carmeliet und Jain, 2000).

Neben VEGF werden von HIF-1 noch die Invasions- bzw. Migrationsmediierenden Faktoren E-Cadherin, Lysyl-Oxidase (LOX), CXCR4 und der stromal-derived factor 1 (SDF-1) reguliert. E-Cadherin vermittelt Zell-Zell-Adhäsion und stimuliert Anti-Wachstums-Signale durch die Interaktion mit β -Catenin. Die Inaktivierung von E-Cadherin verstärkt das migratorische Potential von Tumorzellen, während die Überexpression die Migration inhibiert (Bremnes et al., 2002; Schmalhofer et al., 2009). Es wird vermutet, dass HIF die Repression von E-Cadherin durch die Aktivierung der Expression von E-Cadherin-spezifischen Repressoren wie Snail oder SIP1 induziert (Evans et al., 2007). Ein weiterer von HIF-1 in seiner Expression aktivierter Faktor ist LOX, eine Amin-Oxidase, die bei der Bildung der Extrazellulärmatrix beteiligt ist. Erler und Kollegen konnten zeigen, dass die Inhibierung von LOX die Hypoxie-induzierte Zellinvasion und -migration in-vitro und in-vivo verhindern kann (Erler et al., 2006). Der Chemokinrezeptor CXCR4 und einer seiner Liganden, SDF-1, spielen eine wichtige Rolle bei der gerichteten Migration. Verschiedene Studien zeigten in einer Reihe von Zelltypen, dass beide Faktoren durch HIF-1 induziert werden (Staller et al., 2003; Ceradini et al., 2004; Phillips et al., 2005; Zagzag et al., 2006; Arya et al., 2007).

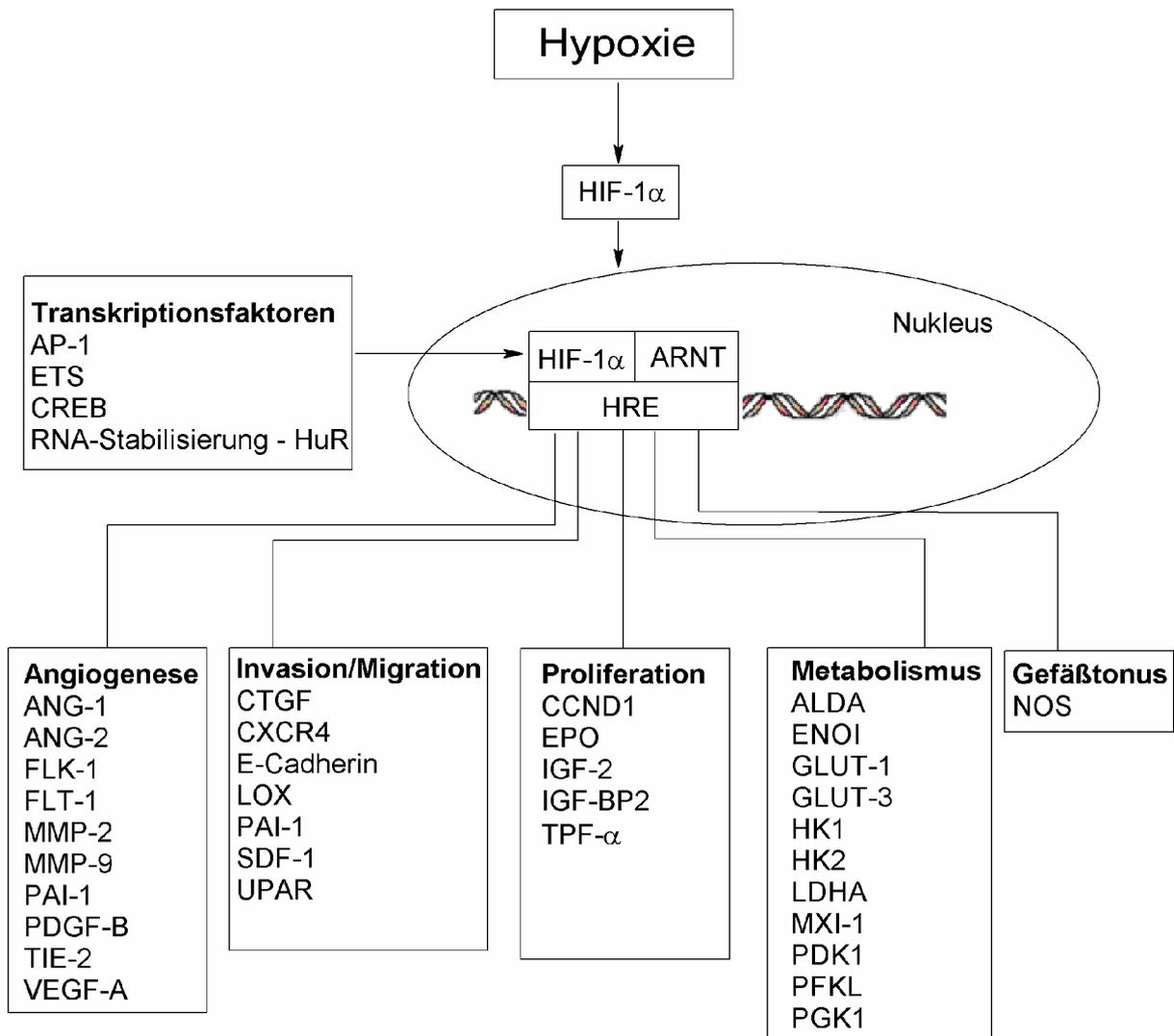


Abb. 1.2. HIF-1 regulierte Gene (modifiziert nach Harris et al., 2002 und Rankin und Giaccia, 2008).
Abkürzungen: ALDA: Aldolase A; ANG-1: Angiopoietin 1; ANG-2: Angiopoietin 2; CCND1: Cyclin D1;
CTGF: Connective tissue growth factor; CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4; EPO: Erythropoietin;
ENO1: Enolase 1; FLT-1: VEGF-Rezeptor 1; FLK-1: VEGF-Rezeptor 2; GLUT-1: Glukosetransporter-1;
GLUT-3: Glukosetransporter-3; HK1: Hexokinase1; HK2: Hexokinase 2; IGF-2: insulin growth factor-2; IGF-
BP2: IGF-factor-bindendes Protein 2; LDHA: Lactatdehydrogenase A; LOX: Lysyl-Oxidase; MMP-2:
Matrixmetalloproteinase-2; MMP-9: Matrixmetalloproteinase-9; MXI-1: Max-Interaktor 1; NOS:
Stickstoffmonoxid-Synthase; PAI-1: Plasminogenaktivator-Inhibitor-1; PDGF-B: platelet-derived growth factor
B; PDK1: Pyruvat dehydrogenase kinase-1; PFKL: Phosphofruktokinase L; PGK1: Phosphglycerasekinase 1;
SDF-1: stromal-derived factor 1; TGF-a: transforming growth factor-a; UPAR: urokinase plasminogen aktivator
Rezeptor; VEGF: vascular endothelial growth factor.

Darüber hinaus ist HIF-1 an der Regulation verschiedener Prozesse wie der Glykolyse (z.B. über Aldolase A, Enolase 1, Lactat-Dehydrogenase A und Hexokinase), dem Glukose-

Transport (z.B. über Glukosetransporter 1 und 3), der Erythropoese (z.B. über Erythropoietin) und der Regulation des Gefäßtonus (z.B. über Stickstoffmonoxid-Synthase) beteiligt (Ratcliffe et al., 1997; Semenza, 2003; Denko et al., 2008). Zahlreiche Studien belegen weiterhin, dass viele Gene wie etwa Angiogenese-Faktoren, Proliferations- und Zelladhäsionsgene durch Hypoxie und HIF-1 α reguliert werden (Denko et al., 2000 und 2008; Koong et al., 2000; Lal et al., 2001). Ein Überblick wichtiger durch HIF-1 α regulierter Gene findet sich in Abbildung 1.2.. Vor allem in Tumoren sorgen diese vielfältigen Hypoxie-induzierte Veränderungen in Stoffwechsel- und Proliferationspathways für eine zunehmende Hypoxieresistenz und eine Verschlechterung der biologischen Eigenschaften des Tumors.

1.2.2. Tumorhypoxie

Tumorhypoxie tritt als Konsequenz bei der Entstehung solider Tumoren auf und kann durch Selektion von genetischen Veränderungen deren Wachstum und Entwicklung fördern. Wenn Tumoren mehr als 100 μm von funktionalen Blutgefäßen entfernt liegen, ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung nicht mehr gewährleistet (Carmeliet und Jain, 2000). Da Tumoren aufgrund ihrer schnellen Proliferation meist über eine nicht ausreichende Gefäßversorgung verfügen, ist Hypoxie in Primärtumoren und deren Metastasen weit verbreitet. Weiterhin sind Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen unterschiedlichen genetischen und adaptiven Veränderungen ausgesetzt. Auf diese Weise werden beim Tumorwachstum unter Hypoxie Zellen mit einem malignen Phänotyp und einem aggressiveren Proliferationsverhalten selektiert (Harris et al., 2002; Vaupel und Mayer, 2007).

Verschiedene Studien zeigen, dass drei Mechanismen, unabhängig von Niveau und Dauer der Hypoxie, einen Einfluss auf die induzierte Tumorvermehrung haben: die Änderung der Proteinexpression und die Veränderung des mRNA-Profiles (Yuan et al., 2000; Semenza et al., 2003; Vaupel et al., 2004; Weinmann et al., 2005, Chi et al., 2006) sowie die klonale Selektion auf Genveränderungen (Gräber et al., 1996; Kim et al., 1997; Kondo et al., 2001; Bristow und Hill, 2008). Vaupel und Kollegen konnten hypoxische Bereiche in Tumoren direkt nachweisen. Der O₂-Gehalt der Tumorzellen wurde mittels Sauerstoff-Elektroden gemessen. Dabei wurde gezeigt, dass eine niedrige O₂-Spannung in Tumoren mit einer erhöhten Metastasierung und einer schlechteren Überlebensprognose für Patienten mit Kopf/Hals-, Cervix- und Mammakarzinomen assoziiert ist (Höckel et al., 1999; Höckel und Vaupel, 2001; Vaupel und Maier, 2007). Akakura und Mitarbeiter konnten für

Pankreaskarzinome zeigen, dass Hypoxie und eine damit verbundene Überexpression von HIF-1 α zu einem gesteigerten Tumorwachstum in-vivo führte (Akakura et al., 2001).

Tumorhypoxie dient als negativer klinischer prognostischer Indikator (Höckel et al., 1993; Knowles et al., 2001, Vaupel und Maier, 2007). Verschiedene Studien mit humanen Tumoren zeigten eine Verbindung zwischen Hypoxie und Metastasierungs-Potential (Brizel et al., 1996; Höckel et al., 1996). Aufgrund der unzureichenden Sauerstoffversorgung von Tumoren ist eine Behandlung mit Chemotherapeutika beziehungsweise Bestrahlung relativ schwierig und stark von der O₂-Verfügbarkeit abhängig (Höckel und Vaupel, 2001; Williams et al., 2004). Eine erhöhte Strahlendosis gegenüber der Behandlung normoxischer Tumoren ist erforderlich, um den gleichen Effekt zu erzielen. Sauerstoff-Radikale, welche nach Bestrahlung des Gewebes entstehen, führen zu einer Schädigung des Zellgenoms und daran anschließend zu einer Zerstörung der Tumorzelle. Diese Radikale entstehen in hypoxischen Tumoren aufgrund des niedrigeren Sauerstofflevels seltener, daher wird der Effekt der Radiotherapie abgeschwächt.

Gegenwärtig gibt es diverse Ansatzpunkte, hypoxische Tumoren sensitiver gegen eine Behandlung zu machen. Einer davon ist die Reduktion des hypoxischen Zustandes als Vorbereitung auf eine Radiotherapie durch Gabe von Erythropoetin. Damit soll der Hämoglobin-Wert über 12 g/l erhöht werden, eine Konzentration, die mit einem besseren Ansprechen auf die Therapie assoziiert ist (Littlewood 2001, Vaupel et al., 2002b). Darüber hinaus könnte Erythropoetin auch durch Reoxygenierung des Tumors eine verstärkte Proliferation der Tumorzellen begünstigen und somit zu einem verbesserten Ansprechen von Chemotherapeutika beitragen. Klinische Studien haben eindrucksvoll gezeigt, dass die Gabe von Erythropoetin das Therapieansprechen von Tumorpatienten verbessert (Littlewood et al., 2001). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Gabe von Medikamenten, die nur unter hypoxischen Bedingungen aktiviert werden. Ein Beispiel dafür ist Tirapazamin, das unter hypoxischen Bedingungen die DNA-Reparatur inhibiert und in Kombination mit einer Cisplatin-Therapie die Prognose von Lungenkrebspatienten deutlich verbessert (von Pawel et al., 2000). Auch die Inhibierung des HIF-Systems ist ein Ansatzpunkt zur Sensitivierung hypoxischer Tumoren. So führte die in-vivo Anwendung von HIF-1 α -siRNA zu einer Inhibierung des Tumorwachstums in einem Maus-Xenograft-Modell (Sun et al., 2001). Auch die Verwendung von kleinen Peptiden (z.B. p34srj („Serin-Glycin rich junction“)), die die Interaktion zwischen HIF-1 α und seinem transkriptionellen Co-Aktivatoren CBP/p300 blockieren, führten zu einer Reduktion des Tumorwachstums und der Angiogenese in Mamma- und Colonkarzinomen (Kung et al., 2000; Pugh et al., 2001). Auch die Gentherapie mittels

Vektoren, die pro-apoptische oder anti-proliferative Gene unter Kontrolle eines HRE-Elements tragen, stellt eine mögliche Therapieoption dar. Diese Vektoren können mittels anaerober Bakterien in hypoxische Tumorbereiche transportiert und dort aktiviert werden (Dachs et al., 1997; Lemmon et al., 1997). Die prinzipielle Anwendbarkeit solcher Systeme und ein therapeutischer Nutzen konnte im Mausmodell gezeigt werden (Dang et al., 2001). Die Alterationen der mRNA-Synthese in Folge von Hypoxie ist bereits in vielen Studien gut belegt. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit lagen aber noch keine Untersuchungen zum Effekt von Hypoxie auf die Expression von microRNAs vor.

1.3. microRNAs

1.3.1. Biologische Funktionen

microRNAs sind kleine, 18-25 bp lange, nichtkodierende RNAs endogenen Ursprungs. Die erste identifizierte microRNA war lin-4 in *Caenorhabditis elegans*. Sie kann über die Regulation der lin-14-mRNA Entwicklungsprozesse beeinflussen. Das lin-14-Protein wird am Ende des ersten Larvenstadiums herunterreguliert, was die Transition in das zweite Larvenstadium einleitet (Ruvkun et al., 1989; Lee et al., 1993). Da die lin-4-Expression zeitabhängig war, wurden sie zuerst als stRNAs (small temporal RNAs) bezeichnet. Eine weitere in *Caenorhabditis elegans* identifizierte stRNAs ist let-7 (lethal-7), die das lin-41 Gen (auf dieselbe Weise wie lin-4 die lin-14-mRNA) reguliert (Reinhardt et al., 2000). Diese microRNA ist, im Gegensatz zu lin-4, in vielen Organismen konserviert (Pasquinelli et al., 2000; Slack et al., 2000).

Versuche von verschiedenen Arbeitsgruppen, kleine ~22 nt RNAs zu klonieren, resultierte in der Identifikation von einigen hundert microRNAs in verschiedenen Organismen (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee et al., 2001). Derzeit sind 695 humane microRNAs bekannt (http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/mirna_summary.pl?org=hsa; miRBase 12.0; Stand: Sept 2008) und es wird darüber hinaus geschätzt, dass das menschliche Genom über 1000 microRNA-Gene enthält (Lewis et al., 2003). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass >30% der humanen mRNAs durch eine oder mehrere microRNAs reguliert werden kann (Lewis et al., 2005).

Im Gegensatz zu siRNAs sind microRNAs endogene RNAs, die mittels RNA-Polymerase II als lange primäre miRNA (pri-miRNA) Transkripte mit 5'-Cap-Struktur und polyA-Schwänzen synthetisiert werden (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Einige microRNAs sind in

Clustern angeordnet und werden als Polycistron transkribiert (Lee et al., 2002), während etwa 40% der microRNAs in den Introns von Proteinkodierenden Genen lokalisiert sind und nach dem Spleißen autonom prozessiert werden (Rodriguez et al., 2004). Pri-miRNA-Transkripte formen charakteristische fold-back-Strukturen, die von dem sogenannten Microprozessor-komplex erkannt werden und in einen etwa 70 bp großen, imperfekten „stem-loop microRNA precursor“ (pre-miRNA) geschnitten werden (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004). Der Mikroprozessorkomplex enthält unter anderem die RNase III Droscha und das DiGregory syndrome critical region gene 8 (DGCR8), auch als Pasha bezeichnet (Lee et al., 2003; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004).

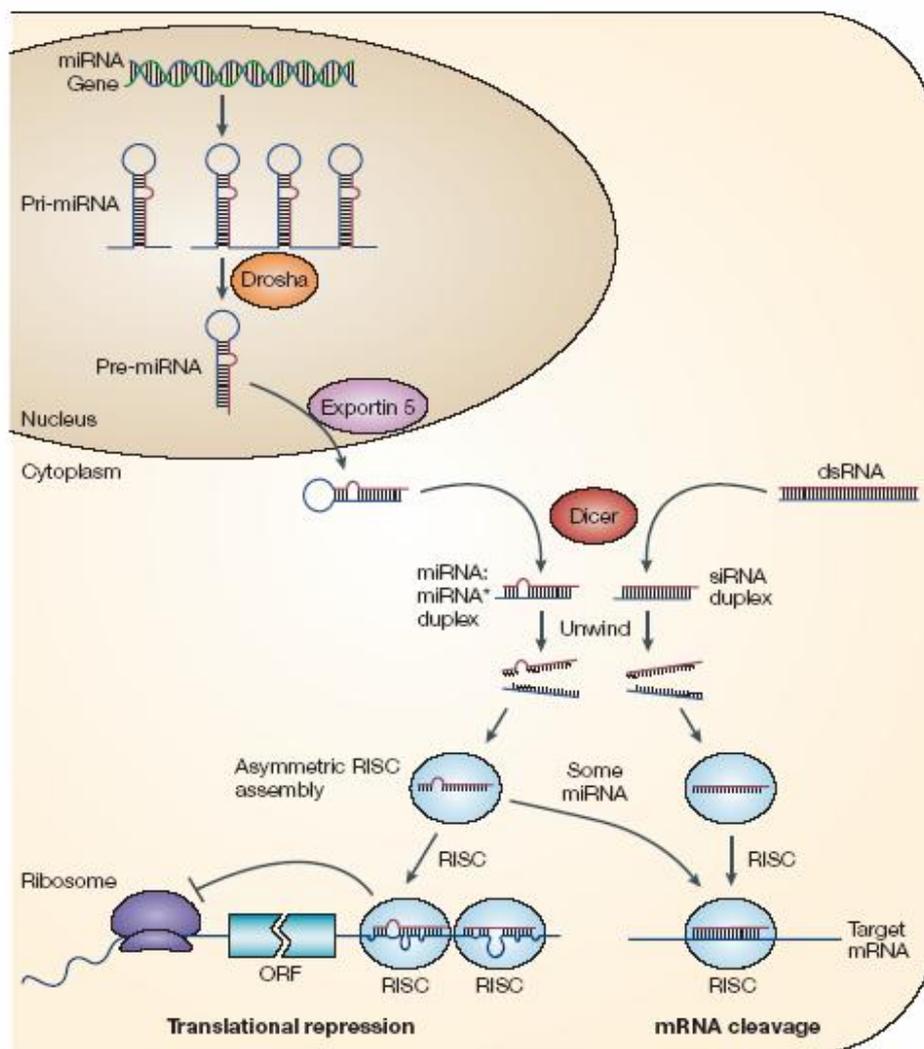


Abb. 1.3. Modell der siRNA und miRNA-Generierung und der unterschiedlichen Wirkmechanismen (He und Hannon, 2004).

Nach der Prozessierung durch den Microprozessorkomplex wird die pre-miRNA mittels des Ran-GTP-abhängigen Transporters Exportin-5 vom Nukleus ins Zytoplasma transportiert (Yi et al., 2003; Bohnsack et al., 2004). Dort wird die pre-miRNA mittels eines weiteren RNase III-Enzyms, Dicer, in imperfekte dsRNA-Duplices zerschnitten (Grishok et al., 2001; Hutvanger et al., 2001). Die thermodynamische Energie der 5'-Enden des miRNA-miRNA*-Duplex ist unterschiedlich und der Strang mit der geringeren Stabilität des 5'-Endes wird bevorzugt in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) inkorporiert, während der komplementäre miRNA*-Strang schnell degradiert wird (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003).

RISCs sind Ribonukleinkomplexe, die in verschiedenen, funktional unterschiedlichen, Subtypen existieren. Die Kernkomponente des RISC sind Proteine aus der Argonaute-Familie (Hammond et al., 2001; Martinez et al., 2002). So konnten im humanen miRNA-enthaltenden RISC das Argonaute-Protein Ago2 und die Helikasen Gemin3 und Gemin4 nachgewiesen werden (Mourelatos et al., 2002). Weitere Proteine, die mit dem RISC assoziieren, sind Tudor-SN („tudor staphylococcal nuclease“; Caudy et al., 2003) sowie das RNA-bindende VIG („vasa intronic gene“) und FXRP („fragile-X related protein“; Caudy et al., 2002; Jin et al., 2004). Die für die Translationsreprimierung maßgebliche Komponente des RISC ist dabei das Argonaute-Protein. Derzeit sind 8 humane Argonaute-Proteine bekannt, die sich in zwei Subfamilien aufspalten – die Ago-Proteine (hAGO1-4) und die Piwi-Proteine (Hiwi1-3 und Hili; Übersicht bei Carmell et al., 2002). Alle Argonaute-Proteine besitzen eine PAZ-Domäne, an der der 3'-OH-Überhang der miRNA gebunden wird und eine Piwi-Domäne, die mit den RNaseH Endonukleasen verwandt ist (Lingel und Sattler, 2005). Allerdings konnte bisher nur für hAGO2 eine endonukleolytische Funktion nachgewiesen werden (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). Bildet sich eine perfekte Komplementarität zwischen microRNA und mRNA aus, so wird die mRNA geschnitten. Dieser Weg der microRNA-induzierten mRNA-Stillegung ist in Pflanzen und einigen Metazoen favorisiert (Llave et al., 2002; Yekta et al., 2004; Allen et al., 2005). In Säugetieren ist hAGO2 für das siRNA-vermittelte „Slicing“ der mRNA verantwortlich (Liu et al., 2004; Song et al., 2004). Ein weiterer Weg des microRNA-induzierten mRNA-Silencing ist die translationelle Reprimierung. Dabei kommt es zu einer unvollständigen komplementären Bindung der microRNA an eine oder mehrere Sequenzen im 3'UTR, die dazu führen, dass die Bildung des ribosomalen Komplexes inhibiert wird (Bartel, 2004, Valencia-Sanchez, 2006).

Mehrere charakteristische Kennzeichen führen dazu, dass microRNAs ihre Funktion ausüben können. Die Nukleotide 2-7 am 5'-Ende einer microRNA werden als „seed“-Sequenz

bezeichnet. Sie sind für die Interaktion von microRNA und eine komplementären Sequenz in dem 3'-UTR einer mRNA maßgeblich, wenn auch nicht ausschließlich, verantwortlich (Krek et al., 2005). Darüber konnte gezeigt werden, dass eine Hexanukleotid-Sequenz in der microRNA miR-29b als Kernlokalisierungssignal fungiert (Hwang et al., 2007).

1.3.2. microRNAs in Tumoren

Kurz nachdem die erste Kohorte humaner microRNAs entdeckt wurde, stellte eine Studie fest, dass etwa 50% in der Nähe von genetischen Bruchpunkten lokalisiert sind (Calin et al., 2004). So wird eine Deletion des Chromosoms 13q14 häufig in chronischen lymphozytären Lymphomen und einigen soliden Tumoren beobachtet. Der wahrscheinlichste Kandidat für ein Tumorsuszeptibilitäts-Gen an diesem Locus ist das miRNA-cluster miR-15a-16 (Calin et al., 2002). miR-15a und miR-16 potenzieren die normale Apoptose durch Unterdrückung der Expression des anti-apoptischen Gens BCL-2 (Cimmino et al., 2005). Auf diese Art fungieren diese beiden microRNAs als Tumorsuppressorgene, und die Re-Expression von miR-15a-16 in Lymphoma-Zellen, die die 13q14-Deletion tragen, induziert in diesen wieder Apoptose (Cimmino et al., 2005). Ein weiteres Beispiel sind die miR-143 und miR-145, deren Expressionslevel im colorektalen Tumoren signifikant reduziert sind (Michael et al., 2003). Auch in Mamma-, Prostata-, Cervix- und Lymphomakarzinomzelllinien wurde die Expression dieser microRNAs stark reduziert gefunden (Iorio et al., 2005; Michael et al., 2003). Auch die Mitglieder der let-7 Familie, die 12 humane Homologe umfasst, wurden als Tumorsuppressorgene eingestuft, da sie an chromosomalen Bruchpunkten liegen, die direkt mit Lungen-, Mamma-, Urothel-, und Cervixkarzinomen assoziiert sind (Calin et al., 2004). Takamizawa und Mitarbeiter berichteten, dass Transkripte verschiedener let-7-Homologa in humanen Bronchialkarzinomen signifikant herunterreguliert sind, und dass dies mit einer verschlechterten Prognose einhergeht (Takamizawa et al., 2004). In-vitro-Versuche an einer humanen Lungenadenomkarzinom-Zelllinie zeigten, dass die transiente Transfektion von let-7 die zelluläre Proliferation inhibieren kann und let-7 somit als Tumorsuppressorgen im Lungengewebe fungiert (Takamizawa et al., 2004). Johnson und Mitarbeiter konnten als ein molekulares Target der let-7-miRNA die Ras-mRNA identifizieren (Johnson et al., 2005). Eine Überexpression von let-7 in humanen Karzinomzelllinien resultierte in einem verminderten Ras-Proteinlevel im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Umgekehrt führt die Depletion von let-7 in humanen Karzinomzelllinien zu einer erhöhten Expression von Ras-

Protein (Johnson et al., 2005). Weitere microRNAs mit tumorsupprimierender Wirkung sind die Mitglieder der miR-34-Familie. Es handelt sich bei ihnen um eine Klasse von microRNAs, die unter anderem durch p53 in ihrer Expression aktiviert werden (Bommer et al., 2007; Chang et al., 2007; He et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007; Tarasov et al., 2007). He und Kollegen konnten zeigen, dass p53 die miR-34-Familie direkt reguliert, und dass miR-34 durch die Regulation verschiedener Zellzyklusregulatoren wie Cyclin-E2 (CCNE2), Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) und dem Hepatozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor (c-Met) einen Wachstumsstopp in verschiedenen Zelllinien induzieren kann (He et al., 2007). Weiterhin resultiert die Expression von miR-34a in einem verstärkten Caspase-induzierten Zelltod (Welch et al., 2007) und trägt auch zu einem Anstieg der p53-vermittelten Apoptose bei (Chang et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007).

Auf der anderen Seite gibt es auch microRNA-Loci auf stark amplifizierten chromosomalen Bereichen in Tumoren. So konnte im Falle des Chromosom 13q31, das besonders in folliculären Lymphomen, B-Zell-Lymphomen und verschiedenen Lungen- und Kopf/Hals-Tumoren amplifiziert vorliegt, ein solcher Locus (C13orf25) identifiziert werden (Ota et al., 2004). Innerhalb des nicht-kodierenden Transkriptes befinden sich die Precusoren der microRNAs miR-17, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b und miR-92. Die erhöhte Expression dieser microRNAs, als miR-17-92-Cluster oder Oncomir1 bekannt, wurde in verschiedenen primären Lymphomen und einer Reihe von Tumorzelllinien verifiziert (Tagawa et al., 2005; He et al., 2005). Ein direkter Hinweis des Zusammenhangs dieser microRNA mit der Tumorgenese wurde in einem Maus-Modell für das Burkitt-Lymphom gegeben (He et al., 2005). Hier führte eine Überexpression dieses Clusters zusammen mit einer aktivierten c-myc-Expression zu einem beschleunigten Tumorentstehung und einer verminderten Apoptose-Induktion (He et al., 2005). Auch in Lungenkarzinomen konnte eine Überexpression des miR-17-92-clusters mit einer erhöhten Wachstumsrate des Tumors assoziiert werden (Hayashita et al., 2005). Zwei Gruppen konnten zeigen, dass der Promoter des miR-17-92-clusters hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor E2F3 aktiviert wird und damit das Target der miR-17, der Transkriptionsfaktor E2F1, inhibiert wird (Woods et al., 2007; Sylvestre et al., 2007). Woods und Kollegen schlugen weiterhin ein Modell vor, in dem durch die Überexpression des miR-17-92-clusters die Zellproliferation aufgrund der Verschiebung der Balance zwischen dem proliferationsfördernden E2F3 und dem pro-apoptotischen E2F1 gefördert wird (Woods et al., 2007). Eine weitere Studie zeigte eine um das 5-100fach verstärkte Expression der miR-21 in Glioblastomen im Vergleich zu normalen Gehirngewebe (Chan et al., 2005). Antisense-Versuche gegen die miR-21 in

Glioblastomzelllinien zeigten, dass diese microRNA das Zellwachstum durch Inhibierung der Apoptose kontrolliert, aber nicht die Zellproliferation beeinflusst (Si et al., 2006). miR-21 ist nicht Gehirn-spezifisch, sondern konnte auch in Mammakarzinomen erhöht exprimiert gefunden werden (Iorio et al., 2005). Dies spricht dafür, dass diese microRNA eine generelle Funktion bei der Tumorprogression ausübt. Auch die miR-155 ist in Mammakarzinomen, in Burkitt- sowie in B-Zell-Lymphomen als verstärkt exprimiert beschrieben (Iorio et al., 2005; Metzler et al., 2004; Eis et al., 2005). miR-155/BIC liegt weiterhin in Verbindung mit dem Onkogen *myc* in einem „chicken lymphoma“-Modell hochexprimiert vor (Tam et al., 1997). miR-155 fungiert möglicherweise in Verbindung mit *myc* ebenfalls als Onkogen, während es normalerweise eine Rolle während der B-Zell-Selektion spielt, indem es zum *myc*-pathway antagonistische Gene inaktiviert (Kluiver et al., 2005). Seine Rolle als Onkogen kann es etwa über die Regulation des Tumor protein 53-induced nuclear Proteins (TP53INP1) ausüben, einem durch Stress induzierten p53 Zielprotein, das die Caspase-3-abhängige Apoptose induziert. Gironella und Kollegen zeigten im duktalem Adenokarzinom des Pankreas, dass die TP53INP1-Expression dramatisch reduziert war, und dass durch Inhibierung der miR-155 die TP53INP1-Expression wiederhergestellt werden konnte (Gironella et al., 2007). Die homologen microRNAs miR-372 und miR-373 fungieren in testikulären Keimzelltumoren als Onkogene, und sie vermitteln diese Wirkung über die Neutralisierung der p53-vermittelten CDK-Inhibierung durch Reprimierung der Large tumor suppressor homolog 2 (LATS2)-Expression (Voorhoeve et al., 2006).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Veränderungen in den Expressionsprofilen von microRNAs unter Hypoxie in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und der Mammaepithelzelllinie MCF-10 analysiert werden. Zu diesem Zweck wird die Expression von 156 humanen microRNAs und drei Kontroll-microRNAs mittels quantitativer real-time-PCR in je einer hypoxischen und einer normoxischen Probe der beiden Zelllinien bestimmt. Aussichtsreiche Kandidaten sollen dann in den hypoxischen und normoxischen Proben eines biologischen Triplikats vermessen werden. microRNAs, die unter Hypoxie 5fach stärker oder schwächer exprimiert sind, werden selektiert und weiter untersucht.

Im zweiten Schritt erfolgt die Charakterisierung der unter Hypoxie regulierten microRNAs in ihrem Einfluss auf das zelluläre Überleben. Dabei sollen verstärkt exprimierte microRNAs mittels microRNA-Inhibitoren, sogenannten Antagomirs, inhibiert und schwächer exprimierte microRNAs mittels Expressionsvektoren oder sequenzgleichen Oligonukleotiden überexprimiert werden. Die Effekte dieser alterierten Expression auf das zelluläre Überleben der MCF-7-Zelllinie wird mittels Koloniebildungstests analysiert. Weiterhin soll die alterierte Expression von aussichtsreichen Kandidaten in der MCF-7-Zelllinie mit anderen Antagomirs und gängigen Chemotherapeutika kombiniert werden, um diese Kombinationen auf verstärkte Effekte auf das zelluläre Überleben zu untersuchen.

Im dritten Teil dieser Arbeit ist geplant, in in-silico Untersuchungen Proteintargets der auffälligen microRNAs zu identifizieren. Diese sollen weiterhin mittels quantitativer real-time-PCR und in Luciferase- bzw. in Western-Blot-Assays verifiziert werden.

Im vierten Abschnitt soll untersucht werden, ob die Expression ausgewählter microRNAs mit der Prognose von Tumorpatienten korreliert ist. Hierfür wird die Expression in Tumoren von zwei Patientenkollektiven, d.h. in Weichteilsarkomen und Pankreaskarzinomen untersucht und statistisch zusammen mit klinischen Faktoren ausgewertet.

2. Material

2.1. Patientengut und Zelllinien

Es wurde Tumormaterial von 78 Weichteilsarkompatienten und 55 PDAC-Patienten untersucht. Eine Übersicht der Tumorkollektive findet sich im Anhang (Tab. 8.2 und 8.3.).

Die Weichteilsarkomproben wurden im Zeitraum von 1998-2001 an der Chirurgischen Klinik 1 der Universität Leipzig operiert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Begutachtung erfolgte durch Prof. Dr. Holzhausen am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nach der WHO-Klassifikation von 1993 (Weiss und Goldblum, 2007). Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Untersuchung ihrer Tumorproben bzw. Verwendung ihrer klinischen Daten.

Die PDAC-Proben sowie die zugehörigen klinischen Daten wurden im Zeitraum von 2003-2007 im Universitätsklinikum Ulm generiert. Sie wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und unter der Leitung von Prof. Dr. Möller begutachtet. Die einzelnen PDAC-Tumoren wurden mittels Mikrodissektion aus dem umliegenden Gewebe extrahiert. Aus den isolierten Gewebestücken wurde in der Firma AJ Innuscreen GmbH (Berlin) mittels des Innuprep RNA Mini-Kits RNA und DNA isoliert. Alle Patienten gaben ebenfalls ihr schriftliches Einverständnis.

Die verwendeten Zelllinien wurden in der Abteilung Zell- und Gewebezüchtung des Instituts für Pathologie nach Standardprotokollen kultiviert.

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Referenzen	ATCC-Nummer
MCF-7	Mammakarzinom	Soule et al., 1973	HTB-22
MCF-10	Mammaepithel	Tait et al., 1990	CRL-10317
HEK 293	Humane embryonale Niere („human embryonal kidney“)	Simmons, 1990	CRL-1573
OAW-42	Ovarialkarzinom	Wilson et al., 1984	-----
SKOV-3	Ovarialkarzinom	Fogh et al., 1977	HTB-77
ES-2	Ovarialkarzinom	Lau et al., 1991	CRL-1978
U251	Glioblastom	Ponten et al., 1968	-----
U343	Glioblastom	Ponten et al., 1968	-----

2.2. Vektoren, Primer und Oligonukleotide

Die verwendeten Vektoren waren folgende:

Verwendungszweck	Vektor	Firma	Antibiotikaresistenz
microRNA-Expression	pcDNA6.2	Invitrogen, Karlsruhe	Spectinomycin
Luciferase-Assay	psiCheck2-Vektor	Promega, Heidelberg	Ampicillin

Primer:

Die verwendeten Primer wurden mittels des Programms CloneManager designt und von TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert.

EFNA3 se: 5'-CAG GCA GGC ATG TAC AGA CT-3'

EFNA3 as: 5'-GTG TCT GTG CGT TGC ATA GG-3'

EphA3 se: 5'-ATG TTT CCA GAC ACG GTA CC-3'

EphA3 as: 5'-CCA TCT TCC TGA GTA GAA CTG TGA GG-3'

HPRT se: 5'-TTG CTG ACC TGC TGG ATT AC-3'

HPRT as: 5'-CTT GCG ACC TTG ACC ATC TT-3'

pcDNA6.2 se: 5'-GGC ATG GAC GAG CTG TAC AA-3'

psiCheck2 se: 5'-GAG CGC GTG CTG AAG AAC GA-3'

XhoI-EFNA3-se: 5'-GGT GGC GCA CTC GAG CCG CAG GCA GGC ATG TAC AGA CT-3'

XhoI-EFNA3-as: 5'-GGT GGC GCA CTC GAG CCG GTG TCT GTG CGT TGC ATA GG-3'

Oligonukleotide:

Die für die Insertion in den microRNA-Expressionsvektor verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe synthetisiert. Die microRNA-sequenzgleichen Oligonukleotiden wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

In den microRNA-Expressionsvektor pcDNA6.2 klonierte Oligonukleotide:

181a: 5'-TGC TGA ACA TTC AAC GCT GTC GGT GAG TGT TTT GGC CAC TGA CTG ACA CTC ACC GAG CGT TGA ATG TT-3'

200a: 5'-TGC TGT AAC ACT GTC TGG TAA CGA TGT GTT TTG GCC ACT GAC TGA CAC ATC GTT CAG ACA GTG TTA-3'

324-5p: 5'-TGC TGC GCA TCC CCT AGG GCA TTG GTG TGT TTT GGC CAC TGA CTG ACA CAC CAA TCC TAG GGG ATG CG-3'

325: 5'-TGC TGC CTA GTA GGT GTC CAG TAA GTG TGT TTT GGC CAC TGA CTG ACA CAC TTA CTG GAC ACC TAC TAG G-3'

microRNA-sequenzgleiche Oligonukleotide (sense-Sequenz):

hsa-miR-181a: 5'-AAC ATT CAA CGC TGT CGG TGA-3'

hsa-miR-200a: 5'-TAA CAC TGT CTG GTA ACG AT-3'

hsa-miR-210: 5'-CTG TGC GTG TGA CAG CGG CTG A-3'

hsa-miR-324-5p: 5'-CGC ATC CCC TAG GGC ATT GGT-3'

hsa-miR-325: 5'-CCT AGT AGG TGT CCA GTA AGT-3'

Kontroll-siRNA: 5'-CGU ACG CGG AAU ACU UCG A-3'

(Luziferase)

2.3. Antikörper

Antigen	Ursprungsorganismus	Klon	Firma
<i>Primärantikörper</i>			
BDNF	Kaninchen; polyklonal	-----	Abcam (Cambridge, UK)
EFNA3	Maus; monoklonal	80814.11	R&D Systems (Wiesbaden)
EphA3	Kaninchen; monoklonal	EP725Y	Abcam (Cambridge, UK)
RASSF1A	Maus; monoklonal	3F3	Abcam (Cambridge, UK)
β-Aktin	Maus; monoklonal	AC-15	Sigma (Steinheim)
<i>Sekundärantikörper</i>			
Anti-Maus-IgG	Kaninchen; polyklonal	-----	Dako (Hamburg)
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege; polyklonal	-----	Dako (Hamburg)
Anti-Maus Cy3	Ziege; polyklonal	-----	Dianova (Hamburg)

2.4. Kits und TaqMan-microRNA-Assays

cDNA archive kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
DNase, RNase-free (1500 Kunitz-Units)	Qiagen (Hilden)
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega (Mannheim)
ECL Western-Blotting Reagenz	GE Healthcare (München)
Effectene	Qiagen (Hilden)
Endotoxin Removal Kit	MoBio Laboratories (Carlsbad, CA, USA)
HotStartTaq DNA Polymerase	Qiagen (Hilden)
Interferin	Polyplus Transfection (New York, NY, USA)
OneShot TOP10-Zellen (E.coli)	Invitrogen (Karlsruhe)
Protein-Assay-Kit (Bradford-Reagenz)	Biorad (München)
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Plasmid Isolationskit	Qiagen (Hilden)
QuantiTect SyBrGreen PCR Kit	Qiagen (Hilden)
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)

TaqMan microRNA Expression Kits:

TaqMan microRNA early access panel
(enthält stem-loop- und TaqMan-Primer
für 156 microRNAs)

Applied Biosystems (Darmstadt)

microRNA	Part number	Vermessene Tumorart
Hsa-miR-155	4373124	PDAC
Hsa-miR-203	4373095	PDAC
Hsa-miR-210	4373089	PDAC; WTS
Hsa-miR-216	4373083	PDAC
Hsa-miR-217	4373082	PDAC
Hsa-miR-222	4373076	PDAC
Hsa-miR-325	4373051	WTS
U18-snoRNA	4380904	Referenzgen MCF-7, MCF-10, WTS
EphA3	Hs00983672_m1	WTS

Antagomirs:

Name	Part number	Firma
anti-hsa-miR-137	AM10513	Ambion, Darmstadt
anti-hsa-miR-210	AM10516	Ambion, Darmstadt
Negativ-Inhibitor	AM17010	Ambion, Darmstadt

2.5. Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Fluka (Neu-Ulm)
Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Bis-Tris-Gel (2%-12%)	Invitrogen (Karlsruhe)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Invitrogen (Karlsruhe)

Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Bsa I	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Bsmb I	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Cis-Platin	Hexal (Holzkirchen)
DAPI	Serva (Heidelberg)
Deoxycholat	Merck (Darmstadt)
DEPC-H ₂ O	Invitrogen (Karlsruhe)
Desoxynukleotidtriphosphate (100mM)	Promega (Heidelberg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
DNase, RNase-free	Qiagen (Hilden)
DNA-Standard (100 bp-Leiter)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM;4,5g/l L-Glukose und L-Glutamin)	Lonza (Basel, Schweiz)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol (96%)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Ficoll 400	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Fötales Kälberserum	Lonza (Basel, Schweiz)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Giemsa-Lösung	Sigma (St. Louis, USA)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Serva (Heidelberg)
LB-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
LDS-Probenpuffer (4x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Magermilchpulver Glücksklee	Nestle (Schweiz)
Mammary epithelial basal medium (MEBM) (mit Zusatz von BPE, Hydrocortison, hEGF, Insulin und Gentamycin)	Lonza (Basel, Schweiz)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
MES-Puffer (20x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Methanol (100% p.a.)	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Serva (Heidelberg)

Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Serva (Heidelberg)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat-(II)hydrat	Serva (Heidelberg)
Natriumpyruvat	BioWhittaker (Heidelberg)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Proben-reduzierendes Agenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Prolong Gold antifading Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma (Steinheim)
Proteinstandard SeeBlue Plus 2	Invitrogen (Karlsruhe)
Random Primer	Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640 (mit 25 mM HEPES und L-Glutamin)	Lonza (Basel, Schweiz)
Spectinomycin	Sigma (Steinheim)
Taxol (Paclitaxel)	Calbiochem (Darmstadt)
T4-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Transferpuffer (20x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
TRIZOL-Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin	Serva (Heidelberg)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
Xho I	Fermentas (St. Leon-Rot)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)

2.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien

10/50 ml Röhrchen	Greiner (Nürtingen)
Bechergläser	Merck (Darmstadt)
Biocenter 2001 (Brutschrank)	Biometra (Göttingen)
BioDocAnalyze (Gelauswertung)	Biometra (Göttingen)
Einweg-Handschuhe	Merck (Darmstadt)
Elektrophorese-Gerät	BioPlex (Freiburg)
Fluoreszenzmikroskop TE2000	Nikon (Düsseldorf)

Hypoxie-Brutschrank CB150	Binder (Tuttlingen)
Kryoröhrchen	Nalgene (Hereford, UK)
Laminarbox	Flow Laboratories (Meckenheim)
Magnetrührer	IKA-Labortechnik (Staufen)
Magnetrührstäbchen	Merck (Darmstadt)
Messzylinder	Merck (Darmstadt)
Mettler AM 100 (Analysewaage)	Mettler (Giessen)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg)
Mini Trans-Blot Cell	Biorad (München)
Novex XCell II Minicell	Invitrogen (Karlsruhe)
Parafilm	Merck (Darmstadt)
pH-Meter CG 840	Schott (Hofsheim)
Peltier ThermalCycler PT200	MJ Research (Hessisch Oldendorf)
„Pipetboy“ (automatische Pipette)	Bioscience (Fernwald)
Pipetten	Nunc (Wiesbaden-Biebrich)
Plattenreader GENios	Tecan (Gröding, Österreich)
PVDF-Membran	Millipore (Schwalbach)
Reaktionsgefäße (0,2/0,5/1,5/2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Rollmischer RM5	Schütt Labortechnik (Göttingen)
Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor	Amersham (Freiburg)
Rotorgene 3000 (real-timer-Cycler)	LTF (Wasserburg)
Starfrost-Objektträger	Medite Medizintechnik (Burgdorf)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Trio-Thermoblock TB1	Biometra (Göttingen)
Ultraspec III (UV/VIS Spektrophotometer)	Pharmacia (Freiburg)
Universal-30 RF (Zentrifuge)	Hettich (Tuttlingen)
Vortex-Schüttler VF2	IKA-Labortechnik (Staufen)
Wasserbad	Julaba Labortechnik (Seelbach)
Zellkultur-Plastikartikel (25 ml-Gewebekulturflaschen, Pipettenspitzen, 6-,24-,96-well-Platten, Einmalpipetten; Zentrifugenröhrchen)	Greiner (Nürtingen)
Zellzählgerät Z2	Coulter-Beckman (Krefeld)

2.7. Puffer und Lösungen

Zellkultur:

PBS (pH 7,5): 0,4 g KCl
 8,0 g NaCl
 0,3 g NaHCO₃
 1,0 g Glucose
 0,2 g EDTA
 in 1 l Aqua bidest. lösen
 sterilfiltrieren, autoklavieren und bei 4°C aufbewahren

Zellkulturmedien: 500 ml RPMI-1640 mit HEPES und L-Gln
 80 ml fötales Kälberserum
 10 ml Antibiotika (Streptomycin und Penicillin)
 5 ml Natrium-Pyruvat
 bei 4°C aufbewahren

500 ml MEM
1 x MEGM SingleQuots
(enthält: 2 ml BPE
 0,5 ml hEGF
 0,5 ml Insulin
 0,5 ml Hydrocortison
 0,5 ml GA-1000)

500 ml DMEM
50 ml fötales Kälberserum

Trypsin-Lösung: 0,5 g Trypsin
 0,2 g EDTA
 in 1 l PBS lösen
 aufbewahren bei 4°C

Proteinisolation:

RIPA-Lysepuffer: 50 mM (pH 7,4) Tris-HCl
200 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1% TritonX-100
0,25% Deoxycholat

Agarosegel-Elektrophorese:*5x TBE-Puffer:*

54 g Tris
27,5 g Borsäure
20 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0)
ad 1 l Aqua Bidest. lösen

DNA-Auftragspuffer:

1,8 g Ficoll 400
25 mg Bromphenolblau
25 mg Xylencyanol
in 10 ml Aqua bidest. lösen

Klonierung:*LB-Medium:*

20 g in 1 l Aqua bidest. lösen und autoklavieren

LB-Agar für Bakterienkulturen:

32 g in 1 l Aqua bidest. lösen und autoklavieren
Zusatz von Ampicillin (50 µg/ml)

Western-Blot:*TBS:*

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
150 mM NaCl
ad 1 l Aqua Bidest. lösen

TBS-T:

0,02 % Tween 20 in 1x TBS

MES-Laufpuffer:

50 ml MES SDS Running Buffer (20x)
950 ml Aqua bidest.

Transferpuffer:

50 ml Transferpuffer (20x)
100 ml Methanol
850 ml Aqua bidest.
bei 4°C lagern

3. Methoden**3.1. Zellzüchtung**

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte durch Einfrieren der Zellen nach der Trypsinierung. Dazu wurden die Zellen in 1,8 ml Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 20% DMSO) aufgenommen und in ein Gefrierrohrchen überführt. Die Lagerung erfolgte dann 24 h bei -20°C, 24 h bei -80°C und dann bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff.

Die Zellen wurden vor Kultivierung rasch bei 37°C aufgetaut und in 20 ml RPMI (bei Ovarialkarzinomzelllinien und HEK 293: DMEM; bei MCF-10: MEBM) überführt. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (1000 U/min, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet ist in Zellkulturmedium resuspendiert worden. Zentrifugations- und Resuspensionschritt wurden mehrmals wiederholt, um das DMSO möglichst zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in 3 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Die Anzucht der Karzinomzelllinien erfolgte bei 37°C bei 3% (v/v) CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit in RPMI. Ausnahme waren die Ovarialkarzinomzelllinien (OAW-42, SKOV-3 und ES-2) und die HEK 293, die bei 5% (v/v) CO₂ in DMEM kultiviert wurden. Die Passagierung erfolgte im Verhältnis 1:2. Aus konfluenten Flaschen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Mittels 3 ml Trypsin wurden die Zellen von der Flasche gelöst und in Zellkulturmedium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 U/min; 5 min) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 6 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Danach wurden je 3 ml der Zellsuspension in eine Flasche überführt.

Hypoxie wurde mittels Inkubation der Zellen in einem speziellen Brutschrank (CB150, Binder, Tuttlingen) appliziert. Die Zellen wurden in der Regel unter den oben genannten Bedingungen für 24 h unter 1% (v/v) O₂ kultiviert.

3.2. Transfektionsversuche

Zur Detektion der Effekte der untersuchten microRNAs wurden entweder Oligonukleotide (miRNA-sequenzgleiche Oligonukleotide oder Antagomirs) oder Expressionsvektoren in die Zellen des zu untersuchenden Systems transfiziert. Die Transfektion erforderte zwei verschiedene Protokolle, die im Folgenden aufgeführt sind:

3.2.1. Lipotransfektion von Antagomirs/Oligonukleotiden

Die Transfektion von kurzen Nukleotidstücken erfolgte mittels des Transfektionskit Interferin (Polyplus Transfection, New York, NY, USA). Die Nukleotide wurden jeweils in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Für die Transfektion einer 3ml-Zellkulturflasche (25 cm²) wurde folgender Ansatz gemischt:

10,0 µl Oligonukleotid- oder Antagomir-Verdünnung (100 nM)
7,5 µl Transfektionsreagenz
102,5 µl EC-Puffer
120,0 µl Gesamtansatz

Der Ansatz wurde gevortext und 20 min inkubiert. Währenddessen konnte das Medium der Zellen erneuert und nach Inkubation des Transfektionsgemisches dieses auf die Zellen gegeben werden. Die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz dauerte in der Regel 24 h.

3.2.2. Transfektion von Expressionsvektoren/Luciferasevektoren

Zur Transfektion von Vektoren wurde der Transfektionskit Effectene (Qiagen, Hilden) gewählt. Es wurde je 1 µg des Vektors transfiziert. Für die Transfektion eines Wells einer 96-well-Platte wurde folgender Ansatz gemischt:

x µl Vektorlösung (1 µg)
2,0 µl DNA-Enhancer
2,5 µl Effectene-Transfektionsreagenz
ad 25,0 µl mit EC-Puffer

Der Ansatz wurde gevortext und 15 min inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Zellen erneuert und nach Inkubation des Transfektionsgemisches dieses auf die Zellen gegeben. Die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz dauerte in der Regel 24 h.

3.3. Zellkoloniebildungstest

Zur Detektion der Effekte einer Behandlung auf das klonogene Zellüberleben wurde ein Zellkoloniebildungstest appliziert. Dabei wurden Zellen 24 h nach der Behandlung mit Hypoxie/Oligonukleotiden/Antagomirs abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde in Zellkulturmedium stark verdünnt und definierte Zellzahlen (bei MCF-7 in der Regel 200 und 400 Zellen) in mehrere Zellkulturflaschen mit gasundurchlässigen Deckeln eingestreut. Die restlichen Zellen wurden pelletiert und zur RNA- oder Protein-Isolation verwendet. Die Zellen wurden 5 Tage unter diesen Bedingungen kultiviert, anschließend wurde das Zellkultur-Medium ausgetauscht und die Zellen weitere 5 Tage wachsen gelassen. Innerhalb dieser Zeit wuchsen die stark vereinzelt Zellen zu Zellkolonien aus. Diese wurden nach der Fixierung mit 3%igem Formaldehyd (20 min) und der Anfärbung mit 15%igem Giemsa (10 min) gewaschen und 1 d getrocknet. Danach wurde die Zahl der Zellkolonien je Flasche bestimmt. Bezogen auf die Zahl der ursprünglich eingestreuten

Zellzahl ergibt sie die absolute Platiereffizienz. Werden innerhalb einer Behandlungsserie die ermittelten absoluten Platiereffizienzen verschiedener Behandlungsarten auf die absolute Platiereffizienz der unbehandelten Kontrolle bezogen, ergibt sich daraus die relative Platiereffizienz.

3.4. mRNA- und microRNA-Expressionsanalysen

Die Analyse der microRNA und mRNA-Expression erfordert die sorgfältige Aufreinigung der zu untersuchenden RNA und eine spezifische Umschreibung in cDNA. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden erläutert.

3.4.1. RNA-Isolation und -messung

Die Isolation der mRNA bzw. microRNA erfolgte mittels Trizol-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Dazu wurden die Zellproben abtrypsiniert, pelletiert und in 1 ml Trizol-Reagenz aufgenommen. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugefügt und manuell gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 4°C mit 12 000 U/min zentrifugiert und anschließend die wässrige Phase in ein neues Tube transferiert. Zu der wässrigen Phase wurde 70 µl einer DNase-Lösung zugesetzt und das Gemisch 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 500 µl Isopropanol zugesetzt und ausgiebig gevortext. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 10 min bei 4°C mit 12 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem 96%igem Ethanol gewaschen werden. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet noch einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Zentrifugation an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet wurde dann in 40 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert und die Lösung nach der Messung bei -80°C gelagert.

Die RNA-Messung erfolgte photometrisch an einer 1:25-Verdünnung, wobei eine OD von 1 einer RNA-Konzentration von 40 ng/ul zugrunde gelegt war.

3.4.2.1. cDNA-Synthese zur mRNA-Expressionsanalyse

Die cDNA-Synthese der mRNA erfolgte mittels des SuperScript Reverse Transkriptase Kits (Invitrogen, Karlsruhe). Es wurden je 1 µg RNA zur Synthese eingesetzt. Der Pre-Annealing-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

x µl RNA (1 µg)
1 µl random Primer (150 ng/µl)
ad 11 µl mit Aqua dest.

Der Mix wurde bei 70°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde zugefügt:

2 µl 10x Puffer
1 µl DTT
1 µl dNTPs (100 mM)
1 µl SuperScript Reverse Transkriptase
9 µl Enzym-Ansatz

Für die Synthese wurde das folgende Programm gewählt:

1. 20°C 10 min
2. 42°C 80 min
3. 85°C 5 min

Nach der Synthese wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

3.4.2.2. cDNA-Synthese zur microRNA-Expressionsanalyse

Zur Synthese von cDNA aus microRNAs wurden stem-loop-Primer verwendet, die nur eine spezifische microRNA amplifizierten. Die Primer für die analysierten 156 microRNAs wurden dem TaqMan microRNA early access panel (Applied Biosystems, Darmstadt) entnommen. Zur cDNA-Synthese wurde eine 2 ng/µl-Verdünnung der RNA hergestellt und insgesamt 10 ng für die Reaktion eingesetzt. Der Ansatz bestand aus Komponenten des cDNA archive kits (Applied Biosystems, Darmstadt):

0,17 µl dNTPs (100 mM)
1,10 µl MLV-Reverse Transkriptase
1,65 µl 10x Puffer

0,21 µl RNase-Inhibitor
4,57 µl Nuclease-freies H₂O
5,36 µl RNA-Verdünnung (2 ng/µl)
15,00 µl Gesamt-Ansatz

Für die cDNA-Synthese wurde das folgende Programm gewählt:

1. 16°C 30 min
2. 42°C 30 min
3. 85°C 5 min
4. 4°C

Die synthetisierte miR-cDNA wurde bei -20°C gelagert und mittels quantitativer real-time-PCR vermessen.

3.4.3. quantitative real-time-PCR

Für die quantitative real-time-PCR wurden je nach Fragestellung zwei verschiedene Anwendungen gewählt. Die Quantifizierung der microRNA-Expression oder der EphA3-Expression wurde mittels TaqMan-Primer durchgeführt (Applied Biosystems, Darmstadt). Hierbei wurde folgender Reaktionsansatz aus den Komponenten des HotStart-Taq-Kits (Qiagen, Hildesheim) erstellt:

10,2 µl H₂O
1,5 µl 10x Puffer
0,8 µl MgCl₂ (25 mM)
0,5 µl dNTPs (100 mM)
0,8 µl TaqMan-Primer
0,2 µl HotStart-Taq-Polymerase
1,0 µl cDNA
15,0 µl Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde mittels folgenden Programms im Real-time-PCR-Gerät Rotorgene 3000 (LTF, Wasserburg) vermessen:

1. 95°C	15 min
2. 95°C	30 sek
3. 60°C	60 sek

Zur Analyse der mRNA-Expression von EFNA3 und des Referenzgens HPRT wurde folgender real-time-PCR-Ansatz mit den Komponenten des Quantitect-Kits (Qiagen, Hildesheim) erstellt:

7,5 µl Quantitect
5,5 µl H ₂ O
1,0 µl Primer (vorwärts und rückwärts)
<u>1,0 µl cDNA</u>
15 µl Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde mittels folgenden Programms im Real-time-PCR-Gerät Rotorgene 3000 (LTF, Wasserburg) vermessen:

1. 95°C	15 min
2. 95°C	20 sek
3. 60°C	30 sek
4. 72°C	30sek
5. Melt	

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen (Livak und Schmittgen, 2001). Es handelt sich dabei um eine relative Quantifizierung mittels des Vergleichs der C_T -Werte (threshold cycle; Anzahl der Zyklen, bei der die Produktmenge einen definierten Schwellenwert erreicht) des zu untersuchenden Gens mit den C_T -Werten eines Referenzgens. Dabei wird eine 100%ige PCR-Effizienz vorausgesetzt. Die $\Delta\Delta C_T$ -Werte errechneten sich mittels folgender Formel:

$$\Delta\Delta C_T = 2^{-(C_T(\text{Gen}) - C_T(\text{Referenz})) - (C_T(\text{Kalibrator}) - C_T(\text{Referenz}))}$$

Für die microRNA-Expressionsmessungen unter Hypoxie und Normoxie sowie in den Weichteilsarkomen diente die Expression der U18-snoRNA als Referenz, in den

Pankreaskarzinomen die Expression der 18S rRNA (Messungen der 18S rRNA wurden durchgeführt von der Firma Roboscreen, Leipzig). Der Kalibrator entspricht der Referenzprobe mit dem niedrigsten C_T -Wert.

3.5. Protein-Expressionsanalyse

3.5.1. Protein-Isolation und –messung

Die Protein-Isolation erfolgte mittels RIPA-Puffer (Zusammensetzung s. 2.5 Puffer und Lösungen). Ein Zellpellet wurde in 200 μ l RIPA-Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 4°C mit 12 000 U/min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Vermessung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Reagenz. Dazu wurde 1 ml einer 1:5-Verdünnung desselben hergestellt und 5 μ l der zu vermessenden Proteinlösung zugesetzt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über eine zuvor aufgenommene Standardkurve.

3.5.2. Western-Blot-Analyse

Mittels Western-Blot sollten Veränderungen im Gehalt eines Proteins visualisiert werden. Es wurden 30 μ g der zu analysierenden Protein-Probe mit Ladepuffer und reduzierendem Reagenz gemischt und 5 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf ein denaturierendes Bis-Tris-Gel (2%-12%; Invitrogen, Karlsruhe) geladen. Die Auftrennung der Probe erfolgte in einem elektrischen Feld von 200 V für 1,5 h. Die aufgetrennten Proteine sind in einem Tank-Blot bei einer Stromstärke von 300 mA auf eine PVDF-Membran überführt worden. Die Membran wurde 1 h in einer Suspension von Magermilchpulver blockiert und anschließend über Nacht bei 4°C in einer Verdünnung des primären Antikörpers in Milchpulver inkubiert. Danach wurde die Membran 2x 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend 1 h mit einer Verdünnung des sekundären Antikörpers inkubiert. Die Membran wurde anschließend 2x 5 min mit PBS-T und 2x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend die Proteinbanden des gesuchten Proteins mittels ECL-Reagenz (GE Healthcare, München) auf einem photoempfindlichen Film visualisiert. Das Molekulargewicht des Proteins konnte mittels eines Größenmarkers, der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurde, bestimmt werden.

3.6. Erstellung der microRNA-Expressionsvektoren und Luciferase-Vektoren

3.6.1. PCR

Zur Amplifizierung von Genabschnitten erfolgte die Synthese der entsprechenden Sequenz mittels der Polymerase-Kettenreaktion und spezifischen Primern unter Verwendung des HotStartTaq DNA-Polymerase-Kits (Qiagen, Hilden). Dazu wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

13,7 µl H₂O
2,0 µl 10x Puffer
1,6 µl MgCl₂ (25 mM)
0,5 µl dNTPs (100 mM)
1,0 µl Primer (se und as)
0,2 µl Taq-Polymerase
1,0 µl cDNA
20,0 µl Reaktionsansatz

Das verwendete Programm bestand aus folgenden Schritten:

1. 95°C	10 min
2. 95°C	20 sek
3. 60°C	30 sek
4. 72°C	30 sek
Schritt 2-4:	35x wiederholen
5. 72°C	5 min
6. 4°C	

Die amplifizierte cDNA wurde weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

3.6.2. Agarose-Gelelektrophorese und cDNA-Aufreinigung

Die Amplifikation der cDNA mittels PCR wurde durch eine elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte überprüft. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte dabei in 1%igen Agarosegelen (versetzt mit 5 µl Ethidiumbromid [10 mg/l] auf 100 ml Agarose-0,5x TBE-Lösung). Die Auftragsmenge auf das Gel betrug jeweils 5 µl des PCR-Produkts plus 1,5 µl

DNA-Auftragspuffer. Die Auftrennung erfolgte bei ca. 90 Volt. Die Banden wurden nach dem Gellauf unter UV-Licht sichtbar gemacht. DNA-Längenstandards dienten der Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

Die visualisierten DNA-Banden wurden aus dem Gel geschnitten. Mittels des QIAQuick-Gel-Extraktionskits (Qiagen, Hilden) wurde die DNA aus der Agarose extrahiert. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in dem 3fachen Volumen des Puffers QX vollständig gelöst und anschließend über eine Säule zentrifugiert (12 000 U/min; 1 min). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 700 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurde die Säule zweimal zentrifugiert (12 000 U/min; 1 min), um den im Puffer enthaltenen Ethanol vollständig zu entfernen. Die cDNA wurde dann in 20 µl Aqua bidest. eluiert (10 000 U/min; 1 min).

3.6.3. Restriktionsverdau

Zur Vorbereitung der Insertion der cDNA-Fragmente in den jeweiligen Vektor wurden beide einem Restriktionsverdau unterworfen, um die passenden Insertionstellen zu schaffen.

Die microRNA-Expressionsvektoren pcDNA6.2. und die zugehörigen Oligonukleotide wurden nach dem folgendem Protokoll des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt a. Main) verdaut:

7,5 µl H₂O
4,0 µl Vektor oder cDNA
1,5 µl NEB3-Puffer (10x)
1,0 µl BsmBI
1,0 µl Bsa I
15,0 µl Ansatz

Programm: 50°C 80 min
 55°C 160 min

Die Luciferase-Vektoren psiCheck2-Vektor und die zugehörigen cDNA-Fragmente wurden nach folgendem Protokoll verdaut:

8,5 µl H₂O
4,0 µl Vektor oder cDNA
1,5 µl Puffer R (10x)
1,0 µl Xho I
15,0 µl Ansatz

Programm: 37°C 30 min

Nach dem Verdau wurden die Fragment nach dem in Abschnitt 3.6.2. beschriebenen Protokoll aufgereinigt. Im Anschluss daran wurde sofort die Ligationsreaktion angesetzt.

3.6.4. Ligation

Die Ligation erfolgt in folgendem Ansatz:

7,0 µl H₂O
4,0 µl Vektor-Lösung (verdaut)
2,0 µl cDNA-Fragment oder Oligonukleotid
2,0 µl Ligase-Puffer (10x)
3,0 µl T4-Ligase
2,0 µl PEG
20 µl Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Vor Gebrauch wurde bei 85°C die Ligase inaktiviert.

3.6.5. Klonierung

Die Klonierung der Plasmide erfolgte in E.coli TOP10-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe). Zu einem auf Eis gelagerten Röhrchen TOP10-Zellen wurden 5 µl Plasmid zugesetzt und der Ansatz bei 0°C für 10 min inkubiert. Dann wurden die Bakterien einem Hitzeschock (30s) bei 42°C ausgesetzt, damit sie das Plasmid aufnehmen. Anschließend wurden sie 10 min auf Eis inkubiert und dann mit 250 µl erwärmten SOC-Medium (Komponente des TOP10-Kits, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Die Bakterien wurden bei 37°C und 100 U/min 1 h ankultiviert und nachfolgend auf Agar-Platten mit 100 µg/µl Ampicillin (bei pcDNA6.2.-

Vektor: 50 µg/µl Spectinomycin) ausgestrichen. Die Kultivierung der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

Auf den Platten gewachsene Kolonien konnten im nächsten Arbeitsschritt mit sterilen Zahnstochern gepickt und in 10 ml LB-Medium verbracht werden. Dann wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C und 200 U/min kultiviert.

3.6.6. Plasmid isolation und –aufreinigung

Zur Isolation der Plasmide wurden die kultivierten Bakterien mit 4000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl des Puffers P1 (enthält RNaseA; Komponente des QIAquick Plasmid isolation Kits, Qiagen, Hilden) aufgenommen. Zur Lyse der Zellen wurde der basische Puffer P2 zugefügt und die Lösung mehrmals invertiert. Die Lysereaktion wurde nach 2 min durch Zugabe des sauren Puffers N3 gestoppt. Anschließend wurde das Gemisch 10 min bei 12 000 U/min zentrifugiert, um die bakteriellen Proteine abzuscheiden. Der Überstand wurde abgenommen und auf eine Säule gegeben. Diese wurde bei 10 000 U/min für 1 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 700 µl Puffer PW gewaschen, dann wurde die Säule bei 10 000 U/min für 2 min trocken zentrifugiert. Die DNA wurde abschließend in 30 µl Aqua dest. eluiert.

Zur Entfernung von bakteriellen Endotoxinen aus der Präparation wurde der Endotoxin Removal Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) eingesetzt. Es wurden 10% (v/v) Endotoxin removal agent (enthält Resin, das Endotoxine bindet) zu der Präparation gegeben und ausgiebig gevortext. Dann wurde der Ansatz zuerst für 10 min bei -20°C und anschließend für 15 min bei 65°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Präparation für 10 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Es wurde dann der farblose Überstand abgenommen und das rotgefärbte Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes verworfen. Der Überstand wurde zur Kontrolle auf Resinrückstände noch einmal zentrifugiert, zeigte sich ein weiteres rotgefärbtes Pellet, wurde die Aufreinigung wiederholt.

3.6.7. Sequenzierung

Zur Kontrolle der Klonierung wurden die isolierten Plasmide zuerst entsprechend der in Abschnitt 3.6.3 geschilderten Vorgehensweise mit Restriktionsenzymen verdaut und auf einem Agarosegel auf das Vorhandensein eines Inserts überprüft. Plasmide, die ein Insert

enthielten, wurden sequenziert, um die Exaktheit der Sequenz sowie die richtige Orientierung im Plasmid zu kontrollieren.

Dazu wurde unter Verwendung des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) folgender Ansatz hergestellt:

2,0 µl Sequenzier-Mix
8,0 µl Puffer
4,0 µl Primer (se; 3,2 pmol)
1,0 µl template cDNA
15,0 µl Ansatz

Programm:

1. 96°C	1 min
2. 96°C	10 sek
3. 50°C	5 sek
4. 60°C	4 min
Schritt 2-4	25x wiederholen
5. 4°C	

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Ansätze aufgereinigt. Dazu wurde 2 µl EDTA, 2 µl Na-Acetat (50 mM) und 50 µl 96%iges Ethanol dem Ansatz hinzugefügt. Die Mischung wurde kurz gevortext und dann 15 min unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 30 min bei 6 000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das cDNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes in 70 µl 70%igem Ethanol resuspendiert und noch einmal für 10 min bei 6000 U/min und 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand verworfen und die Probe bei 65°C getrocknet, um das restliche Ethanol zu entfernen. Die Sequenzierung der Proben wurde im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung von Fr. Dr. Darmer durchgeführt.

3.7. Luciferase-Assay

Mittels des Luciferase-Assay sollte die Regulation einer mRNA durch eine bestimmte microRNA nachgewiesen werden. Dazu wurde im vorherigen Schritt ein die putative

Bindestelle der microRNA enthaltendes Fragment aus dem 3'UTR der zu untersuchenden mRNA in einen Luciferase-Vektor kloniert.

Im ersten Schritt wurden HEK 293-Zellen in weiße 96-well-Platten (Greiner, Nürtingen) ausgestreut und 24 h angezchtet. Die Zellen wurden dann wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben mit den Luciferase-Vektoren transfiziert. Darüber hinaus wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.1. beschrieben mit microRNA-sequenzgleichen Oligonukleotiden oder Kontroll-siRNA cotransfiziert. Die Zellen wurden 24 h kultiviert und anschließend auf ihre Luciferase-Aktivität vermessen.

Dazu wurde der Dual-Glo-Kit (Promega, Heidelberg) verwendet. Zuerst wurde eine Substrat-Lösung zur Vermessung der Firefly-Luciferase-Aktivität (Kontrollgen) hergestellt und je 50 µl je well auf die Zellen gegeben. Die Vermessung erfolgte bei Raumtemperatur im Plattenreader Genios (Tecan, Gröding, Österreich) nach einer Prä-Inkubations-Phase von 15 Minuten. Nach Beendigung der Messung wurde die Firefly-Luciferase durch Zugabe der zweiten Substrat-Lösung inhibiert, mit der die Renilla-Luciferase-Aktivität (Reportergen) gemessen werden konnte. Dazu wurde nach einer Prä-Inkubationsphase von 15 min die Platte noch einmal im Plattenreader Genios vermessen. Die beiden Werte wurden dann in Beziehung gesetzt, um den relativen Wert der Luciferase-Aktivität zu bestimmen.

3.8. Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz lässt sich die Verteilung und Lokalisation von Proteinen in Zellen darstellen sowie bei Anfärbung von zwei Proteinen eine mögliche Kolokalisation. Hierfür wurden MCF-7 und MCF-10-Zellen in 24-well-Platten auf Deckgläschen (12 mm) angezchtet und mit miR-210-Antagomirs transfiziert und/oder unter Hypoxie kultiviert. Die Zellen wurden dann nach 24 h mit 4% Paraformaldehyd (Sigma, Steinheim) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Weiterhin wurden sie mit 0,5 % (v/v) Triton-X in PBS für 5 min permeabilisiert und im folgenden 1 h in 1% BSA in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend wurden die Zellen 1 h mit in 1% BSA/PBS verdünntem Primärantikörper inkubiert und danach 2 Mal je 5 min in PBS gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der Deckgläschen mit in 1% BSA/PBS verdünntem Sekundärantikörper, der mit Cy3 gekoppelt war. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und Abschließend die Deckgläschen zwei Mal mit PBS, zwei Mal mit Aqua dest. und zwei Mal mit 96%igem Ethanol gewaschen. Nachdem die Deckgläschen vollständig getrocknet waren, wurden sie mittels Prolong Gold antifading Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) auf dem

Objektträger befestigt und nach dem Aushärten des antifading Reagenz mittels Fluoreszenzmikroskopie (TE2000, Nikon, Düsseldorf) analysiert. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgte im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Dr. Hüttelmaier.

3.9. Suchalgorithmen für microRNA-Proteintargets

Mittels im Internet verfügbarer Suchalgorithmen wurden putative Proteintargets ausgesuchter microRNAs identifiziert. Es wurden die Datenbanken TargetScan 4.2 (Version: April 2008), PicTar (Version: März 2007) und miRanda (Version: September 2008) verwendet.

http-Adressen der Datenbanken:

- TargetScan 4.2 <http://www.targetscan.org>
- PicTar <http://pictar.mdc-berlin.de>
- miRanda <http://www.microRNA.org>
- miRBase <http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v5/>

3.10. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Als signifikant wurden dabei alle Werte eingestuft, die innerhalb des Wahrscheinlichkeitsintervalls von 0,05 lagen. Die statistischen Analysen umfassten Überlebenszeitanalysen (Kaplan-Meier-Analyse, multivariate Cox-Regressionsanalyse), t-Teste, Chi²-Teste (Kreuztabellen) und bivariate Korrelationen.

Die Überlebenszeitanalyse ist eine statistische Analyse, bei der die Zeit bis zum Eintreten eines bestimmten Ereignisses zwischen zwei oder mehr Gruppen verglichen wird. Mithilfe dieser Analyse können die Effekte von prognostischen Faktoren, medizinischer Behandlung oder schädlichen Einflüssen auf das Erreichen eines spezifischen Endpunktes (Tod des Patienten, Heilung, Neuerkrankung oder Eintreten von Komplikationen) geschätzt werden. Beispiele für solche Analysen sind die Kaplan-Meier-Analyse oder die Cox-Regression.

Bei der Kaplan-Meier-Analyse kann die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt, auch dann berechnet werden, wenn nicht alle Patienten identische Beobachtungszeiträume haben. Es wird dabei das kumulative Überleben der Patientengruppen mit der Überlebenszeit verglichen. Die Kaplan-Meier-Kurve ist weiterhin

geeignet zum Ablesen spezifischer Überlebensraten (z.B. 1- oder 5-Jahres-Überlebensrate) oder genereller Überlebenszeiten.

Die Cox-Regression basiert auf dem Konzept der Hazardrate, mit der die Wahrscheinlichkeit eines „Austrittsereignisses“ (z.B. Tod einer Person oder Versagen eines mechanischen Bauteils) zu einem festen Zeitpunkt geschätzt wird. Der Vorteil gegenüber der Kaplan-Meier-Analyse liegt darin, dass weitere prognostische Faktoren in das Modell integriert werden können. Da bei Tumorerkrankungen klinische Parameter wie das Tumorstadium oder der Resektionsgrad eine wichtige Rolle für die Prognose spielen, kann daher der Einfluss dieser Parameter in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse einbezogen werden, so dass die Prognoserelevanz des zu untersuchenden Faktors ohne Einfluss der klinischen Faktoren ausgedrückt werden kann. Bei den an der Kohorte von Weichteilsarkomen durchgeführten Cox-Regressionsanalysen wurden die klinischen Parameter Tumorstadium, Resektionsgrad, Tumorart und Tumorlokalisation berücksichtigt, bei der Kohorte von Pankreaskarzinomen Tumorstadium und Resektionsgrad.

4. Ergebnisse

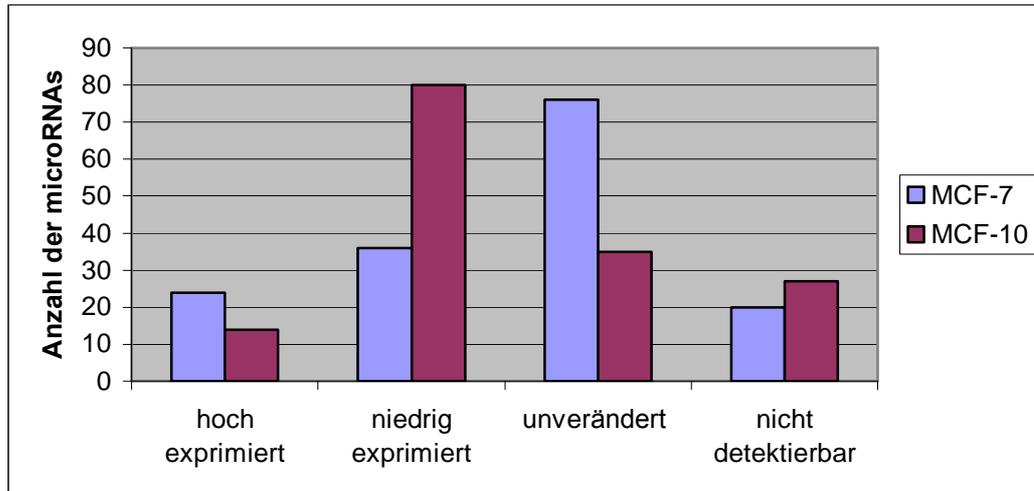
4.1. microRNA-Expression unter Hypoxie

Hypoxie bezeichnet den pathophysiologischen Zustand eines verringerten Sauerstoffpartialdrucks in Geweben. Als Reaktion auf die Unterversorgung mit Sauerstoff und der daraus resultierenden verringerten Synthese von Energieträgern werden zahlreiche physiologische Prozesse in der Zelle aktiviert. Dazu gehört einerseits die Transkription verschiedener Stoffwechselgene über den durch Hypoxie stabilisierten Transkriptionsfaktor HIF-1 α sowie andererseits die Induktion der Angiogenese durch z. B. den „vascular endothelial growth factor“ (VEGF). Insgesamt sind etwa 70 Gene bekannt, deren mRNA unter Hypoxie-Einfluss verstärkt exprimiert werden (Semenza et al., 2003 und 2008). Die Auswirkungen der Sauerstoffunterversorgung auf die Expression der kleinen, nichtkodierenden microRNAs sind bis dato kaum untersucht.

4.1.1. Generelle Veränderungen der microRNA-Expression unter Hypoxie

Es sollte untersucht werden, ob die Expressionsmuster von bestimmten microRNAs durch Hypoxie betroffen sind. Dazu wurde die Expression von 156 microRNAs (enthalten im „microRNA early access panel“ von Applied Biosystems, Darmstadt) in unter Hypoxie oder Normoxie kultivierten MCF-7 und MCF-10-Zellen mittels quantitativer real-time-PCR analysiert. Als Grundlage für die Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen (Livak und Schmittgen, 2001) gewählt und die C_T -Werte auf die Expression der U18-snoRNA bezogen. Werte kleiner 0,01 wurden als nicht detektierbar eingestuft. Eine Differenz von über 50 % in den Expressionswerten unter Hypoxie und Normoxie wurde als verstärkte oder verringerte Expression gewertet, währenddessen Differenzen unter diesem Wert als unveränderte Expression eingeschätzt wurden. In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurden unter Hypoxie 24 microRNAs (15,4 %) verstärkt exprimiert, 76 (48,7 %) waren in ihrer Expression unverändert, während 36 microRNAs (23,1 %) eine verringerte Expression aufwiesen. In Zellen der Mammapithelzelllinie MCF-10 waren unter Hypoxie 14 microRNAs (9,0 %) stärker exprimiert, 35 (22,4 %) in ihrer Expression unverändert und 80 (51,3 %) niedriger exprimiert als unter Normoxie. Ähnlich war die Zahl der microRNAs, die in den Zelllinien nicht detektiert werden konnten (20 bzw. 12,8 % in der MCF-7, 27 bzw. 17,3 % in der MCF-10). In beiden Zelllinien zeigte sich somit ein starker Einfluss von

Hypoxie auf die Expression von microRNAs. Eine Tabelle (Tab. 8.1.) der unter Hypoxie verstärkt oder vermindert exprimierten microRNAs findet sich im Anhang.



	MCF-7	MCF-10
Hoch exprimiert	24	14
Niedrig exprimiert	36	80
Unverändert	76	35
Nicht detektierbar	20	27

Abbildung 4.1.: Auswirkungen von Hypoxie auf das Expressionsmuster der 156 untersuchten microRNAs.

Eine genauere Betrachtung der Anzahl der unter Hypoxie differentiell regulierten microRNAs sollte Unterschiede im Hypoxie-Ansprechen zwischen der Tumor-Zelllinie MCF-7 und der Mammaepithel-Zelllinie MCF-10 aufzeigen.

Drei microRNAs, die in der Zelllinie MCF-7 unter Hypoxie hochexprimiert wurden, lagen auch in der Zelllinie MCF-10 erhöht vor, während es bei den niedriger exprimierten microRNAs 17 Übereinstimmungen gab. 15 microRNAs waren in beiden Zelllinien nicht von der Regulation betroffen und 19 der microRNAs, die in der MCF-7 nicht detektierbar waren, konnten auch in der MCF-10 nicht in ausreichendem Maße nachgewiesen werden. Auffällig ist vor allem, dass 48 der microRNAs, die in der MCF-7 unter Hypoxie unverändert exprimiert wurden, in der MCF-10 herunterreguliert vorlagen, während nur 8 verstärkt exprimiert wurden. 13 microRNAs, die in der MCF-7 unter Hypoxie verstärkt exprimiert wurden, wurden in der MCF-10 herunterreguliert, während der umgekehrte Fall nur bei 2 microRNAs auftrat.

Zusammenfassend zeigte sich ein starker Effekt der Hypoxie auf das Expressionsmuster der im analysierten Pool enthaltenen microRNAs. Dieser bestand vornehmlich in einer verringerten Transkription der microRNAs. In MCF-10-Zellen, die dem normalen Mamma-Epithel ähnlicher sind, war der Hypoxie-Effekt auf die microRNA-Expression deutlicher ausgeprägt als in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7. 72,9 % der detektierbaren microRNAs unterlagen in MCF-10 einer Regulation durch Hypoxie, in der MCF-7 waren es nur 44,1 %. Es ist anzunehmen, dass bereits im Ursprungsgewebe der MCF-7 eine genetische Anpassung an die in Tumoren übliche Sauerstoffunterversorgung stattgefunden hat, die an die Zellklone weitergegeben wurde. Trotzdem waren auch in der MCF-7-Zelllinie einige microRNAs besonders stark in ihrer Expression verändert, sodass eine essentielle Rolle dieser microRNAs im Hypoxieansprechen der Zellen vermutet werden kann.

4.1.2. Stark unter Hypoxie verändert exprimierte microRNAs

Im nächsten Schritt sollten besonders stark regulierte microRNAs identifiziert und exemplarisch betrachtet werden. Dazu wurden diejenigen microRNAs selektiert, die unter Hypoxie mehr als 5fach über- oder unterexprimiert vorlagen. Sowohl in der Zelllinie MCF-7 als auch in der MCF-10 wurde eine mehr als 5fache Überexpression der miR-210 detektiert (MCF-7: 6,5fach; MCF-10: 6,1fach). Diese microRNA ist auch in einer anderen, im Verlauf dieser Experimente publizierten Arbeit (Kulshreshtha et al. 2006) als unter Hypoxie erhöht exprimiert identifiziert worden. Darüber hinaus fanden wir mehrere microRNAs, die unter Hypoxie mehr als 5fach schwächer exprimiert wurden (miR-181a: in MCF-10 7,9fach; miR-200a: in MCF-10 5,0fach; miR-324-5p: in MCF-10 13,8fach; miR-325: in MCF-7 5,5fach und in MCF-10 15,9fach; diese microRNAs sind in Tabelle 4.1. fett markiert).

Weitere microRNAs zeigten eine Expression, die unter Hypoxie mehr als zweifach über- oder unter dem Normalwert bei Normoxie lag. Die Expressionswerte der stark verändert exprimierten microRNAs sind in Tabelle 4.1. aufgeführt. In der MCF-10-Zelllinie sind auf Grund der großen Anzahl der 2fach herunterregulierten microRNAs nur die 3fach schwächer exprimierten aufgeführt. Insgesamt waren in der MCF-10 unter Hypoxie nicht nur deutlich mehr microRNAs herunterreguliert, sondern der Faktor der verminderten Expression fiel deutlich stärker aus als in der MCF-7 (durchschnittlich: 1,77fach; in MCF-10 durchschnittlich 2,38fach).

MCF-7				MCF-10			
Hochregulation		Herunterregulation		Hochregulation		Herunterregulation	
hsa-miR-210	6,45	hsa-miR-325	5,54	hsa-miR-210	6,10	hsa-miR-325	15,85
hsa-miR-27b	3,42	hsa-miR-373	4,16	hsa-miR-142-5p	4,26	hsa-miR-324-5p	13,80
hsa-miR-137	3,14	hsa-miR-219	3,74	hsa-miR-184	3,62	hsa-miR-181a	7,91
hsa-miR-100	2,59	hsa-miR-187	2,80	hsa-miR-9*	2,30	hsa-miR-200a	5,04
hsa-miR-128b	2,56	hsa-miR-368	2,79	hsa-miR-15b	2,19	hsa-miR-9	4,86
hsa-let-7e	2,18	hsa-miR-189	2,77	hsa-miR-338	2,00	hsa-miR-128b	4,58
hsa-miR-21	2,18	hsa-miR-145	2,76	hsa-miR-133a	2,00	hsa-miR-34a	4,38
hsa-miR-140	2,14	hsa-miR-138	2,66			hsa-miR-339	4,29
hsa-miR-151	2,10	hsa-miR-154	2,62			hsa-miR-130a	3,85
hsa-miR-148a	2,02	hsa-miR-373*	2,55			hsa-miR-200b	3,69
		hsa-miR-155	2,50			hsa-miR-135b	3,65
		hsa-miR-214	2,40			hsa-miR-190	3,51
		hsa-miR-299	2,19			hsa-miR-130b	3,49
		hsa-miR-335	2,05			hsa-miR-182*	3,39
		hsa-miR-96	2,02			hsa-miR-331	3,39
		hsa-miR-323	2,00			hsa-miR-34b	3,33
		hsa-miR-370	2,00				

Tab. 4.1. Unter Hypoxie differentiell regulierte microRNAs und der Grad der veränderten Expression. Es wurden alle microRNAs berücksichtigt, die in der MCF-7 mehr als 2fach hoch- oder herunterreguliert, in der MCF-10 mehr als 2fach hoch- oder 3fach herunterreguliert vorlagen.

Die selektierten microRNAs wurden in drei unabhängigen biologischen Triplikaten vermessen. Es konnte in einem Student t-test eine signifikant veränderte Expression der miR-210 und miR-325 in MCF-7 Zellen und der miR-181a, miR-200a, miR-210, miR-324-5p und miR-325 in MCF-10 Zellen unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie nachgewiesen werden.

microRNA	Zelllinie	t-test
hsa-miR-181a	MCF7	n.s.
	MCF10	0,042
hsa-miR-200a	MCF7	n.s.
	MCF10	0,049
hsa-miR-210	MCF7	0,000098
	MCF10	0,002
hsa-miR-324-5p	MCF7	n.s.
	MCF10	0,012
hsa-miR-325	MCF7	0,045
	MCF10	0,026

Tabelle 4.2. Bestimmung der statistischen Signifikanz der differentiellen microRNA-Expression unter Hypoxie. Die p-Werte wurden mittels des Students t-test (zweiseitig, ungepaarte Stichprobe) berechnet, Werte <0,05 werden als signifikant betrachtet. n.s. = nicht signifikant

Auffällig sind somit die in beiden Zelllinien auftretende verstärkte Expression der miR-210 sowie die verringerte Expression der miR-325 unter Hypoxie. Die Expression beider microRNAs war in den beiden Zelllinien mehr als 5fach signifikant erhöht bzw. verringert.

4.1.3. Expression der hsa-miR-210 und hsa-miR-325 unter Hypoxie in weiteren Zelllinien

Es wurde die Expression der microRNAs miR-210 und miR-325 unter Hypoxie und Normoxie in verschiedenen weiteren Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs (ES-2, SKOV-3, OAW-42: Ovarialkarzinomzelllinien; U251; U343: Glioblastomzelllinien; HEK 293: humane embryonale Nierenzelllinie) vermessen. Während die miR-210 homogen in allen untersuchten Zelllinien unter Hypoxie verstärkt exprimiert wurde, ergab sich bei der Expression der miR-325 unter Hypoxie ein heterogenes Bild.

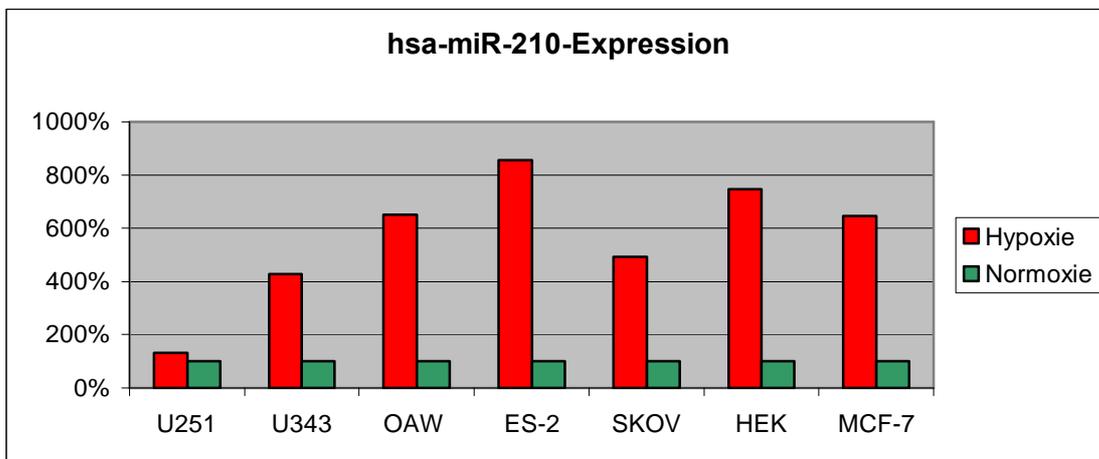


Abb. 4.2. Bestimmung der miR-210-Expression in verschiedenen Zelllinien unter Hypoxie und Normoxie. Es handelt sich um die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

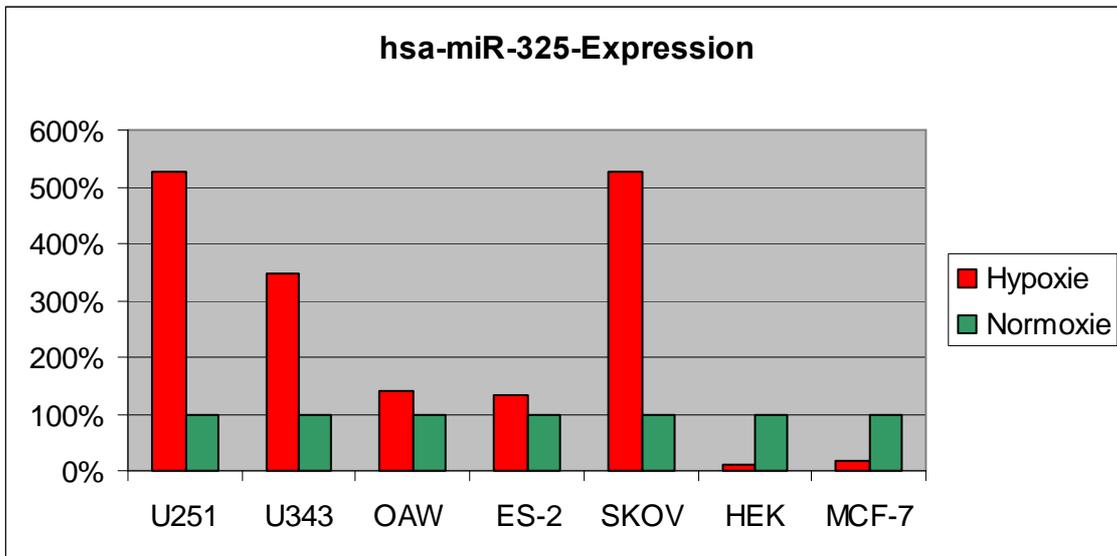


Abb. 4.3. Bestimmung der miR-325-Expression in verschiedenen Zelllinien unter Hypoxie und Normoxie. Es handelt sich um die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

miR-325 wird in den Zelllinien ES-2, U251, U343, SKOV-3 und OAW-42 unter Hypoxie verstärkt exprimiert, während sie in den Zelllinien MCF-7 und HEK 293 schwächer exprimiert wird. Während für die miR-210 eine Aktivierung der Transkription durch HIF-1 α dokumentiert ist (Kulshreshtha et al. 2007; Camps et al. 2008), liegt zur Regulation der miR-325 noch keine Literatur vor. Eine weitergehende Studie von Transkriptions- und Stressfaktoren, die eine transkriptionelle Aktivierung oder Repression vermitteln könnten, könnte Aufschluss über die widersprüchliche Regulation der miR-325 unter Hypoxie bringen.

4.2. Effekte der Inhibierung bzw. Überexpression der hsa-miR-210 und hsa-miR-325 auf das klonogene Zellüberleben

Aufgrund von hypoxischen Bereichen in Tumoren kommt es zu einer Selektion von Tumorzellen mit einem aggressiveren Phänotyp und zur Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika. Da diese Prozesse durch die unter Hypoxie regulierten microRNAs bewirkt oder beschleunigt werden könnten, könnte eine Modulation der Expression dieser microRNAs zu therapeutisch gewünschten Prozessen wie einem verlangsamten Zellwachstum bzw. der Induktion von Apoptose führen. In den folgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, inwiefern die Inhibierung der unter Hypoxie stärker exprimierten miR-210 und miR-137 sowie eine Überexpression der schwächer exprimierten microRNAs (miR-181a, miR-200a, miR-324-5p, miR-325) in MCF-7 und MCF-10-Zellen das klonogene Zellüberleben beeinflussen.

4.2.1. Konstruktion von microRNA-Expressionsvektoren

Es wurden Expressionsvektoren für die microRNAs miR-181a, miR-200a, miR-324-5p und miR-325 angefertigt, um die Auswirkungen der Überexpression dieser microRNAs auf das klonogene Zellüberleben unter Hypoxie zu untersuchen. Trägersystem war in diesem Fall der pcDNA6.2-Vektor (freundlicherweise bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Dr. Hüttelmaier), der zur Kontrolle der Transfektionseffizienz zusätzlich ein EmGFP-Gen trägt (s. Abb. 4.4.).

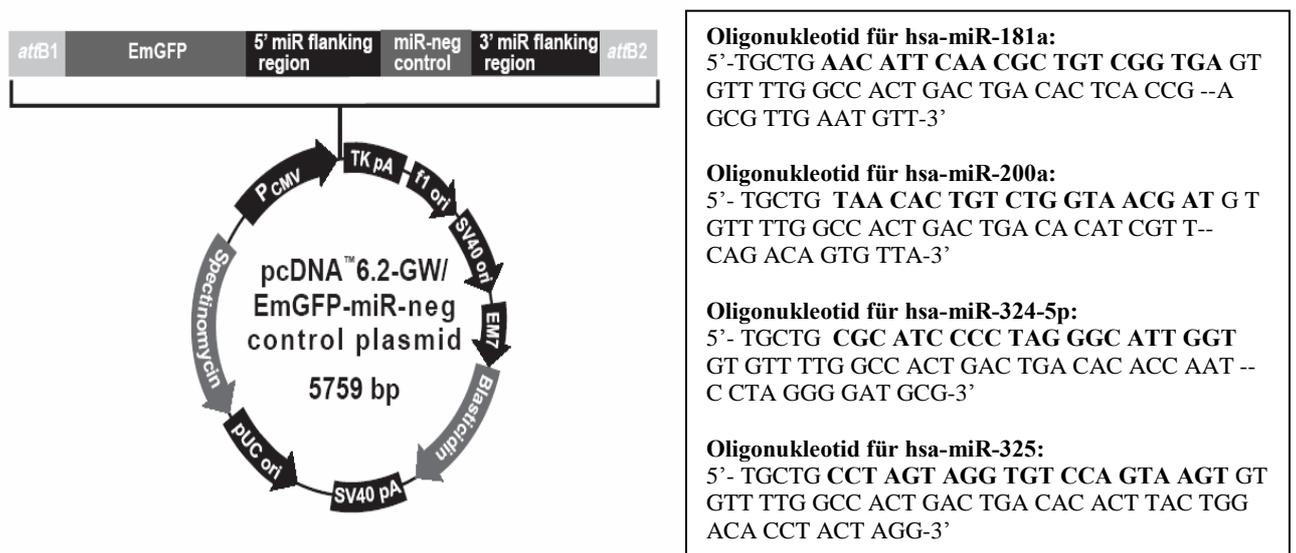


Abb. 4.4. microRNA-Expressionsvektor pcDNA 6.2.-GW/EmGFP und die Sequenzen der klonierten Oligonukleotide.

Um mögliche Einflüsse durch die Vektorsysteme einschätzen zu können, wurden weitere Zellen nur mit den doppelsträngigen Oligonukleotiden transfiziert, die der Sequenz der jeweiligen microRNA entsprechen. Die Effizienz der microRNA-Expressionsvektoren wurde mittels quantitativer real-time-PCR-Messungen 24 h nach Transfektion des Konstruktes in MCF-7-Zellen kontrolliert. Dabei zeigten Zellen, die mit einem microRNA-Expressionsvektor transfiziert wurden, eine spezifische verstärkte Expression der entsprechenden microRNA (s. Abb. 4.5.).

Ebenso resultierte eine Transfektion von microRNA-sequenzgleichen Oligonukleotide in einer verstärkten qPCR-Detektion der entsprechenden microRNA nach 24 Stunden im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

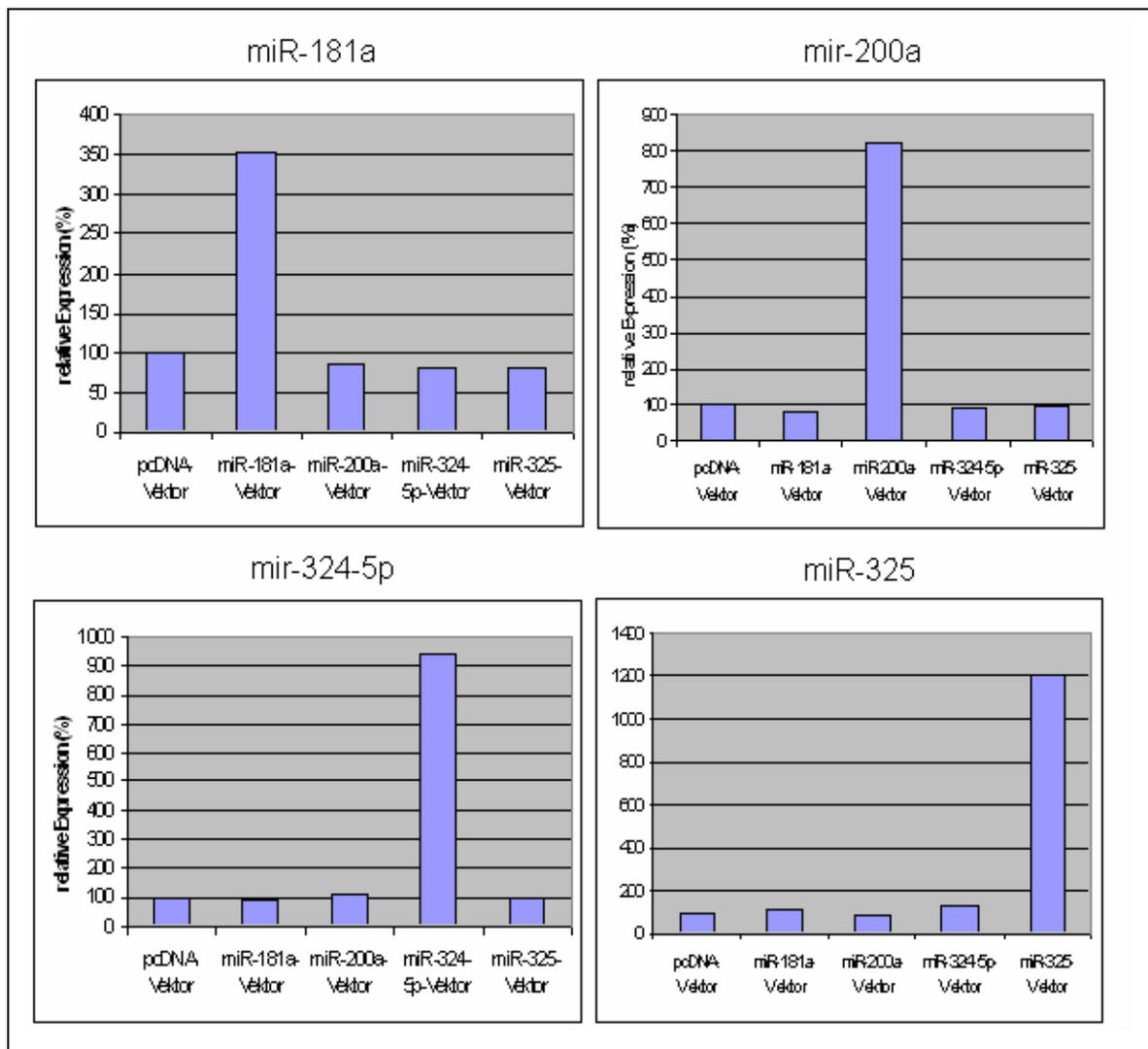


Abb. 4.5. Expressionsanalysen der einzelnen microRNAs nach Transfektion von 4 MCF-7-Zellproben mit den Expressionsvektoren für miR-181a (links oben), miR-200a (rechts oben), miR-324-5p (links unten) und miR-325 (rechts unten).

Zur Inhibierung der miR-210 und miR-137 wurden kommerzielle Antagomirs verwendet. Es handelte sich dabei um 2'-O-Methyl-modifizierte Oligonukleotide der Firma Ambion, Darmstadt (nach Krützfeldt et al., 2005). Die Transfektion erfolgte wie bei den microRNA-Oligonukleotiden mittels des Lipotransfektionsreagenz Interferin (BioMol, Hamburg).

4.2.2. Effekte der Überexpression von hsa-miR-181a, hsa-miR-200a, hsa-miR-324-5p und hsa-miR-325 auf das klonogene Zellüberleben unter Hypoxie

Um zu testen, ob eine Überexpression der unter Hypoxie in der MCF-7 und/oder MCF-10 verringert exprimierten microRNAs einen Einfluss auf das Überleben der Zellen hat, wurde

das klonogene Zellüberleben untersucht. Initiale Versuche zu diesem Thema wurden von Herrn Dipl.-Bio. Matthias Kraus in seiner Diplomarbeit durchgeführt, die dann in dieser Arbeit durch weitere Experimente ergänzt und verifiziert wurden.

Die Überexpression der miR-200a zeigte in der MCF-7 weder unter Hypoxie noch unter Normoxie signifikante Effekte auf das klonogene Zellüberleben im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Demgegenüber war bei Überexpression der miR-181a ein auf 38,7% verringertes Zellüberleben unter Normoxie bzw. ein auf 21,3 % erniedrigtes Zellüberleben unter Hypoxie zu beobachten. Die Überexpression der miR-324-5p führte zu einem auf 74,2 % erniedrigten Überleben unter Normoxie bzw. zu einem auf 60,1 % erniedrigten Überleben unter Hypoxie. Weiterhin bewirkte die Überexpression der miR-325 in den MCF-7-Zellen ein auf 59,1 % verringertes Zellüberleben unter Normoxie bzw. ein auf 77,1 % verringertes Zellüberleben unter Hypoxie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

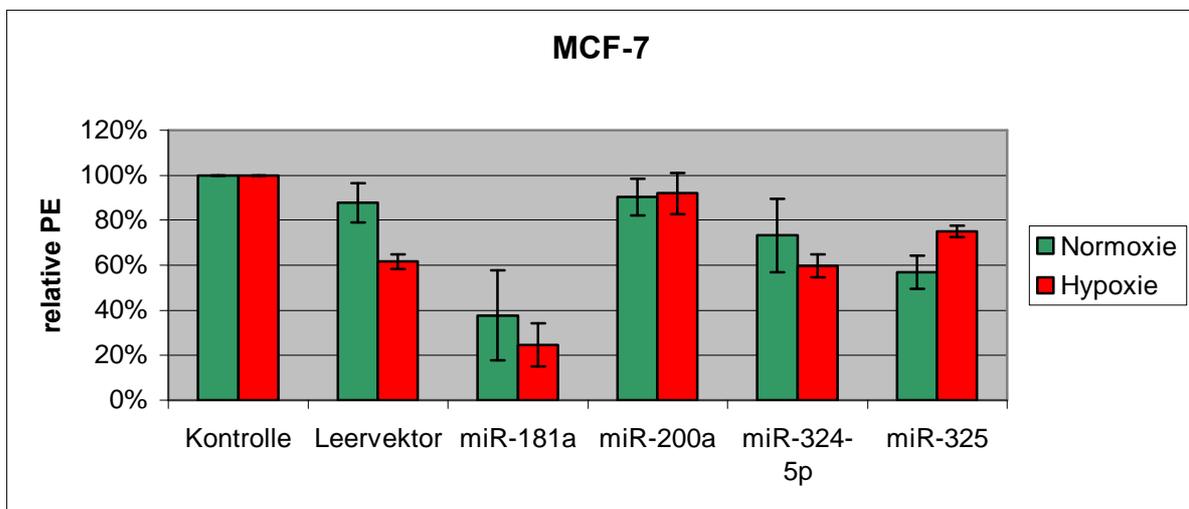


Abb. 4.6. Zellkoloniebildungstest zu den Auswirkungen der Überexpression unter Hypoxie herunterregulierter microRNAs auf das klonogene Zellüberleben. Die MCF-7-Zellen wurden mit den jeweiligen microRNA-Expressionskonstrukten transfiziert und für 24h unter Hypoxie kultiviert. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Kontrolle: unbehandelte MCF-7-Zellen unter Normoxie bzw. Hypoxie. PE = Plattiereffizienz

Auffällig ist der starke Effekt, den die Transfektion des Leervektors unter Hypoxie auf das Zellüberleben hat. So verringert die Transfektion der MCF-7-Zellen mit dem Leervektor allein das klonogene Zellüberleben unter Normoxie auf 84,2 % bzw. unter Hypoxie auf 61,7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Damit unterscheiden sich etwa die Effekte der Transfektion des Leervektors unter Hypoxie auf das klonogene Zellüberleben nicht

signifikant von den Effekten der Überexpression der miR-324-5p oder der miR-325. Um eine mögliche Toxizität des Vektors auszuschließen, wurden die Versuche zum klonogenen Zellüberleben unter Verwendung von doppelsträngigen Oligonukleotiden mit der Sequenz der entsprechenden microRNAs wiederholt.

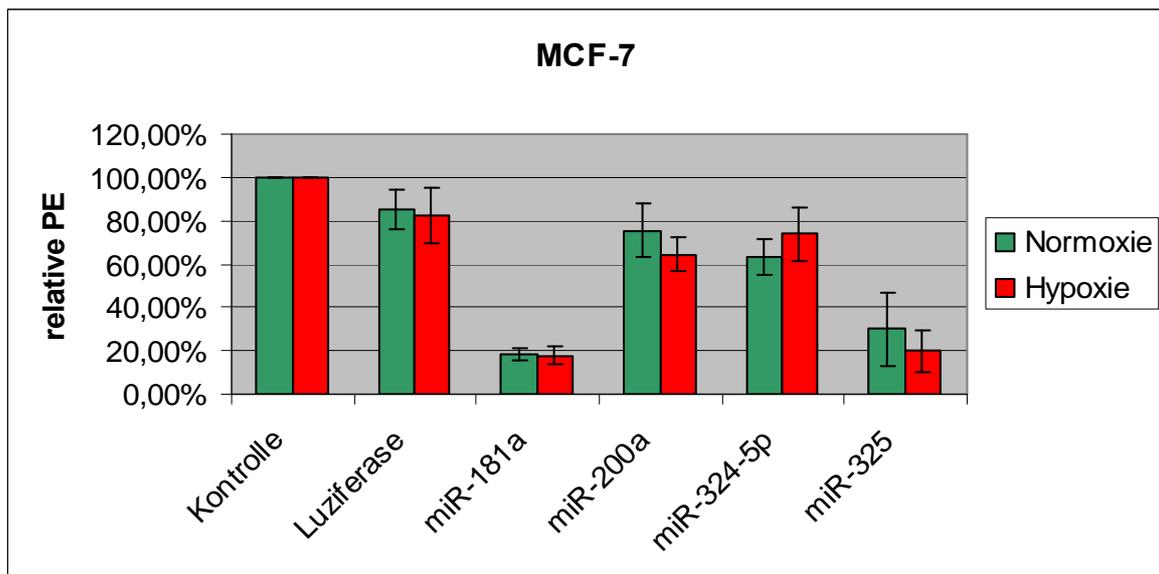


Abb. 4.7. Zellkoloniebildungstest: Auswirkungen der Überexpression der unter Hypoxie herunterregulierten microRNAs auf das klonogene Zellüberleben. Die MCF-7-Zellen wurden mit den jeweiligen microRNA-Oligonukleotiden transfiziert und für 24h unter Hypoxie kultiviert. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. PE = Plattiereffizienz

Bei der Transfektion mit Oligonukleotiden zeigte sich, dass die Überexpression von miR-200a und miR-324-5p keinen signifikanten Einfluss auf das klonogene Überleben der MCF-7-Zellen hat. Dagegen resultierte die Überexpression von miR-181a in einem auf 18,2 % verringerten Zellüberleben unter Normoxie bzw. in einem auf 17,6 % verringerten Zellüberleben unter Hypoxie. Die Überexpression der miR-325 verringerte das klonogene Zellüberleben auf 29,8 % unter Normoxie und auf 19,8 % unter Hypoxie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Eine effiziente Verringerung des klonogenen Zellüberlebens lässt sich daher bei der Überexpression von miR-181a und miR-325 beobachten, wobei die Verwendung von microRNA-sequenzgleichen Oligonukleotiden in einem deutlicheren Effekt resultiert als die Transfektion von microRNA-Expressionsvektoren und zudem eine mögliche toxische Wirkung des Vektors allein ausgeschlossen werden kann.

4.2.3. Auswirkungen der Inhibierung von hsa-miR-210 auf das klonogene Zellüberleben

Die microRNA miR-210 wurde mittels Antagomirs (2-O'-Methyl-modifizierte microRNA-Inhibitoren) gehemmt und die Zellen für 24 h unter Hypoxie kultiviert. Dabei kam es in der MCF-7 zu einem auf 45,0 % verringerten Zellüberleben der behandelten Zellen unter Hypoxie im Vergleich zur unbehandelten hypoxischen Kontrolle. Es handelte sich um eine signifikante Verringerung der Proliferation. Das klonogene Überleben der mit dem miR-210-Antagomir behandelten Zellen, die unter Normoxie kultiviert wurden, war gegenüber der normoxischen Kontrolle auf 59,6 % erniedrigt (s. Abb. 4.8.).

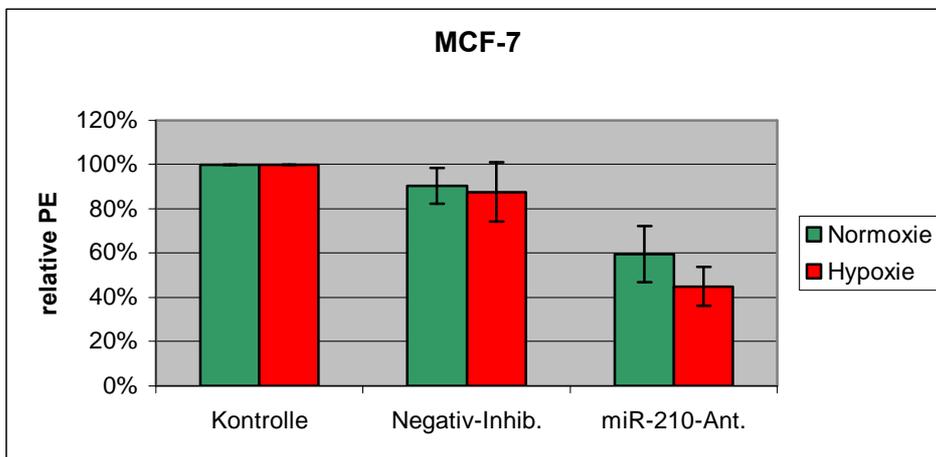


Abb. 4.8. Effekte der Inhibierung der miR-210 auf das klonogene Zellüberleben. MCF-7-Zellen wurden mit dem miR-210-Antagomir oder einem Kontroll-Oligonukleotid transfiziert und 24 h unter Hypoxie oder Normoxie kultiviert. PE = Plattiereffizienz

Die Inhibierung der miR-210 mittels Antagomirs zeigte in der MCF-10 weder unter Hypoxie noch unter Normoxie signifikante Effekte auf das klonogene Zellüberleben (s. Abb. 4.9.).

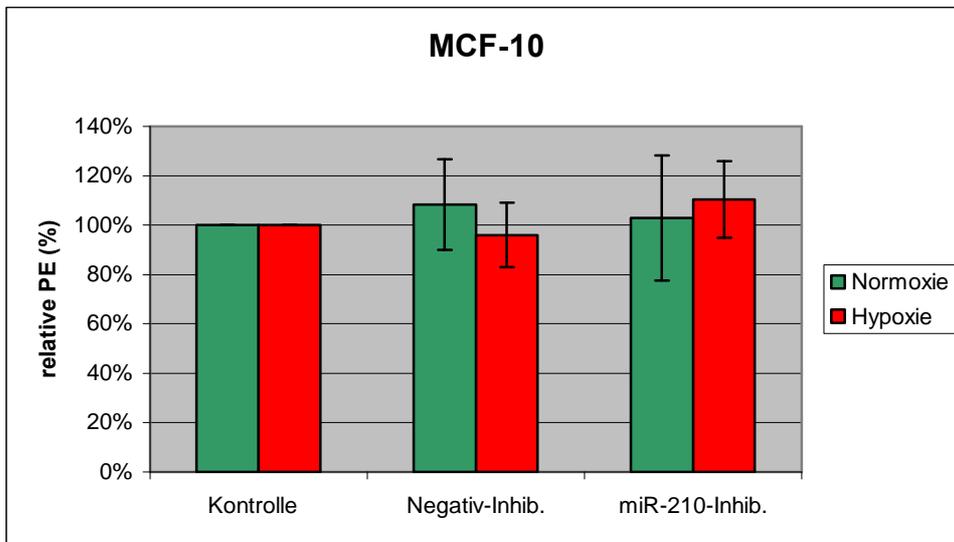


Abb. 4.9. Effekte der Inhibierung der miR-210 auf das klonogene Zellüberleben der MCF-10. Die Zellen wurden mit dem miR-210-Antagomir oder einem Kontroll-Antagomir transfiziert und 24 h unter Hypoxie bzw. Normoxie kultiviert. PE = Plattiereffizienz

Der Effekt von Hypoxie (in diesem Fall ein Sauerstoffpartialdruck von 1 % über 24 h) auf die Proliferationsfähigkeit der MCF-10 Zellen war allerdings in diesen Versuchen ebenfalls gering und verringerte die Proliferation der mit Hypoxie behandelten Zellen lediglich auf 80% der normoxischen Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

Die Inhibierung der miR-210 führte somit zu einem verringerten klonogenen Überleben der MCF-7-Zellen sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie. Die Antagomir-Behandlung bewirkte sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie ein um etwa 40 % verringertes klonogenes Überleben. In einem weiteren Schritt sollte daher die Effekte einer Kombination aus mehreren Antagomirs auf das klonogene Überleben der MCF-7-Zellen untersucht werden.

4.2.4. Kombination von hsa-miR-210 und hsa-miR-137-Antagomirs und deren Auswirkungen auf das klonogene Zellüberleben

Neben der miR-210 war in der MCF-7-Zelllinie die miR-137 unter Hypoxie verstärkt exprimiert (3,14fach). Darüber hinaus wurde von Svoboda und Kollegen eine verstärkte Expression der miR-137 in Colonkarzinomen nach Capectabine-Behandlung beschrieben. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen der verstärkten Expression von miR-137 und dem schlechteren Ansprechen von Tumorzellen auf die Chemoradiotherapie beobachtet worden (Svoboda et al., 2008). Aus diesem Grund wurde ein Antagomir der miR-137 in Kombination mit einem miR-210-Antagomir eingesetzt, um die Effekte einer Inhibierung auf das

klonogene Überleben der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 unter Normoxie und Hypoxie zu untersuchen. Es zeigte sich unter Normoxie eine auf 65,2 % bzw. unter Hypoxie eine auf 67,2% verringerte Zellzahl bei der Inhibierung der miR-137. Die Inhibierung der miR-210 induzierte ein auf 56,5 % (Normoxie) bzw. auf 51,2 % (Hypoxie) reduziertes klonogenes Überleben der MCF-7-Zellen im Vergleich zu den entsprechenden normoxischen bzw. hypoxischen Kontrollproben. Eine Behandlung mit einer Kombination aus beiden Antagomirs bewirkte in der normoxischen Probe keine weitere Verringerung des klonogenen Zellüberlebens (Verringerung auf 57,2 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). Demgegenüber verringert die kombinierte Behandlung aus beiden Antagomirs das klonogene Überleben der MCF-7-Zellen unter Hypoxie auf 36,0 % und damit effektiver als die beiden Antagomirs bei einzelner Transfektion.

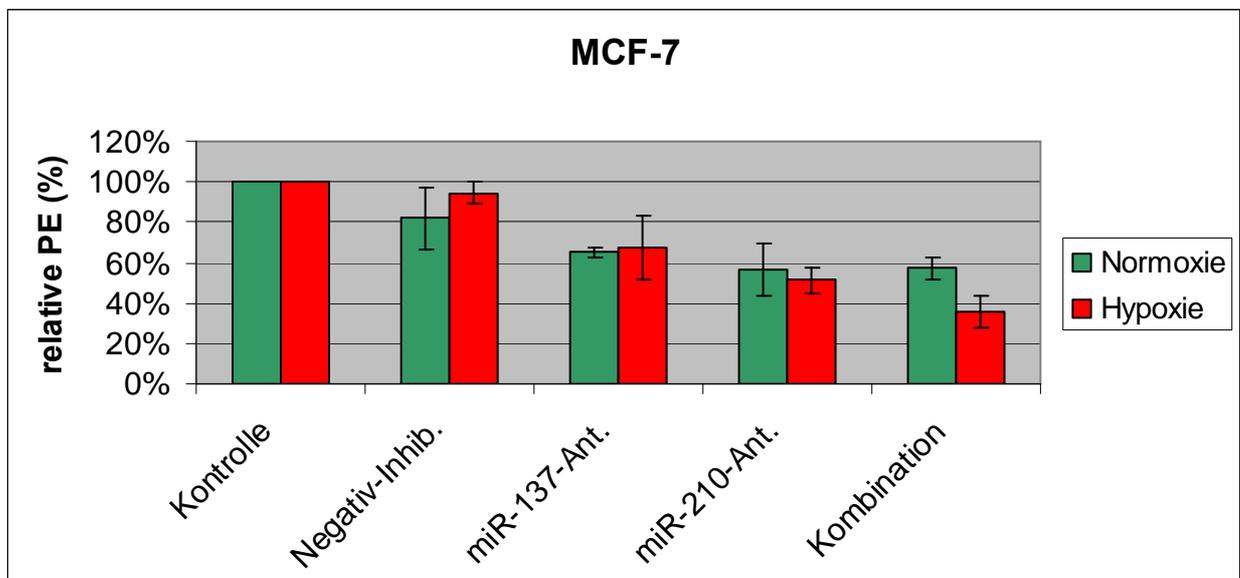


Abb. 4.10. Effekte einer Kombination aus miR-210- und miR-137-Antagomir auf das klonogene Zellüberleben von MCF-7-Zellen. PE = Plattiereffizienz; Ant. = Antagomir, Inhib. = Inhibitor

Wesentlich ist somit, dass eine Kombinationsbehandlung aus Antagomirs gegen miR-137 und miR-210 unter Hypoxie einen verstärkten negativen Effekt auf die Zellproliferation hat. Eine Kombinationsbehandlung mit mehreren Antagomirs - gegen unter Hypoxie verstärkt regulierte microRNAs - könnte daher eine Verbesserung der therapeutischen Anwendbarkeit bewirken.

4.2.5. Kombination von hsa-miR-210-Antagomirs und Chemotherapeutika

Für eine mögliche klinische Applikation von microRNA-Antagomirs ist von besonderem Interesse, inwiefern sie einen synergistischen oder additiven Effekt mit etablierten Therapien aufweisen, um effektiver möglichst viele Zellen eines Tumors abzutöten.

Dazu wurden Zellen der Tumorzelllinie MCF-7 mit miR-210-Antagomirs und den Chemotherapeutika Cisplatin und/oder Taxol behandelt. Cisplatin bewirkt die Quervernetzung zwischen den DNA-Strängen und hemmt dadurch die Replikation und somit die Zellproliferation. Taxol (Paclitaxel) stört den Abbau der Mikrotubuli bei der Mitose und induziert somit einen Zellzyklusarrest. In Zellkoloniebildungstesten sind die Auswirkungen der Behandlungen auf das klonogene Überleben untersucht worden.

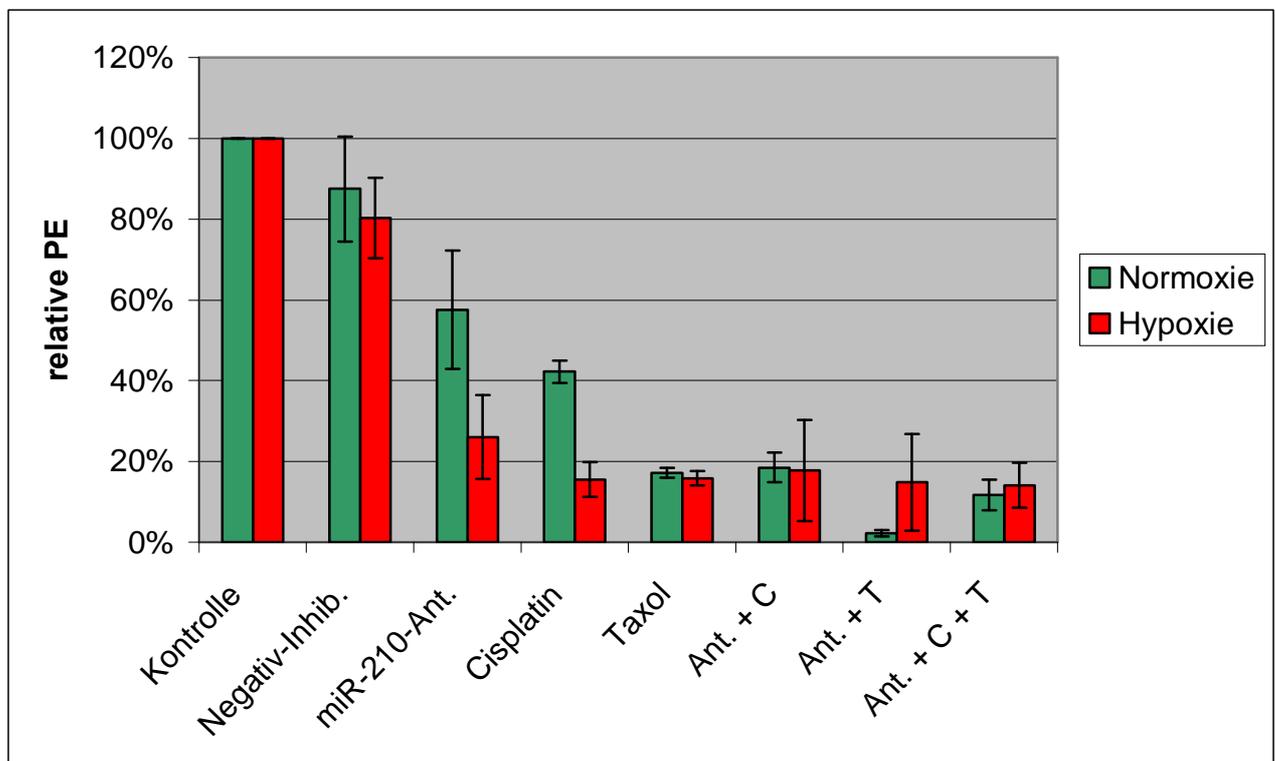


Abb. 4.11. Effekte der Kombination aus miR-210-Antagomirs und Chemotherapeutika auf das klonogene Zellüberleben. Es handelt sich um den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen. Ant. = miR-210-Antagomir; C = Cisplatin; T = Taxol, PE = Plattiereffizienz

Unter Normoxie reduzierte die Behandlung der MCF-7-Zellen mit Cisplatin oder miR-210-Antagomirs das klonogene Zellüberleben auf 42,2 % bzw. 57,5 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Taxol-Behandlung zeigte noch stärkere Auswirkungen auf das klonogene Zellüberleben. Es kam zu einer Reduktion auf 17,2 % im Vergleich zur

unbehandelten Kontrolle. In der Kombination von Taxol mit dem miR-210-Antagomir wurde das klonogene Zellüberleben auf 2,2 % reduziert. Auffällig ist allerdings, dass bei einer Kombination der beiden Chemotherapeutika mit dem miR-210-Antagomir das klonogene Zellüberleben nur auf 11,7 % der unbehandelten Kontrolle reduziert ist. Es scheint daher kein additiver Effekt der beiden Chemotherapeutika mit dem miR-210-Antagomir vorzuliegen. Die Reduktion des klonogenen Zellüberlebens unter Hypoxie mit den verschiedenen Behandlungsarten verhielt sich analog zum klonogenen Zellüberleben unter Normoxie mit zwei Ausnahmen: Der Effekt von Cisplatin auf das klonogene Zellüberleben war unter Hypoxie stärker ausgeprägt (15,5 % im Vergleich zu 42,2 % unter Normoxie) und der Effekt von Taxol in Kombination mit dem miR-210-Antagomir deutlich geringer als unter Normoxie (14,8 % im Vergleich zu 2,2 % unter Normoxie). Insgesamt allerdings ergeben die Behandlungen mit dem miR-210-Antagomir, Cisplatin und Taxol unter Hypoxie vergleichbare Reduktionen des klonogenen Zellüberlebens wie unter Normoxie, die sich auch in den Kombinationsbehandlungen nicht wesentlich steigern ließen (Ant./Cisplatin: 17,7 %; Ant./Taxol: 14,8 %; Ant./Cisplatin/Taxol: 14,1 %)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die kombinierte Behandlung von MCF-7-Zellen mit miR-210-Antagomirs und Chemotherapeutika im Falle von Cisplatin unter Normoxie eine Halbierung des klonogenen Zellüberlebens im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Cisplatin oder miR-210-Antagomirs bewirkt. Bei einer Taxol-Behandlung ist dieser Effekt unter Normoxie sogar verstärkt, hier sinkt das klonogene Zellüberleben fast um den Faktor 10. Auf der anderen Seite ist dieser Effekt nicht additiv, eine Kombination beider Chemotherapeutika mit dem miR-210-Antagomir verstärkt die Reduktion des klonogenen Zellüberlebens nicht weiter. Unter Hypoxie verstärkt keines der Chemotherapeutika, auch in Kombination mit dem miR-210-Antagomir, die Verringerung des klonogenen Zellüberlebens im Vergleich zur spezifischen Behandlung mit miR-210-Antagomir. In-vitro zeigten Kombinationsbehandlungen also keine signifikanten Effekte auf das klonogene Zellüberleben der Mammakarzinomzelllinie MCF-7.

4.3. in-silico Identifizierung von Proteintargets für hsa-miR-210 und hsa-miR-325

Mittels verschiedener Internet-Suchmaschinen lassen sich in-silico Proteintargets für einzelne ausgewählte microRNAs identifizieren. Der Algorithmus selektiert dabei Proteine, deren mRNA im 3'-UTR eine zur „seed“-Sequenz der gewählten microRNA komplementäre Sequenz aufweist. Weitere Parameter sind z.B. a) der sogenannte „ribosome shadow“

(putative Bindestellen befindet sich weniger als 30 bp vom Translationsstop entfernt, dadurch schwächere Wechselwirkung des RISC mit der mRNA möglich), b) eine mögliche Kooperation zwischen benachbarten microRNA-Bindestellen, c) eine komplementäre Paarung zwischen dem 3'-Bereich der microRNA und der Bindestelle mit möglichst wenig wobble-Positionen und einem erhöhten lokalen AU-Gehalt (Grimson, Keystone Symposium „microRNA and Cancer“ 2007, persönliche Mitteilung). Mittels verschiedener Suchalgorithmen sollten putative target-Proteine der miR-210 und miR-325 selektiert und nachfolgend verifiziert werden.

Die Suchalgorithmen „TargetScan“ (www.targetscan.org) und PicTar (www.pictar.org) gaben für die miR-210 die in Tabelle 4.3. aufgeführten putativen Targets an. Übereinstimmungen mit dem Target-Suchprogramm miRanda (www.micorna.org), einem Suchalgorithmus mit weniger strengen Kriterien, sind mit „x“ markiert.

Gensymbol	Gename and Beschreibung	TargetScan context score	PicTar context score	miRanda
ISCU	iron-sulfur cluster scaffold homolog (E. coli)	-0,42		
KIAA1161	KIAA1161	-0,3		X
FAM116A	family with sequence similarity 116, member A	-0,3		X
ACVR1B	activin A receptor, type IB	-0,26		X
MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	-0,24		X
GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	-0,23	2,2047	
EFNA3	ephrin-A3	-0,19	1,0905	X
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	-0,18		
NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa	-0,17		
SYNGAP1	synaptic Ras GTPase activating protein 1 homolog (rat)	-0,17		
ZNF148	zinc finger protein 148	-0,17		
NPTX1	neuronal pentraxin I	-0,17	5,608	X
CPEB2	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2	-0,16		
MID1IP1	MID1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12 homolog (zebrafish))	-0,14		
LRRC62	leucine rich repeat containing 62	-0,13		
HOXA1	homeobox A1	-0,11		
SCRT1	scratch homolog 1, zinc finger protein (Drosophila)	-0,09		X
LOC152485	hypothetical protein LOC152485	-0,09	0,3882	
LOC399947	similar to expressed sequence AI593442	-0,08		
NEUROD2	neurogenic differentiation 2	-0,07		
HOXA9	homeobox A9	-0,04		
	Nur von PicTar vorhergesagt			
MGC20255	Homo sapiens hypothetical protein MGC20255		7,5892	

MDGA1	Homo sapiens MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1		6,0261	
EGR3	Homo sapiens early growth response 3		5,6138	X
SEH1L	Homo sapiens SEH1-like (S. cerevisiae)		5,457	
GLS2	Homo sapiens glutaminase 2 (liver, mitochondrial) nuclear gene encoding mitochondrial protein		2,9041	
CHAD	Homo sapiens chondroadherin		2,4677	
HYPB	Homo sapiens huntingtin interacting protein B		2,4619	
MEIS1	Homo sapiens Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog (mouse)		2,2979	
FLJ34969	Homo sapiens hypothetical protein FLJ34969		2,0139	
KCMF1	Homo sapiens potassium channel modulatory factor 1		1,9324	X
HOXA3	Homo sapiens homeo box A3		1,2393	
E2F3	Homo sapiens E2F transcription factor 3		0,9236	X
ABCB9	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9		0,4077	

Tab. 4.3. Putative Proteintargets der miR-210 bei den Suchalgorithmen PicTar und TargetScan. Proteintargets, die von beiden Suchalgorithmen vorhergesagt wurden, sind fett gedruckt. Weitere Übereinstimmungen mit Targets des Suchalgorithmus miRanda sind mit „x“ markiert.

Auffällig sind die übereinstimmende „Vorhersage“ von Ephrin-A3 (EFNA3) und Neuronal pentraxin I (NPTX1) für die miR-210 zwischen den beiden Target-Suchmaschinen. miRanda bietet darüber hinaus für die miR-210 insgesamt 816 potentielle target-Proteine an, die aus Platzgründen hier nicht aufgeführt sind.

Für die miR-325 geben die Algorithmen folgende putative Proteintargets an:

Gensymbol	Genname und Beschreibung	TargetScan context score	PicTar context score	miRanda
C1orf75	chromosome 1 open reading frame 75	-0.51		
HNRNP3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	-0.41	2.75	X
SGCD	sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	-0.40		
PAIP1	poly(A) binding protein interacting protein 1	-0.40		X
TTLL7	tubulin tyrosine ligase-like family, member 7	-0.40		
RIMS1	regulating synaptic membrane exocytosis 1	-0.39		X
CSNK1A1	casein kinase 1, alpha 1	-0.37	2.88	
TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	-0.37		X
ARRDC3	arrestin domain containing 3	-0.37	1.54	X
EPHA3	EPH receptor A3	-0.37		
ARL5B	ADP-ribosylation factor-like 5B	-0.36		X
CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	-0.34	2.41	X

DIRC2	disrupted in renal carcinoma 2	-0.31	3.18	
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, <i>S. cerevisiae</i>)	-0.30		
ANKRD28	ankyrin repeat domain 28	-0.28		
LIN54	lin-54 homolog (<i>C. elegans</i>)	-0.28		X
KIAA0157	KIAA0157	-0.26	2.06	X
SFRS5	splicing factor, arginine/serine-rich 5	-0.25		
FAM19A1	family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A1	-0.25		X
PHC3	polyhomeotic homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	-0.23		
GLRA2	glycine receptor, alpha 2	-0.23	2.42	X
RUFY3	RUN and FYVE domain containing 3	-0.23		
HIRA	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	-0.21		
ISL1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-1)	-0.21		
NEXN	nexilin (F actin binding protein)	-0.21		X
LOC728215	similar to transmembrane protein 28	-0.21		
DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	-0.20		
LSM12	LSM12 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-0.20		
TLE4	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, <i>Drosophila</i>)	-0.20		
VEZF1	vascular endothelial zinc finger 1	-0.19		
CCDC6	coiled-coil domain containing 6	-0.19		X
KIAA2022	KIAA2022 protein	-0.19		
SEP7	septin 7	-0.19		
ZBED4	zinc finger, BED-type containing 4	-0.18		
VEZT	vezatin, adherens junctions transmembrane protein	-0.18		
VAMP2	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	-0.18		
BAAT	bile acid Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase (glycine N-choloyltransferase)	-0.17		
LOC440093	similar to H3 histone, family 3B	-0.17		
NLK	nemo-like kinase	-0.17		
RNF146	ring finger protein 146	-0.16		
PCDH9	protocadherin 9	-0.15		
SRGAP3	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3	-0.15		
RAD23B	RAD23 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	-0.15		
H3F3B	H3 histone, family 3B (H3.3B)	-0.13		
NHS	Nance-Horan syndrome (congenital cataracts and dental anomalies)	-0.13		
EIF2C1	eukaryotic translation initiation factor 2C, 1	-0.11		
RICTOR	rapamycin-insensitive companion of mTOR	-0.11		
CUGBP1	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	-0.10	3.23	
RIMBP2	RIMS binding protein 2	-0.09		X
FAM104A	family with sequence similarity 104, member A	-0.05		X

PLXNA1	plexin A1	-0.04		
KRT9	keratin 9 (epidermolytic palmoplantar keratoderma)	-0.03		
	Nur von PicTar vorhergesagt			
SFRS7	Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa		4.95	
SLC8A1	Homo sapiens solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1		4.00	
TAFA1	Homo sapiens TAFA1 protein		3.73	
FLJ10874	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10874		3.65	
ARL8	Homo sapiens ADP-ribosylation factor-like 8		2.72	
ATP1B1	Homo sapiens ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide (ATP1B1)		2.49	X
SMC6L1	Homo sapiens SMC6 structural maintenance of chromosomes 6-like 1 (yeast)		2.07	
NKRF	Homo sapiens NF-kappa B repressing factor		2.05	
SLC1A2	Homo sapiens solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2		1.83	X
MAP4K4	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4		1.33	
SEMA6D	Homo sapiens sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D		1.32	

Tab. 4.4. Putative Proteintargets der miR-325 bei den Suchalgorithmen PicTar und TargetScan. Proteintargets, die von beiden Suchalgorithmen vorhergesagt wurden, sind fett gedruckt. Übereinstimmungen mit miRanda sind mit einem „x“ markiert.

Auffällig war, dass für die miR-325 ebenfalls ein putatives Target aus der Ephrin-Protein-Familie, der Ephrin-Rezeptor A3 (EphA3) mittels TargetScan identifiziert werden konnte. Dabei handelt es sich um eine membranständige Rezeptor-Tyrosinkinase, die in der Angiogenese und in „tissue remodelling“ Prozessen aktiviert wird. Einer ihrer Liganden, der ebenfalls auf der Zelloberfläche exprimiert wird, ist das Ephrin-A3 (EFNA3), ein putatives Target der miR-210. Beide putative Targets (EphA3 und EFNA3) sollten in nachfolgenden Versuchen in-vitro verifiziert werden.

4.4. Verifizierung der putativen Proteintargets EFNA3 und EphA3

Da nicht jede microRNA ein vorhergesagtes Target reguliert, ist die Verifizierung von putativen Proteintargets einer microRNA notwendig. Mittels qRT-PCR, Luciferase-Assays und Western-Blot-Analysen sollten die Effekte der miR-210 auf EFNA3 bzw. der miR-325 auf EphA3 untersucht werden. Es wurden dazu in qRT-PCR- und Western-Blot-Analysen mRNA- und Protein von Proben untersucht, die zuvor unter Hypoxie oder Normoxie

kultiviert und zum Teil mit den entsprechenden Antagomirs bzw. microRNAs transfiziert wurden.

4.4.1. Quantitative real-time-PCR

Mittels quantitativer real-time-PCR sollten mögliche Veränderungen im mRNA-Level der zu untersuchenden Targetgene nach Hemmung der jeweiligen microRNA analysiert werden.

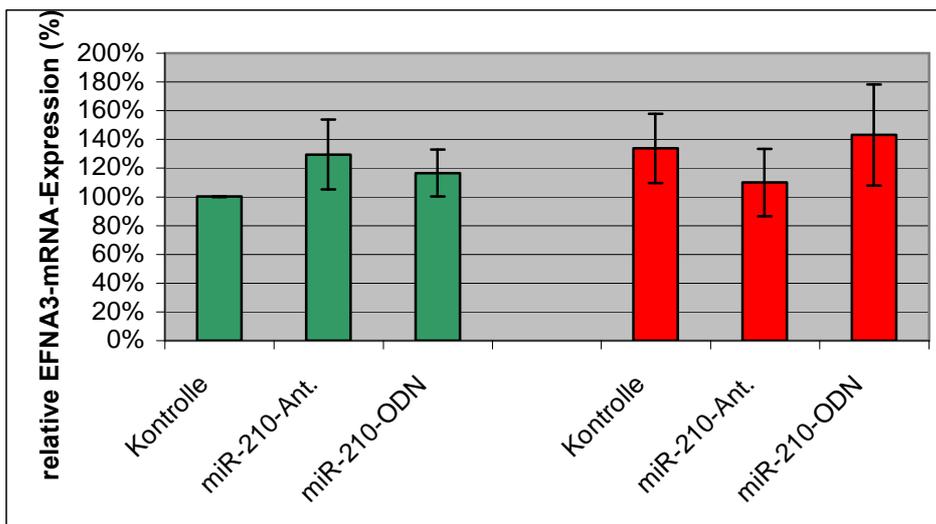


Abb. 4.12. Expression der EFNA3-mRNA in der MCF-7 unter Normoxie und Hypoxie und der Inhibierung der miR-210. Grün dargestellt sind die normoxischen, rot dargestellt die hypoxischen Proben. Ant. = Antagomir; ODN = Oligonukleotide

Die Inhibierung sowie die Überexpression der miR-210 zeigten keine Effekte auf die Expression der EFNA3-mRNA in MCF-7-Zellen, wenn diese unter Hypoxie oder Normoxie kultiviert wurden. Somit wäre eine post-transkriptionelle Regulation des EFNA3-Transkriptes möglich, wenn die miR-210 dieses Transkript reguliert. Die post-transkriptionelle Regulation sollte mittels eines Luciferase-Assays untersucht werden (Abschnitt 4.4.2.).

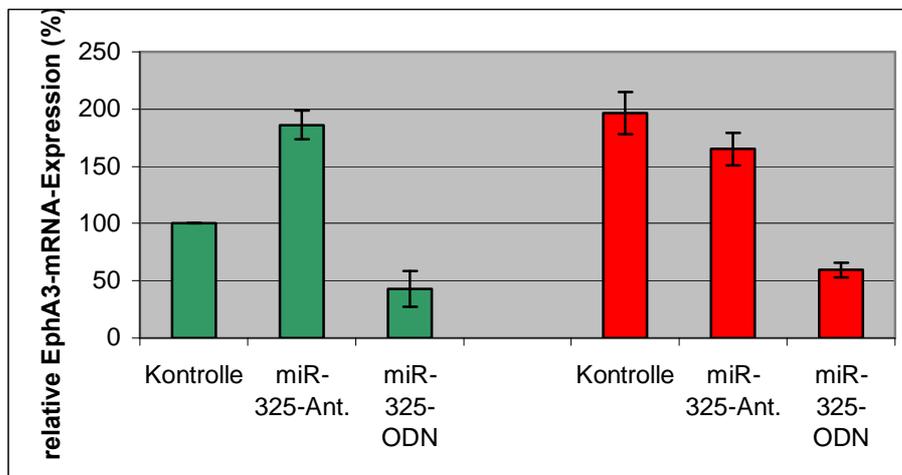


Abb. 4.13. Expression der EphA3-mRNA in der MCF-7 unter Hypoxie und Normoxie und der Inhibierung der miR-325. Grün dargestellt sind die normoxischen, rot dargestellt die hypoxischen Proben. Ant. = Antagomir; ODN = Oligonukleotide

Die EphA3-mRNA-Expression ist hingegen nach der Behandlung der Zellen mit miR-325-Oligonukleotiden reduziert (auf 42,7 % unter Normoxie bzw. auf 59,4 % unter Hypoxie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). EphA3-mRNA wird in der hypoxischen Kontrolle auf 196,3 % im Vergleich zu 100 % in der normoxischen Kontrolle verstärkt exprimiert. Da die miR-325 unter Hypoxie schwächer exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass sie die EphA3-mRNA-Expression mittels der Beeinflussung des mRNA-Abbaus reguliert. Es ist mit dieser Annahme konsistent, dass nach Transfektion der Zellen mit miR-325-Antagomirs die Expression der EphA3-mRNA unter Normoxie auf etwa das 2fache des Wertes verstärkt ist. Dieser Effekt der Antagomirs konnte unter Hypoxie nicht beobachtet werden, möglicherweise aufgrund der von Natur aus geringen miR-325-Expression, die unter Hypoxie noch zusätzlich reduziert ist. Zusammenfassend weisen diese Daten auf eine Regulation der EphA3-mRNA durch die miR-325 über die Modulation der mRNA-Stabilität hin.

4.4.2. Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay dient dem Nachweis von Regulationsmechanismen in-vitro. Dabei wird an den 3'UTR einer Luciferase-mRNA ein 3'UTR-Bereich der zu regulierenden mRNA kloniert. Dieses Konstrukt wird in HEK 293-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach Behandlung der transfizierten Zellen mit der microRNA wird die von der Luciferase vermittelte Lumineszenz gemessen.

Mittels dieses Tests sollte die Regulation der EFNA3-mRNA durch die microRNA miR-210 nachgewiesen werden. Es wurde die 3'UTR-Sequenz der EFNA3-mRNA (Acc.No: NM_004952) von Position 1393 – 1593 in die „multiple cloning site“ eines psiCheck2-Vektors (Promega, Mannheim) kloniert. Innerhalb dieser Sequenz wurde vorher die putative Bindungsstelle von miR-210 aufgrund der Vorhersage von TargetScan lokalisiert. Die mit dem EFNA3-3'UTR-Konstrukt und der miR-210 kotransfizierten HEK293-Zellen wiesen eine auf 57,9 % verringerte Lumineszenz (Luciferase-Aktivität) auf im Vergleich zu dem nur mit dem EFNA3-3'UTR-Konstrukt transfizierten Zellen (s. Abb. 4.14).

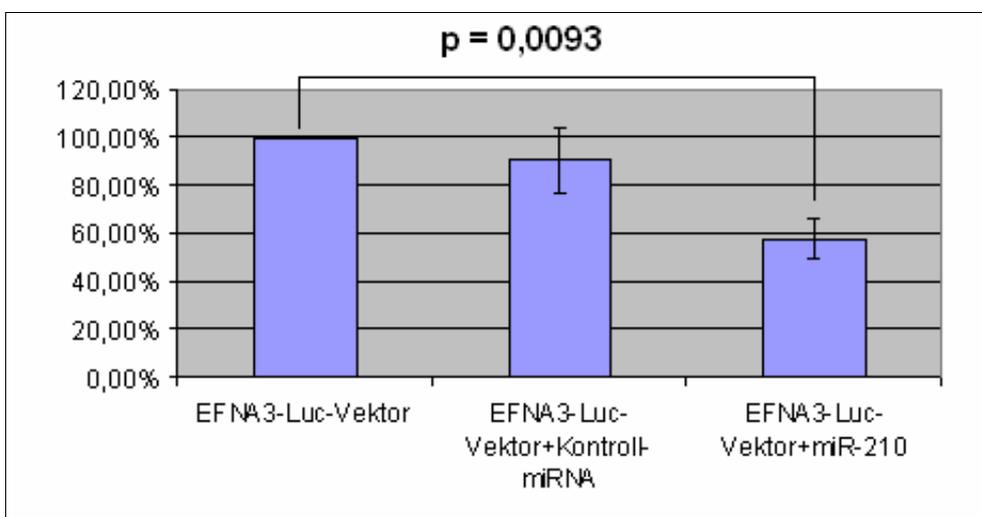


Abb. 4.14. Luciferase-Assay zum Nachweis der Inhibierung des EFNA3-3'-UTRs durch miR-210. Es handelt sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. EFNA3-Luc-Vektor gegen Vektor mit Kontroll-miRNA: $p = 0,338$; Vektor+Kontroll-miRNA gegen Vektor+miR-210: $p = 0,032$; zweiseitiger ungepaarter Student's t-test

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die miR-210 über eine Bindung an das 3'-UTR der EFNA3 mRNA die EFNA3-Proteinexpression regulieren kann. Die beobachtete Regulation des 3'UTRs des EFNA3 durch die miR-210 war signifikant ($p = 0,0093$ im zweiseitigen ungepaarten Student's t-test).

4.4.3. Western-Blot-Analysen

Die Regulation eines Proteins durch eine microRNA lässt sich auch in-vitro beobachten. Hierzu wurde Protein aus mit microRNA-Antagomirs oder -oligonukleotiden behandelten MCF-7-Zellen isoliert und mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

Das EFNA3-Protein zeigte im Western-Blot eine stark verminderte Expression bei Kultivierung der Zellen für 24 Stunden unter Hypoxie. Die densitometrische Auswertung

ergab einen Abfall des Protein-Gehalts in der Probe auf 46,2 % im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Die unter Hypoxie miR-210-vermittelte Herunterregulation des EFNA3-Proteins konnte durch die Inhibierung der miR-210 mittels spezifischen Antagomirs revertiert werden.

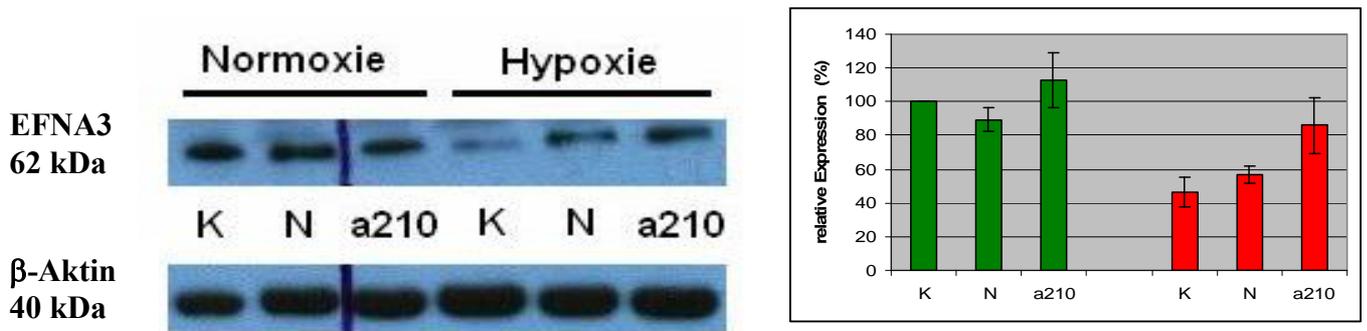


Abb. 4.15. Western-Blot-Analyse der EFNA3-Protein-Expression unter Normoxie und Hypoxie und der Inhibition der miR-210. K = unbehandelte Kontrolle, N = Negativ-Inhibitor, a210 = miR-210-Antagomir. In dem Diagramm sind densitometrische Mittelwerte der Proteinbanden aus drei unabhängigen Versuchen verglichen. Grün dargestellt sind die normoxischen, rot dargestellt die hypoxischen Proben

Demgegenüber zeigte sich unter Hypoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrolle eine stärkere Expression des EphA3-Proteins, welche durch die verringerte Expression der miR-325 induziert wird. Die densitometrische Auswertung ergab dabei einen auf 265,3 % erhöhten EphA3-Proteingehalt in hypoxischen MCF-7-Zellen im Vergleich zu normoxischen Zellen. Die verstärkte Expression des Eph-A3-Proteins unter Hypoxie kann durch die Überexpression der miR-325 mittels sequenzgleichen doppelsträngigen Oligonukleotiden unterdrückt werden.

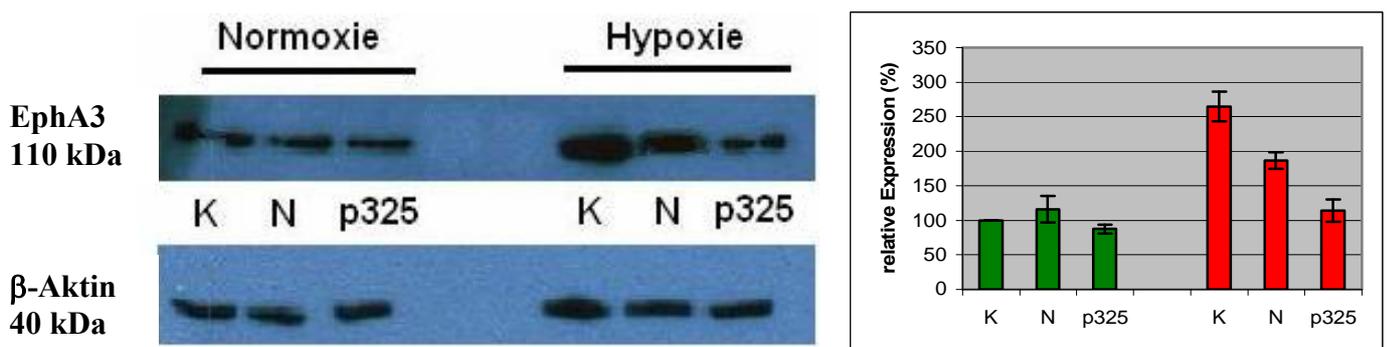


Abb. 4.16. EphA3-Expression unter Hypoxie und Normoxie und Inhibition der miR-325. K = unbehandelte Kontrolle, N = Negativ-Inhibitor, p325 = miR-325-Oligonukleotid. In dem Diagramm sind densitometrische Mittelwerte der Proteinbanden aus drei unabhängigen Versuchen verglichen. Grün dargestellt sind die normoxischen, rot dargestellt die hypoxischen Proben

Nach einer Überexpression der miR-325 war der EphA3-Proteingehalt lediglich auf 114,3% gegenüber dem in normoxischen Zellen erhöht.

Es wurden auch weitere putative Proteintargets der miR-210 auf Veränderungen der Protein-Expression unter Hypoxie und nach Inhibierung der miR-210 untersucht.

Das von dem Target-Suchalgorithmus „miRBase“ (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v5/>) vorgeschlagene Protein RASSF1A zeigte in der MCF-7 keine Expression. In der Zelllinie ES-2 (Ovarialkarzinomzelllinie) war die Expression von RASSF1A unter Hypoxie und unter Inhibierung der miR-210 homogen.

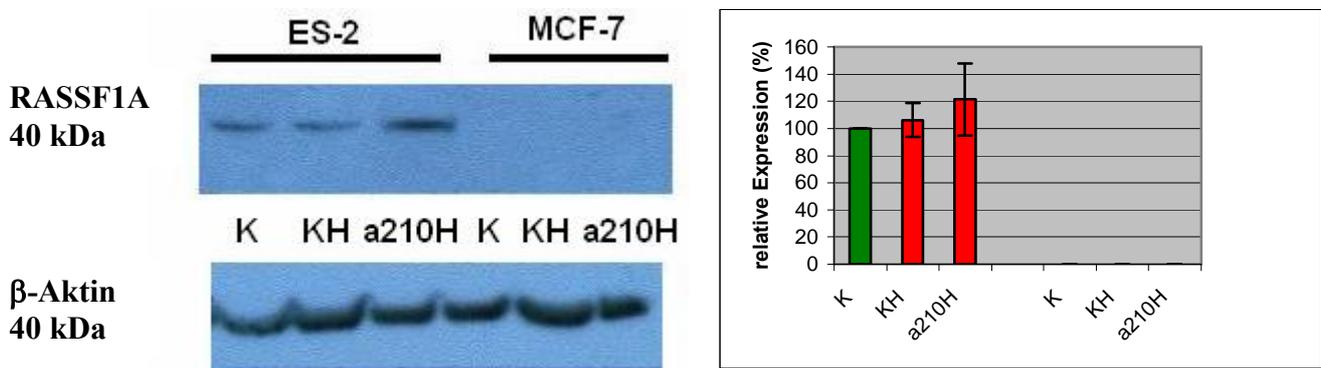


Abb. 4.17. RASSF1A-Protein-Expression in ES-2- und MCF-7-Zellen unter Hypoxie und Normoxie und nach Inhibierung der miR-210. K = unbehandelte Kontrolle, KH = unbehandelte Kontrolle unter Hypoxie, a210H = Inhibierung durch miR-210-Antagonir unter Hypoxie. In dem Diagramm sind densitometrische Mittelwerte der Proteinbanden aus drei unabhängigen Versuchen verglichen. Grün dargestellt sind die normoxischen, rot dargestellt die hypoxischen Proben

Die Expression des putativen Proteintargets BDNF zeigte in den MCF-7-Zellen ebenfalls keine Beeinflussung durch Hypoxie oder Inhibierung der miR-210. Hier wurde nicht nur der zelluläre Proteingehalt, sondern auch der Gehalt an sezerniertem Protein im Überstand untersucht.

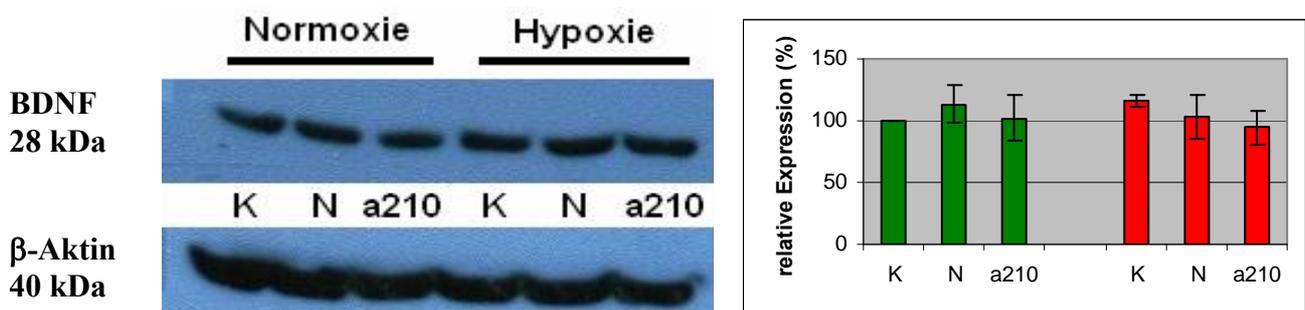


Abb. 4.18. Expression des BDNF-Proteins unter Hypoxie und Normoxie und nach Inhibierung der miR-210. K = unbehandelte Kontrolle, N = Negativ-Inhibitor, a210 = miR-210-Antagonir. In dem Diagramm sind densitometrische Mittelwerte der Proteinbanden aus drei unabhängigen Versuchen verglichen. Grün dargestellt sind die normoxischen, rot dargestellt die hypoxischen Proben

Abschließend lässt sich feststellen, dass von den untersuchten Proteinen lediglich die zwei Mitglieder der Ephrin-/Ephrin-Rezeptor-Familie eine messbare Reaktion auf die Inhibierung der miR-210 beziehungsweise auf die Überexpression der miR-325 zeigten. Damit sind die Ergebnisse konsistent mit denen der quantitativen PCR bzw. der Luciferase-Assays, die eine Inhibierung der EFNA3-Protein-Expression durch miR-210 und der EphA3-Protein-Expression durch miR-325, aber keine Effekte der miR-210 auf das RASSF1A- und das BDNF-Protein gezeigt haben.

4.4.4. Immunfluoreszenz-Analysen

Mittels Immunfluoreszenz sollten Veränderungen in Intensität und Lokalisation des EFNA3-Proteins analysiert und visualisiert werden. Die Versuche wurden in der MCF-7- und der MCF-10-Zelllinie durchgeführt.

Es konnte in jeder Probe EFNA3-Protein detektiert werden. In normoxischen Zellen zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung des Signals über die gesamte Zelloberfläche (s. Abb. 4.19a). Werden die Zellen mit miR-210-Antagomir behandelt, kommt es zu Aggregationen von EFNA3 auf der Zelloberfläche sowie einer schwachen perinukleären Lokalisation (s. Abb. 4.19b). Unter Hypoxie lässt sich ebenfalls eine perinukleäre Lokalisierung von EFNA3 detektieren, die im Vergleich zur normoxischen mit miR-210-Antagomir behandelten Probe verstärkt erscheint (s. Abb. 4.19c). Auch in der hypoxischen mit miR-210-Antagomir behandelten Probe lässt sich eine verstärkte perinukleäre Lokalisierung von EFNA3 beobachten, zudem treten verstärkt Aggregationen des Proteins auf (s. Abb. 4.19d). In dem vorhergegangenen Kapitel konnte eine Regulation des EFNA3-Proteins durch die miR-210 belegt werden. Daher scheint die Inhibierung der konstitutiv exprimierten miR-210 sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie in-vitro zu einer verstärkten Expression des EFNA3-Proteins zu führen, die zu einer Aggregation desselben auf der Zelloberfläche und um die Kernmembran führt. Ob diese Aggregationen nur aus EFNA3-Protein oder weiteren Proteinkomponenten besteht und ob sie eine funktionelle Aufgabe übernehmen oder nur aufgrund des EFNA3-Proteinüberschusses assemblieren konnte in dieser Arbeit leider nicht weitergehend untersucht werden.

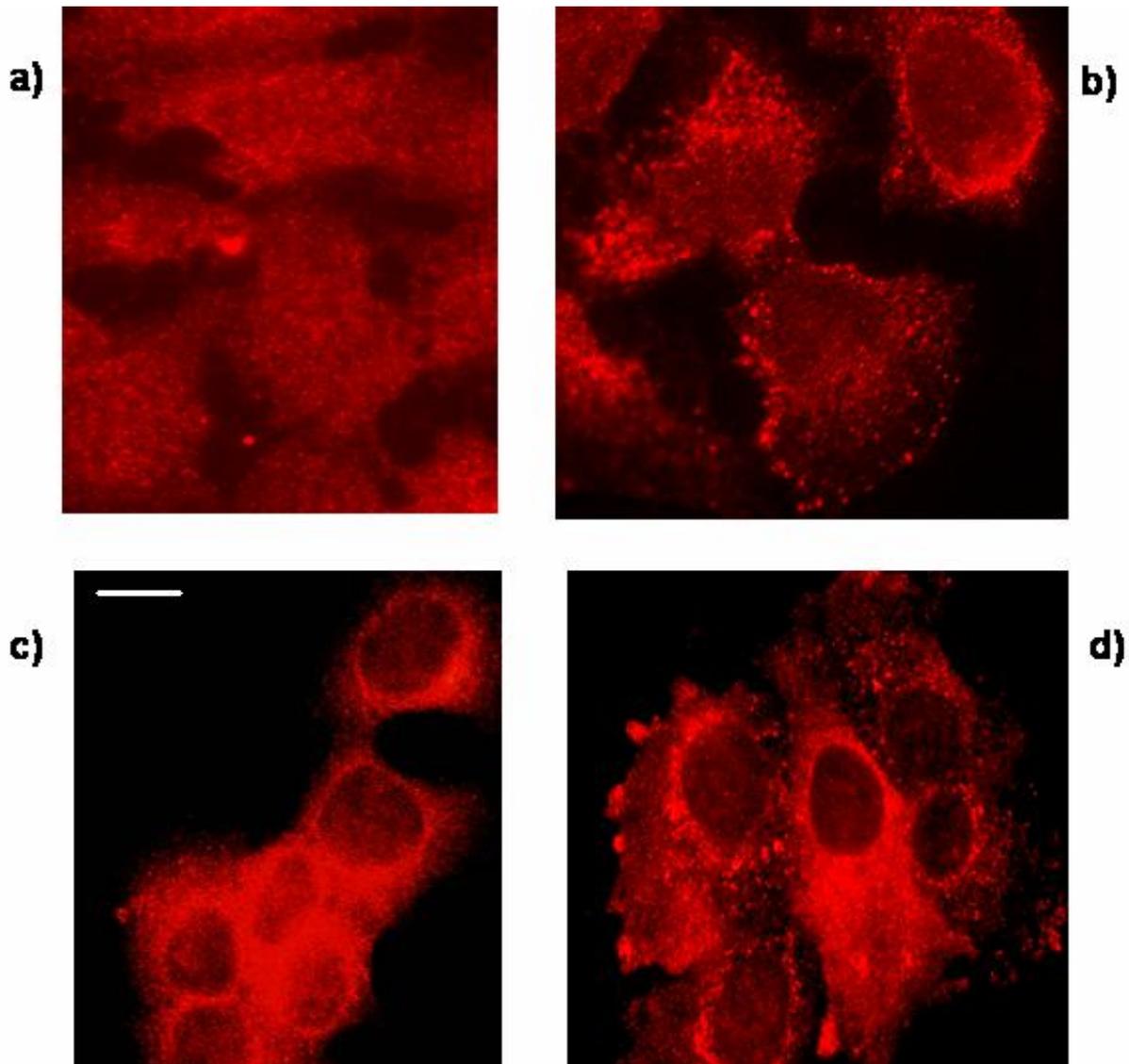


Abb. 4.19. EFNA3-Immunfluoreszenz in MCF-7-Zellen. a) unbehandelte Kontrolle unter Normoxie; b) mit miR-210-Antagomirs behandelte normoxische Probe; c) unbehandelte hypoxische Kontrolle; d) mit miR-210-Antagomirs behandelte hypoxische Probe. Balken: 5 μ m.

Auch in mit Hypoxie und/oder miR-210-Antagomirs behandelten Proben der MCF-10 lässt sich die oben geschilderten Lokalisationen des EFNA3-Proteins beobachten. So können nach der Transfektion der Zellen mit miR-210-Antagomirs Aggregationen sowohl in den hypoxischen als auch in den normoxischen Zellen detektiert werden. Diese Aggregationen bilden sich deutlicher ab als in den MCF-7-Zellen. Sie scheinen darüber hinaus einen größeren Anteil des EFNA3-Proteins einzubeziehen als bei den MCF-7-Zellen, bei denen noch freies EFNA3-Protein als roter Hintergrund zwischen den Aggregationen zu beobachten war. Dieser rote Hintergrund auf der Zellmembran ist bei den MCF-10-Zellen, die mit den miR-210-Antagomirs behandelt wurden (s. Abb. 4.20b und 4.20d) deutlich schwächer.

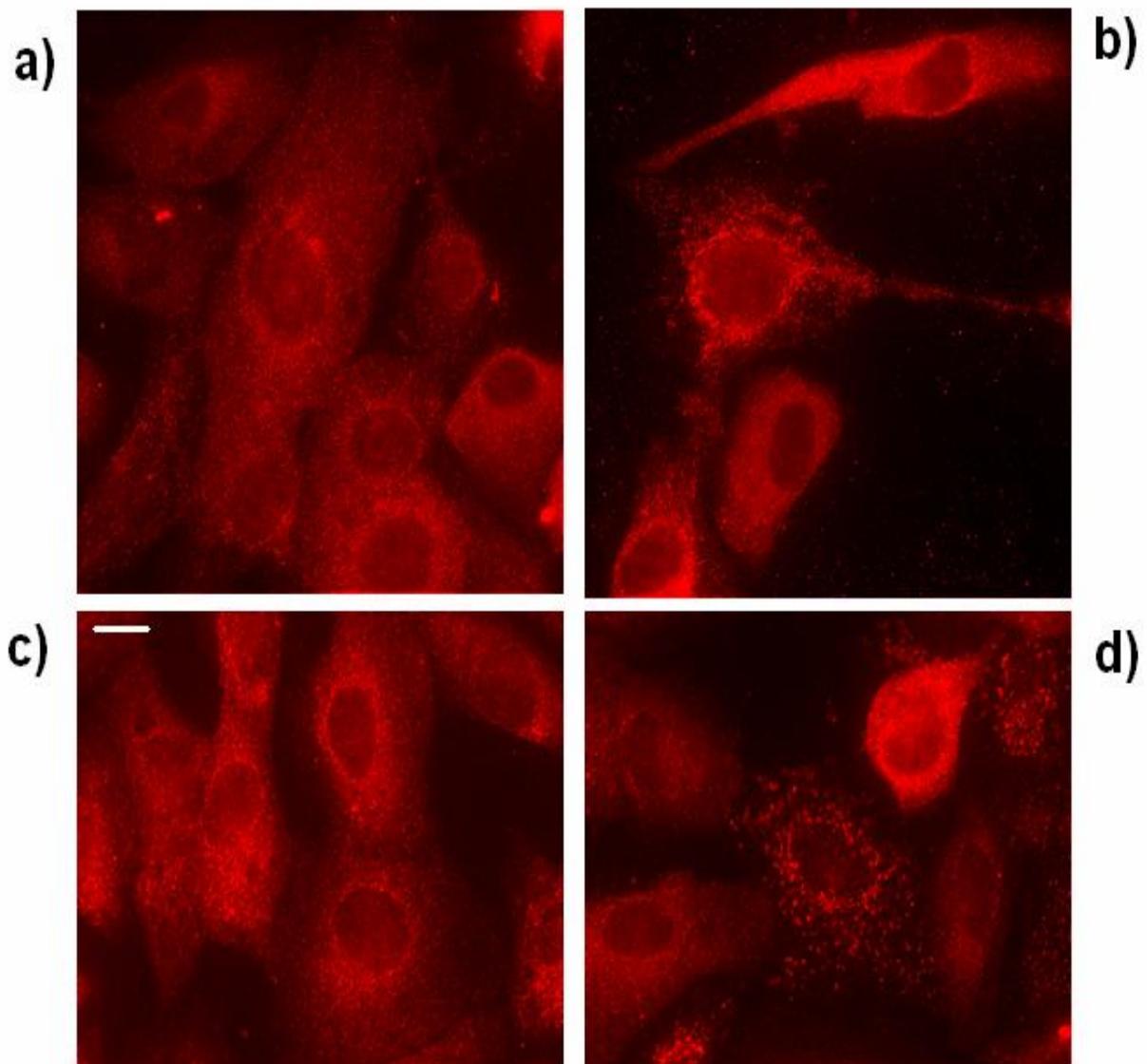


Abb. 4.20. EFNA3-Immunfluoreszenz in MCF-10-Zellen. a) unbehandelte Kontrolle unter Normoxie; b) mit miR-210-Antagomirs behandelte normoxische Probe; c) unbehandelte hypoxische Kontrolle; d) mit miR-210-Antagomirs behandelte hypoxische Probe. Balken: 5 μ m.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulation des EFNA3-Proteins auch in-vitro anhand sekundärer Effekte detektierbar war. Sowohl auf den MCF-7- als auch auf den MCF-10-Zellen konnten gut definierte Aggregationen von EFNA3-Protein bei Inhibierung der konstitutiv exprimierten miR-210 mittels Antagomirs beobachtet werden. Ob diese Aggregationen funktionelle Aufgaben übernehmen oder ein artifizieller Effekt aufgrund der erhöhten EFNA3-Proteinkonzentration sind, bleibt zu klären. Ein weiterer zu beobachtender Effekt ist die Herausbildung eines gut definierten perinukleären Ringes unter Hypoxie bei der MCF-7. Während eine partielle Kernmembranlokalisierung des EFNA3-Proteins in der MCF-

10 auch unter Normoxie vorlag, war dies in der MCF-7-Zelllinie nur unter Hypoxie der Fall. Auch hier bleibt die Frage nach einer möglichen Assoziation des EFNA3-Proteins mit anderen Signalfaktoren und der Mechanismus des Kerntransports offen.

4.5. microRNA-Expression in Tumoren und deren Assoziation zu prognostischen Faktoren

Die prognostische Relevanz von microRNAs für Tumoren konnte in mehreren Studien gezeigt werden und ist für einige microRNAs anerkannt. Bekannteste Beispiele sind die let-7a im Bronchialkarzinom und das miR-17-92-cluster oder das miR-15-16-cluster in chronischer lymphatischer Leukämie (Caelin et al., 2002; Takamizawa et al., 2004; Cho, 2007).

4.5.1. hsa-miR-210 und hsa-miR-325 im Weichteilsarkom

Die Expression von miR-210 und miR-325 wurde in 78 Weichteilsarkomproben mittels qRT-PCR vermessen und die Ergebnisse in multivariaten Cox-Regressions-Analysen zu verschiedenen klinischen Parametern wie Überlebenszeit, Stadium, Tumorart und Alter korreliert. Es findet sich darüber hinaus eine Aufstellung der Kaplan-Meier-Überlebensanalysen und des 5-Jahres-Überlebens im Anhang (Kapitel 8.5.).

Bei der miR-210 wurde eine Terzentilverteilung vorgenommen, die „cut-off-values“ lagen bei 27,0 und 140,0 ($\Delta\Delta C_T$ -Werte). Es ergab sich in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse (adjustiert nach Tumorstadium, -lokalisierung, -entität und Resektionsgrad) bei einer mittleren Expression ein signifikant erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben ($p = 0,017$; RR = 3,19; im Vergleich zu einer hohen miR-210-Expression). Auch für Patienten, deren Tumoren eine niedrige miR-210-Expression zeigten, ergab sich ein um 2,15fach erhöhtes Risiko, am Tumor zu versterben. Dieses Ergebnis war allerdings nicht signifikant ($p = 0,218$).

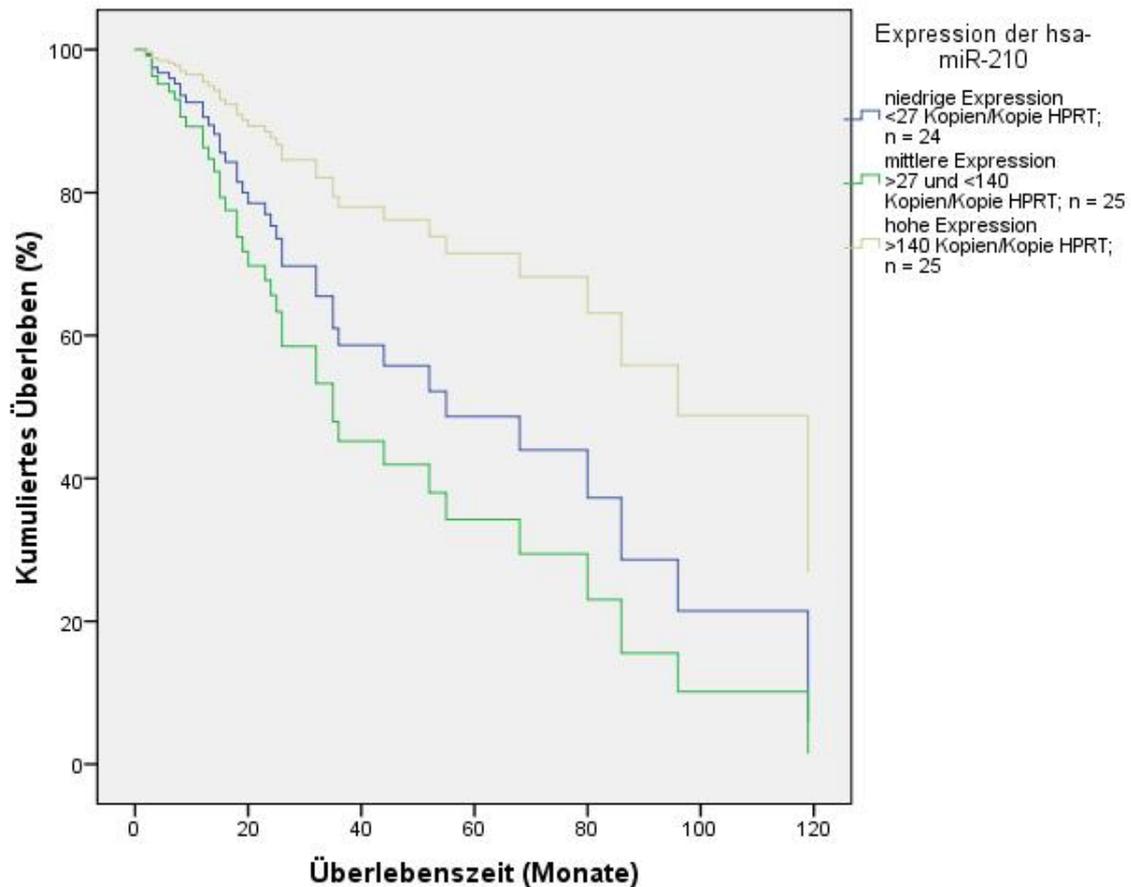


Abb. 4.21. multivariate Cox-Regressionsanalyse: Korrelation der miR-210-Expression mit der Prognose von Weichteilsarkompatienten.

Die miR-325-Expression wurde ebenfalls in drei Gruppen geteilt, wobei die „cut-off-values“ bei Werten von 0,00051 und 0,0082 (Terzentile der $\Delta\Delta C_T$ -Werte) gesetzt wurden. Hier zeigt sich ein anderes Bild als für die prognostische Aussage für die miR-210-Expression. Die Gruppe der Patienten mit einer niedrigen miR-325-Expression hatte die beste Prognose, während Patienten mit mittlerer Expression ein um 3,49fach erhöhtes Risiko hatten, am Tumor zu versterben ($p = 0,019$). Patienten mit einer hohen miR-325-Expression im Tumor zeigten ein 1,55fach erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben, diese Korrelation war allerdings nicht signifikant ($p = 0,439$).

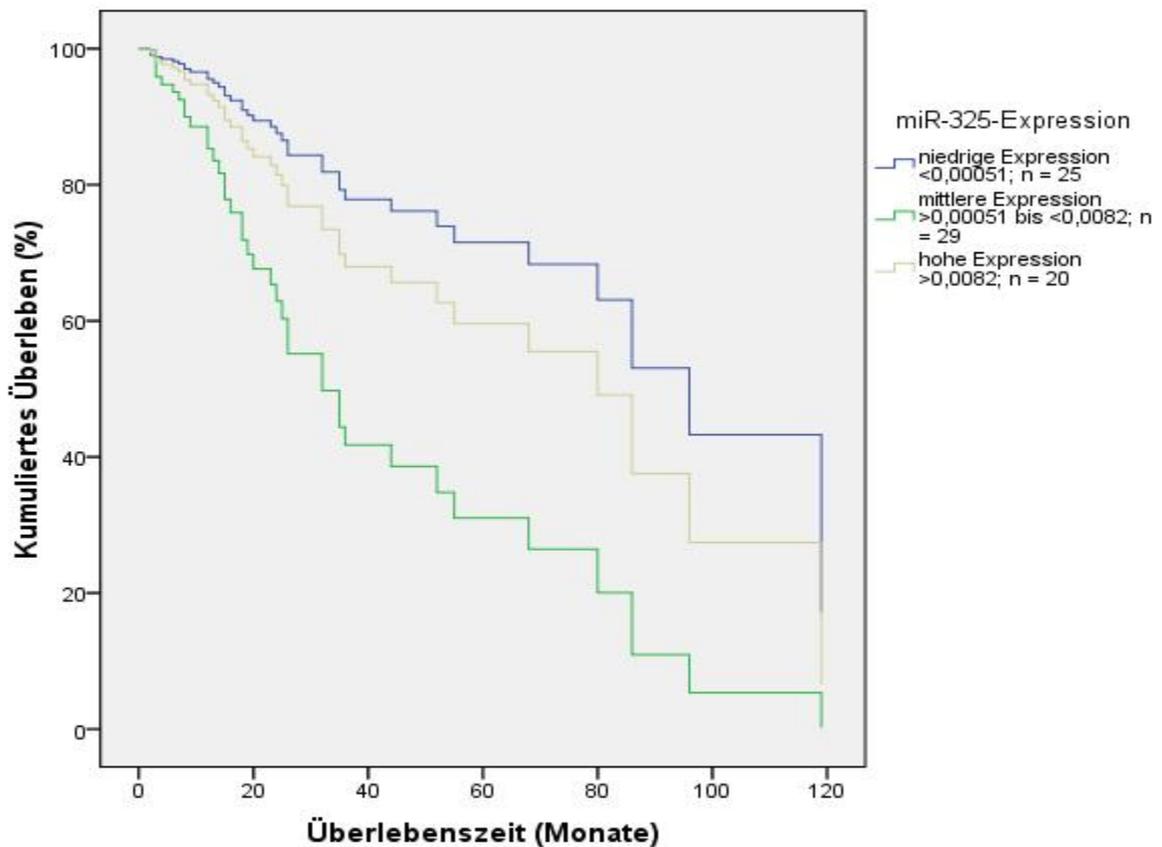


Abb. 4.22. multivariate Cox-Regressionsanalyse der miR-325-Expression in Weichteilsarkompatienten.

In den vorhergehenden Versuchen konnte eine Regulation von EFNA3 durch die miR-210 und von EphA3 durch die miR-325 gezeigt werden. Es sollte die Korrelation beider Transkripte zu den jeweiligen microRNAs auch in der Patientenkohorte untersucht werden. Nach Einteilung in zwei gleiche Gruppen ergab sich in einer bivariaten Korrelation eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Expression des EFNA3- und des EphA3-Transkriptes ($p = 3,04 \cdot 10^{-13}$; $n = 104$). Keine signifikante Korrelation ergab sich zwischen der miR-210- und der EFNA3-mRNA-Expression ($p = 0,143$; $n = 74$) sowie zwischen der miR-325 und der EphA3-mRNA-Expression ($p = 0,711$; $n = 74$). Nach einer Einteilung der EFNA3-mRNA-Expression in drei gleiche Gruppen (Terzentile) trat allerdings eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten miR-210-Expression und einer erhöhten EFNA3-Expression auf ($p = 0,004$; Chi²-Test). Bei Einteilung der EphA3-mRNA-Expression in Terzentile konnte zur miR-325-Expression keine signifikante Korrelation beobachtet werden ($p = 0,344$; Chi²-Test). Weiterhin konnte in einer bivariaten Korrelationsanalyse eine signifikante Korrelation einer erhöhten miR-210-Expression und einer erhöhten HIF-1 α -mRNA-Expression gezeigt werden ($p = 0,017$; HIF-1 α -Daten von Dipl.-Biochem. Svetlana Rot, Klinik für Strahlentherapie). Dieses Ergebnis unterstützt die Befunde von Kulshreshtha

und Kollegen, die eine Regulation von miR-210 über den Hypoxie-induzierten Faktor HIF-1 α zeigen konnten (Kulshreshtha et al., 2007).

Die Expression von EFNA3- oder EphA3-mRNA zeigte in dieser Kohorte Weichteilsarkompatienten keine Korrelation zur Prognose (EFNA3-Median: $p = 0,172$; RR = 1,65; EphA3-Median: $p = 0,336$, RR = 1,35). Auch aus der Aufteilung des Patientenkollektivs in drei Gruppen ergab sich keine Korrelation der EFNA3- und EphA3-mRNA-Expression zu klinischen und prognostischen Faktoren (Daten nicht gezeigt).

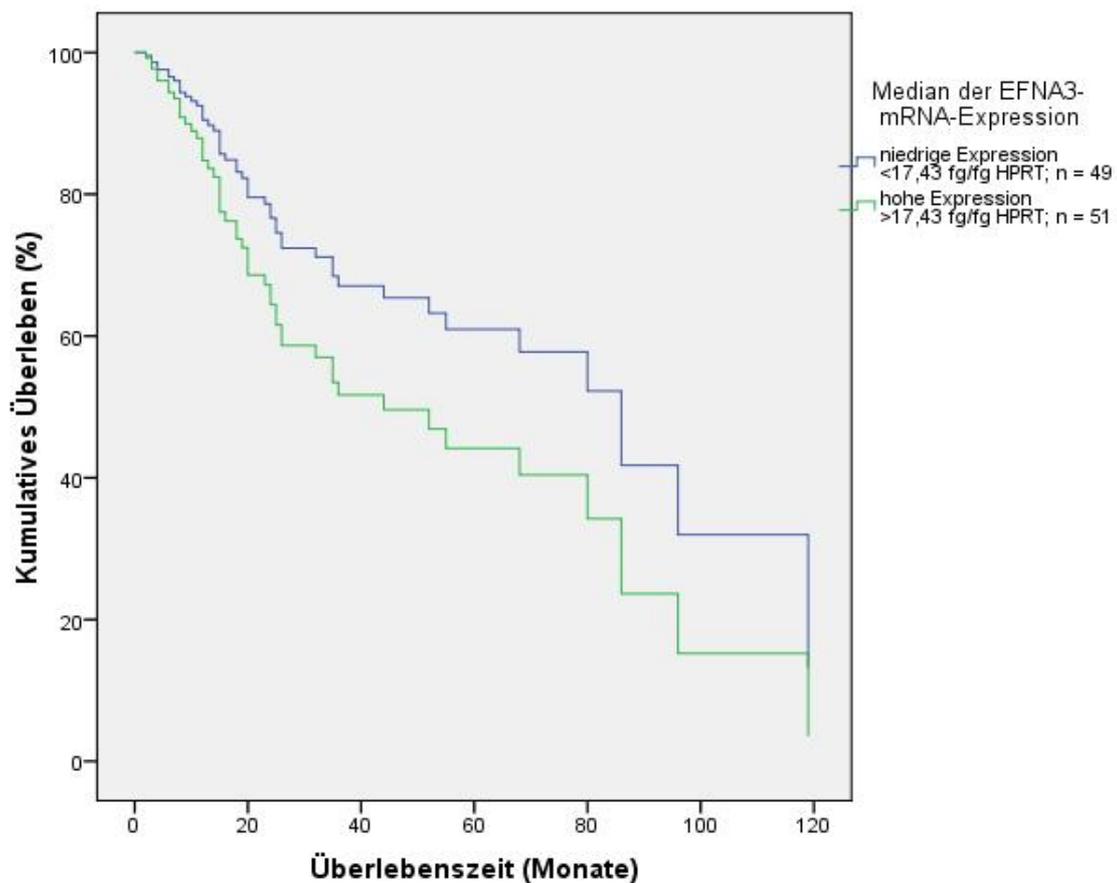


Abb. 4.23. multivariate Cox-Regressionsanalyse: Korrelation der EFNA3-mRNA-Expression mit dem Überleben von Weichteilsarkompatienten

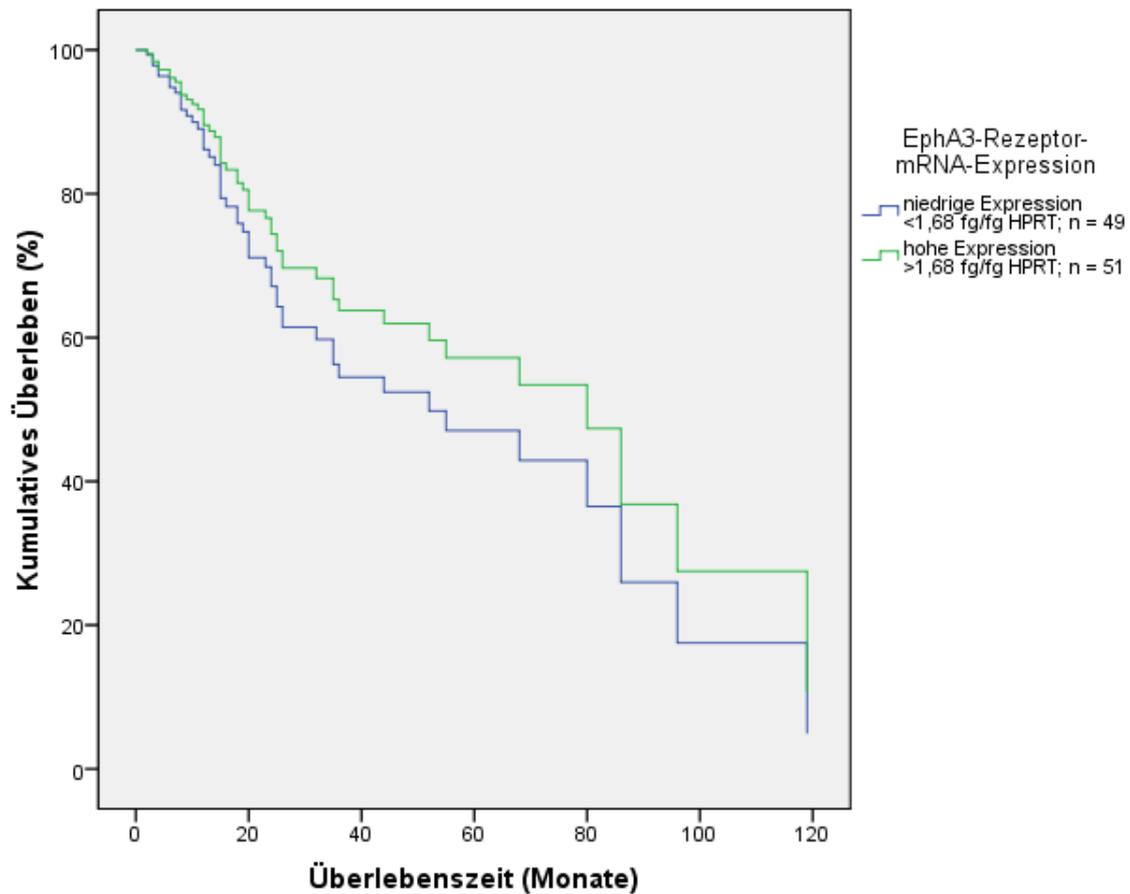


Abb. 4.24. multivariate Cox-Regressionsanalyse: Korrelation der EphA3-mRNA-Expression mit dem Überleben von Weichteilsarkompatienten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die miR-210- und miR-325-Expression, aber nicht die EFNA3- und die EphA3-mRNA-Expression mit dem Überleben von Weichteilsarkompatienten korrelieren. Es ist anzunehmen, dass sowohl miR-210 als auch miR-325 weitere Tumor-relevante Gene/Proteine in ihrer Expression regulieren.

Unsere Daten zeigen nach unserem Wissen erstmals die Relevanz der Expression von microRNAs für die Prognose von Weichteilsarkompatienten. Für die miR-210 wurde darüber hinaus in einer Arbeit von Camps et al. eine prognostische Relevanz der erhöhten Expression für das Überleben von Mammakarzinompatienten detektiert (Camps et al. 2008). Zur Überprüfung weiterer Tumorentitäten wurde die Expression verschiedener tumorassoziierter microRNAs, darunter die miR-210, in einem Subtyp des Pankreaskarzinoms, des duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC), untersucht.

4.5.2. Prognoserelevanz der hsa-miR-210 und anderer microRNAs im PDAC

Obwohl Pankreastumore nur etwa 12% aller diagnostizierten Tumore ausmachen, haben Patienten mit dieser Erkrankung die drittschlechteste Prognose. Etwa 75% aller Pankreastumore sind duktale Adenokarzinome. In verschiedenen Studien wurden die microRNA-Expressionsmuster von diversen Subtypen des Pankreaskarzinoms, auch dem PDAC, mittels microArrays analysiert und mit den Expressionsmustern von Pankreas-Normalgewebe verglichen (Roldo et al., 2006; Bloomston et al., 2007; Lee et al., 2007; Szafranska et al., 2007). Im PDAC wurden vor allem die microRNAs miR-155, miR-203, miR-210 und miR-222 als auffällig stark bzw. die microRNAs miR-216 und miR-217 als auffällig niedrig exprimiert identifiziert (Szafranska et al., 2007).

In multivariaten Cox-Regressionsanalysen sollte nun die Korrelation der Expression der einzelnen microRNAs zur Prognose der Patienten evaluiert werden. Dazu vermaßen wir die Expression der einzelnen microRNAs in einer Kohorte von 55 PDAC-Patienten und bezogen die C_T -Werte auf die C_T -Werte der 18S-rRNA-Expression (die Messungen des Referenzgens wurden durchgeführt von der Firma Roboscreen, Leipzig). Die Expression der einzelnen microRNAs wurde mittels der multivariaten Cox-Regressionsanalyse unter Berücksichtigung des Resektionsstadiums und des Tumorstadiums zum Überleben der Patienten korreliert.

Die einzelnen Gruppen wurden bei allen untersuchten microRNAs gemäß dem Median der Expression eingeteilt. Dieser lag im Falle der miR-155 bei 0,23 (alle Werte ΔC_T -Werte), im Falle der miR-203 bei 0,155, im Falle der miR-210 bei 0,15, im Falle der miR-216 bei 0,25, im Falle der miR-217 bei 0,56 und im Falle der miR-222 bei 0,31. Dementsprechend bestanden die beiden Gruppen im Falle von allen microRNAs aus annähernd der gleichen Anzahl an Patienten, mit einer Ausnahme bei der miR-203. Da hier 4 Patienten den gleichen Expressionswert zeigten, der auch der Schwellenwert war, besteht die Gruppe der niedrig exprimierenden Fälle aus 23 Patienten, die Gruppe der stark exprimierenden aus 27 Patienten. Eine Aufstellung der Kaplan-Meier-Überlebensanalysen und des 5-Jahres-Überlebens für alle analysierten microRNAs findet sich im Anhang (Kapitel 8.6.).

Für die microRNAs miR-155, miR-203, miR-210 und miR-222 ergab sich in den Cox-Regressionsanalysen eine signifikante Korrelation zum Überleben der Patienten (s. Tabelle 4.4). Das relative Risiko, am Tumor zu versterben, war für Patienten mit einer erhöhten Expression der miR-210 im Tumor um das 2,48fache erhöht ($p = 0,005$). Werden die Fälle ausgeschlossen, die aufgrund eines hohen Stadiums (Stadium IV) und/oder einer unvollständigen Resektion (R2) bereits eine sehr schlechte Prognose haben, ist das relative

Risiko bei einer erhöhten miR-210-Expression auf das 2,5fache erhöht. Auch die erhöhte Expression der miR-155, der miR-203 und der miR-222 zeigten eine signifikante Korrelation mit einem schlechteren Überleben der Patienten, die entsprechenden RR-und p-Werte sind in Tabelle 4.4. dargestellt. Im Gegensatz dazu war eine niedrige Expression der miR-217 unter Berücksichtigung aller Fälle mit einem signifikant erhöhten Risiko der Patienten, an ihrem Tumor zu versterben, assoziiert ($p = 0,027$; $RR = 2,33$).

	Parameter	Alle Fälle berücksichtigt	R2/Stadium IV-Fälle ausgeschlossen
miR-155	n	55	45
	p	0,005	0,029
	RR	2,495	2,198
miR-203	n	50	40
	p	0,017	0,023
	RR	2,213	2,288
miR-210	n	55	45
	p	0,005	0,01
	RR	2,478	2,497
miR-216	n	50	40
	p	0,576	0,141
	RR	1,201	1,767
miR-217	n	50	40
	p	0,027	0,066
	RR	2,326	2,179
miR-222	n	52	42
	p	0,035	0,038
	RR	2,05	2,197
Kombination aus miR-155, miR-203, miR-210, und miR-222	n	50	40
	p	0,003	0,034
	RR	6,20	5,238

Tab. 4.4. Multivariate Cox-Regressionsanalyse: Expression verschiedener microRNAs im PDAC in Korrelation zum Überleben von PDAC-Patienten. RR = relatives Risiko, p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant eingeschätzt

Bei einer Kombination der 4 microRNAs, deren verstärkte Expression mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist, ergibt sich ein additiver Verstärkungseffekt auf das Überleben der Patienten. Bei einer erhöhten Expression aller microRNAs ist dann das relative Risiko, am Tumor zu versterben, um das 6,2fache erhöht ($p = 0,003$; gerechnet gegen die Gruppe mit einer niedrigen Expression aller microRNAs). Nach Ausschluss der R2/Stadium IV-Fälle reduziert sich das relative Risiko auf das 5,24fache ($p = 0,034$).

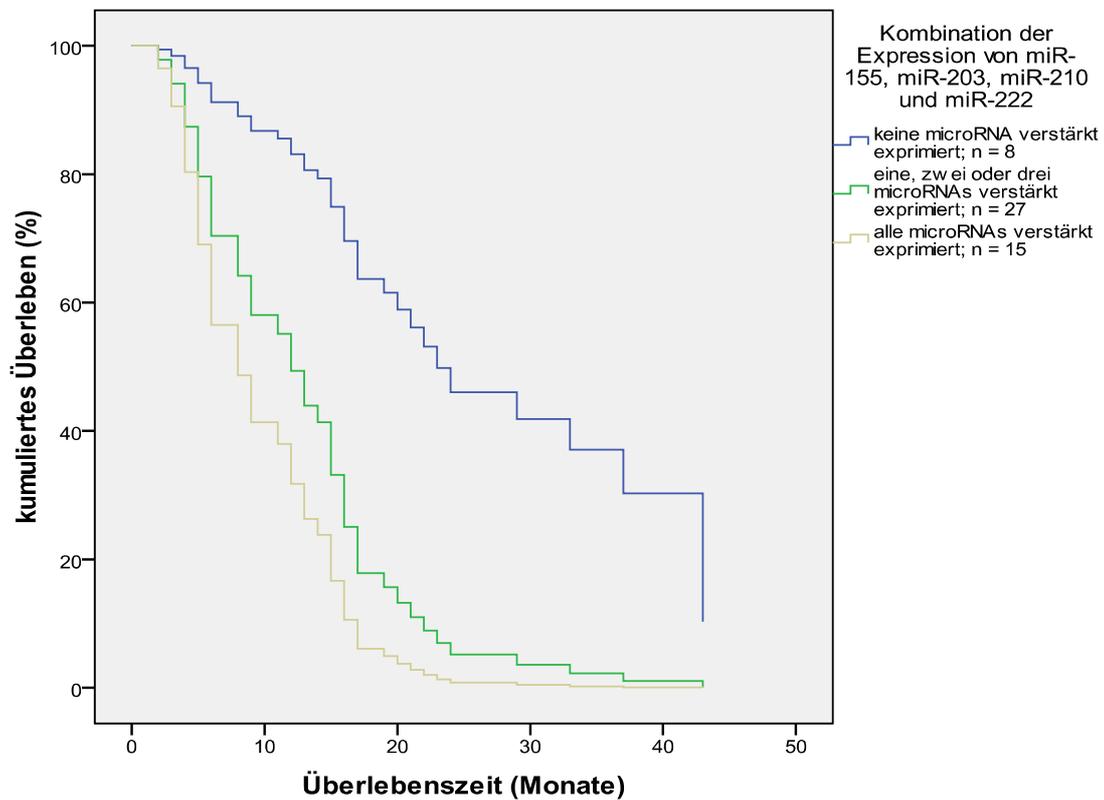


Abb. 4.25. Multivariate Cox-Regressionsanalyse: Kombinierte Expression von miR-155, miR-203, miR-210 und miR-222 korreliert mit schlechterem Überleben von PDAC-Patienten (alle Fälle).

Zusammenfassend ist auch in der Kohorte der PDAC-Fälle eine signifikante Korrelation der Überexpression der miR-210 mit einem schlechteren Überleben zu sehen. Darüber hinaus sind aber auch weitere erhöhte microRNA-Expressionen (miR-155, miR-203, miR-222) mit einer negativen Prognose assoziiert. Bei Kombination der Expression der mit einer schlechten Prognose assoziierten microRNAs miR-155, miR-203, miR-210 und miR-222 erhöhte sich das relative Risiko, am Tumor zu versterben. Dies deutet auf einen additiven Effekt der microRNAs hin, wobei sie möglicherweise in verschiedenen Tumor-relevanten pathways wirken.

5. Diskussion

5.1. Hypoxie-regulierte microRNAs – hsa-miR-210 und hsa-miR-325

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von 156 microRNAs unter Hypoxie und Normoxie in den Zelllinie MCF-7 und MCF-10 mittels quantitativer real-time-PCR untersucht. Die miR-210 wurde dabei unter Hypoxie als mehr als 5fach stärker exprimiert identifiziert, während die miR-325 in beiden Zelllinien mehr als 5fach schwächer exprimiert war.

Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass die miR-210 in einer Anzahl weiterer Zelllinien unter Hypoxie verstärkt exprimiert wird, z.B. in Glioblastomzelllinien (U343, U251), in Ovarialkarzinomzelllinien (SKOV-3, ES-2 und OAW-42) und der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293. Im Verlauf dieser Arbeiten publizierten Kulshreshtha et al. microRNA-Expressionsmuster unter Hypoxie. Sie identifizierten ebenfalls die miR-210 als eine Hypoxie-regulierte microRNA (Kulshreshtha et al. 2007). In MicroArray-Profilen von 4 verschiedenen Zelllinien (MDA-MB-231, MCF-7; HT29, HCT-116) konnten Kulshreshtha et al. nachweisen, dass eine bestimmte Untergruppe von microRNAs, HRM („hypoxia-regulated microRNAs“) genannt, unter Hypoxie verstärkt exprimiert wurden. Kulshreshtha et al. konnten weiterhin zeigen, dass die Aktivierung der miR-210-Expression vom Sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktor HIF-1 α initiiert wird. Auch die Arbeitsgruppe um Camps konnte eine HIF-1 α -abhängige Aktivierung und die erhöhte Expression von miR-210 in weiteren Zelllinien (RCC4, HeLa und Hep3B) unter Hypoxie nachweisen (Camps et al., 2008).

Neben der miR-210 sind weitere, von Kulshreshtha et al. publizierte, HRMs: miR-21, 23a, 23b, 24, 26a, 26b, 27a, 30b, 93, 103, 106a, 107, 125b, 181a, 181b, 181c, 192, 195 und 213. Diese microRNAs zeigten eine einheitliche Überexpression unter Hypoxie in mindestens zwei der untersuchten Brust- und Colonkarzinom-Zelllinien (Kulshreshtha et al., 2007). Diese Liste deckt sich nur in wenigen microRNAs mit den von Hebert et al. in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien unter Hypoxie verstärkt exprimierten microRNAs: miR-7, -15a, -30b, -98, -148a, -148b, -191, -200a, -210, -214, -373, -429, -498, -563, -572, -628, -637, let-7e, -7i, and -7g (Hebert et al. 2007). Neben der miR-210 erscheint nur die miR-30b in beiden Listen. Auch zur Liste der in CNE-Zellen („nasopharyngeal carcinoma cells“) unter Hypoxie detektierten microRNAs gibt es wenig Beziehungen: miR-30d, miR-151, miR-155, miR-181b, miR-188 und miR-210 (Hua et al. 2007). Lediglich die miR-210 und die miR-181b ist sowohl in der

Arbeit von Hua et al. als auch in der Arbeit von Kulshreshtha als unter Hypoxie überexprimiert identifiziert worden. Bedenkt man allerdings den unterschiedlichen zellulären Hintergrund, sind diese Differenzen nicht überraschend. Konsistent zwischen allen Studien und den Ergebnissen dieser Arbeit ist die Überexpression der miR-210 unter Hypoxie in bisher allen untersuchten Zelllinien.

Die Daten zur verminderten Expression von microRNAs unter Hypoxie sind noch uneinheitlicher. Es wurden unter anderem miR-19a, miR-29b, miR-30e-5p, miR-101, miR-122a, miR-141, miR-186, miR-195, miR-197, miR-320, miR-374, miR-422b, miR-424 und miR-565 in Plattenepithelkarzinom-Zellen (Hebert et al. 2007), aber auch miR-15b, miR-16, miR-20b, miR-30b und miR-224 in CNE-Zellen (Hua et al. 2007) als unter Hypoxie herunterreguliert beschrieben. Kulshreshtha et al. konnten in ihren Microarray-Analyse miR-126, miR-128, miR-138, miR-323 und miR-326 als durch Hypoxie herunterreguliert detektieren, allerdings nicht in allen von ihnen untersuchten Zelllinien (Kulshreshtha et al. 2007b). Wir konnten innerhalb dieser Arbeit die miR-325 als unter Hypoxie vermindert exprimiert identifizieren. Interessanterweise findet sich diese verminderte Expression nur in den Zelllinien MCF-7, MCF-10 und HEK 293, während etwa in den verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien die miR-325 deutlich verstärkt exprimiert wurde.

Daten zur Expression von miR-325 sind rar. Lediglich in mikrodissezierten Proben von Plattenepithel-Karzinomen der Zunge wurde miR-325 im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe als 3fach überexprimiert identifiziert (Wong et al. 2008). microRNA-Expressionsprofile mittels MicroArrays von Ambion detektieren eine schwache Expression der miR-325 in den Zelllinien HEK 293, A549 und HepG2, aber in der Zelllinie MCF-7 ist das Detektionssignal der miR-325 nicht stärker als das Negativ-Signal (Daten: www.ambion.com/miRNA). Diese niedrige Expression könnte dazu geführt haben, dass diese microRNA in den meisten MicroArray-Versuchen falsch negativ gewertet wurde und nur in der von uns gewählten Methode der quantitativen real-time-PCR detektierbar war. Auffällig ist in unseren Versuchen die gegenläufige Regulation der miR-325 unter Hypoxie in verschiedenen Zelllinien. Vor allem in den 3 Ovarialkarzinomzelllinien ES-2, OAW-42 und SKOV-3 kommt es unter Hypoxie zu einer deutlichen, mehr als 5fach erhöhten Expression der miR-325, während in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und der Nierenzelllinie HEK 293 eine verminderte Expression detektiert werden kann. Auch die Glioblastomzelllinien U251 und U343 zeigen eine erhöhte miR-325 Expression unter Hypoxie, die allerdings nicht so ausgeprägt ist wie bei den Ovarialkarzinomzelllinien. Die Regulation der microRNA miR-325 unter Hypoxie ist bisher nicht geklärt. Genetische Unterschiede zwischen den

unterschiedlichen Zelllinien, die für diese Beobachtung verantwortlich sein könnten, konnten nicht identifiziert werden. So zeichnen sich etwa die die miR-325 unter Hypoxie vermindert exprimierenden Zelllinien MCF-7, MCF-10 und HEK-293 durch Wildtyp-p53 aus, allerdings auch die die miR-325 unter Hypoxie verstärkt exprimierende Zelllinie OAW-42. Interessanterweise konnte aber Smalheiser und Torvik mittels des Programms RepeatMasker (www.repeatmasker.org) aufzeigen, dass die miR-325 aus einem LINE-2-Element entstanden ist (Smalheiser und Torvik, 2005). Daher wäre Regulation über Transposon-supprimierende Faktoren wie etwa Hiwi (Kalmykova et al., 2005) denkbar, müsste aber am Zellmodell überprüft werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Hypoxie einen starken Einfluss auf die Expression verschiedener microRNAs hat. Vor allem die durch HIF-1 α induzierte verstärkte miR-210-Expression scheint eine essentielle Rolle beim Ansprechen der Zellen auf Hypoxie zu spielen, da sie in allen bisher untersuchten Zelllinien unter Hypoxie verstärkt exprimiert. Dagegen ist die Rolle der miR-325 bei dem Ansprechen der Zellen auf Hypoxie noch zu klären, da sie in verschiedenen Zelllinien unter Hypoxie unterschiedlich reguliert scheint.

5.2. Effekte der modulierten Expression der hsa-miR-210 und hsa-miR-325

Um eine mögliche Therapierelevanz der Hypoxie-regulierten microRNAs zu testen, wurde die Expression dieser microRNAs mittels a) Expressionsvektoren oder b) sequenzgleicher Oligonukleotide (miR-181a, miR-200a, miR-324-5p und miR-325) oder c) Antagomirs (miR-210 und miR-137) moduliert.

Auffällig war bei der Verwendung des Expressionsvektors pcDNA6.2. vor allem, dass allein die Transfektion des Leervektors eine deutliche Verringerung des klonogenen Zellüberlebens unter Hypoxie nach sich zog. Diese Beobachtung könnte auf mögliche „off-target“-Effekte der GFP-mRNA oder flankierender Sequenzen hindeuten, wenn diese in den RNAi-pathway eingeschleust werden. Zumindest lassen diese Effekte Zweifel an der Aussagekraft von Experimenten mit diesem Expressionsvektors zu, daher wurde die Überexpression bestimmter microRNAs durch eine transiente Transfektion von der microRNA sequenzgleiche Oligonukleotide durchgeführt.

Die Überexpression von miR-181a durch Expressionsvektoren und Oligonukleotide resultierte in einer deutlichen Verringerung des klonogenen Zellüberlebens in der MCF-7. Ein tumorsupprimierender Effekt der Re-Expression dieser microRNA ist auch in Glioblastom-Zelllinien beschrieben. Hier induzierte sie eine Wachstumsinhibierung und Apoptose in

Glioblastom-Zelllinien (Shi et al., 2008). Interessanterweise zeigten unsere Ergebnisse, dass die miR-181a unter Hypoxie in der Normal-Zelllinie MCF-10 herunterreguliert wird, während sie in der Tumorzelllinie MCF-7 verstärkt induziert wird. Damit wäre sie ein möglicher Kandidat für die Erklärung der größeren Toleranz der MCF-7 gegenüber hypoxischem Stress. miR-181a kann die Expression von BCL-2, CD69 und dem T-Zell-Rezeptor reprimieren, was ein vermindertes Ansprechen auf extrinsische Apoptose-Signale zur Folge haben kann (Neilson et al., 2007).

Die Überexpression der miR-200a und miR-324-5p zeigte keine signifikanten Effekte auf das klonogene Zellüberleben der MCF-7. Die miR-200-Familie induziert die Epithel-Mesenchym-Transition von Tumorzellen (Gregory et al., 2008; Bracken et al., 2008). Sie könnte in dieser Eigenschaft dazu beitragen, unter Hypoxie Angiogenese-Prozesse zu aktivieren. Die miR-324-5p ist im Hedgehog-Signaling-Pathway aktiv, wo sie die Translation des Transkriptionsfaktors Gli1 reguliert. Die verminderte Expression dieser microRNA in Kombination mit der verminderten Expression der anderen Hedgehog-Komponenten regulierenden microRNAs miR-125b und miR-326 erlaubt die Hedgehog-vermittelte Proliferation von Tumorzellen (Ferretti et al., 2008). Die alleinige Überexpression der miR-324-5p ist aber, wie unsere Versuche zeigen, nicht hinreichend, um die Proliferation zu inhibieren.

Die Überexpression der miR-325 mittels Oligonukleotiden induzierte ein verschlechtertes Überleben der MCF-7-Zellen. Für die miR-325 sind eine Vielzahl an putativen Proteintargets vorhergesagt, die mit Proliferation in Verbindung stehen. Ein möglicher Kandidat ist das „vascular endothelial zinc finger 1“ (VEZF1)-Protein. VEZF1 steht im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der DNA-Methylierungsmuster an vielen verschiedenen Loci. Die Depletion von VEZF1 führt in murinen embryonalen Stammzellen zu einem weitgehenden Verlust der Methylierung (Gohwer et al., 2008). Interessanterweise wird VEZF1 nur in endothelialen Zellen und deren Vorläuferzellen exprimiert (Xiong et al., 1999). Es fungiert darüber hinaus als Transkriptionsfaktor und reguliert etwa die Expression von Endothelin-1, einem vasokonstriktorisches Peptid (Aitseaomo et al., 2001). Im Zusammenhang mit der p75-Neurotrophin-Rezeptor-induzierten Reprimierung der VEZF1-mRNA wurde weiterhin in endothelialen Zellen Apoptose induziert (Caporali et al., 2008). Ein ähnlicher Mechanismus wäre durch eine miR-325-induzierte translationelle Repression des VEZF1-Proteins denkbar. Ein weiteres viel versprechendes putatives Proteintarget der miR-325 ist RICTOR. RICTOR interagiert mit der Integrin-linked kinase (ILK), eine Depletion der beiden Proteine führte in Mammakarzinomzelllinien zur Induktion von Apoptose (McDonald et al., 2008). Ein

interessantes putatives Proteintarget der miR-325 ist EIF2C1, auch als humanes Argonaute-Protein 1 (hAGO1) bekannt. Es handelt sich dabei um ein Mitglied der Ago-Subfamilie der Argonaute-Protein-Familie (Sasaki et al., 2003). Proteine der Ago-Familie interagieren mit siRNAs und microRNAs und formen den RNA-induced silencing complex (RISC), in dem sie die miRNA-mRNA-Interaktion vermitteln (Hutvanger et al., 2002; Martinez et al., 2003; Doi et al., 2003). Die potentiell verstärkte Induktion dieses Faktors in Hypoxie-gestressten Zellen könnte eine Vorbereitung auf eine Transdifferenzierung zu endothelialen Zellen sein oder eine Rolle bei der Translationsinhibierung bzw. dem mRNA-Abbau unter Hypoxie spielen.

Die Effekte der Überexpression von miR-181a und miR-325 auf das zelluläre Überleben der MCF-7 unter Normoxie werden allerdings nicht durch Hypoxie verstärkt. Dies weist darauf hin, dass es sich um einen stress-unabhängigen Mechanismus handelt oder dieser Mechanismus nicht direkt mit dem Zellüberleben unter Hypoxie assoziiert ist. Weitere Untersuchungen sollten Analysen zur Induktion von Angiogenese durch die untersuchten microRNAs und zur Differenzierung der Zellen in Richtung endothelialer Zellen beinhalten.

Die Inhibierung der miR-210 führt in in-vitro-Versuchen zu einem verschlechterten klonogenen Überleben der MCF-7-Zellen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit denen von Fasanaro et al., die ebenfalls eine Verstärkung der Apoptoserate nach Inhibierung der miR-210 feststellen konnten. So induzierte die Inhibierung der miR-210 mittels Antagomirs ein um etwa 35 % verringertes Überleben unter Normoxie bzw. ein um etwa 10% verringertes Überleben unter Hypoxie in HUVEC (human umbilical vascular endothelial cells; Fasanaro et al. 2008). Weiterhin konnte in unserer Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten miR-210-Expression in den Tumoren und einem verschlechterten Überleben bei Pankreaskarzinompatienten detektiert werden. Denselben Zusammenhang beschrieb Camps et al. im Mammakarzinom (Camps et al., 2008). Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die erhöhte miR-210-Expression auch im Zusammenhang mit dem zellulären Überleben von Tumorzellen steht. In unserer in-silico target-Suche (TargetScan und PicTar) konnten keine direkten in die Apoptose-Induktion involvierten Gene identifiziert werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Wirkmechanismus der miR-210 auf der Regulation von Zellzyklus-Arrest induzierenden Genen beruht. Ein verifiziertes Target-Gen, dass mit dieser Funktion zusammenhängt, ist E2F3 (Giannakakis et al., 2007). E2F3 ist ein transkriptioneller Aktivator, der die Expression von Genen reguliert, die für die DNA-Synthese in der G₁/S-Phase benötigt werden. Eine translationelle Repression durch miR-210 könnte dann unter Hypoxie einen Wachstumsstopp induzieren und somit Raum für andere physiologische Prozesse geben. Darüber hinaus identifizierten Giannakakis und Kollegen mittels Luciferase-

Assays „Brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF), „homeobox A3“ (HOXA3), „huntingtin interacting protein B“ (HYPB), „potassium channel modulatory factor“ (KCMF1) and „NADH dehydrogenase (ubiquinone) alpha subcomplex 4“ (NDUFA4) als Zielgene der miR-210. Interessant unter dem Gesichtspunkt des Hypoxie-Ansprechens der MCF-7-Zellen ist dabei BDNF, das eine Doppelfunktion als anti-apoptotischer und pro-angiogener Faktor einnehmen kann. So ist unter anderem ein anti-apoptotischer Effekt des sezernierten BDNF auf B-Lymphozyten sowie ein Absinken der Sekretion des precursor-BDNFs unter Stress-Bedingungen beschrieben (Fauchais et al., 2008). Auf der anderen Seite aktiviert sezerniertes BDNF über den AKT- und ERK1/2-Signalweg die Bildung von Gefäßen aus HUVECs und somit die Angiogenese (Wang et al., 2008). Für den Transkriptionsfaktor HOXA3 konnte gezeigt werden, dass seine Expression, die in mesenchymalen Stammzellen relativ hoch ist, im Laufe der Endothelzell-Differenzierung absinkt (Chung et al., 2007). Auf der anderen Seite kann HOXA3 bei Wundheilungsprozessen verstärkt exprimiert werden, um dann die endotheliale Zellmigration zu stimulieren. Durch diese und eine weitere Stimulation der Matrix-Metalloproteinase-14 und des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptors induziert HOXA3 die Angiogenese (Mace et al., 2005). Folgerichtig ist in Mäusen, die homozygot mutiert für HOXA3 sind, auch die Entwicklung des ventrikulären Systems fehlerhaft, z.B. die Entwicklung der Karotis-Arterie (Kameda et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression des HOXA3-PAX1-Pathways notwendig für das Wachstum epithelialer Zellen ist (Su et al., 2000 und 2001).

Ein weiteres Proteintarget der miR-210 ist das neuronale Pentraxin 1 (NPTX1) (Pulkkinen et al., 2008). Es handelt sich um ein Mitglied einer Klasse von Proteinen, deren Expression fast ausschließlich auf die zentralen Neuronen des Gehirns beschränkt ist (Schlimgen et al., 1995). Die NPTX1-mRNA kann aber auch in weiteren Geweben wie der Lunge, quergestreifter Muskulatur und der Prostata detektiert werden (Unigene-Datenbank: EST-Profil, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.702002>). NPTX1 wird infolge einer hypoxisch-ischämischen Verletzung von neuronalen Zellen verstärkt exprimiert und führt zu dem Tod von 30-40% der Zellen (Hossain et al., 2004). In zentralen Neuronen von Ratten-Hirnen wirkt dementsprechend die Inhibierung von NPTX1 neuroprotektiv gegen einen induzierten Zelltod der Neuronen infolge einer hypoxisch-ischämischen Verletzung (Hossain, 2004).

Interessanterweise verschlechterte die Inhibierung der miR-210 auch das klonogene Überleben von MCF-7-Zellen, die unter Normoxie kultiviert wurden. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die ubiquitär exprimierte miR-210 neben der Vermittlung des Hypoxie-

Ansprechen auch weitere regulatorische Funktionen möglicherweise bei der Proliferationsinduktion und der Apoptose-Inhibierung in der ungestressten Zelle übernehmen kann.

Die Inhibierung der miR-137 führte in unseren Versuchen zu einem auf etwa 65 % verschlechterten klonogenen Zellüberleben. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen induzierte die Transfektion von miR-137-precursor in Glioblastom-Zelllinien einen Zellzyklus-Arrest und daraus resultierend eine Wachstums-Inhibierung (Silber et al., 2008). Auch in Plattenepithelkarzinomzelllinien der Mundhöhle (OSC-Zelllinien) führte die ektotopische Expression von miR-137 zu einer Wachstumsinhibierung (Kozaki et al., 2008). Andererseits reguliert die miR-137 die Expression des Mikrophtalmie-assoziierten Transkriptionsfaktors (MITF) (Bemis et al., 2008). In-vivo-Studien am Tumorgewebe von 104 Melanom-Patienten zeigten eine Assoziation zwischen erhöhter MITF-Expression und reduziertem Überleben (Uqrel et al., 2007). Geringere Level von MITF werden in Melanozyten nötig, um die Zellproliferation und das Überleben zu ermöglichen (Wellbrock et al., 2008), hohe MITF-Level wirken jedoch anti-proliferativ in Melanozyten und inhibieren auch das Wachstum von Melanom-Zellen (Wellbrock et al., 2005). Die durch die Inhibierung der miR-137 ermöglichte verstärkte Translation von MITF stellt somit auch eine mögliche Erklärung für die verringerte Proliferationsrate der behandelten MCF-7-Zellen dar.

Interessanterweise zeigte die Inhibierung der miR-210 weder unter Hypoxie noch unter Normoxie signifikante Auswirkungen auf das klonogene Überleben der MCF-10-Zellen. Der unterschiedliche Einfluss der Antagomirbehandlung auf das klonogene Überleben in den Zelllinien MCF-7 und MCF-10 könnte zelltypspezifisch sein und auf eine unterschiedliche genetische Konstitution der beiden Zellsysteme zurückzuführen sein. In diesem Fall wirkt die miR-210-Inhibierung in der MCF-7 möglicherweise aufgrund fehlender genetischer „backup“-Systeme apoptose-induzierend oder proliferationssupprimierend, während sie in der MCF-10 keine akuten Auswirkungen auf das klonogene Überleben zeigt.

Weiterhin waren die Effekte der einzelnen Inhibierung von miR-210 und miR-137 auf das klonogene Überleben unabhängig von der Sauerstoffversorgung der Zellen, trotz einer Überexpression der miR-210 unter Hypoxie. Es kann aufgrund der Reduktion des klonogenen Überlebens bei kombinierter Inhibierung unter Hypoxie davon ausgegangen werden, dass eine therapeutische Anwendung unter tumorhypoxischen Anwendungen durchaus einen synergistischer Effekt auf das klonogene Zellüberleben haben kann.

Die Kombination des miR-210-Antagomirs mit den Chemotherapeutika Taxol und Cisplatin resultierte nicht in einem additiven Effekt beider Behandlungsarten auf das klonogene

Überleben. Lediglich die Kombination von Taxol mit dem miR-210-Antagomir ergab unter Normoxie ein stark verringertes klonogenes Überleben auf 2,2 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Da dieser Effekt aber unter Hypoxie nicht beobachtet werden konnte und in der Kombination mit Cisplatin nicht auftrat, könnte es sich auch um einen artifiziellen Effekt handeln. Trotzdem ist die Kombination von spezifischen microRNA-Inhibitoren und Chemotherapeutika ein interessanter Ansatz, zu dem bisher wenig Literatur existiert. Es wurde aber der Nachweis erbracht, dass der siRNA-vermittelte „knock-down“ von Dicer zu einer erhöhten Sensitivität der MCF-7 gegen Cisplatin führte (Bu et al., 2009). Möglicherweise lässt sich die Sensitivität von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika durch die selektive Inhibierung bestimmter microRNAs spezifischer manipulieren als durch den globalen Ansatz eines Dicer-„knock-downs“.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inhibierung der miR-137 und der miR-210 bzw. die Überexpression der miR-181a sowie der miR-325 eine Reduktion des klonogenen Überlebens der Tumorzelllinie MCF-7 bewirken und somit mögliche Ansatzpunkte für eine Therapie-Anwendung bieten. Allerdings erreichte keine Anwendung für sich eine vollständige Inhibierung des Zellwachstums, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in jedem Fall bestimmte Zellpopulationen trotz Behandlung weiter wachsen konnten. Eine mögliche Anwendung von Antagomirs bzw. sequenzgleichen Oligonukleotiden der genannten microRNAs ist daher nur in Ergänzung zu konventionellen Therapien sinnvoll.

5.3. hsa-miR-210 und hsa-miR-325 und das Ephrin/Eph-Rezeptor-System

Die in-silico-Untersuchungen zu den Proteintargets der Hypoxie-regulierten microRNAs miR-210 und miR-325 lieferten eine Fülle an potentiellen Zielproteinen. Auffällig war für die miR-210 als target-Protein das Ephrin-A3 (EFNA3). Es wurde im Zusammenhang mit Hypoxie und Hypoxie-Ansprechen der Zelle vor kurzem beschrieben (Fasanaro et al., 2008). In Luciferase-Assays und Western-Blots konnte im Rahmen dieser Arbeit die Regulation der Translation des EFNA3 durch die miR-210 bestätigt werden. Weiterhin war es möglich, den Eph-Rezeptor A3 als ein Proteintarget der miR-325 zu identifizieren. Es handelt sich dabei um einen Interaktionspartner des EFNA3s. Eph-Rezeptoren sind Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und verfügen in ihrer extrazellulären Region über eine Ligand-bindende Domäne mit Immunglobulin-ähnlichen Motiven sowie in ihrer intrazellulären Region über eine Tyrosin-Kinase-Domäne, ein „sterile-alpha“-Motiv und ein PDZ bindendes-Motiv (Cheng et al., 2002). Ihre Liganden, die Ephrine, sind nach Sequenzkonservierung in eine A- und eine B-

Klasse unterteilt. EphrinA-Liganden sind mittels eines Glykosyl-Phosphatidylinositol-Ankers an die Membran gebunden, während EphrinB-Liganden über eine Transmembrandomäne und einen kurzen cytoplasmatischen Rest verfügen. Basierend auf ihren Interaktionen mit den beiden Klassen der Ephrin-Liganden werden auch die Eph-Rezeptoren in eine A- und eine B-Klasse unterschieden, wobei es in einigen Ausnahmefällen auch zu klassenübergreifenden Wechselwirkungen kommt (Himanen et al., 2004; Pasquale et al., 2004). Die Wechselwirkungen resultieren in der Bildung von Multimer-Komplexen, die zu einer verstärkten Signalübertragung führen (David et al., 1994; Stein et al., 1998). Die Eph-Rezeptor-Ephrin-Proteinfamilie übt Funktionen in so vielfältigen Prozessen wie in der Bildung von Nervenverbindungen („axon guidance“), Zelladhäsions- und -abstoßungseffekten, aber auch in der Angiogenese aus (Übersicht bei Cheng et al., 2002; Merlos-Suarez et al., 2008). Dadurch kann diese Proteinklasse auch zur Tumorgenese und -progression beitragen (Übersicht bei Surawska et al., 2004).

Die Zelllinien MCF-7 und MCF-10 exprimierten in unseren Versuchen sowohl EFNA3- als auch EphA3-mRNA. In Übereinstimmung zu unseren Ergebnissen konnte auch von einer anderen Arbeitsgruppe die Expression dieser beiden mRNAs in den genannten Zelllinien nachgewiesen werden (Fox et al., 2004). Wie in unseren Versuchen wird auch bei Fox und Kollegen die EphA3-mRNA in beiden Zelllinien sehr schwach exprimiert und kann nur mittels qPCR detektiert werden. Im Vergleich zwischen beiden Zelllinien ist die mRNA des EphA3-Rezeptor und des EFNA3 in der MCF-7 überexprimiert (Fox et al., 2004).

EFNA3-mRNA ist in vielen Geweben (Lunge, Leber, Milz, Dünndarm, Niere, Blase, Prostata, Uterus, Thymus und Knochenmark) nur schwach exprimiert (Hafner et al., 2004), auffällig stark allerdings in Colon, Gehirn und Haut (Hafner et al., 2006). Darüber hinaus wird die EFNA3-mRNA im humanen Gehirn bereits deutlich stärker exprimiert als in allen Geweben außer der Haut. EFNA3 spielt weiterhin in der Maus eine wichtige Rolle als inhibitorischer Regulator der Neurogenese im adulten Gehirn (Jiao et al. 2008).

In Osteosarkom-Zelllinien konnte nur in einer von neun Linien die Expression von EFNA3-mRNA detektiert werden (Varelias et al., 2002). Demgegenüber konnten wir eine ubiquitäre Expression der EFNA3-mRNA in dem von uns untersuchten Weichteilsarkom-Kollektiv detektieren. Möglich ist, dass sich die Expression der EFNA3-mRNA zwischen Osteo- und Weichteilsarkomen generell unterscheidet oder die von Varelias applizierte Methode der RT-PCR zu wenig sensitiv gegenüber der Expression der EFNA3-mRNA war.

EphA3-mRNA wird verstärkt in Geweben wie Lunge, Dünndarm, Blase, Prostata, Testis und Uterus exprimiert, sehr schwach allerdings in Colon, Knochenmark und Haut (Hafner et al.,

2004 und 2006). EphA3 zeigt in adulten Normalgeweben eine zur EFNA3-mRNA-Expression gegenläufige Verteilung und könnte somit möglicherweise eine antagonistische Rolle spielen. Während keine differentielle Expression der EFNA3-mRNA durch Hypoxie beschrieben ist, ist für EphA3-mRNA bekannt, dass sie durch Hypoxie in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen verstärkt exprimiert wird (Martin-Rendon et al., 2007). Konsistent dazu zeigen unsere Ergebnisse auch eine verstärkte Expression der EphA3-mRNA unter Hypoxie in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnte EFNA3-Protein auch von zwei anderen Arbeitsgruppen als durch die microRNA miR-210 reguliert identifiziert werden (Fasanaro et al., 2008; Pulkkinen et al., 2008). Während Fasanaro et al. im weiteren mittels Western-Blot-Analysen in-vitro eine Reduktion des EFNA3-Protein-Gehalts von HUVEC unter Hypoxie detektierten, beobachteten Pulkkinen et al. mittels Immunhistochemie eine verstärkte Expression von EFNA3-Protein in hypoxisch-ischämischen Schnitten von murinem Gehirngewebe.

Die Reaktion der EFNA3-mRNA-Expression auf Hypoxie ist unterschiedlich in der Literatur beschrieben. In Blasentumor-Xenografts wurde in Reaktion auf die Behandlung mit Hypericin, das hypoxisch wirkt, eine verstärkte Expression von EFNA3-mRNA nach 24 h detektiert (Bhuvaneswari et al., 2008). Im Gegensatz dazu veränderten sich in unseren Versuchen die EFNA3-mRNA-Level in MCF-7-Zellen unter Hypoxie gegenüber denen unter Normoxie nicht signifikant.

Es stellt sich die Frage, ob eine verringerte Expression des EFNA3-Proteins die Angiogenese fördert oder hemmt. Durch eine verstärkte miR-210-Expression unter Hypoxie kommt es zu einer EFNA3-Translations-Inhibierung nach 24 h, die zu einer Stimulation der Gefäßbildung und Chemotaxis der HUVEC führte (Fasanaro et al., 2008). Demgegenüber stellen Pulkkinen et al. eine verstärkte Expression von EFNA3 im murinen Gehirn 3 Tagen nach einer ischämischen Verletzung fest. Diese beiden Befunde müssen sich nicht ausschließen, da von microRNAs bekannt ist, dass sie auch translationsaktivierend wirken können (Vasudevan et al., 2007 und 2008). Nach Vasudevan wirken sie dabei zellzyklusabhängig: In ruhenden Zellen können microRNAs die Expression mancher Zielgene aktivieren, während sie in proliferierenden Zellen die Translation dieser Zielgene reprimieren (Vasudevan et al., 2008). Inwiefern ein solcher Mechanismus für die Regulation des EFNA3-Transkriptes durch die miR-210 gilt, bleibt jedoch noch zu klären.

Ähnlich komplex ist die Wirkung des Eph-Rezeptor-A3/miR-325-Regelkreises. Die verminderte Expression der miR-325 unter Hypoxie in MCF-7 und MCF-10 resultierte in

unserer Arbeit in einer Erhöhung der EphA3-mRNA und des EphA3-Proteins. Eine Überexpression der miR-325 wiederum bewirkte eine Verringerung der EphA3-Protein-Expression auch unter Hypoxie.

In unserem Modell stellt sich die Wirkung der miR-210 und miR-325 unter Hypoxie wie folgt dar (s. auch Fig. 5.1.): Hypoxie stabilisiert die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α , der die verstärkte Transkription der miR-210 induziert (Kulshreshtha et al., 2007; Camps et al., 2008). miR-210 reguliert dann weiterhin verschiedene Proteintargets wie etwa BDNF und E2F3 (Giannakakis et al., 2007), EFNA3 (Fasanaro et al. 2008) oder NPTX1 (Pulkkinen et al., 2008), die Prozesse wie Proliferation, Angiogenese und Zellmigration regulieren. Über einen noch zu identifizierenden hypoxie-regulierten Faktor wird die Transkription von miR-325 in MCF-7 und MCF-10 supprimiert. Dadurch können das von miR-325 regulierte Transkript EphA3 und weitere putative targets wie VEZF1, RICTOR oder EIF2C1 verstärkt translatiert werden und ebenso die Angiogenese, Proliferation und Zellmigration beeinflussen.

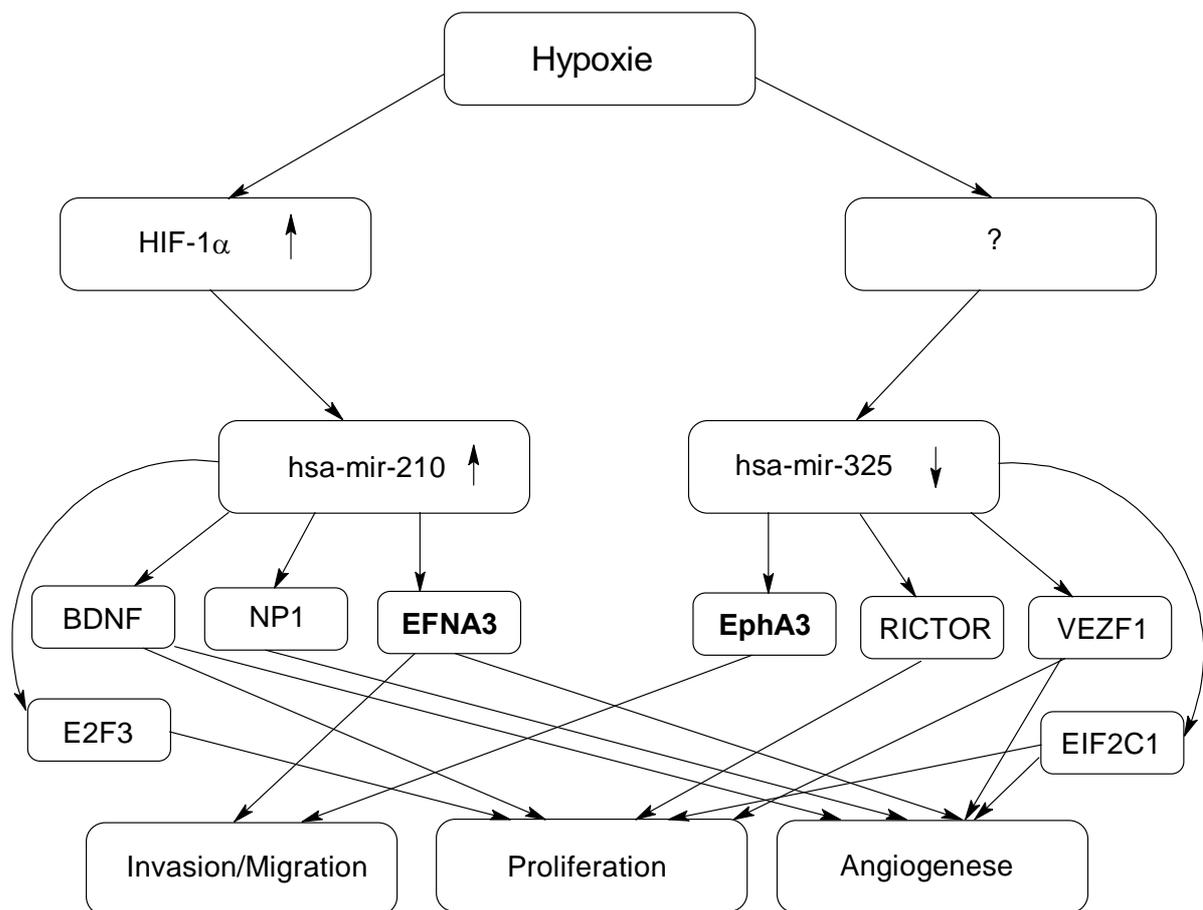


Abb. 5.1. Modell der Hypoxie-Regulation von microRNAs und putativen Proteintargets. Pfeil nach oben = verstärkte Expression; Pfeil nach unten = schwächere Expression.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Hypoxie-induzierten Alterationen im microRNA-Muster eine nachweislich verschiedenen mRNAs reguliert und damit die Stressantwort der Zelle moduliert wird. Smalheiser und Torvik werfen darüber hinaus die Frage auf, ob microRNAs direkt an der Bildung von heterochromatischen Bereichen beteiligt sind, da einige microRNAs, darunter auch die miR-325, von LINE-2-Elementen abstammen und auch chromosomale LINE-2 repeats direkte Targets dieser microRNAs sein könnten (Smalheiser und Torvik, 2005). Zumindest von der Klasse der rasiRNA („repeat-associated small RNAs“) ist bekannt, dass sie direkt mit chromosomalen repeat-Elementen interagieren, um die Bildung und Stabilität von Heterochromatin zu regulieren (Reinhart und Bartel, 2002; Schramke und Allshire, 2004). Die verminderte Expression der miR-325 unter Hypoxie könnte somit auch die Expression von zuvor stillgelegten Genen vorbereiten, wenn bestimmte heterochromatische Bereiche wieder der Transkription zugänglich werden.

5.4. Prognostische Relevanz der untersuchten microRNAs in Tumoren

Die prognostische Relevanz wurde für die miR-210 und miR-325 in Weichteilsarkomen sowie für miR-155, miR-203, miR-210, miR-216, miR-217 und miR-222 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) untersucht. Vor allem die miR-210 zeigte in beiden untersuchten Tumorentitäten eine signifikante Korrelation zum Überleben der Tumorpatienten. Bei Weichteilsarkompatienten ergab eine mittlere miR-210-Expression im Vergleich zu einer niedrigen Expression ein um das 3,2fach erhöhtes Risiko, am Tumor zu versterben. Beim PDAC korrelierte die erhöhte Expression dieser microRNA im Vergleich zu einer geringeren Expression mit einem um das 2,48fach erhöhte Risiko, am Tumor zu versterben.

Die mittlere Expression der miR-325 ergab im Vergleich zur niedrigen Expression für die Weichteilsarkompatienten ein um das 3,5fach erhöhtes Risiko, am Tumor zu versterben. Obwohl diese microRNA generell nur schwach exprimiert wird, hat sie einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten, was für eine relevante Rolle im Zellgeschehen spricht. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden RNA-Menge konnte die Expression und Prognoserelevanz dieser microRNA im PDAC leider nicht untersucht werden.

Sowohl die mittlere Expression der miR-210 wie auch der miR-325 erhöhten somit das Risiko der Weichteilsarkom-Patienten, am Tumor zu versterben, wohingegen eine verstärkte bzw. eine niedrige Expression mit einem besseren Überleben korrelierten. Dieser Befund ist auf den ersten Blick widersprüchlich, kann aber zum einen mit der großen Heterogenität des

Tumorkollektivs erklärt werden, das Sarkomentitäten mit relativ guter Prognose wie das Liposarkom und Entitäten mit schlechter Prognose wie das maligne fibröse Histiocytem (MFH) enthält. Andererseits könnte auch die verstärkte oder verringerte Expression einer microRNA zur Inhibierung von Onkogenen oder für den Metabolismus relevanten Genen beziehungsweise zur Deregulation von Tumorsuppressorgenen führen, die dann die Tumorgenese und –progression hemmen.

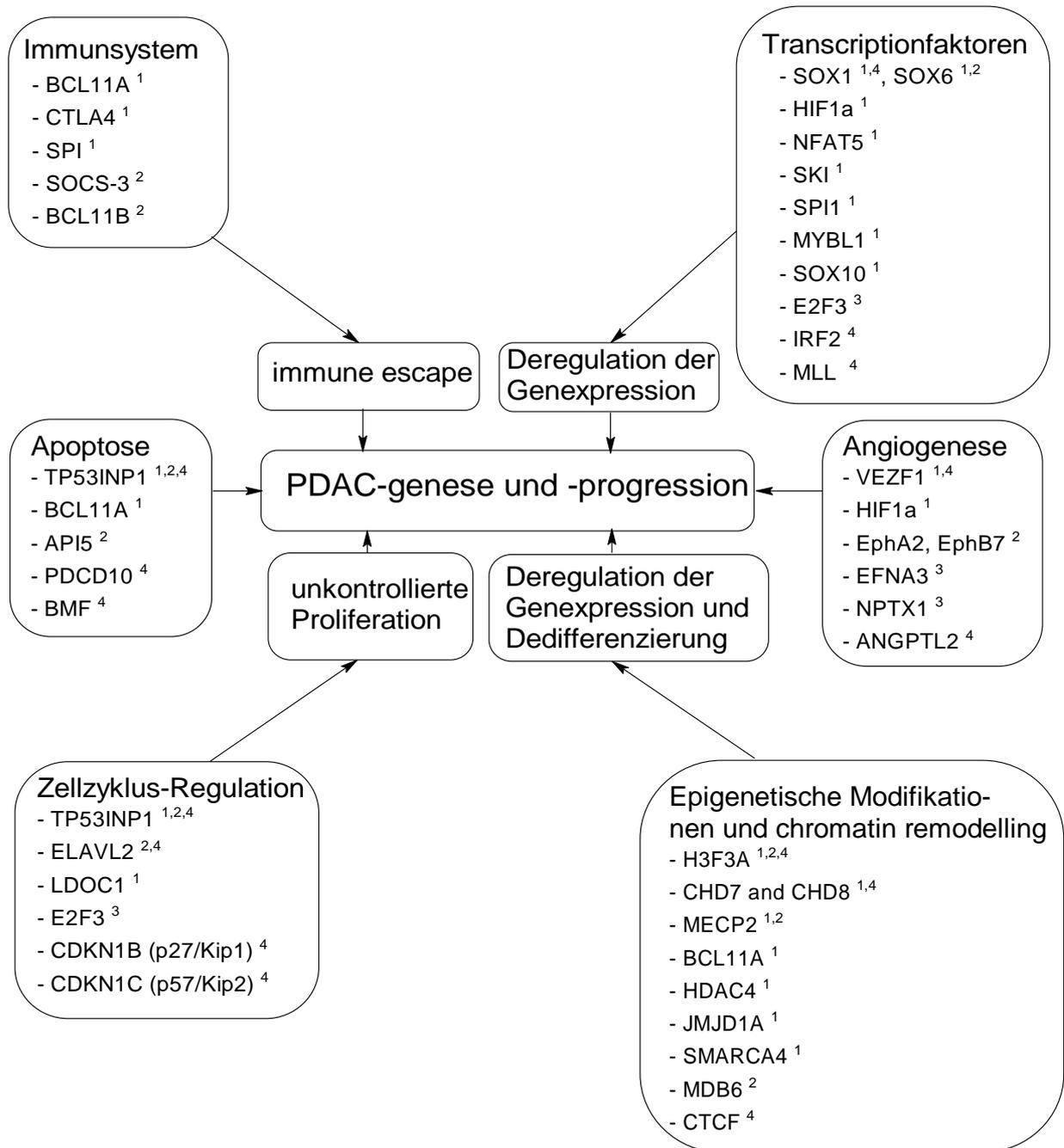


Abb. 5.2. Putative Targets der prognostisch relevanten microRNAs im PDCA. Abkürzungen: ¹ putative Proteintargets der miR-155, ² putative Proteintargets der miR-203; ³ putative Proteintargets der miR-210; ⁴ putative Proteintargets der miR-222.

Im PDAC korrelierte eine erhöhte Expression der miR-210 mit einem verschlechterten Überleben. Hier wurde das Patientenkollektiv gemäß dem Median in zwei Gruppen geteilt. Konsistent dazu ist die Studie von Camps et al., die eine verschlechterte Prognose von Mammakarzinompatienten bei erhöhter miR-210-Expression ergab (Camps et al., 2008).

Neben der miR-210 zeigten weitere microRNAs eine Prognose-Relevanz für PDAC-Patienten. Darunter waren bereits als Onkogen bekannte microRNAs wie die miR-155 (reviewed in Jay et al., 2007) und die miR-222, aber auch die noch nicht mit einer Prognoserelevanz in Verbindung gebrachte miR-203. Eine Liste putativer Proteintargets dieser microRNAs findet sich im Anhang (Tab. 8.4). In Fig. 5.2. ist modellhaft dargestellt, wie die einzelnen microRNAs im PDAC über die Regulation ihrer Proteintargets essentielle Funktionen wie Proliferation, Apoptose, Invasion und „immune escape“ beeinflussen können. Aufgrund der hohen Anzahl an regulierten Proteintargets ist es vorteilhafter, von microRNA-regulierten Tumorpathways zu sprechen (Gusev et al., 2007). Die Identifikation solcher Pathways bedarf allerdings spezieller bioinformatischer Methoden und kann in dieser Arbeit nur angerissen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir in dieser Arbeit erstmals eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von miR-210 oder miR-325 und dem Überleben von Weichteilsarkompatienten zeigen konnten. Auch die Korrelation der Überexpression von miR-155, miR-203, miR-210 oder miR-222 mit dem Überleben von PDAC-Patienten ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Diese Befunde zeigen, dass diese microRNAs nicht nur in zellphysiologischer Hinsicht eine neue Regulationsebene beim Ansprechen von Zellen auf Umweltstress darstellen, sondern auch als prognostische Faktoren und mögliche Ansatzpunkte für neue Therapieoptionen in der klinischen Praxis interessant sind.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollten die Veränderungen im microRNA-Expressionsmuster der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und der Brustepithel-Zelllinie MCF-10 unter Hypoxie untersucht werden. Von den 156 untersuchten microRNAs zeigten in der MCF-7 60 microRNAs (38,5 %) eine auffällige Regulation unter Hypoxie. In der MCF-10 waren mit 94 microRNAs (60,3 %) deutlich mehr microRNAs durch Hypoxie reguliert. Die stärkste Regulation unter Hypoxie zeigte in beiden Zelllinien die microRNA miR-210, die in der MCF-7 6,5fach und in der MCF-10 6,1fach verstärkt exprimiert wurde, und die miR-325, die in der MCF-7 5,5fach und in der MCF-10 15,9fach schwächer exprimiert vorlag. Beide microRNAs waren in drei unabhängigen biologischen Triplikaten signifikant reguliert und können daher als Hypoxie-regulierte microRNAs betrachtet werden.

Im nächsten Schritt sollten die Effekte einer Inhibierung der miR-210 bzw. einer Überexpression der miR-325 auf das klonogene Überleben der MCF-7-Zellen unter Hypoxie analysiert werden. Die Inhibierung der miR-210 verringerte das klonogene Zellüberleben auf 59,6 % (Normoxie) bzw. auf 45 % (Hypoxie). In Kombination mit einer Inhibierung der miR-137 wurde eine Reduktion auf 57,2 % (Normoxie) bzw. 36,0 % (Hypoxie) erreicht. Eine Kombination von miR-210-Antagomirs mit den Chemotherapeutika Cisplatin oder Taxol ergab allerdings keine signifikanten kombinierte Effekte.

Die Suche nach möglichen Proteintargets der miR-210 ergab 21 putative Zielproteine (nach dem Suchalgorithmus TargetScan) und zusätzlich weitere 13 putative Zielproteine (nach dem Suchalgorithmus PicTar). Auffällig waren einige mit Hypoxie in Verbindung gebrachte Proteine wie BDNF („brain-derived neurotrophic factor“), EFNA3 (Ephrin-A3) und NPTX1 (neuronales Pentraxin 1). Als putative Zielproteine der miR-325 konnte unter anderem das Hypoxie-assoziierte Gen EphA3 (Ephrin-Rezeptor A3) identifiziert werden. Es sollten die Gene EFNA3 und EphA3 sowie BDNF und RASSF1A (putatives Proteintarget der miR-210 in der Datenbank miRBase) verifiziert werden.

Die Verifizierung dieser Proteintargets erfolgte über quantitative real-time-PCR und Western-Blots (EphA3) bzw. über Luciferase-Assays und Western-Blot (EFNA3). Für BDNF und RASSF1A konnte in Western-Blot-Analysen keine Regulation der Translation durch die miR-210 nachgewiesen werden.

Im letzten Arbeitsabschnitt sollte die prognostische Relevanz der miR-210 und miR-325-Expression in Weichteilsarkomen untersucht werden. Eine mittlere miR-210-Expression korrelierte dabei signifikant mit einem erhöhten Risiko, am Tumor zu versterben ($p = 0,017$;

RR = 3,19; im Vergleich zu Patienten mit einer erhöhten Expression). Eine mittlere miR-325-Expression korrelierte ebenfalls signifikant mit einem erhöhten Risiko, am Tumor zu versterben ($p = 0,019$; RR = 3,49; im Vergleich zur Gruppe mit einer niedrigen miR-325-Expression). In einer Subgruppe des Pankreaskarzinoms, dem duktalem Adenokarzinom (PDAC), ist eine erhöhte Expression der miR-210 mit einem erhöhten Risiko, am Tumor zu versterben, korreliert ($p = 0,005$; RR = 2,48 bei Berücksichtigung aller Fälle; $p = 0,01$; RR = 2,50 bei Ausschluss der Fälle mit schlechter Prognose (R2/StadiumIV)).

Zusammenfassend konnten die miR-210 und die miR-325 als Hypoxie-regulierte microRNAs identifiziert werden, die in der Modulation des Hypoxie-Ansprechens von Zellen in-vitro eine wichtige Rolle spielen und deren Expression darüber hinaus in Weichteilsarkomen und PDAC prognostische Relevanz besitzt.

Anschließend an diese Arbeit stellen sich einige interessante Fragestellungen. Zum einen ist es notwendig, weitere Proteintargets der Hypoxie-regulierten microRNAs miR-210 und miR-325 zu verifizieren, um ein detaillierteres Bild der möglichen „downstream“-Prozesse nach der Hypoxieeinwirkung zu erhalten. Zudem könnte in in-vivo-Tumormodellen die Effekte einer Hemmung der miR-210 sowie die Überexpression der miR-181a und der miR-325 als mögliche Therapieoptionen studiert werden. Auch die Proteintargets der miR-210 und der miR-325, Ephrin-A3 und Eph-Rezeptor A3 könnten in einem Angiogenesemodell wie etwa dem CAM-Modell mittels Antagonisten gehemmt und die Effekte dieser Hemmung auf die Gefäßneubildung analysiert werden. Darüber hinaus könnten die Effekte einer kombinierten Behandlung mehrerer microRNA-Inhibitoren mit Chemotherapeutika oder auch einer Radiotherapie auf das klonogene Überleben an weiteren Zelllinien untersucht werden.

Weiterhin ist die Suche nach einem putativen Mediator der starken Regulation der miR-325 unter Hypoxie ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis des Einflusses von Hypoxie auf die microRNA-Expression. Interessant wäre die Frage, ob mittels der Überexpression von Regulationsfaktoren der transponiblen Elemente des Genoms wie Hiwi eine Reduktion der miR-325-Expression sowie der Expression weiterer microRNAs, die aus Transposons entstanden sind, erreicht werden kann.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die miR-210 und die miR-325 auch in anderen Tumorarten prognostische Relevanz besitzen und ob sie möglicherweise mit weiteren klinischen Verlaufsfaktoren wie Metastasierung und Rezidivbildung assoziiert sind.

7. Literatur

Ahlgren JD. Chemotherapy for pancreatic carcinoma. *Cancer*. 1996;78:654-63.

Aitsebaomo J, Kingsley-Kallesen ML, Wu Y, Quertermous T, Patterson C. Vezf1/DB1 is an endothelial cell-specific transcription factor that regulates expression of the endothelin-1 promoter. *J Biol Chem*. 2001;276:39197-205.

Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res*. 2001;61:6548-54.

Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*. 2005;121:207-21.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988;53:549-54.

Amendola BE, Amendola M., McClatchey KD. Radiation-associated sarcoma: a review of 23 patients with postradiation sarcoma over a 50 year period. *American Journal of Clinical Oncology*. 1989;12:411-420.

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:12969-73.

Bárdos JI, Chau NM, Ashcroft M. Growth factor-mediated induction of HDM2 positively regulates hypoxia-inducible factor 1alpha expression. *Mol Cell Biol*. 2004;24:2905-14.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97.

Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey DG, Erickson PF, Shellman YG, Robinson WA. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Res*. 2008;68:1362-8.

Berkey CS, Frazier AL, Gardner JD, Colditz GA Adolescence and breast carcinoma risk. *Cancer*. 1999;85:2400-9.

Berns EM, Foekens JA, van Putten WL, van Staveren IL, Portengen H, de Koning WC, Klijn JG. Prognostic factors in human primary breast cancer: comparison of c-myc and HER2/neu amplification. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992;43:13-9.

Bhuvaneshwari R, Gan YY, Lucky SS, Chin WW, Ali SM, Soo KC, Olivo M. Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. *Mol Cancer*. 2008;7:56.

- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007;297:1901-8.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10:185-91.
- Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR, Fearon ER. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol*. 2007;17:1298-307.
- Borg A, Sandberg T, Nilsson K, Johannsson O, Klinker M, Måsbäck A, Westerdahl J, Olsson H, Ingvar C. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1260-6.
- Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2008;68:7846-54.
- Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett*. 2007;581:3582-91.
- Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, Gemmill RM, Drabkin HA, Franklin WA. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:2417-28.
- Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:180-92.
- Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res*. 1996;56:941-3.
- Brody LC, Biesecker BB. Breast cancer susceptibility genes. BRCA1 and BRCA2. *Medicine (Baltimore)*. 1998;77:208-26.
- Bu Y, Lu C, Bian C, Wang J, Li J, Zhang B, Li Z, Brewer G, Zhao RC. Knockdown of Dicer in MCF-7 human breast carcinoma cells results in G1 arrest and increased sensitivity to cisplatin. *Oncol Rep*. 2009;21:13-7.
- Burgess AW. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors*. 2008;26:263-74.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10:1957-66.
- Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res*. 1994;54:3568-73.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15524-9.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2999-3004.

Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, Ragoussis J. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1340-8.

Caporali A, Pani E, Horrevoets AJ, Kraenkel N, Oikawa A, Sala-Newby GB, Meloni M, Cristofaro B, Graiani G, Leroyer AS, Boulanger CM, Spinetti G, Yoon SO, Madeddu P, Emanuelli C. Neurotrophin p75 receptor (p75NTR) promotes endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: implications for diabetes-induced impaired neovascularization in ischemic limb muscles. *Circ Res*. 2008;103:e15-26.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249-57.

Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2002;16:2733-42.

Cathomas G. Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV)/Human Herpesvirus 8 (HHV-8) as a Tumour Virus. *Herpes* 2003; 10:72-77.

Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*. 2002;16:2491-6.

Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AM, Tops BB, Silva JM, Myers MM, Hannon GJ, Plasterk RH. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature*. 2003;425:411-4.

Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004;10:858-64.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005;65:6029-33.

Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*. 2007;26:745-52.

Cheng N, Brantley DM, Chen J. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:75-85.

Cheng N, Brantley DM, Liu H, Lin Q, Enriquez M, Gale N, Yancopoulos G, Cerretti DP, Daniel TO, Chen J. Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis. *Mol Cancer Res.* 2002;1:2-11.

Chi JT, Wang Z, Nuyten DS, Rodriguez EH, Schaner ME, Salim A, Wang Y, Kristensen GB, Helland A, Børresen-Dale AL, Giaccia A, Longaker MT, Hastie T, Yang GP, van de Vijver MJ, Brown PO. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med.* 2006;3:e47.

Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer.* 2007;6:60.

Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci.* 2002;17:581-8.

Chung N, Jee BK, Chae SW, Jeon YW, Lee KH, Rha HK. HOX gene analysis of endothelial cell differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Biol Rep.* 2009;36:227-35.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:13944-9.

Dachs GU, Patterson AV, Firth JD, Ratcliffe PJ, Townsend KM, Stratford IJ, Harris AL. Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat Med.* 1997;3:515-20.

Dang LH, Bettegowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:15155-60.

Dean-Colomb W, Esteva FJ. Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer.* 2008;44:2806-12.

Denko NC, Green SL, Edwards D, Giaccia AJ. p53 checkpoint-defective cells are sensitive to X rays, but not hypoxia. *Exp Cell Res.* 2000;258:82-91.

Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:705-13.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432:231-5.

Deramaudt T, Rustgi AK. Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1756:97-101.

- Dickson RB, Bates SE, McManaway ME, Lippman ME. Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1986;46:1707-13.
- Doi N, Zenno S, Ueda R, Ohki-Hamazaki H, Ui-Tei K, Saigo K. Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr Biol.* 2003;13:41-6.
- Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:3627-32.
- Elliot P, Kleinschmidt I. Angiosarcoma of the liver in Great Britain in proximity to vinyl chloride sites. *Occupational Environmental Medicine* 1997; 54:14-22.
- Enzinger FM, Weiss SW. *Soft tissue tumors.* 3rd Edition. St. Louis, Mosby. 1995.
- Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature.* 2006;440:1222-6.
- Evans AJ, Russell RC, Roche O, Burry TN, Fish JE, Chow VW, Kim WY, Saravanan A, Maynard MA, Gervais ML, Sufan RI, Roberts AM, Wilson LA, Betten M, Vandewalle C, Berx G, Marsden PA, Irwin MS, Teh BT, Jewett MA, Ohh M. VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol Cell Biol.* 2007;27:157-69.
- Farshadpour F, Schapveeld M, Suurmeijer AJH, Wymenga ANM, Otter R, Hoekstra HJ. Soft tissue sarcomas: why not treated? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2004; 54:77-83.
- Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, Capogrossi MC, Martelli F. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem.* 2008;283:15878-83.
- Fauchais AL, Lalloué F, Lise MC, Boumediene A, Preud'homme JL, Vidal E, Jauberteau MO. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol.* 2008;181:3027-38.
- Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, Paganelli A, Di Marcotullio L, Caffarelli E, Screpanti I, Bozzoni I, Gulino A. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J.* 2008;27:2616-27.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4604-13.
- Fox BP, Kandpal RP. Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318:882-92.

- Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer*. 2005;41:2213-36.
- Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, Li C, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Weber BL, Simon C, Coukos G, Zhang L. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*. 2008;7:255-64.
- Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pébusque MJ, Dusetti NJ. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:16170-5.
- Goerke K, Valet A. *Geburtshilfe und Gynäkologie*. Urban und Fischer Verlag. 2002.
- Goggins M, Offerhaus GJ, Hilgers W, Griffin CA, Shekher M, Tang D, Sohn TA, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol*. 1998;152:1501-7.
- Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther*. 1999;21:309-18.
- Gowher H, Stuhlmann H, Felsenfeld G. Vezf1 regulates genomic DNA methylation through its effects on expression of DNA methyltransferase Dnmt3b. *Genes Dev*. 2008;22:2075-84.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 1996;379:88-91.
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*. 2001;51:15-36.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432:235-40.
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*. 2008;10:593-601.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001;106:23-34.
- Gross JL, Younes RN, Haddad FJ, Deheinzelin D, Pinto CAL, Costa MLV. Soft-Tissue Sarcomas of the Chest Wall. *Chest* 2005; 127:902-908.

- Gusev Y, Schmittgen TD, Lerner M, Postier R, Brackett D. Computational analysis of biological functions and pathways collectively targeted by co-expressed microRNAs in cancer. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:S16.
- Hafner C, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, Dietmaier W, Landthaler M, Vogt T. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem*. 2004;50:490-9.
- Hafner C, Becker B, Landthaler M, Vogt T. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and downregulation of EphA1 in nonmelanoma skin cancer. *Mod Pathol*. 2006;19:1369-77.
- Hahn SA, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Schutte M, Rozenblum E, Seymour AB, Weinstein CL, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 1996;56:490-4.
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*. 2001;2:110-9.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18:3016-27.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
- Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:38-47.
- Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*. 2005;65:9628-32.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5:522-31.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435:828-33.
- He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447:1130-4.
- Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2007;6:5.
- Herzog C. Overview of Sarcomas in the Adolescent and Young Adult Population. *Journal of Pediatric Hematologic Oncology* 2005; 27:215-218.

Hickey MM, Simon MC. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol.* 2006;76:217-57.

Hilakivi-Clarke L. Estrogens, BRCA1, and breast cancer. *Cancer Res.* 2000;60:4993-5001.

Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB. Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci.* 2004;7:501-9.

Höckel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol.* 1993;26:45-50.

Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996;56:4509-15.

Höckel M, Schlenger K, Höckel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res.* 1999;59:4525-8.

Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:266-76.

Hossain MA, Russell JC, O'Brien R, Latterra J. Neuronal pentraxin 1: a novel mediator of hypoxic-ischemic injury in neonatal brain. *J Neurosci.* 2004;24:4187-96.

Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav.* 2005;7:204-13.

Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol.* 1993;143:545-54.

Hruban RH, Offerhaus GJ, Kern SE, Goggins M, Wilentz RE, Yeo CJ. Tumor-suppressor genes in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1998;5:383-91.

Hruban RH, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Falatko F, Yeo CJ, Kern SE. Familial pancreatic cancer. *Ann Oncol.* 1999;10:69-73.

Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, Ji Y, Zhao C, Wang J, Yang BB, Zhang Y. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS ONE.* 2006;1:e116.

Hurd C, Khattree N, Dinda S, Alban P, Moudgil VK. Regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, by estrogen and antiestrogens in breast cancer cells. *Oncogene.* 1997;15:991-5.

- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293:834-8.
- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002;297:2056-60.
- Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science*. 2007;315:97-100.
- 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. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:7065-70.
- Ishida T, Kiba T, Takeda M, Matsuyama K, Teramukai S, Ishiwata R, Masuda N, Takatsuka Y, Noguchi S, Ishioka C, Fukushima M, Ohuchi N. Phase II study of capecitabine and trastuzumab combination chemotherapy in patients with HER2 overexpressing metastatic breast cancers resistant to both anthracyclines and taxanes. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 2001;292:464-8.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292:468-72.
- Jay C, Nemunaitis J, Chen P, Fulgham P, Tong AW. miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA Cell Biol*. 2007;26:293-300.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58:71-96.
- Jiao JW, Feldheim DA, Chen DF. Ephrins as negative regulators of adult neurogenesis in diverse regions of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:8778-83.
- Jin P, Alisch RS, Warren ST. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol*. 2004;6:1048-53.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120:635-47.
- Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:865-73.

- Kameda Y, Watari-Goshima N, Nishimaki T, Chisaka O. Disruption of the Hoxa3 homeobox gene results in anomalies of the carotid artery system and the arterial baroreceptors. *Cell Tissue Res.* 2003;311:343-52.
- Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1993;15:36-47.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000;321:624-8.
- Kalmykova A, Klenov MS, Gvozdev VA. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Research* 2005;33:2052-2059.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003;115:209-16.
- Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG, DiPaolo JA, Peehl DM, Giaccia AJ. Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer Res.* 1997;57:4200-4.
- Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen BJ, van den Berg A. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol.* 2005;207:243-9.
- Knowles HJ, Harris AL. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* 2001;3:318-22.
- Kondo A, Safaei R, Mishima M, Niedner H, Lin X, Howell SB. Hypoxia-induced enrichment and mutagenesis of cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 2001;61:7603-7.
- Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, Giaccia AJ. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res.* 2000;60:883-7.
- Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res.* 2008;68:2094-105.
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005;37:495-500.
- Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 2005;438:685-9.
- Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2007;27:1859-67.

- Kulshreshtha R, Ferracin M, Negrini M, Calin GA, Davuluri RV, Ivan M. Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. *Cell Cycle*. 2007;6:1426-31.
- Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med*. 2000;6:1335-40.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294:853-8.
- Lal BK, Varma S, Pappas PJ, Hobson RW 2nd, Durán WN. VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc Res*. 2001;62:252-62.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:858-62.
- Landi S. Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: A review of the literature. *Mutat Res*. 2008 Dec 27. [Epub ahead of print]
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-54.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:862-4.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21:4663-70.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425:415-9.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23:4051-60.
- Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2007;120:1046-54.
- Lemmon MJ, van Zijl P, Fox ME, Mauchline ML, Giaccia AJ, Minton NP, Brown JM. Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene Ther*. 1997;4:791-6.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115:787-98.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120:15-20.
- Lingel A, Sattler M. Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15:107-15.

- Littlewood TJ. The impact of hemoglobin levels on treatment outcomes in patients with cancer. *Semin Oncol.* 2001;28:49-53.
- Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, Vercaemmen E, Rapoport B; Epoetin Alfa Study Group. Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol.* 2001;19:2865-74.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 2004;305:1437-41.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell.* 2002;14:1605-19.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:442-6.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006;20:197-209.
- Lynch HT, Brand RE, Hogg D, Deters CA, Fusaro RM, Lynch JF, Liu L, Knezetic J, Lassam NJ, Goggins M, Kern S. Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer.* 2002;94:84-96.
- Lynch HT, Voorhees GJ, Lanspa SJ, McGreevy PS, Lynch JF. Pancreatic carcinoma and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a family study. *Br J Cancer.* 1985;52:271-3.
- Mace KA, Hansen SL, Myers C, Young DM, Boudreau N. HOXA3 induces cell migration in endothelial and epithelial cells promoting angiogenesis and wound repair. *J Cell Sci.* 2005;118:2567-77.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 2002;110:563-74.
- Martin-Rendon E, Hale SJ, Ryan D, Baban D, Forde SP, Roubelakis M, Sweeney D, Moukayed M, Harris AL, Davies K, Watt SM. Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells.* 2007;25:1003-12.
- McDonald PC, Oloumi A, Mills J, Dobreva I, Maidan M, Gray V, Wederell ED, Bally MB, Foster LJ, Dedhar S. Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res.* 2008;68:1618-24.

- Meggiorini ML, Labi L, Vestri AR, Porfiri LM, Savelli S, De Felice C. Tamoxifen in women with breast cancer and mammographic density. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2008;29:598-601.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 2004;15:185-97.
- Merlos-Suárez A, Batlle E. Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20:194-200.
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;39:167-9.
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003;1:882-91.
- Miller JW, Borowsky AD, Marple TC, McGoldrick ET, Dillard-Telm L, Young LJ, Green R. Folate, DNA methylation, and mouse models of breast tumorigenesis. *Nutr Rev.* 2008;66:S59-64.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 2002;16:720-8.
- Murai KK, Pasquale EB. 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci.* 2003;116:2823-32.
- Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, Hruban RH, Kern SE. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res.* 2002;62:3789-93.
- Neilson JR, Zheng GX, Burge CB, Sharp PA. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev.* 2007;21:578-89.
- Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med.* 2008;74:1656-65.
- Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.* 2004;64:3087-95.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408:86-9.
- Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-

kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2005;280:22473-81.

Pugh CW, Gleadle J, Maxwell PH. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia signalling pathways. *Breast Cancer Res.* 2001;3:313-7.

Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Ylä-Herttuala S. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett.* 2008;582:2397-401.

Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2008;15:678-85.

Ratcliffe PJ, Ebert BL, Firth JD, Gleadle JM, Maxwell PH, Nagao M, O'Rourke JF, Pugh CW, Wood SM. Oxygen regulated gene expression: erythropoietin as a model system. *Kidney Int.* 1997;51:514-26.

Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, Bentwich Z, Oren M. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 2007;26:731-43.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403:901-6.

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

Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends.* 6. überarbeitete Auflage. Berlin, 2008.

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

Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol.* 2006;24:4677-84.

Rosen PP (Hrsg.). *Rosen's Breast Pathology.* Second Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia-Baltimore-New York, 2001

Ruvkun G, Ambros V, Coulson A, Waterston R, Sulston J, Horvitz HR. Molecular genetics of the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14*. *Genetics.* 1989;121:501-16.

Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics.* 2003;82:323-30.

Schlimgen AK, Helms JA, Vogel H, Perin MS. Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system. *Neuron*. 1995;14:519-26.

Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009. [Epub ahead of print]

Schramke V, Allshire R. Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14:174-80.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115:199-208.

Silverman DT, Schiffman M, Everhart J, Goldstein A, Lillemoe KD, Swanson GM, Schwartz AG, Brown LM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Pottern LM, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 1999;80:1830-7.

Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1996;271:32529-37.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:721-32.

Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol*. 2008. [Epub ahead of print]

Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res*. 2008;1236:185-93.

Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26:2799-803.

Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*. 2008;6:14.

Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*. 2000;5:659-69.

Smalheiser NR, Torvik VI. Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. *Trends Genet*. 2005;21:322-6.

Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Fukushima N, Campbell KA, Lillemoe KD. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: an updated experience. *Ann Surg*. 2004;239:788-99.

- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 2004;305:1434-7.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973;51:1409-16.
- Spillman MA, Bowcock AM. BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen. *Oncogene*. 1996;13:1639-45.
- Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*. 2003;425:307-11.
- Stein E, Huynh-Do U, Lane AA, Cerretti DP, Daniel TO. Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:1303-8.
- Su GH, Kern SE. Molecular genetics of ductal pancreatic neoplasia. *Curr Opin Gastroenterol*. 2000;16:419-25.
- Su DM, Manley NR. Hoxa3 and pax1 transcription factors regulate the ability of fetal thymic epithelial cells to promote thymocyte development. *J Immunol*. 2000;164:5753-60.
- Su D, Ellis S, Napier A, Lee K, Manley NR. Hoxa3 and pax1 regulate epithelial cell death and proliferation during thymus and parathyroid organogenesis. *Dev Biol*. 2001;236:316-29.
- Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther*. 2001;8:638-45.
- Surawska H, Ma PC, Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:419-33.
- Svoboda M, Izakovicova Holla L, Sefr R, Vrtkova I, Kocakova I, Tichy B, Dvorak J. MicroRNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol*. 2008;33:541-7.
- Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem*. 2007;282:2135-43.
- Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, Labourier E, Hahn SA. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2007;26:4442-52.
- Tagawa H, Seto M. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia*. 2005;19:2013-6.
- Tait L, Soule HD, Russo J. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*. 1990 Sep;50:6087-94.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004;64:3753-6.

Tam W, Ben-Yehuda D, Hayward WS. bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukemia virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol Cell Biol.* 1997;17:1490-502.

Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Meister G, Hermeking H. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle.* 2007;6:1586-93.

Taubert H, Würfl P, Greither T, Kappler M, Bache M, Bartel F, Kehlen A, Lautenschläger C, Harris LC, Kaushal D, Füssel S, Meye A, Böhnke A, Schmidt H, Holzhausen HJ, Hauptmann S. Stem cell-associated genes are extremely poor prognostic factors for soft-tissue sarcoma patients. *Oncogene.* 2007;26:7170-4.

Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, Falatko FC, Brune KA, Goggins M, Rozenblum E, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:738-44.

Ugurel S, Houben R, Schrama D, Voigt H, Zapatka M, Schadendorf D, Bröcker EB, Becker JC. Microphthalmia-associated transcription factor gene amplification in metastatic melanoma is a prognostic marker for patient survival, but not a predictive marker for chemosensitivity and chemotherapy response. *Clin Cancer Res.* 2007;13:6344-50.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 2006;20:515-24.

Varelias A, Koblar SA, Cowled PA, Carter CD, Clayer M. Human osteosarcoma expresses specific ephrin profiles: implications for tumorigenicity and prognosis. *Cancer.* 2002;95:862-9.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318:1931-4.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle.* 2008;7:1545-9.

Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* 1991;51:3316-22.

Vaupel P, Thews O, Mayer A, Höckel S, Höckel M. Oxygenation status of gynecologic tumors: what is the optimal hemoglobin level? *Strahlenther Onkol.* 2002;178:727-31.

Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol.* 2004;381:335-54.

Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:225-39.

von Pawel J, von Roemeling R, Gatzemeier U, Boyer M, Elisson LO, Clark P, Talbot D, Rey A, Butler TW, Hirsh V, Olver I, Bergman B, Ayoub J, Richardson G, Dunlop D, Arcenas A, Vescio R, Viallet J, Treat J. Tirapazamine plus cisplatin versus cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A report of the international CATAPULT I study group. Cisplatin and Tirapazamine in Subjects with Advanced Previously Untreated Non-Small-Cell Lung Tumors. *J Clin Oncol.* 2000;18:1351-9.

Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell.* 2006;124:1169-81.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:5510-4.

Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1995;270:1230-7.

Wang Y, Liu L, Xia Z. Brain-derived neurotrophic factor stimulates the transcriptional and neuroprotective activity of myocyte-enhancer factor 2C through an ERK1/2-RSK2 signaling cascade. *J Neurochem.* 2007;102:957-66.

Weinberg RA *The biology of cancer.* Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 2007.

Weinmann M, Belka C, Güner D, Goecke B, Müller I, Bamberg M, Jendrossek V. Array-based comparative gene expression analysis of tumor cells with increased apoptosis resistance after hypoxic selection. *Oncogene.* 2005;24:5914-22.

Weiss SW und Goldblum JR. *Enzinger and Weiss's Soft tissue tumors.* 5th Edition. St. Louis, Mosby. 2007.

Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2007;26:5017-22.

Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol.* 2005;170:703-8.

Wellbrock C, Rana S, Paterson H, Pickersgill H, Brummelkamp T, Marais R. Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS ONE.* 2008;3:e2734.

Wenger RH, Marti HH, Schuerer-Maly CC, Kvietikova I, Bauer C, Gassmann M, Maly FE. Hypoxic induction of gene expression in chronic granulomatous disease-derived B-cell lines:

oxygen sensing is independent of the cytochrome b558-containing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Blood*. 1996;87:756-61.

Williams KJ, Cowen RL, Brown LM, Chinje EC, Jaffar M, Stratford IJ. Hypoxia in tumors: molecular targets for anti-cancer therapeutics. *Adv Enzyme Regul*. 2004;44:93-108.

Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*. 2008;14:2588-92.

Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem*. 2007;282:2130-4.

Xiong JW, Leahy A, Lee HH, Stuhlmann H. Vezf1: A Zn finger transcription factor restricted to endothelial cells and their precursors. *Dev Biol*. 1999;206:123-41.

Yamashita H. Current research topics in endocrine therapy for breast cancer. *Int J Clin Oncol*. 2008; 13:380-3.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004;304:594-6.

Yen TW, Kuerer HM, Ottesen RA, Rouse L, Niland JC, Edge SB, Theriault RL, Weeks JC. Impact of randomized clinical trial results in the national comprehensive cancer network on the use of tamoxifen after breast surgery for ductal carcinoma in situ. *J Clin Oncol*. 2007;25:3251-8.

Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Goggins M, Canto MI, Abrams RA, Laheru D, Jaffee EM, Hidalgo M, Yeo CJ. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer*. 2002;26:176-275.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17:3011-6.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B. Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:14517-22.

Yuan J, Narayanan L, Rockwell S, Glazer PM. Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer Res*. 2000;60:4372-6.

Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest*. 2006;86:1221-32.

Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell*. 1998;1:611-7.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	erworbenes Immundefizienz-Syndrom („acquired immunodeficiency syndrome“)
as	„antisense“
BDNF	„brain-derived neurotrophic factor“
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BPE	B-Phycoerythrin
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DANN
CNE	„nasopharyngeal carcinoma cells“
C _T	„threshold cycle“
Da	Dalton
DAPI	4,6-diaminidino-2-phenylindolhydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFNA3	Ephrin-A3
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EphA3	Ephrin-Rezeptor A3

ER	Östrogenrezeptor
et al.	et altera
evtl.	eventuell
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
hEGF	humaner epithelialer Wachstumsfaktor („human epithelial growth factor“)
HEK	humane embryonale Niere („human embryonal kidney“)
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor („hypoxia-inducible factor“)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRE	„hypoxia responsive element“
HRM	Hypoxie-regulierte microRNAs („hypoxia-regulated microRNAs“)
HUVEC	humane Zellen aus venösen Nabelschnurendothelien („human umbilical vein endothelial cells“)
IgG	Immunglobulin G
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobasen
Ko	Kontrolle
l	Liter
LB	Luria Bertani
Lu	Luziferase
M	Mol
mA	Milliampere
max.	maximal
MCF	“Michigan cancer foundation”
MCS	“multiple cloning site”
MDM2	„murine double minute“ 2
MEBM	“Mammary epithelial basal medium”
MFH	malignes fibröses Histiozytom
min	Minuten
mind.	mindestens
miRNA	microRNA

ml	Milliliter
MLV	murines Leukämie-Virus
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
µl	Mikroliter
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
NPTX1	Neuronales Pentraxin 1
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung („phosphat-buffered solution“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas („pancreatic ductal adenocarcinoma“)
PE	Plattiereffizienz
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentium hydrogenii
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
RASSF1A	„Ras association domain family 1“
RISC	„RNA-induced silencing complex“
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
se	„sense“
siRNA	„small interfering“ RNA
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt

VEGF	„vascular endothelial growth factor“
vgl.	vergleiche
VHL	von Hippel-Lindau-Faktor
WB	Western-Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation („world health organization“)
WTS	Weichteilsarkom
z. B.	zum Beispiel
ZKBT	Zellkoloniebildungstest

8.2. Liste der microRNA-Expressionsänderungen unter Hypoxie

	MCF-7	MCF-10		MCF-7	MCF-10
cel-lin-4			hsa-miR-125b		
cel-miR-2			hsa-miR-126	-1,53	-2,67
ath-miR-159a			hsa-miR-127		
hsa-miR-9	-1,12	-4,86	hsa-miR-128a	-1,97	-1,26
hsa-miR-9*	-1,09	2,30	hsa-miR-128b	2,56	-4,58
hsa-miR-10a	1,58	-2,71	hsa-miR-129	1,13	1,90
hsa-miR-15a	-1,16	1,12	hsa-miR-130a	1,55	-3,85
hsa-miR-15b	1,58	2,19	hsa-miR-130b	1,25	-3,49
hsa-miR-16	-1,54	-1,26	hsa-miR-132	-1,13	-1,14
hsa-miR-17-3p	1,39	-2,76	hsa-miR-133a	1,14	2,00
hsa-miR-17-5p	1,46	-1,61	hsa-miR-133b	-1,52	1,64
hsa-miR-19a	1,01	-1,33	hsa-miR-134	-1,91	-1,65
hsa-miR-20	1,12	-1,59	hsa-miR-135a	1,15	-2,58
hsa-miR-21	2,18	1,37	hsa-miR-135b	1,13	-3,65
hsa-miR-23a	1,39	1,57	hsa-miR-137	3,14	
hsa-miR-23b	-1,69	-1,29	hsa-miR-138	-2,66	-1,78
hsa-miR-25	1,20	-2,32	hsa-miR-139	-1,20	-2,54
hsa-miR-26a	1,48	-1,72	hsa-miR-140	2,14	-2,10
hsa-miR-26b	1,16	1,16	hsa-miR-141	-1,14	-2,45
hsa-miR-27a	-1,03		hsa-miR-142-3p	-1,91	
hsa-miR-27b	3,42	-1,14	hsa-miR-142-5p		4,26
hsa-miR-28	1,33	-2,46	hsa-miR-143	1,07	-1,75
hsa-miR-29a	1,01	-2,81	hsa-miR-144		
hsa-miR-29b	1,51		hsa-miR-145	-2,76	
hsa-miR-29c	1,68	-2,60	hsa-miR-146	-1,16	-1,70
hsa-miR-30a-3p	1,34	1,78	hsa-miR-147		
hsa-miR-30b	1,18	-1,84	hsa-miR-148a	2,02	-1,62
hsa-miR-30c	1,01	-2,34	hsa-miR-150	1,24	-1,44
hsa-miR-30d	1,23	-2,06	hsa-miR-151	2,10	-2,35
hsa-miR-30e	-1,33		hsa-miR-152	-1,12	-1,81
hsa-miR-31		-2,13	hsa-miR-154	-2,62	-1,02
hsa-miR-34a	1,63	-4,38	hsa-miR-154*	-1,53	-1,78
hsa-miR-34b	1,24	-3,33	hsa-miR-155	-2,50	-1,69
hsa-miR-34c			hsa-miR-181a	1,75	-7,91
hsa-miR-92	1,13	-1,02	hsa-miR-181b	1,55	-2,56
hsa-miR-95	1,15	-1,00	hsa-miR-181c	-1,22	
hsa-miR-96	-2,02	-1,75	hsa-miR-182	1,70	1,84
hsa-miR-98	1,32	-1,71	hsa-miR-182*	-1,47	-3,39
hsa-miR-99a	1,47	-1,45	hsa-miR-183	-1,23	-2,03
hsa-miR-100	2,59	1,33	hsa-miR-184	1,09	3,62
hsa-miR-103	1,28	-1,48	hsa-miR-185	1,29	-1,20
hsa-miR-104			hsa-miR-186	1,09	
hsa-miR-105	-1,51	-2,81	hsa-miR-187	-2,80	
hsa-miR-106a	-1,22	-1,81	hsa-miR-189	-2,77	
hsa-miR-107	-1,55	-1,54	hsa-miR-190	-1,53	-3,51
hsa-miR-122a			hsa-miR-191	-1,43	-1,84
hsa-miR-124a	-1,00	-1,99	hsa-miR-193	1,36	-2,82
hsa-miR-124b	1,93	-1,53	hsa-miR-194	-1,71	-2,53

hsa-miR-125a	-1,41	-1,55	hsa-miR-195	1,39	1,55
hsa-miR-197	1,29	-1,76	hsa-miR-326	-1,57	-1,42
hsa-miR-198	-1,95	-1,34	hsa-miR-328	-1,01	-2,20
hsa-miR-199a	-1,95	-1,08	hsa-miR-330	1,74	-2,04
hsa-miR-199a*	-1,31	-1,15	hsa-miR-331	1,43	-3,39
hsa-miR-199b	1,47		hsa-miR-335	-2,05	-1,19
hsa-miR-199-s	1,08	-1,78	hsa-miR-337		
hsa-miR-200a	1,48	-5,04	hsa-miR-338	-1,13	2,00
hsa-miR-200b	-1,47	-3,69	hsa-miR-339	1,27	-4,29
hsa-miR-200c	-1,35	-1,82	hsa-miR-340	-1,38	-2,26
hsa-miR-203	-1,29	-2,28	hsa-miR-342	1,99	-1,21
hsa-miR-204	-1,06	1,44	hsa-miR-367		
hsa-miR-205	1,45	-1,90	hsa-miR-368	-2,79	1,78
hsa-miR-210	6,45	6,10	hsa-miR-370	-2,00	-2,10
hsa-miR-211			hsa-miR-371	-1,99	1,08
hsa-miR-213	-1,01	-2,45	hsa-miR-372		
hsa-miR-214	-2,40	-1,74	hsa-miR-373	-4,16	-2,96
hsa-miR-215	-1,31	-2,22	hsa-miR-373*	-2,55	-1,23
hsa-miR-216			hsa-miR-374	-1,68	-2,63
hsa-miR-218	1,28	-2,29	hsa-let-7a	1,27	-1,01
hsa-miR-219	-3,74		hsa-let-7b	1,02	-1,36
hsa-miR-220			hsa-let-7d	-1,92	-1,53
hsa-miR-221	1,27	-1,45	hsa-let-7e	2,18	-1,09
hsa-miR-222	-1,19	-1,89	hsa-let-7g	1,10	-1,94
hsa-miR-223		1,43	hsa-let-7i	1,51	-1,20
hsa-miR-224		-1,33			
hsa-miR-296	-1,21	-2,22			
hsa-miR-299	-2,19	1,22			
hsa-miR-301	1,57	-1,84			
hsa-miR-302a		-2,26			
hsa-miR-302b					
hsa-miR-302b*					
hsa-miR-302c					
hsa-miR-302c*	-1,56	-1,00			
hsa-miR-302d	-1,31	-1,60			
hsa-miR-320	1,14	-2,53			
hsa-miR-323	-2,00	-2,47			
hsa-miR-324-5p	-1,04	-13,80			
hsa-miR-325	-5,54	-15,85			

Tab. 8.1. microRNA-Expressionstabellen. Die Werte geben die xfache Änderung der microRNA-Expression in den hypoxischen Proben im Vergleich zu den normoxischen Proben an. Ein negativer Wert steht für eine verminderte Expression der entsprechenden microRNA, ein positiver Wert für eine verstärkte Expression. Änderungen zwischen $>0,9$ und $<1,1$ wurden als gleichbleibende Expression gewertet. Leere Felder stehen für ein nicht detektierbares microRNA-Level

8.3. Klinische Daten der Weichteilsarkompatienten

Geschlecht		am Tumor verstorben		Stadium		Resektionsart		Tumorlokalisierung		Tumorart	
männlich	45	ja	52	I	15	1	72	1	65	1	24
weiblich	59	nein	52	II	41	2	32	2	8	2	31
				III	37			3	4	3	13
				IV	11			4	24	4	25
								unbekannt	3	5	10
										unbekannt	1
Summe	104		104		104		104		104		104
mittleres Alter der Patienten				56 Jahre							
Median Alter der Patienten				59 Jahre		range (16-87)					
mittlere Überlebenszeit				42 Monate							
Median der Überlebenszeit				29 Monate		range (2-198)					

Tab. 8.2. Klinische Daten der Weichteilsarkompatienten. Resektionsart: 1 = primäre weite Excision/primäre Kompartimentresektion/primäre Gliedmaßenamputation, 2 = primäre Tumorexstirpation bzw. Tumoraussschälung/palliative Tumormassenresektion; Tumorlokalisierung: 1 = obere Extremität/Schulter/Hüfte/untere Extremität, 2 = Thorax/Bauchwand, 3 = Kopf/Hals, 4 = intraabdominal/retroperitoneal; Tumorart: 1 = Liposarkom, 2 = Fibrosarkom/MFH, 3 = neurogenes Sarkom, 4 = Rhabdomyosarkom/Leiomyosarkom, 5 = andere.

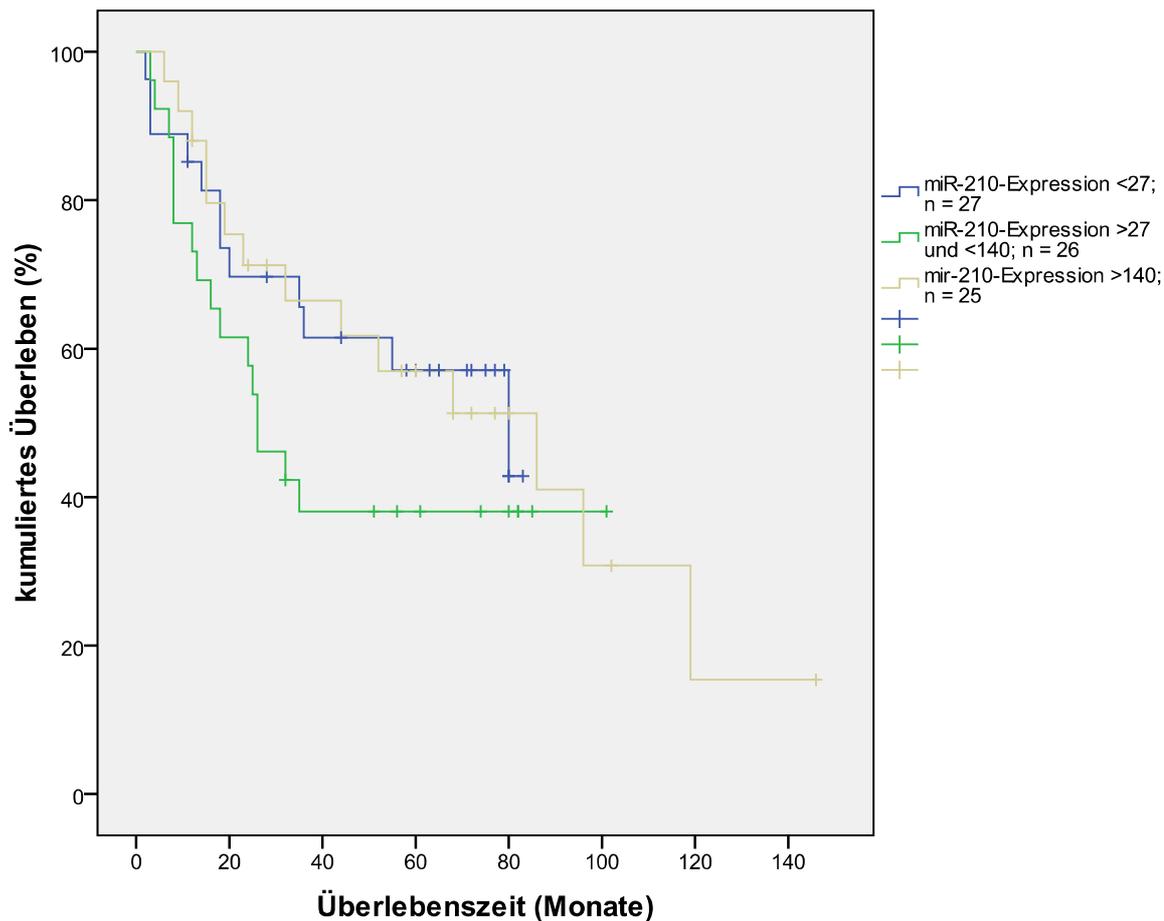
8.4. Klinische Daten der PDAC-Patienten

Geschlecht		am Tumor verstorben		Stadium		Resektionsart	
männlich	35	ja	48	I	2	R0	37
weiblich	20	nein	7	II	12	R1	9
				III	31	R2	9
				IV	10		
Summe	55		55		55		55
mittleres Alter der Patienten				62 Jahre			
Median Alter der Patienten				65 Jahre		range (34-80)	
mittlere Überlebenszeit				16 Monate			
Median der Überlebenszeit				14 Monate		range (1-61)	

Tab. 8.3. Klinische Daten des PDAC-Patientenkollektivs.

8.5. Kaplan-Meier-Analysen und 5-Jahres-Überleben im Weichteilsarkom

8.5.1. hsa-miR-210 im Weichteilsarkom



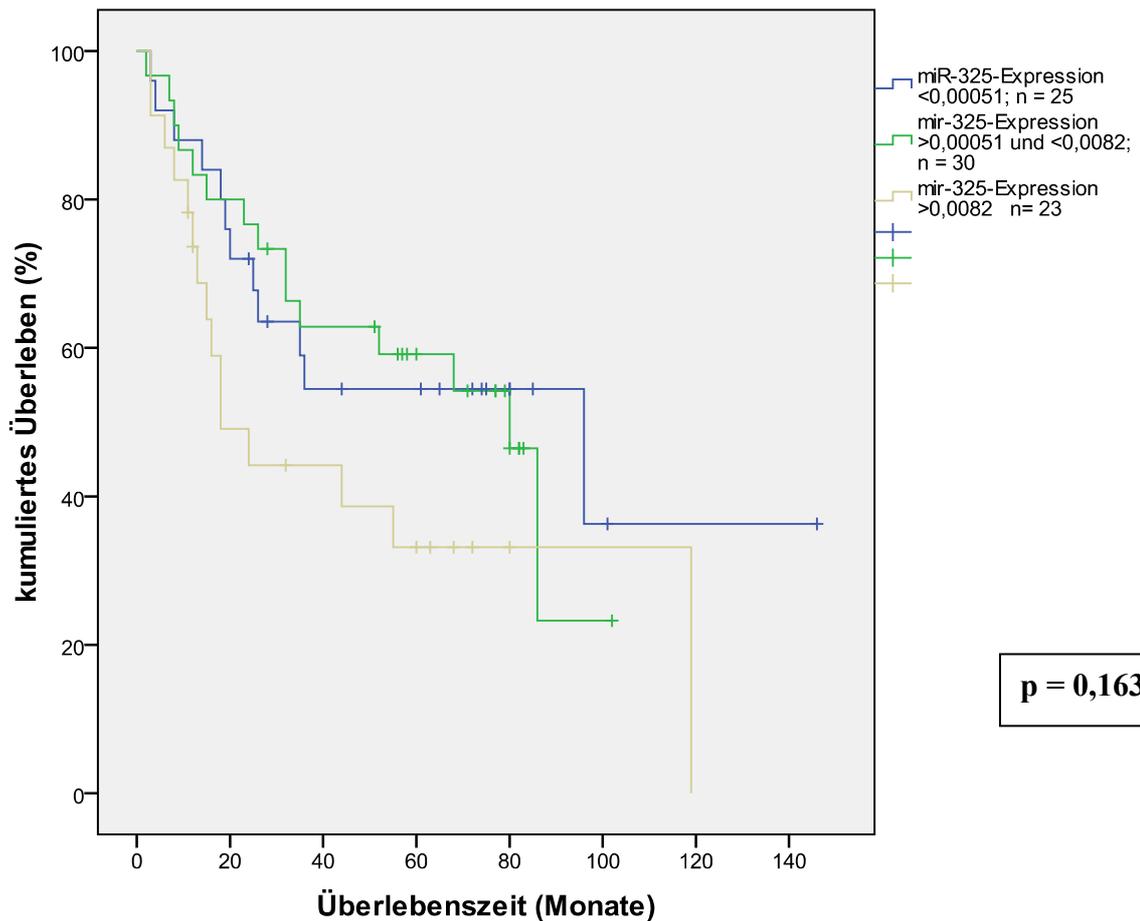
Median der Überlebenszeiten:

	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige miR-210-Expression	80 Monate	30,5-129,4 Monate
mittlere miR-210-Expression	26 Monate	16,0-35,9 Monate
hohe miR-210-Expression	86 Monate	36,2-99,8 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre
niedrige miR-210-Expression	27/27 (100%)	22/26 (84,6%)	16/25 (64,0%)	12/23 (52,2%)
mittlere miR-210-Expression	26/26 (100%)	20/26 (76,9%)	16/25 (64,0%)	7/22 (31,8%)
hohe miR-210-Expression	25/25 (100%)	23/25 (92,0%)	17/24 (70,8%)	11/21 (52,3%)

8.5.2. hsa-mir-325 im Weichteilsarkom



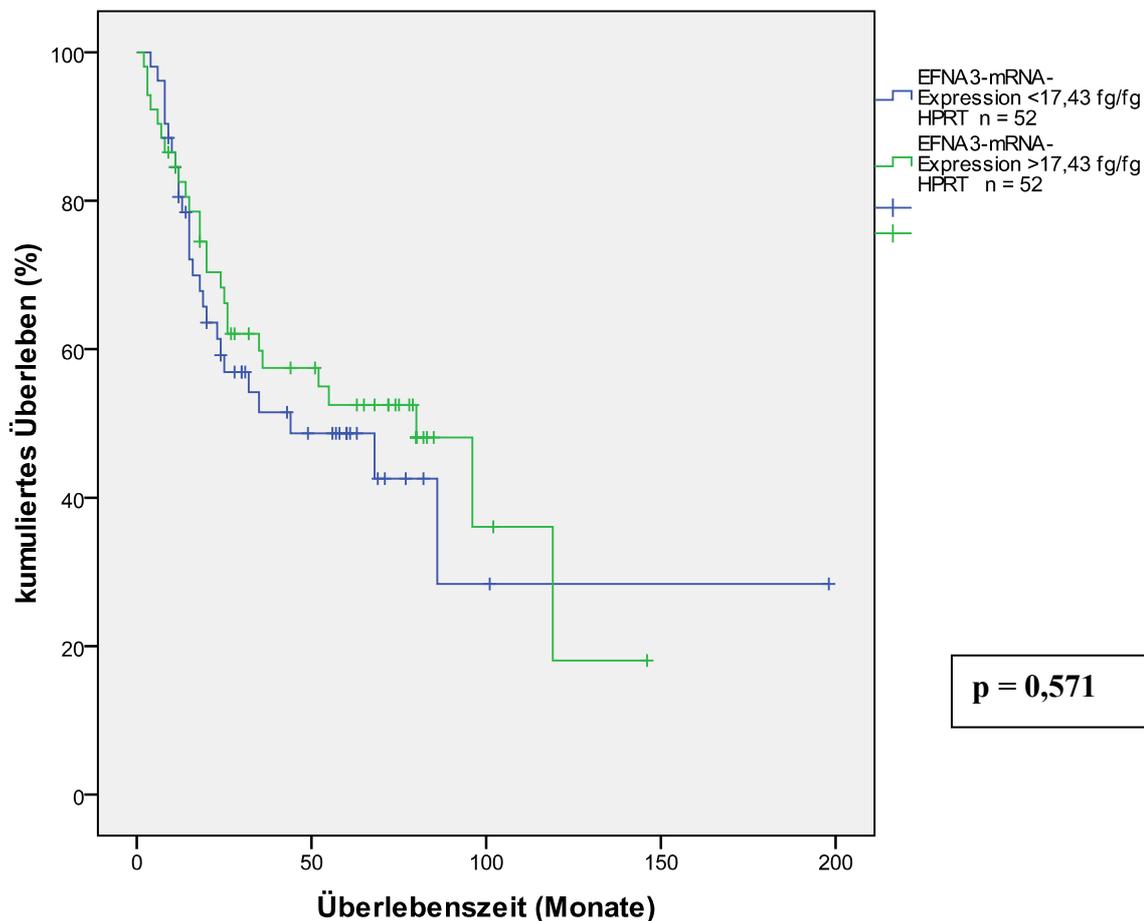
Median der Überlebenszeiten:

	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige miR-325-Expression	96 Monate	10,0-181,0 Monate
mittlere miR-325-Expression	80 Monate	59,8-100,2 Monate
hohe miR-325-Expression	18 Monate	6,4-29,6 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre
niedrige miR-325-Expression	25/25 (100%)	22/25 (88,0%)	18/23 (78,3%)	11/20 (55,0%)
mittlere miR-325-Expression	30/30 (100%)	26/30 (86,7%)	23/29 (79,3%)	13/25 (52,0%)
hohe miR-325-Expression	23/23 (100%)	17/22 (77,3%)	10/21 (47,6%)	6/21 (28,6%)

8.5.3. EFNA3-mRNA im Weichteilsarkom



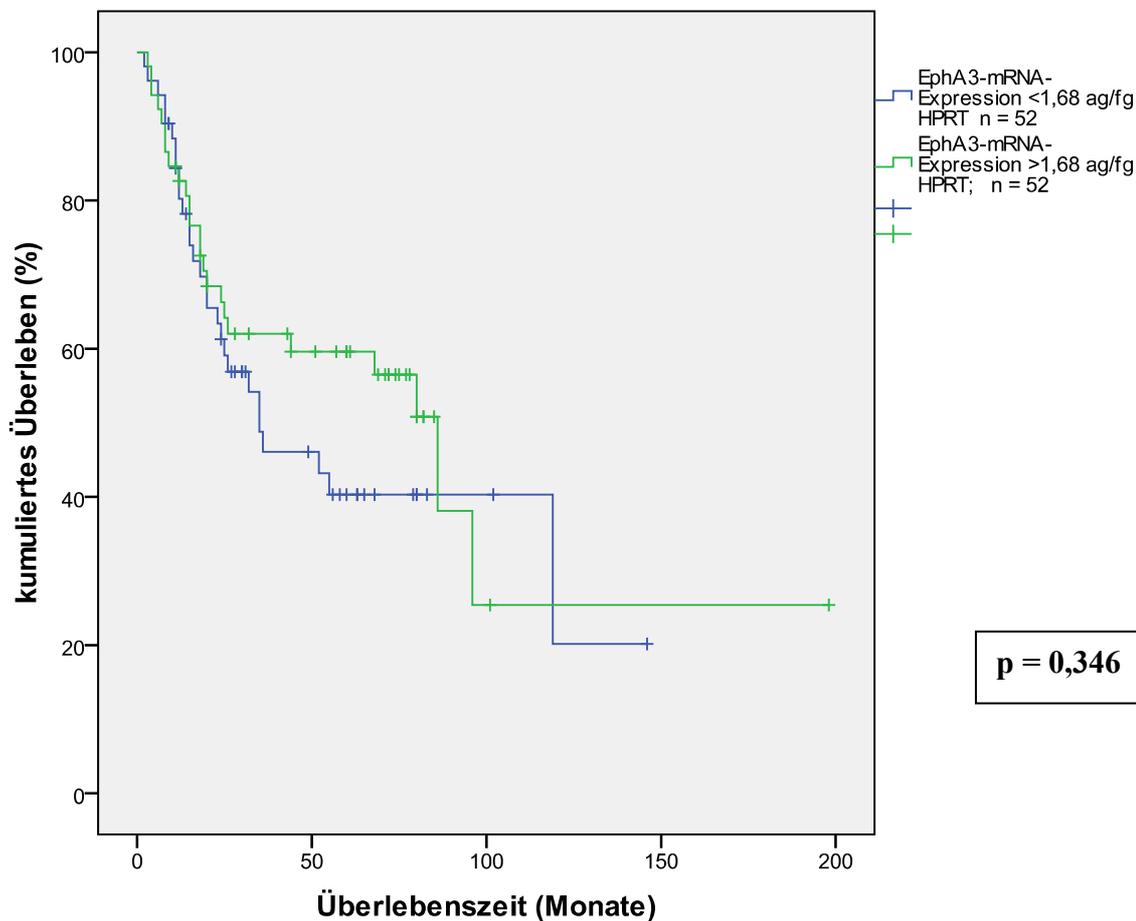
Median der Überlebenszeiten:

	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige EFNA3-mRNA-Expression	44 Monate	0-88,3 Monate
hohe EFNA3-mRNA-Expression	80 Monate	36,3-123,4 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre
niedrige EFNA3-mRNA-Expression	52/52 (100%)	42/50 (84,0%)	28/47 (59,6%)	13/37 (35,1%)
hohe EFNA3-mRNA-Expression	52/52 (100%)	42/50 (84,0%)	34/49 (69,4%)	21/44 (47,7%)

8.5.4. EphA3-mRNA im Weichteilsarkom



Median der Überlebenszeiten:

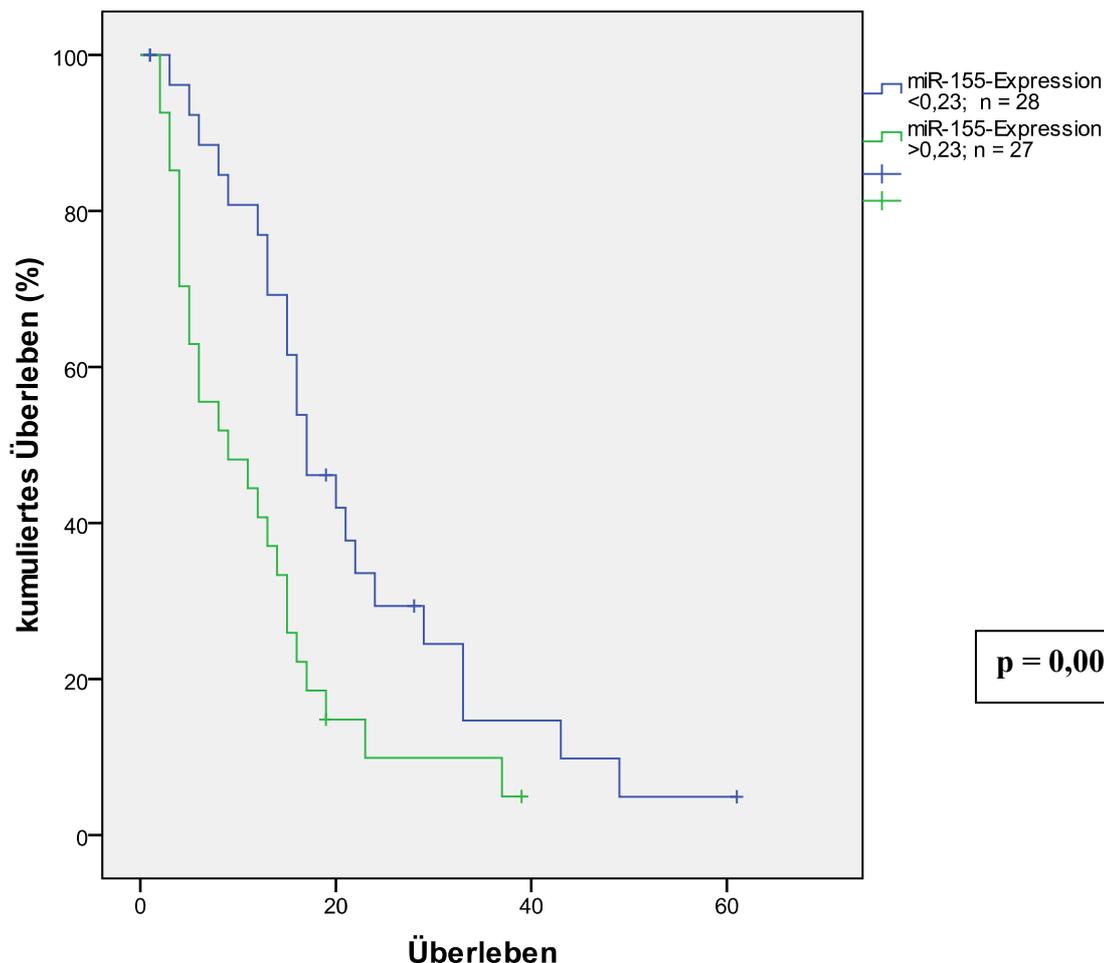
	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige EFNA3-mRNA-Expression	35 Monate	7,1-62,9 Monate
hohe EFNA3-mRNA-Expression	86 Monate	61,6-110,4 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre
niedrige EphA3-mRNA-Expression	52/52 (100%)	41/49 (83,7%)	30/48 (62,5%)	12/39 (30,8%)
hohe EphA3-mRNA-Expression	52/52 (100%)	43/51 (84,3%)	32/48 (66,7%)	22/42 (52,4%)

8.6. Kaplan-Meier-Analysen und 5-Jahres-Überleben im PDAC

8.6.1. hsa-miR-155 im PDAC



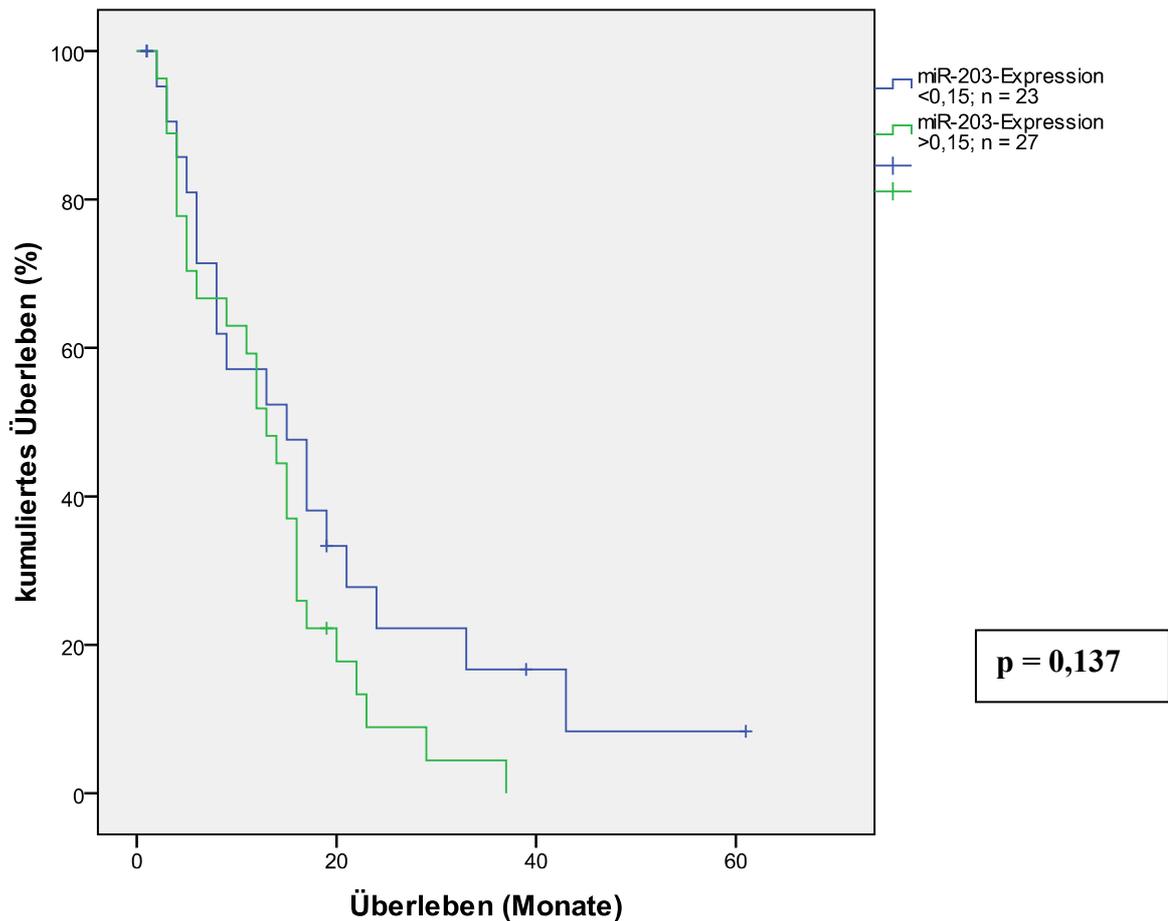
Median der Überlebenszeiten:

	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige miR-155-Expression	17 Monate	12,1-21,9 Monate
hohe miR-155-Expression	9 Monate	0,5-17,5 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	5 Jahre
niedrige miR-155-Expression	28/28 (100%)	21/26 (80,8%)	1/24 (4,2%)
hohe miR-155-Expression	27/27 (100%)	12/27 (44,4%)	0/25 (0%)

8.6.2. hsa-miR-203 im PDAC



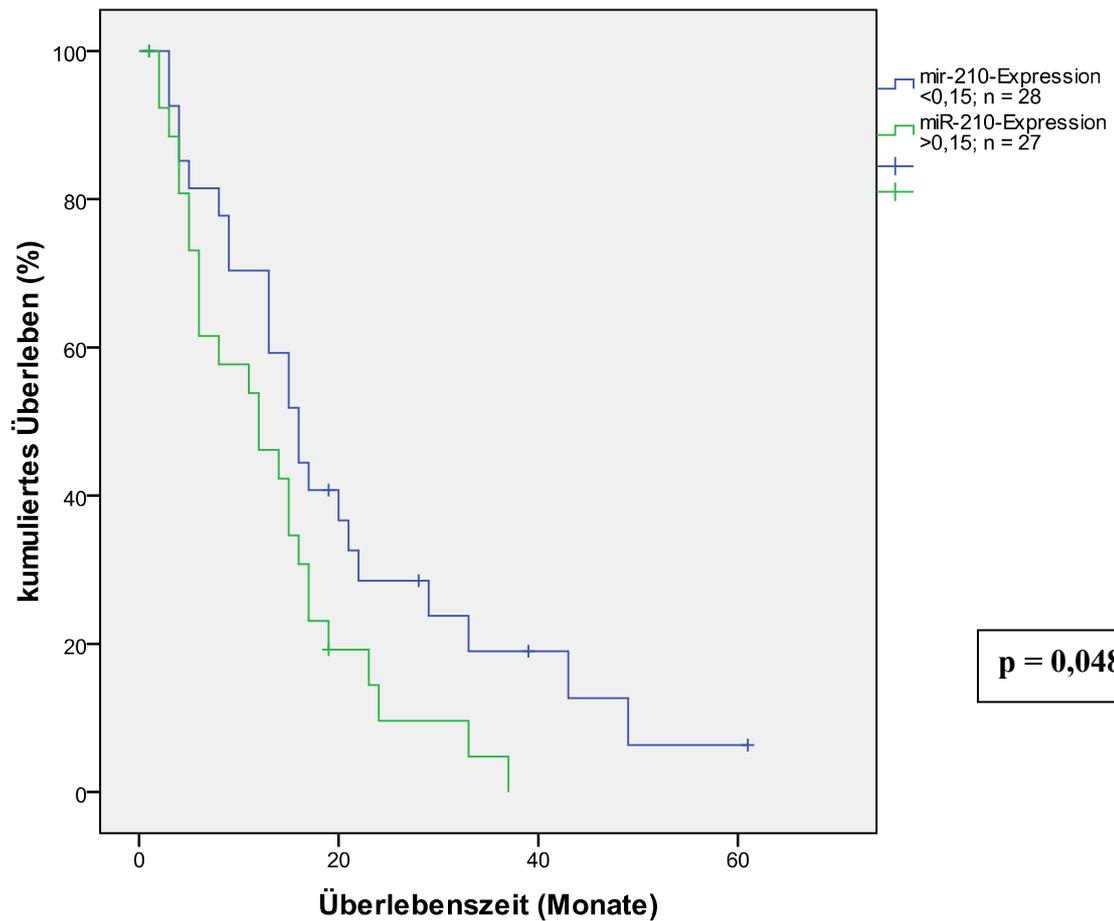
Median der Überlebenszeiten:

	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige miR-203-Expression	15 Monate	6,0-24,0 Monate
hohe miR-203-Expression	13 Monate	9,2-16,8 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	5 Jahre
niedrige miR-203-Expression	23/23 (100%)	12/21 (57,1%)	1/19 (5,3%)
hohe miR-203-Expression	27/27 (100%)	16/27 (59,3%)	0/26 (0%)

8.6.3. hsa-miR-210 im PDAC



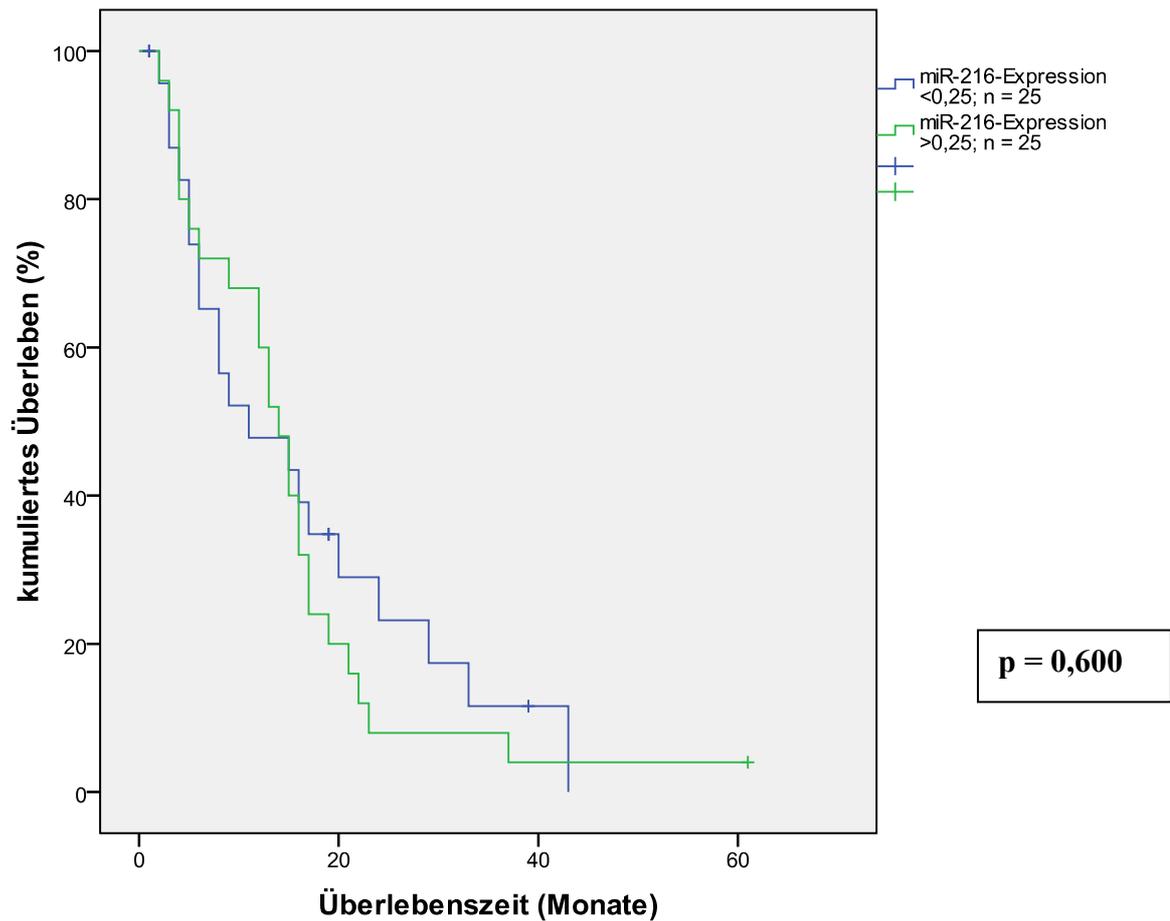
Median der Überlebenszeiten:

	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige miR-210-Expression	16 Monate	12,2-19,8 Monate
hohe miR-210-Expression	12 Monate	4,5-19,5 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	5 Jahre
niedrige miR-210-Expression	28/28 (100%)	19/27 (70,4%)	1/24 (4,2%)
hohe miR-210-Expression	27/27 (100%)	14/26 (53,8%)	0/25 (0%)

8.6.4. hsa-miR-216 im PDAC



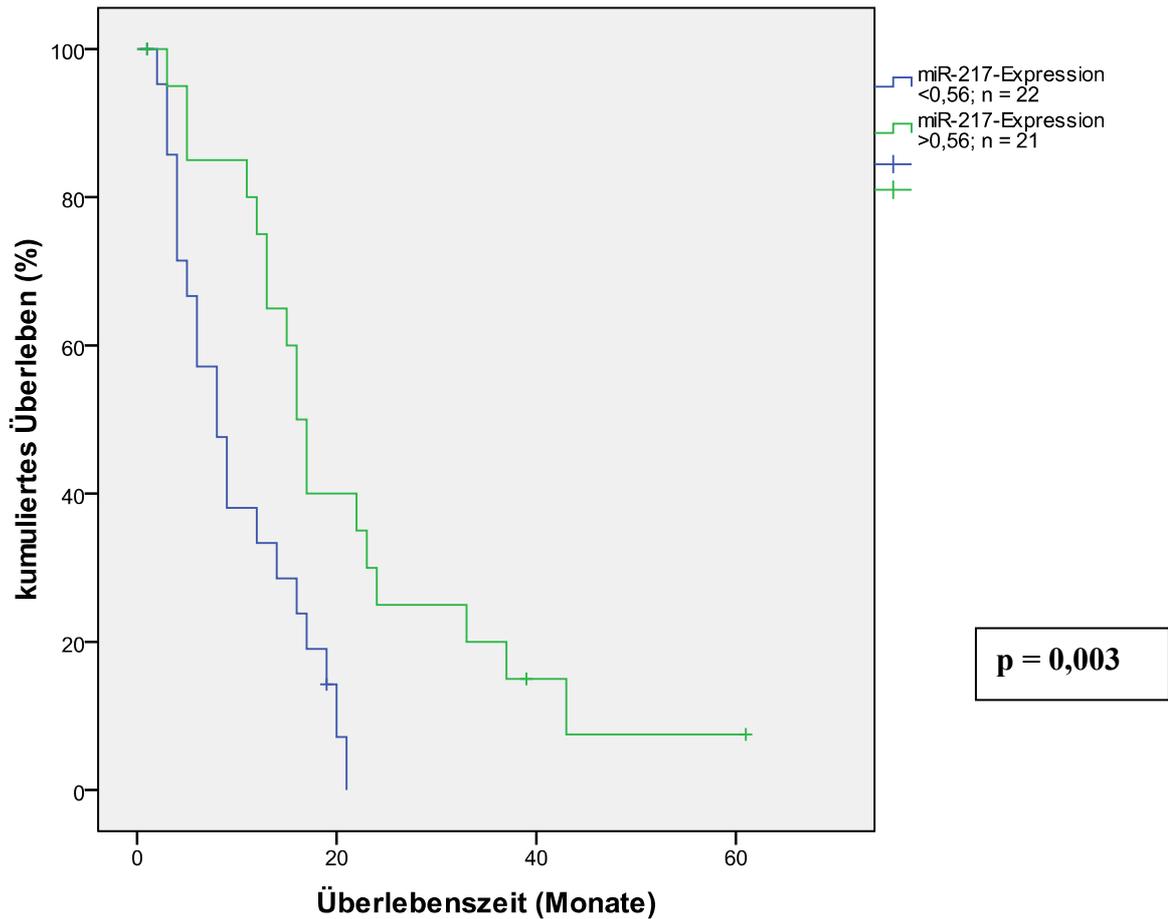
Median der Überlebenszeiten:

	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige miR-216-Expression	11 Monate	0,04-22,0 Monate
hohe miR-216-Expression	14 Monate	11,1-16,9 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	5 Jahre
niedrige miR-216-Expression	25/25 (100%)	11/23 (47,8%)	0/20 (0%)
hohe miR-216-Expression	25/25 (100%)	17/25 (68,0%)	1/25 (4,0%)

8.6.5. hsa-miR-217 im PDAC



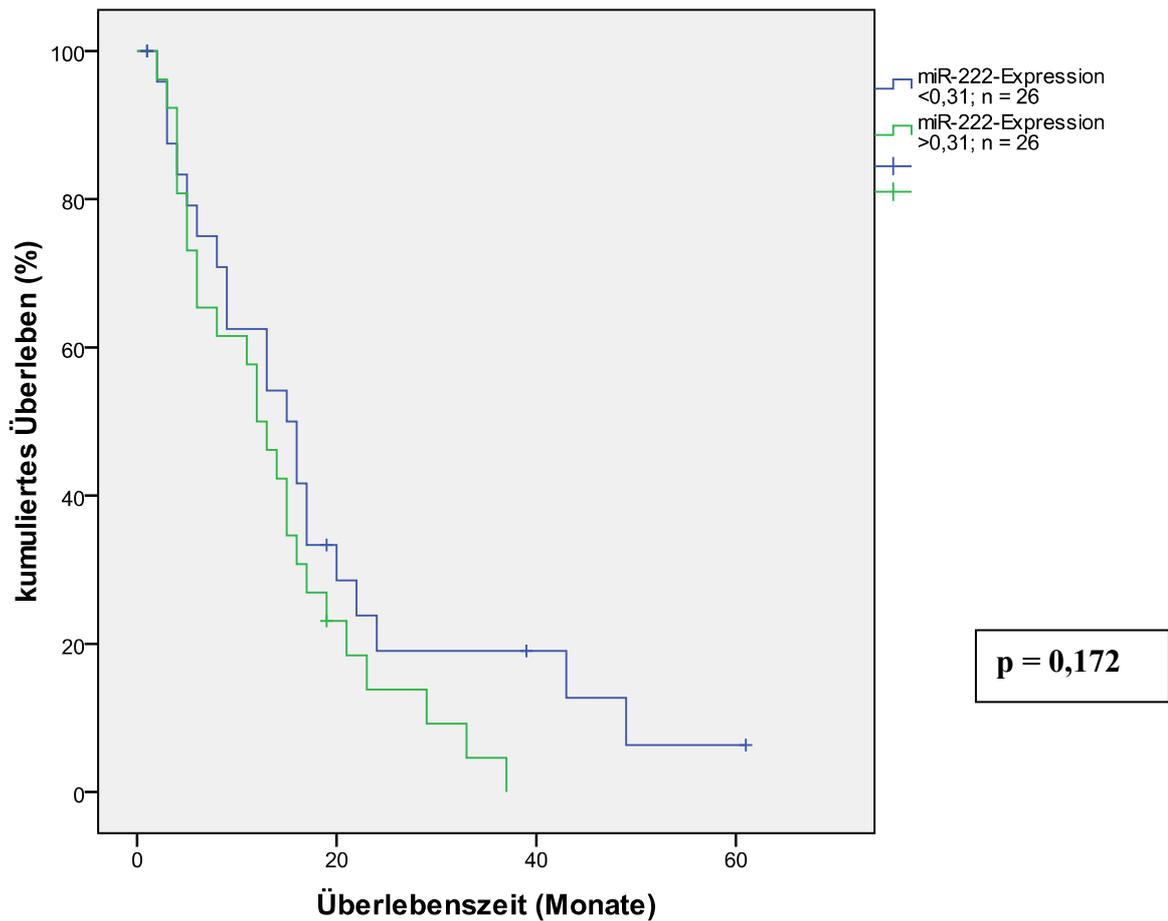
Median der Überlebenszeiten:

	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige miR-217-Expression	8 Monate	4,6-11,4 Monate
hohe miR-217-Expression	16 Monate	13,8-18,2 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	5 Jahre
niedrige miR-217-Expression	22/22 (100%)	8/21 (38,1%)	0/20 (0%)
hohe miR-217-Expression	21/21 (100%)	16/20 (80,0%)	1/19 (5,3%)

8.6.6. hsa-miR-222 im PDAC



Median der Überlebenszeiten:

	Median der Überlebenszeit	95%iges Konfidenzintervall
niedrige miR-222-Expression	15 Monate	8,3-21,7 Monate
hohe miR-222-Expression	12 Monate	8,3-15,7 Monate

5-Jahres-Überleben:

	0 Jahre	1 Jahr	5 Jahre
niedrige miR-222-Expression	26/26 (100%)	15/24 (62,5%)	1/22 (4,5%)
hohe miR-222-Expression	26/26 (100%)	15/26 (57,7%)	0/25 (0%)

8.7. Putative Proteintargets der hsa-miR-155, hsa-miR-203 und hsa-miR-222

Gene ID	miR-155 protein target name	TargetScan context score	PicTar score
BACH1	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1	-0.75	7,16
ZNF652	zinc finger protein 652	-0.74	
RAB11FIP2	RAB11 family interacting protein 2 (class I)	-0.70	2,33
ZBTB41	zinc finger and BTB domain containing 41	-0.68	
TSHZ3	teashirt family zinc finger 3	-0.67	
ARID2	AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like)	-0.63	
UBQLN1	ubiquilin 1	-0.62	3,04
ZIC3	Zic family member 3 heterotaxy 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	-0.62	4,10
MLSTD2	male sterility domain containing 2	-0.61	4,08
LRP1B	low density lipoprotein-related protein 1B (deleted in tumors)	-0.59	3,90
RICTOR	rapamycin-insensitive companion of mTOR	-0.57	
SMAD2	SMAD family member 2	-0.55	
LCORL	ligand dependent nuclear receptor corepressor-like	-0.54	
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	-0.53	3,61
ARVCF	armadillo repeat gene deletes in velocardiofacial syndrome	-0.52	3,40
ANTXR2	anthrax toxin receptor 2	-0.51	2,48
HNRPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	-0.51	
TLE4	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)	-0.50	1,69
CSNK1A1	casein kinase 1, alpha 1	-0.50	2,23
SEPT11	septin 11	-0.49	3,05
KIAA1411	KIAA1411	-0.49	
C21orf66	chromosome 21 open reading frame 66	-0.49	
KIAA1274	KIAA1274	-0.48	2,74
GDF6	growth differentiation factor 6	-0.48	1,55
DYNC1H1	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1	-0.47	
NDFIP1	Nedd4 family interacting protein 1	-0.47	2,72
SGK3	serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3	-0.46	
ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	-0.46	3,01
GPM6B	glycoprotein M6B	-0.46	
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	-0.44	3,41
PICALM	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	-0.44	
FGF7	fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)	-0.44	3,69
H3F3A	H3 histone, family 3A	-0.43	2,75
ZNF236	zinc finger protein 236	-0.43	1,14
WWC1	WW and C2 domain containing 1	-0.42	
RCOR1	REST corepressor 1	-0.42	
MYO1D	myosin ID	-0.41	2,43
ODZ3	odz, odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)	-0.41	
ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle	-0.41	3,96
MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	-0.40	
LOC153222	adult retina protein	-0.40	2,43

PCDH9	protocadherin 9	-0.40	2,33
FBXO33	F-box protein 33	-0.39	1,47
USP48	ubiquitin specific peptidase 48	-0.39	2,51
KPNA1	karyopherin alpha 1 (importin alpha 5)	-0.39	
ARL5B	ADP-ribosylation factor-like 5B	-0.38	
BOC	Boc homolog (mouse)	-0.38	2,71
WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)	-0.38	2,23
FLJ20273	RNA-binding protein	-0.38	2,29
ADD3	adducin 3 (gamma)	-0.37	3,66
SPRED1	sprouty-related, EVH1 domain containing 1	-0.37	3,46
MAP3K7IP2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2	-0.37	1,49
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	-0.37	1,99
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	-0.37	0,76
SDCBP	syndecan binding protein (syntenin)	-0.37	2,10
FZD5	frizzled homolog 5 (Drosophila)	-0.36	
STON1	stonin 1	-0.36	
HIVEP2	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2	-0.36	2,64
HBP1	HMG-box transcription factor 1	-0.35	
RNF123	ring finger protein 123	-0.35	4,65
RPS6KA3	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3	-0.35	
PHF17	PHD finger protein 17	-0.35	
AICDA	activation-induced cytidine deaminase	-0.35	1,60
UPP2	uridine phosphorylase 2	-0.34	2,00
C10orf46	chromosome 10 open reading frame 46	-0.34	
CD47	CD47 molecule	-0.34	1,24
SOX11	SRY (sex determining region Y)-box 11	-0.33	1,31
CARHSP1	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	-0.33	4,35
RAB1A	RAB1A, member RAS oncogene family	-0.33	1,58
SCG2	secretogranin II (chromogranin C)	-0.33	3,05
VEZF1	vascular endothelial zinc finger 1	-0.32	
PKN2	protein kinase N2	-0.32	
C3orf18	chromosome 3 open reading frame 18	-0.32	
BCAT1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	-0.32	1,56
MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	-0.32	2,74
KIAA1729	KIAA1729 protein	-0.31	
CSNK1G2	casein kinase 1, gamma 2	-0.31	
SGCZ	sarcoglycan zeta	-0.31	
DCLRE1A	DNA cross-link repair 1A (PSO2 homolog, S. cerevisiae)	-0.31	
TOMM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)	-0.31	1,84
HIF1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	-0.31	1,98
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	-0.30	3,51
MYO10	myosin X	-0.30	2,13
TRPS1	trichorhinophalangeal syndrome I	-0.30	2,94
CDC73	cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)	-0.30	
Gene ID	miR-203 protein target name	TargetScan context score	PicTar score
ZNF281	zinc finger protein 281	-1.47	11,71
AFF4	AF4/FMR2 family, member 4	-1.17	

ZNF148	zinc finger protein 148	-1.00	
GABRA1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1	-0.98	4,77
TLOC1	translocation protein 1	-0.97	6,05
OSBPL8	oxysterol binding protein-like 8	-0.95	2,58
PAPD5	PAP associated domain containing 5	-0.91	
PPP1R12A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	-0.83	3,81
GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	-0.82	
PRPS2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	-0.82	2,69
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	-0.81	
AHR	aryl hydrocarbon receptor	-0.81	6,95
GRHL3	grainyhead-like 3 (Drosophila)	-0.81	
ADK	adenosine kinase	-0.80	2,12
ADPGK	ADP-dependent glucokinase	-0.80	
SOCS6	suppressor of cytokine signaling 6	-0.79	2,28
TLL2	tolloid-like 2	-0.79	
MBNL2	muscleblind-like 2 (Drosophila)	-0.79	8,72
SEMA5A	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	-0.78	10,47
PDE4D	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (phosphodiesterase E3 dunce homolog, Drosophila)	-0.77	13,32
SP4	Sp4 transcription factor	-0.76	
RUNX2	runt-related transcription factor 2	-0.67	
PRDM10	PR domain containing 10	-0.67	
FAM126B	family with sequence similarity 126, member B	-0.66	
ADAMTS6	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 6	-0.66	
APPL1	adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1	-0.64	
RKHD2	ring finger and KH domain containing 2	-0.64	6,04
KIAA0831	KIAA0831	-0.64	
BTBD7	BTB (POZ) domain containing 7	-0.64	
PPM1E	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing)	-0.63	
C4orf33	chromosome 4 open reading frame 33	-0.63	
DPY19L4	dpy-19-like 4 (C. elegans)	-0.63	
SLC4A4	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	-0.62	4,17
SLC1A2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	-0.62	1,72
RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family	-0.62	
ODZ1	odz, odd Oz/ten-m homolog 1(Drosophila)	-0.61	
SOSTDC1	sclerostin domain containing 1	-0.61	3,95
PRICKLE2	prickle homolog 2 (Drosophila)	-0.61	3,38
VAPA	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A, 33kDa	-0.60	
TMTC2	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 2	-0.60	
MMP16	matrix metallopeptidase 16 (membrane-inserted)	-0.60	
LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	-0.60	1,32
GMFB	glia maturation factor, beta	-0.60	
ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	-0.59	2,51
KLF12	Kruppel-like factor 12	-0.59	1,12
SLC17A6	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6	-0.59	1,43
DCX	doublecortin; lissencephaly, X-linked (doublecortin)	-0.58	
ZFHX4	zinc finger homeodomain 4	-0.58	

ID4	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	-0.57	1,77
SFRS1	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)	-0.56	1,57
CENPC1	centromere protein C 1	-0.56	
PHF2	PHD finger protein 2	-0.56	
GORASP2	golgi reassembly stacking protein 2, 55kDa	-0.55	
TRPS1	trichorhinophalangeal syndrome I	-0.55	
HNRPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	-0.54	
PAPD4	PAP associated domain containing 4	-0.54	
ZMYND11	zinc finger, MYND domain containing 11	-0.53	1,94
RFXDC2	regulatory factor X domain containing 2	-0.53	
LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1	-0.53	
DGKB	diacylglycerol kinase, beta 90kDa	-0.52	2,99
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	-0.52	2,64
PCDH17	protocadherin 17	-0.52	
LPIN1	lipin 1	-0.51	1,93
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	-0.51	2,62
C1orf34	chromosome 1 open reading frame 34	-0.51	
UBR1	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 1	-0.50	
CAMSAP1L1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1	-0.50	
XRN2	5'-3' exoribonuclease 2	-0.50	2,66
IRS2	insulin receptor substrate 2	-0.50	1,74
C12orf4	chromosome 12 open reading frame 4	-0.50	2,33
RPS6KA3	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3	-0.50	
HNRPUL2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	-0.50	
TIAL1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1	-0.50	
DNAJA5	DnaJ homology subfamily A member 5	-0.49	
KCNMA1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	-0.49	2,68
KIF2A	kinesin heavy chain member 2A	-0.49	
PUM2	pumilio homolog 2 (Drosophila)	-0.49	
GNAO1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	-0.48	3,69
STEAP1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	-0.48	4,63
SEMA3A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	-0.48	
WDFY3	WD repeat and FYVE domain containing 3	-0.48	1,66
GPR85	G protein-coupled receptor 85	-0.47	1,68
EBF3	early B-cell factor 3	-0.47	
MATR3	matrin 3	-0.46	
SLC23A2	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2	-0.46	
AFAP1L2	actin filament associated protein 1-like 2	-0.46	
SPAST	spastin	-0.46	
NDRG3	NDRG family member 3	-0.46	1,93
H3F3A	H3 histone, family 3A	-0.46	3,97
DUSP5	dual specificity phosphatase 5	-0.46	6,01
FAM13C1	family with sequence similarity 13, member C1	-0.45	
COPS7B	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7B (Arabidopsis)	-0.45	2,57
TMEM100	transmembrane protein 100	-0.45	
RBM25	RNA binding motif protein 25	-0.44	
DLG5	discs, large homolog 5 (Drosophila)	-0.43	3,06
KCTD9	potassium channel tetramerisation domain containing 9	-0.43	

AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	-0.43	
ARHGAP12	Rho GTPase activating protein 12	-0.42	2,39
MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3	-0.42	1,85
PRKCB1	protein kinase C, beta 1	-0.42	4,16
RAPGEF4	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	-0.42	1,81
NUFIP2	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2	-0.41	
KIAA1429	KIAA1429	-0.41	
CREBZF	CREB/ATF bZIP transcription factor	-0.41	
TOX3	TOX high mobility group box family member 3	-0.41	
C5orf30	chromosome 5 open reading frame 30	-0.41	
CCNC	cyclin C	-0.41	2,77
CRSP2	cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 2, 150kDa	-0.41	1,43
CUL1	cullin 1	-0.40	2,90
MTCH2	mitochondrial carrier homolog 2 (C. elegans)	-0.40	
EGR3	early growth response 3	-0.40	2,07
AP1S2	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	-0.40	
RP11-493K23.3	similar to poly(A)binding protein, cytoplasmic 1	-0.39	
IMPA1	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	-0.39	
MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)	-0.39	1,22
ZMIZ1	zinc finger, MIZ-type containing 1	-0.39	
CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	-0.39	1,93
KRT85	keratin 85	-0.39	
RIMS1	regulating synaptic membrane exocytosis 1	-0.39	
OVOL1	ovo-like 1(Drosophila)	-0.38	2,74
ETV1	ets variant gene 1	-0.38	
C7orf42	chromosome 7 open reading frame 42	-0.38	
NAT12	N-acetyltransferase 12	-0.38	
RNF38	ring finger protein 38	-0.38	0,86
FAT	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	-0.38	
BPTF	bromodomain PHD finger transcription factor	-0.38	
GPATCH1	G patch domain containing 1	-0.38	
HOOK3	hook homolog 3 (Drosophila)	-0.37	1,66
KIAA1212	KIAA1212	-0.37	
YTHDF3	YTH domain family, member 3	-0.37	
MEGF11	multiple EGF-like-domains 11	-0.37	
MECP2	methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome)	-0.37	
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	-0.37	1,79
TGFB3	transforming growth factor, beta 3	-0.37	
CCNG1	cyclin G1	-0.37	2,26
TRPV3	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3	-0.37	3,37
ZRANB2	zinc finger, RAN-binding domain containing 2	-0.37	
PLEKHG3	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 3	-0.36	
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	-0.36	
LASP1	LIM and SH3 protein 1	-0.36	2,24
PLAA	phospholipase A2-activating protein	-0.36	4,02
RIC8B	resistance to inhibitors of cholinesterase 8 homolog B (C. elegans)	-0.36	
IKZF2	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)	-0.35	

GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	-0.35	3,84
BCL11B	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	-0.35	4,47
ASXL1	additional sex combs like 1 (Drosophila)	-0.35	
DKFZP686A01247	hypothetical protein	-0.35	2,90
KHDRBS1	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1	-0.35	1,91
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	-0.34	
PHF12	PHD finger protein 12	-0.34	
LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3	-0.34	
ZNF650	zinc finger protein 650	-0.34	
C14orf147	chromosome 14 open reading frame 147	-0.34	1,53
SOX30	SRY (sex determining region Y)-box 30	-0.34	
C14orf4	chromosome 14 open reading frame 4	-0.34	
APC	adenomatosis polyposis coli	-0.34	3,45
JOSD1	Josephin domain containing 1	-0.33	
RNF34	ring finger protein 34	-0.33	2,29
UNC50	unc-50 homolog (C. elegans)	-0.33	
C8ORFK32	C8orfK32 protein	-0.33	
SESTD1	SEC14 and spectrin domains 1	-0.33	2,25
MAPKAP1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	-0.33	
ANKH	ankylosis, progressive homolog (mouse)	-0.33	
RALB	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)	-0.32	
REV1	REV1 homolog (S. cerevisiae)	-0.32	
LOC153364	similar to metallo-beta-lactamase superfamily protein	-0.32	3,47
RPRM	reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	-0.32	
RICTOR	rapamycin-insensitive companion of mTOR	-0.32	
RAB10	RAB10, member RAS oncogene family	-0.31	
SPEN	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	-0.31	
MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	-0.31	
ARHGAP15	Rho GTPase activating protein 15	-0.31	
ADCY1	adenylate cyclase 1 (brain)	-0.31	
RAB8B	RAB8B, member RAS oncogene family	-0.30	
ITGB3BP	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)	-0.30	
KIAA1005	KIAA1005 protein	-0.30	
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2	-0.30	
DLX6	distal-less homeobox 6	-0.30	
ZMAT4	zinc finger, matrin type 4	-0.30	
NBEA	neurobeachin	-0.30	3,42
C1orf108	chromosome 1 open reading frame 108	-0.30	
TLK1	tousled-like kinase 1	-0.30	
Gene ID	miR-222 protein target name	TargetScan context score	PicTar score
TCF12	transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	-0.80	4,80
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	-0.77	
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	-0.76	5,91
VGLL4	vestigial like 4 (Drosophila)	-0.67	
HECTD2	HECT domain containing 2	-0.67	
GABRA1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1	-0.66	
MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	-0.65	
RIMS3	regulating synaptic membrane exocytosis 3	-0.64	12,19

RFXDC2	regulatory factor X domain containing 2	-0.60	
MARK1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1	-0.59	
NAP1L5	nucleosome assembly protein 1-like 5	-0.59	8,84
PAIP1	poly(A) binding protein interacting protein 1	-0.58	
EIF5A2	eukaryotic translation initiation factor 5A2	-0.58	1,99
HRB	HIV-1 Rev binding protein	-0.57	2,34
CREBZF	CREB/ATF bZIP transcription factor	-0.57	
IRX5	iroquois homeobox protein 5	-0.56	3,26
TLOC1	translocation protein 1	-0.55	
DCUN1D1	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	-0.54	
RBM24	RNA binding motif protein 24	-0.53	5,19
NRK	Nik related kinase	-0.53	
PPP3R1	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, alpha isoform	-0.52	
C6orf213	chromosome 6 open reading frame 213	-0.51	
C18orf25	chromosome 18 open reading frame 25	-0.51	
FNDC3A	fibronectin type III domain containing 3A	-0.49	
CCDC64	coiled-coil domain containing 64	-0.48	
DMRT3	doublesex and mab-3 related transcription factor 3	-0.47	2,73
NTF3	neurotrophin 3	-0.47	
TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	-0.47	
ARF4	ADP-ribosylation factor 4	-0.46	2,86
MIER3	mesoderm induction early response 1, family member 3	-0.44	
CASZ1	castor zinc finger 1	-0.44	
KIAA1370	KIAA1370	-0.44	
MYLIP	myosin regulatory light chain interacting protein	-0.44	2,11
SBK1	SH3-binding domain kinase 1	-0.44	
C20orf23	chromosome 20 open reading frame 23	-0.43	2,48
ZFPM2	zinc finger protein, multitype 2	-0.43	2,52
PLEKHC1	pleckstrin homology domain containing, family C (with FERM domain) member 1	-0.42	2,56
C9orf39	chromosome 9 open reading frame 39	-0.42	
CDC2L6	cell division cycle 2-like 6 (CDK8-like)	-0.41	
UNC84B	unc-84 homolog B (<i>C. elegans</i>)	-0.41	2,32
WDR47	WD repeat domain 47	-0.41	
PPP1R15B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15B	-0.40	
GARNL1	GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 1	-0.40	2,45
ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	-0.39	4,33
STYX	serine/threonine/tyrosine interacting protein	-0.39	
CAMKK1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha	-0.39	
CHSY1	carbohydrate (chondroitin) synthase 1	-0.39	
LOC285382	hypothetical gene supported by AK091454	-0.39	
C12orf30	chromosome 12 open reading frame 30	-0.38	
ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	-0.38	
UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)	-0.38	2,91
FOXN2	forkhead box N2	-0.38	
NSMCE4A	non-SMC element 4 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	-0.38	
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	-0.38	
YWHAG	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	-0.37	1,37
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	-0.37	1,64
BMF	Bcl2 modifying factor	-0.37	1,31

MEGF9	multiple EGF-like-domains 9	-0.37	
ZNF704	zinc finger protein 704	-0.36	
ESR1	estrogen receptor 1	-0.36	1,86
ROD1	ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe)	-0.36	
ANGPTL2	angiopoietin-like 2	-0.35	2,28
SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2	-0.35	0,92
PDCD10	programmed cell death 10	-0.35	3,53
IRF2	interferon regulatory factor 2	-0.35	2,61
ATXN1	ataxin 1	-0.34	3,30
MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	-0.33	
<u>INSIG1</u>	<u>insulin induced gene 1</u>	<u>-0.33</u>	2,91
RSBN1L	round spermatid basic protein 1-like	-0.33	3,32
HIPK1	homeodomain interacting protein kinase 1	-0.33	<u>1,04</u>
EIF3S1	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 alpha, 35kDa	-0.33	2,13
MSL2L1	male-specific lethal 2-like 1 (Drosophila)	-0.33	
ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)	-0.33	
PPARGC1A	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	-0.32	
CPNE8	copine VIII	-0.32	2,18
HNRPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	-0.32	
NOPE	likely ortholog of mouse neighbor of Punc E11	-0.32	
FMR1	fragile X mental retardation 1	-0.31	
MIDN	midnolin	-0.31	
PCDHAC1	protocadherin alpha subfamily C, 1	-0.31	1,69
PCDHAC2	protocadherin alpha subfamily C, 2	-0.31	1,69
PCDHA1	protocadherin alpha 1	-0.31	1,69
PCDHA10	protocadherin alpha 10	-0.31	1,69
PCDHA12	protocadherin alpha 12	-0.31	1,69
PCDHA13	protocadherin alpha 13	-0.31	1,69
PCDHA2	protocadherin alpha 2	-0.31	1,69
PCDHA3	protocadherin alpha 3	-0.31	1,69
PCDHA4	protocadherin alpha 4	-0.31	1,69
PCDHA5	protocadherin alpha 5	-0.31	1,69
PCDHA6	protocadherin alpha 6	-0.31	1,69
PCDHA7	protocadherin alpha 7	-0.31	1,69
PCDHA8	protocadherin alpha 8	-0.31	1,69
SEMA6D	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D	-0.31	3,64
RNF4	ring finger protein 4	-0.30	
FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2	-0.30	
ZNF385	zinc finger protein 385	-0.30	3,43
EIF4E3	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3	-0.30	
ACVR2B	activin A receptor, type IIB	-0.30	
TOX	thymocyte selection-associated high mobility group box	-0.30	7,26
MYO10	myosin X	-0.30	2,18
ZADH2	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 2	-0.30	

Tab. 8.4. Putative Proteintargets der hsa-miR-155, hsa-miR-203 und hsa-mir-222. Die Targets wurden mittels des Suchalgorithmus TargetScan selektiert und mit den Treffern des

Algorithmus PicTar verglichen. Putative Targets, die einen TargetScan-Score <-0.30 aufwiesen, wurden aus Platzgründen nicht aufgeführt.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Helge Taubert für die Überlassung dieses spannenden Themas, die immerwährende Diskussionsbereitschaft und die ausgezeichnete Betreuung.

Ich danke Prof. Dr. Peter Würfl für die Überlassung der klinischen Proben und der zugehörigen Datenbanken und die stets gute Zusammenarbeit.

Ich danke Prof. Dr. Steffen Hauptmann für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Ich danke Prof. Dr. Elmar Wahle für die hilfreichen Hinweise und die Diskussionen zu dieser Arbeit.

Ich danke sowohl Birgit Wypior, Ute Rolle und Ilona Wiederhold als auch Anja Böhnke, Anja Wolf, Stefanie Hammer und Dr. Frank Bartel und allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für die stetige Hilfe, anregende Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke den Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie Dr. Matthias Bache, Dr. Matthias Kappler, Swetlana Rot, Jacqueline Kessler, Henri Wichmann, Antje Hahnel und Kathrin Spröte sowohl für die konstante Unterstützung als auch die jederzeit freundliche und hilfreiche Laboratmosphäre.

Ich danke Matthias Kraus für seinen Fleiss, seine Einsatzbereitschaft und die Energie, die er in unsere gemeinsame Arbeit gesteckt hat.

Ich danke Dr. Stefan Hüttelmaier, Juliane Braun und Dr. Nadine Stöhr für ihre Unterstützung beim Erlernen und Anwenden der Techniken der Immunfluoreszenz und Luciferase-Assays.

Ich danke PD Dr. Astrid Kehlen für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich danke allen meinen Freunden für den kontinuierlichen Beistand und die anregenden Gespräche.

Ich danke meinen Eltern und meiner Freundin Julia für die liebevolle und immerwährende Unterstützung, die mich stets von Neuem motivierte weiterzumachen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle, den

(Thomas Greither)

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Thomas Greither
Geburtstag und –ort: 09.03.1980 in Memmingen/Bayern
Wohnort: Robert-Blum-Str. 6
06114 Halle
Familienstand: ledig

Studium

Seit 10/05 Promotion am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/04-06/05 Diplomarbeit am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/00-06/05 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/99-08/00 Zivildienst an der Umweltstation Unterallgäu (Legau)

Schulausbildung

09/90-06/99 Vöhl-Gymnasium Memmingen
09/86-08/90 Grundschule Illerbeuren

Wissenschaftliches Engagement

06/07 Teilnahme am Keystone Symposium „microRNA and cancer“ in Keystone, CO (mit Posterpräsentation)
10/06 Teilnahme am 4th Meeting of the GBM study group RNA biochemistry
04/06 Teilnahme am 97th Annual Meeting of the AACR in Washington (mit Posterpräsentation)

Publikationsliste

Taubert H, Bartel F, Greither T, Bache M, Kappler M, Köhler T, Böhnke A, Lautenschläger C, Schmidt H, Holzhausen HJ, Hauptmann S, Würfl P. Association of HDM2 transcript levels with age of onset and prognosis in soft tissue sarcomas. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1575-81.

Grochola LF, Greither T, Taubert H, Möller P, Knippschild U, Udelnow A, Henne-Bruns D, Würfl P. The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. *Br J Cancer.* 2008 7;99:1083-8.

Grochola LF, Greither T, Taubert HW, Möller P, Knippschild U, Udelnow A, Henne-Bruns D, Würfl P. Prognostic relevance of hTERT mRNA expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Neoplasia.* 2008;10:973-6.

Kappler M, Rot S, Taubert H, Greither T, Bartel F, Dellas K, Hänsgen G, Trott KR, Bache M. The effects of knockdown of wild-type survivin, survivin-2B or survivin-delta3 on the radiosensitization in a soft tissue sarcoma cells in vitro under different oxygen conditions. *Cancer Gene Ther.* 2007;14:994-1001.

Taubert H, Würfl P, Greither T, Kappler M, Bache M, Bartel F, Kehlen A, Lautenschläger C, Harris LC, Kaushal D, Füssel S, Meye A, Böhnke A, Schmidt H, Holzhausen HJ, Hauptmann S. Stem cell-associated genes are extremely poor prognostic factors for soft-tissue sarcoma patients. *Oncogene.* 2007;26:7170-4.

Taubert H, Greither T, Kaushal D, Würfl P, Bache M, Bartel F, Kehlen A, Lautenschläger C, Harris L, Kraemer K, Meye A, Kappler M, Schmidt H, Holzhausen HJ, Hauptmann S. Expression of the stem cell self-renewal gene Hiwi and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Oncogene.* 2007;26:1098-100.

Abstracts

Greither T, Taubert H, Kehlen A, Würfl P, Hauptmann S. A MDM2 associated gene has prognostic impact in STS patients. *AACR 97th Annual Meeting 2006, Washington D.C., 1.-5. April 2006.*

Greither T, Würfl P, Bache M, Bartel F, Stephan O, Bira S, Kappler M, Böhnke A, Schmidt H, Hauptmann S, Taubert H. Alterations in the expression of miRNAs after hypoxia. *Keystone Symposium: MicroRNA and Cancer, Keystone, CO, 8.-12. Juni 2007.*