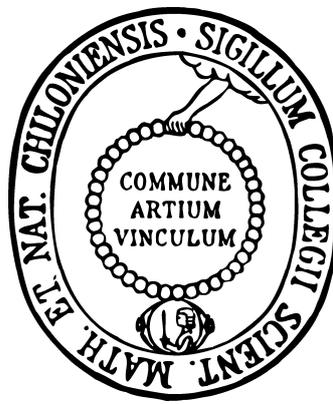


Die Rolle von mikroRNAs in der TRAIL-induzierten Apoptose bei Pankreasadenokarzinomzellen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Andreas Noack

Kiel, 2009

Referent: Prof. Dr. Holger Kalthoff
Koreferent: Prof. Dr. Matthias Leippe

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2009
Zum Druck genehmigt: 15.12.2009

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 MikroRNAs in Tumoren.....	1
1.1.1 MikroRNAs beim Pankreaskarzinom.....	2
1.2 MikroRNA Biogenese.....	2
1.3 TRAIL und TRAIL-Rezeptoren.....	5
1.4 Todesrezeptorsignalwege und mikroRNAs	6
1.5 Nicht-apoptotische TRAIL-induzierte Signalwege und mikroRNAs	9
1.6 Ziele der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden.....	12
2.1 Materialien.....	12
2.1.1 Geräte und Materialien	12
2.1.2 Chemikalien.....	13
2.1.3 Software	15
2.1.4 Antikörper.....	16
2.1.5 Eingesetzte Vektoren.....	17
2.1.6 Verwendete Zelllinien.....	18
2.2 Zellbiologische Methoden.....	18
2.2.1 Zellkulturbedingungen und Passagieren von Zellen	18
2.2.2 Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff	19
2.2.3 Auftauen der Zellen aus flüssigem Stickstoff	19
2.2.4 Stimulierung der Zellen mit Todesliganden	20
2.2.5 Zellzählung	20
2.2.6 Reverse Transfektion.....	20
2.2.7 Zellviabilitätsbestimmung	21

2.2.8 Elektroporation	21
2.2.9 Messung der Zellproliferation	22
2.3 Proteinchemische und immunologische Methoden	22
2.3.1 Isolierung von Gesamtprotein mit RIPA-Puffer und Messung der Proteinkonzentration	22
2.3.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	23
2.3.3 Proteinnachweis mittels Western Blot Analyse.....	24
2.3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	25
2.3.5 Electromobility Shift Assay (EMSA).....	25
2.3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie	26
2.3.7 Messung des DNA-Gehaltes durch Durchflusszytometrie	26
2.3.8 Zytokin-Antikörper Array	27
2.3.9 Luciferaseassay	28
2.3.10 2D-Gelelektrophorese.....	29
2.3.11 MALDI-TOF (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of flight</i>).....	29
2.4 Molekularbiologische Methoden	30
2.4.1 RNA-Isolierung.....	30
2.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	30
2.4.3 Quantitative Real Time Polymerase chain reaction (qRT-PCR)	30
2.4.4 MikroRNA-Array Analyse	32
2.4.5 Transformation	32
2.4.6 Mini-Plasmidpräparation.....	33
2.4.7 Einfrieren von Bakterienzellen.....	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Einfluss von mikroRNAs auf die TRAIL-induzierte Apoptose im duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC).....	34
3.1.1 TRAIL beeinflusst die Expression von mikroRNAs	34

3.1.2 Die Rolle von mikroRNA-197 und mikroRNA-452* in PDAC-Zellen.....	36
3.1.2.1 MikroRNA Expressionsmuster der Pankreaskarzinomzelllinien Colo357, Panc89 und PancTul	36
3.1.2.2 Einfluss von mikroRNA-452* auf PDAC-Zelllinien	38
3.1.2.3 Einfluss von mikroRNA-197 auf epitheliale Tumorzellen	44
3.1.2.3.1 Inhibition von mikroRNA-197 reduziert in Abhängigkeit des p38-Signalweges die Vitalität und Proliferation von epithelialen Tumorzellen	44
3.1.2.3.2 Die Kinase p38 vermittelt die Hemmung der Proliferation von epithelialen Tumorzellen nach der Inhibition von mikroRNA-197	46
3.1.2.3.3 Die Inhibition der mikroRNA-197 beeinflusst die Zytokinsezernierung in Panc89-Zellen	48
3.1.3 MikroRNAs beeinflussen die TRAIL-induzierte Apoptose in PDAC-Zelllinien	51
3.1.3.1 Die FasL induzierte Apoptose wird verstärkt durch die Inhibition der mikroRNA-197	53
3.1.3.2 Die Inhibition der mikroRNA-197 und gleichzeitige Überexpression der mikroRNA-432* verstärkt die TRAIL-induzierte Apoptose in Panc89-Zellen nach TRAIL-Behandlung	54
3.1.3.3 TRAIL-vermittelte Signaltransduktionswege werden unterschiedlich durch die Inhibition der mikroRNA-197 und Überexpression der mikroRNA-432* bei Panc89-Zellen beeinflusst.....	56
3.1.3.4 Durch Inhibition und Überexpression der mikroRNA-197 werden Todesligand-induzierte Signaltransduktionswege verändert	59
3.1.3.5 Durch Inhibition und Überexpression der mikroRNA-197 wird die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB in Panc89-Zellen beeinflusst	60
3.2 MikroRNA-197 reguliert die Expression von Ran GTPase.....	62
3.2.1 Inhibition von mikroRNA-197 verändert die Proteinexpression in epithelialen Tumorzellen.....	62
3.2.2 MikroRNA-197 reguliert die Expression von Ran GTPase in epithelialen Tumorzellen.....	65
4. Diskussion	68
4.1 Die Rolle von mikroRNA-197 in Pankreaskarzinomzellen	69

4.1.1 Das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen ist reduziert nach Inhibition von mikroRNA-197.....	69
4.1.2 Die Zytokinsekernierung von Pankreaskarzinomzellen ist verändert nach Inhibition von mikroRNA-197	69
4.1.3 MikroRNA-197 beeinflusst die TRAIL-induzierte Apoptose bei Pankreaskarzinomzellen	71
4.1.4 MikroRNA-197 reguliert die Ran GTPase Genexpression.....	73
4.1.5 Therapeutisches Potenzial der mikroRNA-197.....	76
4.2 Die Inhibition der mikroRNA-452* und die Überexpression der mikroRNA-432* verursachen eine signifikant verstärkte TRAIL-induzierte Apoptose in Panc89-Zellen.....	77
5. Zusammenfassung	79
6. Summary	81
7. Literaturverzeichnis.....	82
8. Danksagung	97
9. Lebenslauf.....	98

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Struktur von Dicer- und Argonaut-Proteinen	5
2	Todesrezeptorsignalwege und mikroRNAs	8
3	Vektorkarte pEZX-MT01 (A) und DNA Sequenz der Ran GTPase 3'-UTR (B)	18
4	TRAIL-induzierte Apoptose bei Pankreaskarzinomzelllinien	34
5	TRAIL-induzierte Apoptose induziert mikroRNA-197 Expression in Colo357-Zellen	36
6	MikroRNA Expressionsmuster in Colo357-, Panc89- und PancTul-Zellen	38
7	Transfektion mit fluoreszenzmarkierten anti-miRs und pre-miRs bei der Pankreaskarzinomzelllinie Colo357	39
8	Inhibition der mikroRNA-197 und Überexpression der mikroRNA-452* reduzieren die Vitalität in Colo357- und Panc89-Zellen	41
9	MikroRNA-452* hemmt die Proliferation in Panc89-Zellen	42
10	Die Überexpression von mikroRNA-452* reduziert die Proliferation von Panc89-Zellen	43
11	Die Überexpression der mikroRNA-452* hat keinen direkten Einfluss auf den Zellzyklus in Panc89-Zellen	44
12	Die Inhibition von mikroRNA-197 reduziert p38 abhängig die Vitalität in epithelialen Tumorzellen	45
13	Die Inhibition von mikroRNA-197 reduziert p38 abhängig die Proliferation in epithelialen Tumorzellen	46
14	Das Ausschalten der mikroRNA-197 führt zur Aktivierung des p38 Signaltransduktionsweges und zur Spaltung von Caspase3	47
15	Zytokinanalyse der Überstände von Panc89-Zellen nach Inhibition der mikroRNA-197	49
16	Inhibition der mikroRNA-197 induziert die IL-6 Sezernierung in epithelialen Tumorzellen	50
17	MikroRNA-197, mikroRNA-432*, mikroRNA-452*, mikroRNA-302c* und mikroRNA-140 beeinflussen die TRAIL-induzierte Apoptose in PDACs	53
18	Inhibition der mikroRNA-197 verstärkt die TRAIL- und FasL induzierte Apoptose in Panc89-Zellen	54
19	Inhibition der mikroRNA-197 und gleichzeitige Überexpression der mikroRNA-432* verstärkt die Apoptose nach TRAIL- Behandlung	56

20	Western Blot Analyse nach Inhibition der mikroRNA-197 und Überexpression der mikroRNA-432* der TRAIL-behandelten Panc89-Zellen	58
21	Western Blot Analyse nach Inhibition und Überexpression der mikroRNA-197 der TRAIL-behandelten Panc89-Zellen	60
22	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i> der Kernextrakte von Panc89-Zellen nach transienter Transfektion und TRAIL-Behandlung	61
23	Differentielle Gelelektrophorese nach Inhibition der mikroRNA-197 in epithelialen Tumorzellen	63
24	MikroRNA-197 reguliert die Ran GTPase Expression in epithelialen Tumorzellen	65
25	MikroRNA-197 reguliert die Expression der Ran GTPase über die Interaktion mit der 3'-UTR der Ran GTPase mRNA	67

Tabellenverzeichnis

1	Eingesetzte Geräte und Materialien	12
2	Eingesetzte Chemikalien	13
3	Eingesetzte Software	15
4	Eingesetzte Antikörper	16
5	Identifikation von mikroRNA-197 Zielsequenzen durch <i>in silico</i> Analysen	64

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
2D	zwei-dimensional
³² P	Phosphorisotop
A	Adenin
AGO	<i>Archipelago homolog</i>
AP-1	Aktivatorprotein-1
<i>Apaf-1</i>	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Bcl-2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl2-interacting mediator of cell death</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Caspase	<i>cysteine dependent aspartat specific protease</i>
cDNA	komplementäre DNA
<i>cFLIP</i>	<i>Cellular Fllice-like inhibitory protein</i>
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	<i>counts per minute</i>
C _T	<i>Threshold cycle</i>
<i>ctrl</i>	<i>Kontrolle</i>
CY	Cyanine
DDT	dichlorodiphenyltrichloroethan
dest.	destilliert
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>

DIABLO	<i>Direct IAP Binding Protein with Low pI</i>
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
<i>DR</i>	<i>Death Receptor</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	et alteri
<i>FACS</i>	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
<i>FADD</i>	<i>FAS-associated protein with DD</i>
<i>FASL (bzw. CD95L)</i>	<i>FAS-Ligand</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FLIP	<i>FLICE-inhibitory protein</i>
FMR1	<i>fragile X mental retardation 1</i>
<i>FRET</i>	<i>Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer</i>
FSC	<i>forwardscatter</i>
FTC	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
Fus1	<i>Fusion 1 Protein</i>
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
<i>HEK</i>	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N-ethansulfonsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>

HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>I kappa B-kinase</i>
IL	Interleukin
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
Kan	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
kBq	Kilobecquerel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LATS-2	<i>large tumor suppressor, homolog 2</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
<i>mAbM2</i>	<i>monoclonal antibody M2</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
<i>Mcl-1</i>	<i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium Eagle</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minute
miR, miRNA	mikroRNA
miRISC	<i>miRNA-containing RNA-induced silencing complex</i>
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Neo	Neomycinresistenz
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NFκB	<i>nuclear factor-kappa B</i>

ng	Nanogramm
NP-40	Nonidet P-40
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OH	Hydroxylgruppe
ori	<i>origin of replication</i>
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
Pasha	<i>partner of drosha</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDAC	duktale Pankreasadenokarzinomzellen
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
pl	isoelektrischer Punkt
<i>PKC</i>	<i>Protein Kinase C</i>
pre-miRNA, miR	<i>precursor microRNA</i>
pri-miRNA	primäre mikroRNA
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	<i>quantitative Real-time-PCR</i>
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i>
RDE-4	<i>RNAi Defective4</i>
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease A
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interferece Ribonukleinsäure</i>
Smac	<i>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
SSC	<i>sidescatter</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>

T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53INP1	<i>tumor protein p53 inducible nuclear protein 1</i>
TRADD	<i>TNFR1-associated DEATH domain protein</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
<i>TRAIL-R</i>	<i>TRAIL-Rezeptor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	<i>weight per volume</i>

1. Einleitung

1.1 MikroRNAs in Tumoren

MikroRNAs sind kleine nicht kodierende RNAs mit einer Länge von 18-24 Nukleotiden, die negativ auf die Expression von spezifischen Genen wirken. Sie binden sequenzspezifisch an die von ihnen regulierte messenger RNA (mRNA) und führen entweder zu deren Degradation oder zur spezifischen Hemmung der Translation (Ambros *et al.*, 2003; Bartel *et al.*, 2004; Cullen *et al.*, 2004). Bisher wurden 706 humane mikroRNAs entdeckt (Chuncheng *et al.*, 2009) und es wurde die Existenz von insgesamt ungefähr 1.000 mikroRNAs im Menschen aufgrund von Sequenzanalysen vorhergesagt (Lewis *et al.*, 2005). Die Komplexität des durch mikroRNAs regulierten Genexpressionsnetzwerkes wird deutlich, wenn man in Betracht zieht, dass eine einzelne mikroRNA viele unterschiedliche mRNAs binden kann und deren Translation reguliert und andersherum viele verschiedene mikroRNAs in Kooperation eine einzige mRNA beeinflussen können (Lewis *et al.*, 2003). Durch bioinformatische Analysen wurde vorhergesagt, dass jede mikroRNA an durchschnittlich 100-200 mRNA-Zielsequenzen binden kann und somit eine große Anzahl von proteinkodierenden Genen regulieren kann. MikroRNAs beeinflussen nahezu alle zellulären Prozesse (Lim *et al.*, 2005).

Der Durchbruch in der mikroRNA-Forschung gelang durch die Entdeckung der in Mensch und Maus konservierten mikroRNA-let-7. Let-7 kontrolliert die zeitliche Abfolge in der Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* (Reinhardt *et al.*, 2000; Pasquinelli *et al.*, 2000). Mehrere andere mikroRNAs wurden seitdem als essentiell für die Entwicklung verschiedener Tierarten und auch bei den Menschen beschrieben. Im Jahr 2002 gab es einen ersten Hinweis darauf, dass mikroRNAs in Tumoren dereguliert vorliegen. Die Gene der mikroRNAs 15 und 16 wurden beim Menschen auf Chromosom 13 in einem Bereich detektiert, der bei chronischer lymphatischer Leukämie in B-Zellen häufig deletiert ist (Calin *et al.*, 2002). Die genaue Analyse der chromosomalen Positionen von 186 mikroRNA Genen zeigte, dass von diesen 52 % in Tumor charakterisierenden Regionen positioniert sind (Calin *et al.*, 2004). MikroRNAs greifen in die Tumorentwicklung ein, indem sie das Zellwachstum und/oder Apoptose regulieren. Es wurden bereits mehrere Beispiele, in denen mikroRNAs als Onkogene oder Tumorsuppressoren wirken, publiziert. Das mikroRNA-17-92-Cluster ist ein in Lungentumoren überexprimiertes Onkogen (He *et al.*, 2005). Die mikroRNAs 372 und 373 vermitteln Zellproliferation und Tumorentwicklung durch die Inhibierung des Tumorsuppressorgens

LATS 2 (Vorhoeve *et al.*, 2006). Die mikroRNAs 15 und 16 induzieren Apoptose durch die Inhibierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Cimmino *et al.*, 2005). Und die in *Caenorhabditis elegans* entdeckte mikroRNA let-7 spielt in Tumoren die Rolle eines Tumorsuppressorgens, da sie an die 3'-untranslatierte Region der mRNA des *ras* Onkogens (Johnson *et al.*, 2005) und des *hmg2* Onkogens (Mayr *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Herbert *et al.*, 2007) bindet und somit deren Expression inhibiert.

1.1.1 MikroRNAs beim Pankreaskarzinom

MikroRNAs eignen sich sehr gut als diagnostische Marker von Tumoren. Neben der Tatsache, dass die Expression vom Großteil der mikroRNA Gene in Tumoren im Vergleich zu gesunden Geweben reduziert ist, konnte gezeigt werden, dass mikroRNA-Genexpressionsprofile die Klassifizierung von Tumoren besser widerspiegeln als mRNAs (Lu *et al.*, 2005). Die Strategien, die bisher zur Verfügung stehen, um das Pankreaskarzinom zu diagnostizieren und zu behandeln sind unbefriedigend, da die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten nach Diagnose bei 5 % liegt (Jemal *et al.*, 2008). Durch mikroRNA-Genexpressionsstudien konnte das Pankreaskarzinom eindeutig von gesundem Pankreas und chronischer Pankreatitis unterschieden werden. Die Analyse der mikroRNA-Genexpressionsdaten ergab, dass sich anhand der in gesunden Pankreasgewebe hochregulierten mikroRNA-217 und der in Proben des Pankreaskarzinoms hochregulierten mikroRNA-196a eine Identifizierung des Pankreaskarzinoms bewerkstelligen ließ (Szafranska *et al.*, 2007). Des Weiteren ist die Genexpression von mikroRNA-155 im Pankreaskarzinom, wie auch in vielen anderen Tumoren erhöht (Lee *et al.*, 2007; Szafranska *et al.*, 2007; Gironella *et al.*, 2007). Zu dem durch mikroRNA-155 regulierten Genexpressionsnetzwerk gehören TP53INP1 (Gironella *et al.*, 2007), FADD, das receptor-interacting protein (RIP) (Tili *et al.*, 2007) und auch die Caspase3 (Ovcharenko *et al.*, 2007) (Abschnitt 1.4, Abbildung 2).

1.2 MikroRNA Biogenese

MikroRNA Gene sind evolutionär konserviert und liegen zu 70 % in Introns oder Exons von proteinkodierenden Genen und zu 30 % in nicht proteinkodierenden DNA-Regionen, als unabhängige Transkriptionseinheiten vor (Rodriguez *et al.*, 2004). MikroRNAs werden hauptsächlich durch Polymerase II transkribiert. Es entstehen lange primäre RNA-Transkripte

(pri-mikroRNA), die mehrere Kilobasen lang sein können und charakteristische Haarnadelstrukturen aufweisen. Pri-mikroRNAs werden im Kern durch das RNase-III-Enzym Drosha zu ungefähr 70 Nukleotid langen *precursor microRNAs* (pre-mikroRNAs) prozessiert (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). Drosha ist ein 160 kDa großes Protein, das konserviert in Eukaryoten vorliegt (Filippov *et al.*, 2000; Fortin *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2000). Es enthält zwei RNase-III Domänen und eine Doppelstrang bindende Domäne die entscheidend für die Prozessierung der pri-mikroRNAs sind (Han *et al.*, 2004). Drosha formt einen 500 kDa großen Komplex in *Drosophila melanogaster* (Denli *et al.*, 2004) oder einen 650 kDa großen Komplex im Menschen, der als Mikroprozessorkomplex bezeichnet wird (Han *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004). In diesem Komplex interagiert Drosha mit dem Kofaktor DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) Protein im Menschen. Dieses ungefähr 120 kDa große Protein ist in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* auch unter dem Namen Pasha bekannt. Die Rolle von DGCR8 beziehungsweise Pasha ist noch nicht vollständig geklärt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass dieses Protein Drosha bei der Substraterkennung hilft (Han *et al.*, 2004; Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Landthaler *et al.*, 2004). Die Substraterkennung von Drosha ist auch noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt hunderte verschiedene pri-mikroRNAs in tierischen Zellen, aber es scheint keine gemeinsamen Sequenzmotive zu geben. Allerdings zeigen Mutationsanalysen, dass die Tertiärstruktur der pri-mikroRNAs für die Spezifität der vom Drosha-Komplex durchgeführten Prozessierung von pri-mikroRNAs zu pre-mikroRNAs verantwortlich ist (Lee *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2005).

Beim Export der pre-mikroRNAs aus dem Kern ins Zytoplasma wird die aus einer Doppelmembran bestehende Kernhülle über die Kernporen, die aus Proteinkomplexen bestehen, überwunden (Nakielny *et al.*, 1999). Für den Export von RNA oder Proteinen binden Mitglieder der Kern-Export-Rezeptor-Familie an das zu transportierende Molekül und auch an die GTP gebundene Form des Kofaktors Ran im Kern. Nach dem Export wird GTP zu GDP hydrolysiert und das Molekül wird in das Zytoplasma entlassen. Das Ausschalten des Rezeptors Exportin-5 führte zu einer deutlichen Reduktion der Menge von pre-mikroRNAs und reifen mikroRNAs im Zytoplasma. Demzufolge vermittelt der Kern-Export-Rezeptor Exportin-5 den Export von pre-mikroRNAs (Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2004). Exportin-5 war zuvor schon als tRNA-Transporter bekannt, da der Transporter Exportin-5 die Aufgabe des tRNA-Transporters Exportin-t übernehmen kann, wenn dieser ausgeschaltet wird (Bohnsack *et al.*, 2002; Calado *et al.*, 2002). Exportin-5 kann auch nichtkodierende 160 Nukleotid lange adenovirale RNA exportieren. Für den Export dieser RNA ist ein drei bis acht Nukleotide langer 3'-Überhang und eine Mini-Helix deren Stamm aus

mindestens 14 Basenpaaren besteht, nötig (Gwizdek *et al.*, 2003). Ein ähnliches Strukturmotiv findet sich auch in den Haarnadelstrukturen von pre-mikroRNAs, diese haben normalerweise einen Stamm, der aus 22 Nukleotiden besteht und einen 3'-Überhang der aus zwei Nukleotiden besteht (Lee *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004; Basyuk *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2004). Durch Mutationsanalysen wurde bei pre-mikroRNA-30a gezeigt, dass ein Stamm der Haarnadelstruktur von mindestens 16 Basenpaaren und ein kurzer 3'-Überhang notwendig ist um die pre-mikroRNA zu exportieren (Zeng *et al.*, 2004).

Im Zytoplasma werden die pre-mikroRNAs in ungefähr 22 Nukleotide große doppelsträngige mikroRNAs geschnitten (Bernstein *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001; Knight *et al.*, 2001). Zuerst wurde die Hypothese aufgestellt, dass das RNaseIII-Enzym Dicer, das bereits bei der Prozessierung von short-interference-RNAs (siRNAs) identifiziert wurde (Hammond *et al.*, 2000), auch die Prozessierung von pre-mikroRNAs in reife mikroRNAs vollführt. Einen ersten Hinweis, der diese Hypothese bestärkte, lieferte ein Experiment, bei dem Dicer mittels Immunpräzipitation isoliert wurde und *in vitro* aus synthetisch hergestellter pre-mikroRNA-let-7 reife mikroRNA-let-7 generiert wurde (Ketting *et al.*, 2001; Knight *et al.*, 2001). Des Weiteren führte das Ausschalten von Dicer zu einer Anhäufung von pre-mikroRNAs und zu einer Verminderung von reifer mikroRNA in *Caenorhabditis elegans* und auch in humanen Zelllinien (Grishok *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001; Knight *et al.*, 2001). Dicer ist ein hochkonserviertes Protein, das in fast allen eukaryotischen Organismen wie Pilzen (*Schizosaccharomyces pombe*), Pflanzen und Tieren enthalten ist. Manche Organismen haben eine Vielzahl von Dicer-Homologen denen unterschiedliche Aufgaben zugeteilt werden. Zum Beispiel wurde in *Drosophila melanogaster* gezeigt, dass Dicer-1 für die Prozessierung von pre-mikroRNAs und Dicer-2 für die Prozessierung von siRNAs zuständig ist (Lee *et al.*, 2004). Dicer Homologe sind 200 kDa große Proteine mit mehreren Domänen (Abbildung 1A). Die PAZ-Domäne bindet doppelsträngige RNAs mit kurzen, zwei Nukleotide langen 3'-Überhängen. Die beiden RNase-III-Domänen schneiden jeweils einen der beiden Stränge. Diese Reaktion hinterlässt ein 5'-Monophosphat an den Produktenden. Die Funktionen der anderen Dicer Domänen sind noch weitestgehend unbekannt. Dicer ist mit mehreren Proteinen assoziiert, RDE-4 in *Caenorhabditis elegans* (Tabara *et al.*, 2002), R2D2 und FMR1 in *Drosophila melanogaster* (Liu *et al.*, 2003; Ishizuka *et al.*, 2002; Caudy *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2004) und mit Proteinen der Argonaut-Familie in mehreren Organismen (Hammond *et al.*, 2001; Carmell *et al.*, 2002). Auch in der hochkonservierten Argonaut-Proteinfamilie (AGO) ist die PAZ-Domäne enthalten (Abbildung 1B). In *Drosophila melanogaster* wurde gezeigt, dass AGO-1 und AGO-2 an das hervorstehende 3'-Ende von kleinen RNAs bindet (Ma *et al.*, 2004; Lingel *et al.*, 2004; Song

et al., 2003; Yan *et al.*, 2003). Das mit Dicer interagierende humane Protein AGO-2 kann mRNAs degradieren (Song *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004). Die doppelsträngige mikroRNA wird entwunden und die reife einzelsträngige mikroRNA wird in den mikroRNA-containing RNA-induced silencing complex (miRISC) eingebaut, wobei das 5'-Ende der einzelsträngigen RNA an die Mid-Domäne des im RISC-Komplex enthaltenen Argonaut-Proteins gebunden wird. Es ist nicht bekannt, wie der verworfene Strang entfernt und abgebaut wird. Es gibt jedoch siRNA Studien die zeigen, dass die relative thermodynamische Stabilität der beiden Enden des Doppelstranges bestimmt, welcher Strang in den RISC-Komplex eingebaut wird. Normalerweise wird der Strang mit unstabileren Basenpaarungen am 5'-Ende in den RISC-Komplex eingebaut (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003; Carthew *et al.*, 2009). Der RISC-Komplex erlangt durch den Einbau der mikroRNA Spezifität und kann entweder zur Degradation oder zur Hemmung der Translation von mRNAs führen (Ambros *et al.*, 2003; Bartel *et al.*, 2004; Cullen *et al.*, 2004).

A**B**

Abbildung 1. Schematische Struktur von Dicer- und Argonaut-Proteinen. Die mikroRNA-vermittelte Inhibition der Translation wird insbesondere durch das Protein Dicer (A) und Proteine der Argonaut-Familie (B) vermittelt. Die PAZ-Domäne bindet doppelsträngige RNAs mit kurzen ungefähr zwei Nukleotide langen 3'-Überhängen und ist sowohl in Dicer Proteinen als auch in Proteinen der Argonaut-Familie vorhanden (A, B). Die in Proteinen der Argonaut-Familie enthaltene Mid Domäne bindet das 5'-Ende der einzelsträngigen RNA im RISC-Komplex (aus Carthew *et al.*, 2009).

1.3 TRAIL und TRAIL-Rezeptoren

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand, auch bekannt als Apo2L oder TNFSF10), ist ein Typ-II transmembranäres Protein, das zur TNF-Superfamilie gehört. Der Todesligand TRAIL induziert Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen in Tumorzellen und

präferenziell in gesunden Zellen (Ashkenazi *et al.*, 1999; Walczak H *et al.*, 1999; Griffith *et al.*, 2009). TRAIL wurde ursprünglich basierend auf Sequenzhomologien der extrazellulären Domäne zu FasL (CD95L) (28 % identisch), und zu TNF (23 % identisch) identifiziert und kloniert (Wiley *et al.*, 1995). Der Mensch hat fünf unterschiedliche TRAIL-Rezeptoren (Ashkenazi *et al.*, 2002), die durch separate Gene auf der DNA kodiert vorliegen. DR4 (TNFRSF10a, TRAILR1) und DR5 (TNFRSF10b, TRAILR2) können Komplexe mit sich selbst (Homomere) oder untereinander (Heteromere) bilden und Apoptose induzieren (Kischkel *et al.*, 2000).

Die anderen drei Rezeptoren werden als Decoy-Rezeptoren (engl.: decoy-Lockvogel) bezeichnet. Decoy-Rezeptor 1 (DcR1) hat keine zytoplasmatische Domäne (Sheridan *et al.*, 1997) und DcR2 (Degli-Esposti *et al.*, 1997) hat eine trunkturierte, nicht funktionelle zytoplasmatische Todesdomäne. DcR1 und DcR2 sind daher unfähig apoptotische Signale zu vermitteln. Der fünfte TRAIL-bindende Rezeptor ist Osteoprotegerin (TNFRSF11b). Dies ist ein lösliches Protein, das ebenfalls als Decoy-Rezeptor wirken könnte, indem es TRAIL extrazellulär bindet (Emery *et al.*, 1998).

1.4 Todesrezeptorsignalwege und mikroRNAs

Der extrinsische oder auch Caspase8/10 abhängige Signalweg wird durch Todesliganden wie TRAIL, CD95L (FasL) und TNF α induziert. Die Expression des Gens das für den Todesliganden TNF α kodiert wird durch mikroRNA-125b inhibiert (Tili *et al.*, 2007). Alle Todesrezeptoren haben eine zytoplasmatische Todesdomäne. Dies ist eine strukturell konservierte Protein-Interaktionsdomäne, die aus sechs α -Helices besteht und eine wichtige Rolle in der Initiation von apoptotischen Signalen spielt (Bodmer *et al.*, 2002). Nach Bindung von Todesliganden trimerisieren die aktivierten Todesrezeptoren und bilden den *death-inducing signalling complex* (DISC). Im DISC ist das Adapterprotein FADD über die Bindung der FADD-Todesdomäne mit den Todesdomänen des Rezeptorkomplexes assoziiert und rekrutiert Caspase8 oder Caspase10, die durch autoproteolytische Spaltung aktiviert werden (Bodmer *et al.*, 2000). In Typ-I-Zellen kann die aktivierte Caspase8 nach Freisetzung ins Zytosol zur Aktivierung der Caspase3 und zur Apoptose führen. MikroRNA-155 beeinflusst die Initiation von apoptotischen Signalen durch die Inhibition der Translation des Adapterproteins FADD und des receptor-interacting proteins (RIP) (Tili *et al.*, 2007) und greift auch in die Effektorphase der Apoptose ein, indem die Expression des Gens der Effektor-Caspase3 inhibiert wird (Ovcharenko *et al.*, 2007). RIP ist eine Serin/Threonin Kinase, die wie

auch FADD eine Todesdomäne besitzt, die für die Rekrutierung mit der Todesdomäne des Fas-Rezeptors und des TNF-Rezeptors durch Interaktion mit TRADD (*TNFR1-associated DEATH domain protein*) verantwortlich ist (Hsu *et al.*, 1996; Stanger *et al.*, 1995). In Typ-II-Zellen wird sehr wenig aktive Caspase8 am DISC produziert. Eine gewisse Menge an produzierter Caspase8 ist jedoch erforderlich, um das zytosolische Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) zu spalten (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Gespaltenes Bid induziert die Freisetzung von Cytochrom c und SMAC/Diablo (*Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding Protein with Low pI*) aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma. SMAC/Diablo wirkt proapoptotisch durch die Neutralisierung der antiapoptotisch wirkenden Proteine der IAP-Familie (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) (Du *et al.*, 2000). Die Proteine der IAP-Familie wirken antiapoptotisch durch die Inhibition der Caspasen-9, -3 und -7 (Deveraux *et al.*, 1997). Cytochrom c bindet die Adapterproteine Apaf-1 und Pro-Caspase9 und formt so das Apoptosom, das Caspase3 aktiviert und die Apoptose induziert (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 1999) (Abbildung 2). Als wichtiger Indikator für apoptotischen Zelltod gilt die Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1). PARP-1 wird während der Apoptose durch die Caspase3 und Caspase7 gespalten (Kaufmann *et al.*, 1993).

Die Bcl-2 Familie greift regulierend in die Apoptose ein (Adams *et al.*, 1998). Zu den antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 Familienmitgliedern deren Genexpression von mikroRNAs reguliert wird gehören Bcl-2 und Mcl-1. Bcl-2 inhibiert die Freilassung von Cytochrom c (Murphy *et al.*, 2000) und Mcl-1 interagiert und blockiert proapoptotische Bcl2-Familienmitglieder (Sato *et al.*, 1994). Die Genexpression von Mcl-1 wird von mikroRNA-29 und von Bcl-2 von mikroRNA-15 und mikroRNA-16 reguliert, diese mikroRNAs wirken dementsprechend proapoptotisch (Mott *et al.*, 2007; Cimmino *et al.*, 2005). Die Regulation der Genexpression durch mikroRNAs, eines proapoptotisch wirkenden Bcl-2 Familienmitglieds konnte bisher nur für das Protein Bim gezeigt werden. Bim induziert die Apoptose durch die Bindung und Blockierung von antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 Familienmitgliedern (O'Connor *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1998). Die Genexpression von Bim wird durch mikroRNA-17-92 (Inomata *et al.*, 2009) und mikroRNA-106b-25 (Petrocca *et al.*, 2008) reguliert. Weitere mikroRNAs die die Expression des Gens der Effektor-Caspase3 regulieren sind mikroRNA-96, mikroRNA-145, mikroRNA-150 und mikroRNA-188 (Ovcharenko *et al.*, 2007) (Abbildung 2).

Die Caspase8- und Caspase10-Aktivierung am DISC kann durch cFLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) gehemmt werden. Ähnlich der Caspase8 und Caspase10 hat cFlip zwei Todeseffektordomänen. Bisher wurden drei unterschiedliche Spleißvarianten von cFlip auf

Proteinebene entdeckt, die cFLIP_L, cFLIP_S und cFLIP_R genannt werden (Golks *et al.*, 2005). Sowohl cFLIP_L als auch cFLIP_S werden über Interaktion mit den Todesdomänen an den DISC-Komplex rekrutiert. Es wurde gezeigt, dass cFLIP_S die Caspase8 Aktivierung am DISC kompetitiv durch die Bindung an FADD blockiert. Aufgrund der Ähnlichkeit von cFLIP_R zu cFLIP_S wird eine ähnliche Funktion in der Todesrezeptor vermittelten Apoptose angenommen. Die Funktion von cFLIP_L ist umstritten. Es wurde beschrieben, dass cFLIP_L antiapoptotisch in der Art wie cFLIP_S wirkt und auch proapoptotisch durch die Aktivierung der Caspase8 am DISC (Rasper *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 2000).

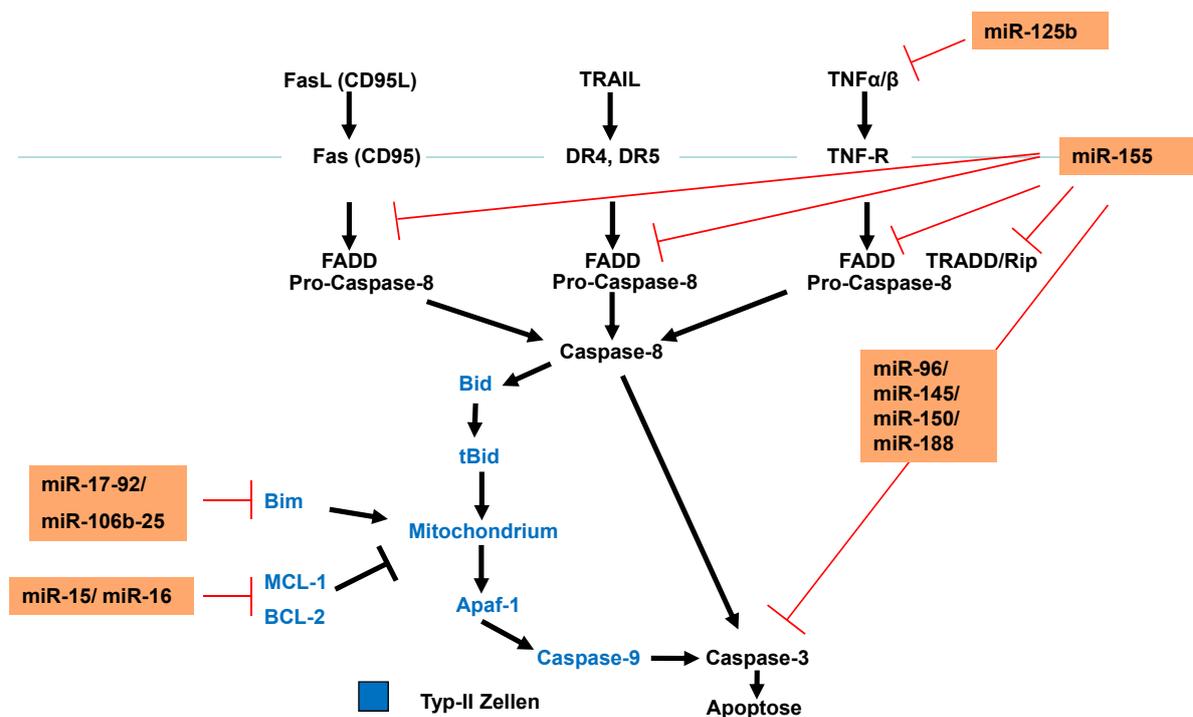


Abbildung 2. Todesrezeptorsignalwege und mikroRNAs. Schematische Darstellung von Todesrezeptorsignalwegen von Typ-I-Zellen und Typ-II-Zellen (blau). Die orange hinterlegten mikroRNAs inhibieren die Genexpression von Todesrezeptorsignalmolekülen (aus Garofalo *et al.*, 2009).

1.5 Nicht-apoptotische TRAIL-induzierte Signalwege und mikroRNAs

Die TRAIL-induzierte Apoptose führt nicht nur zur Aktivierung von Effektor-Caspasen und schließlich zur Initiation der Apoptose, sondern induziert auch nicht-apoptotische Signalwege in Pankreaskarzinomzellen, zu denen NFκB, mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase, MAPK) und Proteinkinase C (PKC) gehören (MacFarlane *et al.* 2003; Trauzold *et al.*, 2001; Siegmund *et al.*, 2007). NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, der als Dimer im inaktiven Zustand gebunden an IκB im Zytoplasma vorliegt. Von den fünf verschiedenen NFκB-Untereinheiten (cRel, RelA (p65), RelB, p50 und p52), bilden sich zumeist Heterodimere aus einem der Rel-Proteine (cRel, RelA (p65) und RelB) und p50 oder p52 (Palombella *et al.*, 1994; Karin *et al.*, 2000). NFκB ist beteiligt an Entzündungsprozessen, an der Stressantwort, an der Zellproliferation und an der Apoptose. Im TNF-Rezeptorsystem, wird nach Ligandenbindung, wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, das Protein RIP intrazellulär über die Todesdomäne an den Todesrezeptorkomplex rekrutiert. RIP interagiert mit IKKγ und IκB Kinase α (IKKα) und IKKβ, die wiederum die Inhibitoren von κB (IκB) phosphorylieren. Dies führt zu einer Degradation von IκB und zu einer Aktivierung von NFκB (Mercurio *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997). Des Weiteren wurde RIP auch im TRAIL-induzierten DISC gefunden (Harper *et al.*, 2001). Promotoranalysen haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor NFκB die Expression des mikroRNA-146 Genes und des mikroRNA-let-7a-3/-let-7b Genclusters reguliert (Taganov *et al.*, 2006; Garzon *et al.*, 2007). Außerdem wurde durch Inhibitionsstudien gezeigt, dass pri-mikroRNA-155 von NFκB reguliert wird (Kluiver *et al.*, 2007). Das pri-mikroRNA-155 Transkript ist auf der mRNA des B-Zell-Integrationscluster (BIC) kodiert (Eis *et al.*, 2005). Eine erhöhte Genexpression dieser mikroRNA wurde in B-Zell Lymphomen (Costinean *et al.*, 2006), bei Lungenkrebs (Yanaihara *et al.*, 2006), bei Brustkrebs (Iorio *et al.*, 2005) und beim Pankreaskarzinom (Gironella *et al.*, 2007) gemessen. MikroRNA-155 reguliert die Genexpression von TP53INP1. TP53INP1 wiederum vermittelt Zellzyklusarrest und Apoptose und wird durch den Transkriptionsfaktors p53 induziert. Eine erhöhte Genexpression von mikroRNA-155 korreliert mit einer deutlich reduzierten TP53INP1 Proteinmenge im Pankreaskarzinom (Gironella *et al.*, 2007).

Zur Familie der MAP-Kinasen gehören unter anderem die extracellular signal-regulated kinase (ERK), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38-MAP-Kinase. Die MAP-Kinasen beeinflussen wie auch NFκB verschiedene zelluläre Prozesse, zu denen Entzündungsprozesse, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und auch Apoptose gehören.

Es wurde gezeigt, dass die TRAIL-induzierte ERK Aktivierung anti-apoptotisch wirkt (Soderstrom *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2001) und die Inhibition des ERK-Signaltransduktionsweges in humanen Brustkrebszellen zu einer Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose führt (Lee *et al.*, 2006). Umgekehrt wurde gezeigt, dass die Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose in Lungenkrebszellen durch ein Diterpen (PG490) mittels Inhibierung der Phosphorylierung des ERK-Signaltransduktionsweges aufgehoben werden kann. Demzufolge spielt der ERK-Signaltransduktionsweg in diesem Zellsystem eine pro-apoptotische Rolle (Frese *et al.*, 2003). Die Rolle der p38-MAP-Kinase und von JNK in der TRAIL-induzierten Apoptose wird ebenfalls umstritten diskutiert. Nach TRAIL-induzierter Apoptose konnte in der Darmkrebszelllinie DLD1 eine p38-Aktivierung nachgewiesen werden. Die Inhibition des p38-Signaltransduktionsweges hatte keinen Einfluss auf TRAIL-induzierte Apoptose in Darmkrebszellen (Zhang *et al.*, 2004). Wohingegen die Inhibition der p38-MAP-Kinase in vielen verschiedenen Krebsarten die Effekte von Chemotherapeutika-Anwendungen verstärkte (Guicciardi *et al.*, 2007; Gonzalez-Guerrico *et al.*, 2005; Lub-de Hooge *et al.*, 2004). Zum einen wurde gezeigt, dass die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung in HeLa-Zellen nicht mit dem Zelltod assoziiert ist (Muhlenbeck *et al.*, 1998) und zum anderen wurde gezeigt, dass in humanen Oligodendrozyten die TRAIL-induzierte Apoptose die Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges benötigt (Jurewicz *et al.*, 2006).

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, mikroRNAs, die an der TRAIL-vermittelten zellulären Antwort beteiligt sind, zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Durch diese Ergebnisse sollte ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von TRAIL erlangt werden. Zunächst sollten mikroRNA-Genexpressionsanalysen mit und ohne TRAIL-Stimulation bei einer TRAIL-sensitiven Pankreaskarzinomzelllinie mittels mikroRNA-Array Analyse und quantitativer RT-PCR durchgeführt werden. Nach Identifizierung der differentiell exprimierten mikroRNAs sollte eine funktionelle Analyse in den sensitiven Colo357-Zellen, sowie in den resistenten Panc89-, BxPc3- und PancTul-Zellen erfolgen. Die funktionelle Analyse sollte auf zwei molekularbiologischen Ansätzen gründen:

1. Die Heraufregulation der mikroRNA-Aktivität, wodurch *gain of function*-Phänotypen generiert werden. Dies sollte mittels Transfektion von Vorläufer-mikroRNA- (pre-mikroRNA-) Molekülen durchgeführt werden.

2. Die Herunterregulation der mikroRNA-Aktivität, wodurch *loss of function*-Phänotypen generiert werden. Dies sollte durch eine *Knockdown*-Technik erfolgen, bei der kurze antisense Oligonukleotide, die an Cholesterol gekoppelt sind, in die Zelle transfiziert werden. Die jeweilige Identifizierung der veränderten Phänotypen sollte mittels verschiedener zellbiologischer und molekularbiologischer Techniken (Apoptose- und Proliferations-Assays, Westernblot, quantitative RT-PCR) durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Materialien

Tabelle 1. Eingesetzte Geräte und Materialien.

Gerätenamen	Typbezeichnung (Hersteller)
Amaxa Elektroporationsgerät	Nucleofactor II System Solution V (Lonza, Köln, Deutschland)
Blotting PVDF Membran	Immobilon-P (Millipore, Schwalbach, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
ECL-Chemiluminiszenz- Film	Hyperfilm (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)
ELISA-Reader	Sunrise Remote (Tecan Trading AG, Männedorf, Deutschland)
Eppendorfreaktionsgefäße	0,5 ml; 1ml; 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Filmentwickler	Curix 60 (Agfa, Gera, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Gele	4-20% Tris-Glycin-Gel 1mm x 10 Well (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Heizblock	Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Kühlzentrifuge	5415 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Lichtmikroskop	Axiovert S100 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Liquid Szintillations Counter	Betaplate Liquid Scintillation Beta Counter (Wallace Oy, Turku, Finnland)
Schüttler	Certomat [®] U, B. Braun (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)

Schwenktisch	Duomax 2030 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
SDS-Page Gelkammer	Novex Mini Cell XCell Sure Lock (Invitrogen)
Spannungsgerät	Biometra (Biotron, Göttingen, Deutschland)
Sterilbänke	HBB2448, Heraeus LaminAir® HLB2472, Heraeus LaminAir® (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland)
Thermoblock	Thermomixer Compact (Eppendorf)
Vortexer	Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
Zellharvester	Skatron, Lier, Norwegen
Zellkulturflaschen	T75, T175 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturinkubatoren	BBD 6220 und B6 (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland)
Zellkulturplatten	6- /96-Loch-Platten (Sarstedt)
Zellkulturzentrifuge	Rotina 48 R (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
Zellzahlmessgerät	Casy 1 TT (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2. Eingesetzte Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Accutase	PAA, Cölbe, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Casyton Lösung	Schärfe System
Complete Mini Protease-Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Curix 60 Developer G153 A und B	Agfa

Curix 60 Rapid Fixer G354	Agfa
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DTT (1,4-Dithiohreitoll)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ECL Plus	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Glutamax 100x	Invitrogen
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Hepes	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
KCl (Kalium Chlorid)	Roth
Kristallviolett	Roth
Magermilchpulver	Roth
Methanol	Roth
Natriumazid (NaN ₃)	Roth
Natriumchlorid	J.T. Baker, Niederlande
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Roth
Natriumpyruvat 100mM	Invitrogen
OPTI-MEM I Kulturmedium	Invitrogen

Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich
RNase A	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RPMI 1640 Kulturmedium	Invitrogen
Salzsäure 37%ig	Roth
SDS 10%ige Lösung	ApliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	Merck
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin 10x	Invitrogen
Tween 20	Merck

2.1.3 Software

Tabelle 3. Eingesetzte Software.

Software	Hersteller
Cell Quest Pro	Becton Dickinson
DC Leica Viewer	Leica, Bensheim, Deutschland
Graph pad prism	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft® Corporation, Redmond, USA
Microsoft Office Picture Manager 2003	Microsoft® Corporation
Microsoft Office PowerPoint 2003	Microsoft® Corporation
Microsoft Office Word 2003	Microsoft® Corporation
Quantity One 1-D Analysis Software 4.6.3	Bio-Rad, München, Deutschland

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4. Eingesetzte Antikörper.

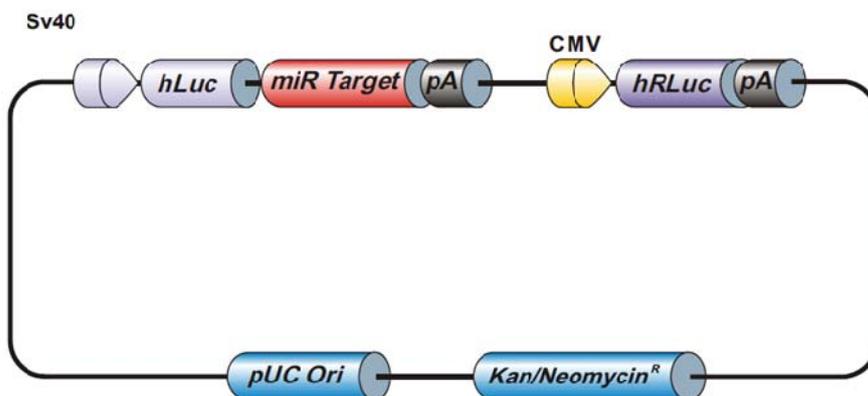
primäre und sekundäre Antikörper	Herkunft	Firma	eingesetzte Verdünnung:
primäre Antikörper:			
anti-Caspase3	Maus	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland	1:1000
anti-Caspase7	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	1:1000
anti-Caspase9	Kaninchen	Cell signaling, Frankfurt am Main, Deutschland	1:1000
anti-c-Jun	Kaninchen	Cell signaling	1:1000
anti-Flip	Maus	Alexis, Lörrach, Deutschland	1:1000
anti-p38	Maus	Cell signaling	1:1000
anti-PARP	Kaninchen	Cell signaling	1:1000
anti-p-c-jun (ser73)	Kaninchen	Millipore, Schwalbach, Deutschland	1:1000
anti-PKCdelta	Kaninchen	Cell signaling	1:1000
anti-p-p38	Kaninchen	Cell signaling	1:1000
anti-p-PKCdelta	Kaninchen	Cell signaling	1:1000
anti-p-Sapk/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	Cell signaling	1:1000
anti-Ran GTPase	Kaninchen	Cell signaling	1:1000
anti-Sapk/Jnk	Kaninchen	Cell signaling	1:1000
anti-β-Aktin	Maus	Sigma-Aldrich	1:10000

sekundäre Antikörper:			
anti-Kaninchen IgG (HRP-konjugiert)	Ziege	Cell signaling	1:3000
anti-Maus IgG (HRP- konjugiert)	Ziege	Cell signaling	1:2000
anti-Maus IgG (HRP- konjugiert)	Ziege	Cell signaling	1:2000

2.1.5 Eingesetzte Vektoren

Der Vektor pEZX-MT01 (Genecopoeia, Rockville, USA) wurde mit der DNA-Sequenz der Ran GTPase 3'-UTR enthaltenen Sequenz erworben. Die DNA Sequenz der Ran GTPase 3'-UTR liegt in 5' – 3' Richtung stromabwärts zum Reporter gen Firflyluciferase, das vom SV40 Promotor kontrolliert wird. Als Referenz für eine erfolgreiche Transfektion ist ein weiteres Reporter gen die Renilla Luciferase auf dem Vektor enthalten. Diese wird von dem CMV-Promotor kontrolliert. Des Weiteren ist eine Kanamycin/Neomycin Resistenzkassette zur Selektion in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen enthalten. Außerdem ist zur Anreicherung in Bakterienzellen ein ori (engl. *origin of replikation*) enthalten, von dem ausgehend Bakterien die Replikation initiieren können (Abbildung 3). Zusätzlich wurde der Kontrollvektor pEZX-MT01 (Genecopoeia) erworben, bei dem keine potenzielle mikroRNA-Zielsequenz enthalten war.

A



B**DNA Sequenz der Ran GTPase 3'-UTR:**

```
agaatgaagctggagcccagcgtcagaagtctagttttataggcagctgtcctgtgatgt
cagcgggtgcagcgtgtgtgccacctcattattatctagctaagcgggaacatgtgctttat
ctgtgggatgctgaaggagatgagtgggcttcggagtgaaatgtggcagtttaaaaaataa
cttcattgtttggacctgcataatctagctgtttggacgcagttgattccttgagtttcat
atataagactgctgcagtcacatcacaaatattcagtggtgaaatcttgtttgttactgtc
attcccattccttttctttagaatcagaataaagttgtatcttcaaatacttaagcaagtg
aactcatcccttgtttataaaatagcatttggaaccactaaagtagggaagttttatgcc
atgtaaatatttgaaatgccttgcttttatcacttaatttgaaatctattgggtaattt
ctccctatgtttattttgtacatttgagccatgtcacacaaactgatgatgacaggtca
gcagtattctatttggttagaagggttacatgggtgtaaatattagtgcagttaagctaaa
gcagtgtttgctccaccttcatattggctaggtagggtcacctaggggaagcacttgctca
aaatctgtgacctgtcagaataaaaatgtgggttgtagacatatcaaatagatattttaagg
gtaaatattttcttttatggcaaaagtaaatcatgttttaatgtagaacctcaaacaggatg
gaacatcagtggtggcaggagggtgggaattcttgctgttaaaaataattacaaatttt
gcactttttgtttgaaatgtagatgcttagtggtgaagttgatacgcaagccg
```

Abbildung 3. Vektorkarte pEZX-MT01 (A) und DNA Sequenz der Ran GTPase 3'-UTR (B) (von Genecopoeia)

2.1.6 Verwendete Zelllinien

Es wurden die humanen Pankreaskarzinomzelllinien Colo357 (Morgan *et al.*, 1980), Panc89 (von T. Okabe, Tokyo, Japan), BxPc3 (Tan *et al.*, 1986) und PancTul (von M.v.Bülow, Mainz, Deutschland) eingesetzt. Außerdem wurde die Gebärmutterhalskrebszelllinie HeLa (Scherer *et al.*, 1953) verwendet.

2.2 Zellbiologische Methoden**2.2.1 Zellkulturbedingungen und Passagieren von Zellen**

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen oder Mehrlochplatten mit Zellkulturmedium (RPMI 1640) zu dem 10 % FCS, 2 mM Glutamat und 1 mM Natrium-Pyruvat gegeben wurde, im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Um die adhärennten Zellen einschichtig

wachsen zu lassen und konstante Bedingungen zu schaffen wurden die Zellen zweimal pro Woche passagiert, so dass eine 90 %ige Zelldichte nicht überschritten wurde. Vor dem Passagieren wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen wurden die Zellen mit der Peptidase Trypsin versetzt und anschließend für fünf bis 15 min. bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator inkubiert, bis die Zellen abgelöst und vereinzelt waren. Um die Zellen nicht zu schädigen wurde eine äquivalente Menge Zellkulturmedium zugegeben, in der wie weiter oben beschrieben FCS enthalten war. FCS enthält unter anderem auch das Trypsin inaktivierende α1-Antitrypsin (Berninger *et al.*, 1985). Anschließend wurden die Zellen bei RT und 1.420 rpm für 4 min. zentrifugiert (Rotina 48 R) und der Überstand abgesaugt. Nach resuspendieren der Zellen in Zellkulturmedium wurde die Zellzahl einem Zellzahlmessgerät (Casy 1 TT) nach den Angaben des Herstellers bestimmt, so dass für die unterschiedlichen Experimente genaue Zellzahlen ausgesät werden konnten.

2.2.2 Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei RT und 1.420 rpm für 4 min. zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml FCS mit 10 % DMSO resuspendiert. DMSO verhindert einerseits die Bildung von Eiskristallen und ist andererseits giftig für die Zellen, da es in die Atmungskette eingreift, indem es den Elektronentransport unterbricht. Damit die Zellen keinen Schaden nehmen wurde schnell und auf Eis gearbeitet. Nach Resuspendierung der Zellen wurden sie in ein Kryo-Röhrchen übergeben, dass zuvor in ein vorgekühltes Gefäß gestellt wurde und anschließend bei -70 °C eine Stunde eingefroren wurde. Letztendlich wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3 Auftauen der Zellen aus flüssigem Stickstoff

Die Zellen wurden in einem Kryowellröhrchen eingefroren. Zum Auftauen wurde das Kryowellröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen sichtbar war. Nach Überführung in ein Falconröhrchen wurde das 10fache Volumen Zellkulturmedium zugegeben. Anschließend wurde bei RT und 1.420 rpm für 4 min. zentrifugiert (Rotina 48 R). Das Zellpellet wurde in Zellkulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen (T175) in einem Gesamtvolumen von 35 ml überführt und im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.4 Stimulierung der Zellen mit Todesliganden

Transfizierte- (siehe Abschnitt 2.2.6) und untransfizierte Zellen wurden in 6- und 96-Loch-Platten 24 Stunden nachdem sie ausgesät wurden, mit den Todesliganden TRAIL (R&D Systems), Flag-CD95L (FasL, von Prof. Harald Wajant, Würzburg, Deutschland) und TNF α (Knoll AG, Ludwigshafen, Deutschland) für weitere drei- oder 16 Stunden stimuliert. FasL (150 μ g/ml) wurde in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit einem anti-Flag mAbM2 (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich) bei 37 °C für 30 min. inkubiert. TRAIL und FasL wurden mit einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. TNF α wurde mit einer Konzentration von 50 ng/ml eingesetzt.

2.2.5 Zellzählung

Zur Bestimmung des Zellwachstums wurden $2,3 \times 10^5$ Zellen in dreifacher Ausführung mit Kontroll mikroRNA und mikroRNA-452* mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM transfiziert und anschließend in 6 Loch Platten ausgesät (Abschnitt 2.2.6). 16- und 40 Stunden nach Transfektion wurde die Zellzahl mit dem Zellzahlmeßgerät (CASY 1 TT) nach den Angaben des Herstellers ermittelt (Abschnitt 2.2.1).

2.2.6 Reverse Transfektion

Bei der reversen Transfektion mit dem *siPORT NeoFx Transfection Agent* (Applied Biosystems) wurden die Zellen beim aussäen gemäß den Angaben des Herstellers transfiziert. Der Unterschied zu herkömmlichen Transfektionsprotokollen ist, dass die Zellen beim aussäen noch nicht adhärent sind und somit höhere Transfektionsraten erzielt werden können. Im 6-Loch-Format wurden $2,3 \times 10^5$ und im 96-Loch-Format 8×10^3 Zellen transfiziert. Das lipidbasierte Transfektionsreagenz *NeoFx* (Applied Biosystems) wurde im Verlauf des Protokolls im Verhältnis 1:20 mit OPTI-MEM I Kulturmedium (Invitrogen) eingesetzt. Zur Inhibition von endogenen mikroRNAs wurden anti mikroRNAs (anti-miRs) (Applied Biosystems) eingesetzt. Anti-miRs sind von Applied Biosystems chemisch modifizierte einzelsträngige Oligonukleotide, die sequenzspezifisch an die reife Form von mikroRNAs binden und diese in ihrer Funktion inhibieren. Zur Überexpression von endogenen mikroRNAs wurden *precursor microRNAs* (pre-miRs) (Applied Biosystems) eingesetzt. Pre-miRs sind doppelsträngige RNA Moleküle, die von Applied Biosystems hergestellt wurden, um die Funktion von reifen endogenen mikroRNAs zu übernehmen. Die anti-miRs und pre-miRs für spezifische mikroRNAs und die Kontrollen für anti-miR und miR

(anti-miR-ctrl, miR-ctrl) (Applied Biosystems) wurden mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM oder 75 nM eingesetzt. Es wurden außerdem mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierte miRs (Applied Biosystems) mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM transfiziert.

Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen wurde das Volumen des lipidbasierten Transfektionsreagenz *NeoFx* (Applied Biosystems) variiert. *NeoFx* (Applied Biosystems) wurde im Verlauf des Protokolls im Verhältnis 1:80, 1:32 und 1:20 mit OPTI-MEM I Kulturmedium (Invitrogen) eingesetzt. Zur fluoreszenzmikroskopischen (Abschnitt 2.3.6) Ermittlung der Transfektionsbedingungen mit der höchsten Transfektionsrate wurden anti-miRs und miRs, die mit dem rot fluoreszierenden Carbocyanin (Cy3) von der Firma Applied Biosystems markiert wurden in die Zellen transfiziert. Für alle weiteren Transfektionen wurde *NeoFx* (Applied Biosystems) mit OPTI-MEM I Kulturmedium (Invitrogen) mit einem Verhältnis von 1:20 eingesetzt, da unter diesen Bedingungen gute Transfektionsraten ermittelt wurden.

2.2.7 Zellviabilitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der Farbstoff Kristallviolett eingesetzt. Kristallviolett bindet an die DNA von lebenden und toten Zellen. Die Zellviabilität von den adhärent wachsenden epithelialen Tumorzellen Colo357, Panc89, BxPc3, PancTul und HeLa wurde im 96-Loch Platten Format gemessen. Tote Zellen lösen sich vom Boden der 96-Loch Platten ab und wurden durch Entfernung der Überstände von den lebenden Zellen getrennt. Die lebenden Zellen wurden mit 50 µl Kristallviolettlösung (0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol, 80 % dest. H₂O) für 20 min. auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Die Überstände wurden verworfen und fünf- bis siebenmal mit einem Volumen von 200 µl dest. H₂O pro Loch der 96-Loch Platten gewaschen und zwei Stunden oder über Nacht bei 37 °C im Brutschrank B6 (Heraeus Holding GmbH) getrocknet. Nach Trocknung wurde das an die DNA gebundene Kristallviolett in einem Volumen von 200 µl Methanol gelöst. Kristallviolett absorbiert Wellenlängen in einem Bereich von 500 nm bis 600 nm. Die photometrische Messung erfolgte bei 590 nm. Die Extinktionen wurden in Relation zu untransfizierten oder mit anti-miR-ctrl oder miR-ctrl transfizierten Kontrollzellen (Abschnitt 2.2.6) gesetzt.

2.2.8 Elektroporation

Die Zellen wurden mit dem Reportervektoren pEZX-MT01 und zugehörigen Kontrollvektor (Genecopoeia) (siehe Abschnitt 2.1.5) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit dem *Amaxa*

Nucleofactor II System (Solution V; Lonza) nach den Angaben des Herstellers. Das *Amaxa Nucleofactor II System* basiert auf der Methode der Elektroporation. Bei der Elektroporation wird durch einen kurzen Stromschlag die Permeabilität der Plasmamembran erhöht, so dass DNA eingeschleust werden kann. Es wurden 1×10^6 Panc89-Zellen in 100 μl *Solution V* (Lonza) suspendiert und mit 4 μg der jeweiligen Vektor-DNA mit dem Programm T-21 des Amaxa Gerätes transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit miRs und anti-miRs revers im 96-Loch Format transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.6).

2.2.9 Messung der Zellproliferation

Die Zellproliferation wurde durch die Messung der DNA-Syntheserate im 96-Loch-Format ermittelt. Um die DNA-Syntheserate messen zu können wurde radioaktiv markiertes Thymidin auf die mit anti-miRs und miRs transfizierten Zellen (Abschnitt 2.2.6) gegeben. Die Markierung der Zellen mit ^3H -Thymidin (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) erfolgte 24 Stunden nach Transfektion mit einer Konzentration von 370 kBq/ μL . Das mit Tritium markierte Thymidin wurde in einem Zeitraum von 16 Stunden während der Synthesephase in die DNA der Zellen eingebaut. Nach Zugabe von 100 μl einer 0,1 %igen SDS-Lösung pro Loch der 96-Loch Platte wurden die Zellen für 30 min. im Zellinkubator lysiert. Anschließend wurde mit einem Zellerntegerät (Zellharvester, Skatron) das Zelllysate durch eine Filtermatte gesogen, durch die die radioaktiv markierten DNA-Moleküle herausgefiltert wurden. Die Radioaktivität wurde mit einem *Liquid Scintillation Counter* (Wallace Oy) gemessen. Hierfür wurde die Filtermatte bei RT getrocknet und in eine Plastikhülle mit Scintillationsflüssigkeit eingeschweißt. Die in cpm (*counts per minute*) gemessene Radioaktivität ließ auf die Zellproliferation zurückschließen und wurde in Relation zu Kontrolltransfektionen (Abschnitt 2.2.6) gesetzt.

2.3 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Gesamtprotein mit RIPA-Puffer und Messung der Proteinkonzentration

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät. Um Gesamtprotein sowohl von den nicht adhärennten potentiell toten Zellen als auch von den adhärennten Zellen zu erhalten, wurden in einem ersten Schritt die Überstände der Zellen abgenommen und bei 16.100 x g RT 5 min.

zentrifugiert. Der für die Zellyse eingesetzte Ripa-Puffer (Tris-Base 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NP40 1 %, Na-Desoxycholat 1 %, SDS 0,1 %) wurde mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Complete Protease-Inhibitor und PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor, Roche, Mannheim, Deutschland) vervollständigt, um enzymatische Degradationen und Dephosphorylierungen zu vermeiden. Die Zellpellets der toten Zellen und die adhärennten Zellen wurden daraufhin mit eiskaltem PBS gewaschen und mit Ripa-Puffer versetzt. Es wurden 130 µl, pro ca. 90 % konfluenten 6-well und 30 µl pro Zellpellet Ripa-Puffer auf Eis eingesetzt und anschließend bei -20 °C eingefroren. Die Zellysate wurden auf Eis aufgetaut und mit einem Zellschaber abgelöst und auf die jeweils zugehörigen Pellets transferiert und anschließend für ungefähr 10 Sekunden sonifiziert um die Zellen weiter aufzuschließen. Das Zellysate wurde daraufhin 15 min. bei 16.100 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden für die Proteinbestimmung in einem Eppendorfgefäß gesichert und bei -20 °C gelagert. Die Messung der Proteinkonzentrationen der Ripa-Lysate wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Pierce BCA Protein Assay Kit beruht darauf, dass das Absorptionsspektrum des Farbstoffes Comassie brilliant blue durch die Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Nach Erstellung einer Verdünnungsreihe mit Albumin kann über das Maß der Absorption bei 595 nm die Konzentration der Ripalysate auf der erstellten Kalibrierungsgerade abgelesen werden.

2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE werden Proteingemische analysiert. Die Proteingemische werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Damit gleiche Proteinmengen der Größe nach aufgetrennt werden können, müssen zuerst die Proteinkonzentrationen der zu analysierenden Proben bestimmt werden (Abschnitt 2.3.1). Die Zellysate wurden mit einfach Lämmli-puffer (pH 6,8, Tris-HCL 2M 1,25 ml, SDS 10% 8ml, DTT 308,5 mg, Glycerin 2,02 ml, Bromphenolblau 2 mg) (Laemmli *et al.*, 1970) versetzt und die Volumina mit Ripa-Puffer (Tris-Base pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, Na-Desoxycholat 1%, SDS 0,1%) angeglichen. Durch Zugabe von SDS werden die Proteine zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen die denaturiert vorliegen. Dithiothreitol (DTT) zerstört zusätzlich Protein-Protein Wechselwirkungen (Quartärstruktur) durch Reduktion. Dies äußert sich in der Spaltung von Disulfidbrücken. Erhitzen auf 95°C im Thermoblock zerstört auch die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine, hierbei werden Wasserstoffbrückenbindungen zerbrochen, so dass sich die Proteine nur noch in ihrer Größe unterscheiden.

Anschließend wurden die Proteingemische auf 4-20%ige Tris-Glycin-Gradientengele (Invitrogen) aufgetragen, die in eine Novex Mini Cell Gelkammer (Invitrogen) eingesetzt wurden. Bei der Gelelektrophorese wandert der negativ geladene SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld bei 125 V im Laufpuffer (pH 8,3, Tris-Base 30,29 g, Glycin 144,09 g, SDS 10 %, auf 1000 ml mit dest. H₂O auffüllen) zur Anode, so dass die denaturierten Proteine durch die Matrix Gels aufgetrennt werden. Auf dem Gel wurde außerdem ein Größenstandard aufgetragen (Rainbow-Marker, GE-Healthcare), damit anschließend in der Western Blot Analyse (siehe Abschnitt 2.3.3) die molekulare Masse von unterschiedlichen Proteinen nachgewiesen werden kann.

2.3.3 Proteinnachweis mittels Western Blot Analyse

Die in der SDS Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.2) aufgetrennten Proteine werden bei der Western Blot Analyse auf eine Immobilon-P Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Millipore) übertragen, so dass die geblocteten Antigenen mit Antikörpern nachgewiesen werden können.

Die Western Blot Analyse wurde in einer Mini Tank Blotting Kammer (Bio-Rad) durchgeführt. Dafür wurde die Immobilon-P PVDF Membran (Millipore) für 5 min. in Methanol aktiviert und mit dest. H₂O gewaschen. Der Einsatz der Blottingkammer wurde von Richtung der Anode zur Richtung der Kathode mit einem Schwamm und mit einem Whatmannpapier (Millipore) versehen. Darauf wurde dann das Gel und die aktivierte Immobilon-P PVDF Membran (Millipore) platziert gefolgt von wiederum einem Whatmannpapier (Millipore) und einem Schwamm. Nach Aufbau des Einsatzes wurde dieser in die Blotting Kammer (Biorad) eingesetzt und die Kammer mit Blottingpuffer (Glycin 192 mM, Methanol 200 ml, Tris-Base 25 mM, 800 ml dest. H₂O) aufgefüllt. Die Proteine wurden anschließend für 90-120 min. bei 400 mA transferiert. Anschließend wurde die Immobilon-P PVDF Membran (Millipore) entnommen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in einer Blockierungslösung (5 % Milch TBS-T (pH 7,4, Tris-Base 0,1 M, NaCl 1 M, 1 % (w/v) Tween20)) bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde daraufhin mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe Tabelle 2.1.4) in 0,5 % Milch TBS-T-lösung über Nacht bei 4° C schwenkend inkubiert. Nach dreimaligen waschen mit TBS-T für 10 min. wurde der sekundäre mit horse radish peroxidase (HRP) konjugierte Antikörper (siehe Tabelle 2.1.4) in 0,5 % Milch TBS-T-lösung für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Wiederum wurde die Membran dreimal 10 min. mit TBS-T gewaschen.

Daraufhin wurde durch 2 min. Inkubation mit der Substratlösung ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, München, Deutschland), die Detektion des gebundenen peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpers, durch Auflegen eines ECL-Chemiluminiszenz-Hyperfilms (GE Healthcare), in einer Dunkelkammer ermöglicht. Die Oxidation des Chemiluminiszenz-Substrates emittiert Licht, durch das der ECL-Chemiluminiszenz-Hyperfilm (GE Healthcare) belichtet wird. Die Entwicklung des Films wurde mit dem Curix 60-Filmentwickler (AGFA, Gera, Deutschland) durchgeführt.

2.3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Es wurde ein so genannter *Sandwich*-ELISA in Nunc-MaxiSorp-Mikrotiterplatten durchgeführt, um die Zytokin-Konzentration im Überstand von epithelialen Tumorzellen zu messen. Zur Messung der Konzentration des IL-6 wurde das *Kit IL-6 DUO SET ELISA* (R&D Systems) eingesetzt. Die Messungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.5 Electromobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA dient dem Nachweis der Bindung von Kernproteinen an regulatorische DNA-Fragmente. Das Prinzip des EMSA beruht darauf, dass DNA-Fragmente eine unterschiedliche Größe und Ladung haben, wenn Proteine an sie gebunden sind. Bei einer Auftrennung mittels Gelelektrophorese wandern DNA-Proteinkomplexe langsamer durch das Gel als freie DNA-Fragmente. Zum Nachweis der DNA-Proteinkomplexe mittels Autoradiographie wurde das DNA-Fragment mit dem radioaktiven Isotop ^{32}P markiert.

Zur Isolierung von Kernproteinen wurde auf Eis zuerst eine Zytosolextraktion mit EMSA-I-Puffer (Hepes 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,2 mM und DDT 1 mM) und dann eine Kernextraktion mit EMSA-II-Puffer (Hepes 20 mM, NaCl 0,4 M, EDTA 0,4 mM und DDT 1 mM) durchgeführt. Hierbei wurde die Zellen nach Entfernung des Überstandes mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 500 μl EMSA-I-Puffer pro Loch einer 6-Loch Platte versetzt. Das Zelllysate wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und dann bei 16.100 x g für 5 min. und 4 °C zentrifugiert. Das Zytosol befand sich im Überstand und die Kerne im Pellet. Zur Kernextraktion wurde das Pellet nach Entfernung des Überstandes mit 20 μl EMSA-II-Puffer resuspendiert und für 20 min. schüttelnd auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für 5 min. bei 16.100 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß

überführt. Die Proteinkonzentration der EMSA-Lysate wurde mittels DC ProteinAssay (Bio-Rad) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Um die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 nachzuweisen wurde der Gelshift™ NF κ B (Carcinoma) (Active Motif, Rixensart, Belgien) und der Gelshift™ AP-1 (Carcinoma) (Active Motif) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Dies wurde von der technischen Angestellten Birgit Fricke durchgeführt. Hierbei wurden 8 μ g Kernextrakt mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden die entweder eine spezifische NF κ B- oder AP-1-Bindungsstelle enthielten für 30 min. bei RT inkubiert. Die Auftrennung wurde in einem 6 %igen Polyacrylamid-Gel mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Nach Trocknung des Gels wurde ein ECL-Chemiluminiszenz-Hyperfilm (GE Healthcare) belichtet. Der Film wurde mit dem Curix 60-Filmentwickler (AGFA) entwickelt.

2.3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konjugierten miRs und anti-miRs (Applied Biosystems) transfizierten Zellen (Abschnitt 2.2.6) wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Zeiss) betrachtet. Der Nachweis der Transfektion erfolgte, indem die Fluoreszenz durch UV-Licht angeregt wurde. Nach Anregung emittiert Cy3 das Licht bei 565 nm. Zur Detektion des emittierten Lichtes wurde ein FITC-Filtereinsatz verwendet (Bandpassfilter 530-585, Farbteiler 600, Langpassfilter 615).

2.3.7 Messung des DNA-Gehaltes durch Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zur Analysierung des DNA-Gehaltes nach Transfektion (Abschnitt 2.2.6) mit anti-miRs und miRs eingesetzt. Um die DNA meßbar zu machen wurde der DNA interkalierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) eingesetzt. Das Absorptionsmaximum von Propidiumiodid liegt bei 488 nm. Die Messungen wurden im FACSCalibur (Becton Dickinson) durchgeführt. Dieses Gerät enthält einen Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einen Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm. Die Zellen werden in einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an dem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die hydrodynamische Fokussierung basiert auf einem System, das aus einem zentralen Kern besteht, durch den die Proben injiziert werden. Der Kern wird von einer Flüssigkeit mit hoher Geschwindigkeit umspült, die einen zerrenden Effekt auf die Verengung der zentralen Kammer ausübt. Dies beeinflusst die Geschwindigkeit der zentralen Zellsuspension, dessen vorderste Front an der Verengung eine parabolische Form annimmt,

in der die Geschwindigkeit in der Mitte am höchsten ist und an den Wänden gegen Null läuft. Durch das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forwardscatter*) wird die Größe der Zellen gemessen. Das abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (SSC, *sidescatter*) misst die Zellgranularität. Durch die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen monochromatischen Laserstrahl wird dieser auf ein höheres Energieniveau gehoben und fällt unter Abgabe von Energie, in Form von Photonen, auf sein Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert und verhält sich proportional zur Länge der doppelsträngigen DNA pro Zelle. Somit kann eine Aussage über den DNA-Gehalt getroffen werden, der charakteristisch für die G1-, S- und G2-Phasen des Zellzyklus ist. Außerdem kann der programmierte Selbstmord der Zelle (Apoptose), bei dem die DNA degradiert wird oder Polyploidie, bei der die Chromosomen vervielfältigt und nicht voneinander getrennt werden, gemessen werden. Nach 40 h Transfektion und 16 h TRAIL-Behandlung wurden Panc89-Zellen für die Analysierung des Zellzyklus vorbereitet. Um auch tote, nicht mehr adhärenente Zellen zu analysieren, wurde der Überstand abgenommen und in 5 ml Polystyrene FACS-Röhrchen (Becton Dickinson) übergeben. Die adhärenente Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für ca. 10 min. (bis unter dem Mikroskop zu erkennen, war das die Zellen abgelöst waren) bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit ihren zugehörigen Überständen in FACS-Röhrchen vereinigt und abzentrifugiert (450 x g, 4 °C, 8 min.). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS 5 mM EDTA gewaschen und in jeweils 1 ml PBS 5 mM EDTA gelöst und wurden dann mit ETOH (99,9 %) für 30 min. bei RT fixiert. Anschließend wurden die Überstände entfernt und die Zellpellets mit jeweils 500 µl PBS 5 mM EDTA 0,1 M RNase A (Qiagen) bei RT inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit 500 µl PBS 5 mM EDTA Propidiumiodid (100 µg/ml) für 30 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und der DNA-Gehalt wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen.

2.3.8 Zytokin-Antikörper Array

Die Expression von 174 Proteinen wurde mit dem *Human Cytokine Antibody array C series 2000* (Hözel Diagnostika, Köln, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers gemessen. Hierfür wurden die Überstände von Panc89-Zellen deren Vitalität mittels Kristallviolett bestimmt wurde (Abschnitt 2.2.7), nach Inhibition der mikroRNA-197 im Vergleich zur Kontrolle eingesetzt. Die Array-Membranen wurden mit Blockierlösung (Hözel Diagnostika) blockiert und für zwei Stunden mit den zu analysierenden Überständen bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal mit PBS-Tween (Hözel

Diagnostika) gewaschen und mit einem Antikörper-Cocktail (Hölzel Diagnostika), der aus primären Biotin-konjugierten Antikörpern bestand für zwei Stunden bei RT schüttelnd inkubiert. Nach zweimaligen waschen mit PBS-Tween (Hölzel Diagnostika) wurden die Membranen mit Horseradish-Peroxidase-Antikörpern (Hölzel Diagnostika), die Streptavidin konjugiert waren für zwei Stunden bei RT schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen wie zuvor beschrieben gewaschen. Die Detektion des gebundenen peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpers erfolgte nach dem in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Protokoll. Anschließend wurden die Spots densitometrisch mit der Quantity One 1-D Analysis Software 4.6.3 (Bio-Rad) nach den Angaben des Herstellers quantifiziert.

2.3.9 Luciferaseassay

Der Nachweis der Luciferaseaktivität erfolgte mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Mannheim, Deutschland) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Auf dem Reporter-gen-Vektorkonstrukt pEZX-MT01 (Abschnitt 2.1.5) sind die zwei Reportergene Firefly- und Renillaluciferase enthalten. Reportergene sind nach Expression leicht zu messen und lassen indirekt auf die Transkriptionsaktivität zurückschließen. Die Reporter Firefly- und Renillaluciferase katalysieren aufgrund ihrer unterschiedlichen evolutionären Ursprünge unterschiedliche Reaktionen. Die Fireflyluciferase ist ein 61 kDa großes Enzym des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*). Direkt nach Translation der Fireflyluciferase setzt die Reporterfunktion ein. Es werden Photonen emittiert, indem durch die Fireflyluciferase katalysiert Luciferin zu Oxyluciferin in Anwesenheit von O₂, Mg²⁺-Ionen und ATP umgesetzt wird (DeLuca *et al.*, 1976). Die Renillaluciferase ist ein 36 kDa großes Enzym aus der Seefedernart (*Renilla reniformis*), das die Decarboxylierung des Substrates Coelenterazin unter Lichtemission katalysiert (Matthews *et al.*, 1977).

Mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) wird zuerst die Fireflyluciferaseaktivität und anschließend die Renillaluciferaseaktivität als internes Referenzsignal (Abschnitt 2.1.5) gemessen. Die mittels Elektroporation (Abschnitt 2.2.8) und reverser Transfektion (Abschnitt 2.2.6) für 40 Stunden transfizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Lyse-Puffer (Promega) für 15 min. bei RT lysiert. Anschließend wurde das Zelllysat in 96-Loch Luminometerplatten (Nunc, Langenselbold, Deutschland) überführt. Das Luciferase Assay Reagent II (Promega) wurde über den Injektor des Luminometers (Turner Biosystems, Sunnyvale, USA) auf das Lysat gegeben und die Fireflyluciferaseaktivität gemessen. Durch Zugabe des Reagents Stop&Glo® (Promega) konnte die

Renillaluciferaseaktivität gemessen werden. Die in Form von Licht emission gemessene Aktivität der Fireflyluciferase wurde auf die Aktivität der Renillaluciferase normalisiert.

2.3.10 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophoresen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Ottmar Janssen (Institut für Immunologie, Kiel, Deutschland) von Dr. Hendrik Schmidt und Melanie Nebendahl durchgeführt (Schmidt *et al.*, 2008). Bei der 2D-Gelelektrophorese werden Proteingemische in 2 Dimensionen aufgetrennt. Bei der ersten Dimension werden die Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) aufgetrennt. Der pI ist bei einem pH-Wert erreicht, bei dem die Ladungen der sauren und basischen Aminosäurereste des jeweiligen Proteins ausgeglichen sind. Anschließend werden, die nach pI aufgetrennten Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Analyse des Proteoms nach Inhibition der mikroRNA-197 wurde Gesamtprotein der epithelialen Tumorzellen Colo357, Panc89 und HeLa nach 40 Stunden Transfektion (Abschnitt 2.2.6) extrahiert. Die Lyse wurde mit 2D-Lyse-Puffer (Harnstoff 7 M, Thioharnstoff 2 M, Tris 30 mM, pH 8,5, CHAPS 4 %) versetzt mit Protease Inhibitor (Roche) auf Eis durchgeführt. Die Proteingemische der mikroRNA-197 und mikroRNA-ctrl transfizierten epithelialen Tumorzellen wurden für die differentielle Gelelektrophorese mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy5, Cy3 und Cy2 markiert, so dass die markierten Proteine im 2D-Gel quantifizierbar wurden. Über die Fluoreszenzintensität wurde die Menge der durch differentielle Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine der einzelnen Proben ermittelt. Unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten wurden mit der Software DeCyder 6.5 (GE Healthcare) markiert. Es wurde nach zwei Kriterien ausgewählt ob ein Proteinspot aus dem Gel ausgestochen wurde und mittels Massenspektrometrie sequenziert (Abschnitt 2.3.11) wurde. Es wurden die Proteine aus dem Gel ausgestochen, die eine mindestens 1,25 fache Veränderung in der Fluoreszenzintensität nach mikroRNA-197- im Vergleich zur mikroRNA-ctrl Transfektion aufwiesen und zusätzlich in allen drei epithelialen Tumorzelllinien gleich dereguliert vorlagen.

2.3.11 MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of flight*)

Die Identifizierung der durch differentielle Gelelektrophorese aufgetrennten und anschließend isolierten Proteine erfolgte mittels Massenspektrometrie. Die Massenspektrometrieanalysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Matthias Leippe (Institut für Zoologie, Kiel, Deutschland) von Dr. Christoph Gelhaus durchgeführt. Die

Massenanalysen wurden mit dem 4.700 Proteomics Analyzer, MALDI-TOF/TOF System (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des MALDI-TOF Systems ist, dass die Proteine in eine Matrix eingebettet werden und mit Laserimpulsen beschossen werden. Die Matrix verdampft und die Peptide wandern ionisiert in einem elektrischen Feld. In dem elektrischen Feld wird die Flugzeit gemessen, die in Abhängigkeit der Masse des Peptids ist. Über die gemessenen Peptidmassen werden durch Datenbankabgleiche die Proteine identifiziert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des *mirVanaTM kits* (Applied Biosystems) isoliert. Für die RNA-Isolierung wurde das Protokoll gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die RNA von dem Säulenfilter zu lösen, wurde ein Volumen von 50 µl der im Kit enthaltenen Elutionslösung, die zuvor auf 95 °C erhitzt wurde, eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte nach der in 2.4.2 beschriebenen Methode. Eine $OD_{260} = 1$ entsprach einem Gehalt von 40 µg/ml RNA.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration der DNA und RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem RNA/DNA-Calculator Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Es wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1cm eingesetzt, bei der eine Lösung mit 50 µg/ml DNA einen Absorptionswert von 1 hat, der der optischen Dichte (OD) entspricht. Aufgrund dieser Tatsache läßt sich der DNA und RNA-Gehalt einer Lösung mit folgender Formel berechnen:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

2.4.3 Quantitative Real Time Polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Die Quantifizierung der mikroRNA Expressionen wurde mittels qRT-PCR Taqman assays (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Experimente

wurden in Kooperation mit Robert Häsler und von der technischen Angestellten Dorina Oelsner durchgeführt.

Um die Expression einer mikroRNA messen zu können, wurde die gesamt-RNA mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Taqman qRT-PCR ist erweiterte Methode der PCR. Die klassische PCR ist eine gentechnologische Methode zur Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer DNA-Sequenzen (Saiki, R. K., *et al.*, 1985). Die Erweiterung der Methode besteht in der Möglichkeit die cDNA nicht nur zu amplifizieren, sondern auch zu quantifizieren.

Der Reaktionsansatz enthält das cDNA-Template, zwei mikroRNA spezifische Primer, eine mikroRNA spezifische Taqman Hybridisierungssonde, die vier Desoxynucleotide (dNTPs) zur Synthese des neuen DNA-Stranges, die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase und einen Puffer, der Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor enthält. Die Taqman Hybridisierungssonde ist ein Oligonukleotid, dass antikomplementär an die cDNA-Sequenz der jeweiligen zu detektierenden mikroRNA bindet. Diese Sonde ist mit einem Reporterfluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und mit einem Quencher am 3'-Ende markiert. Bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge wird das Fluoreszenzsignal aufgrund von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Das PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Die Denaturierungstemperatur liegt bei 92 °C. Dabei werden die beiden Stränge der Template-DNA voneinander getrennt. Bei dem folgenden Annealingschritt hybridisieren die Primer und die Sonde mit ihren komplementären Sequenzbereichen auf der cDNA. Beim Elongationsschritt wird die Temperatur auf die optimale Reaktionstemperatur der Taq-DNA-Polymerase (72 °C) erhöht. In diesem Schritt wird ausgehend von den freien 3'-OH-Enden der Primer in 5'-3'-Richtung der komplementäre Strang zu dem jeweiligen Matrizenstrang synthetisiert. Die hybridisierte Sonde wird durch die Taq-DNA-Polymerase mit ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität abgebaut, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird, da die Fluoreszenzemission in der räumlichen Nähe des Quencher-moleküls am 3'-Ende unterdrückt wird. Der Denaturierungsschritt, der Annealingschritt und der Elongationsschritt wird in mehreren Zyklen wiederholt, wobei die jeweils im vorherigen Schritt neu entstandenen DNA-Stränge ebenfalls als Template dienen. Somit kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA.

Die Quantifizierung erfolgt über die Fluoreszenz, die ein Maß für die Menge an DNA-Template eines jeden Zyklus ist. Die qRT-PCR wurde mit 24 unterschiedlichen mikroRNA Primersets mit den zugehörigen Sonden durchgeführt. Die Messungen von drei unabhängigen Versuchen wurden in zweifacher Ausführung durchgeführt.

Die Auswertung der relativen Expression erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (Livak *et al.*, 2001). Bei der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode muss zuerst der CT-Wert (engl. *Cycle Threshold*) ermittelt werden. Der CT-Wert wird im exponentiellen Bereich der Amplifikationskurven ermittelt. Die CT-Werte werden von den jeweiligen endogenen Referenzen abgezogen (ΔCT). Als endogene Referenzen wurden die CTs von mikroRNA-320 oder mikroRNA-130a eingesetzt, da diese die geringsten Unterschiede nach 3 h TRAIL-Behandlung aufwiesen. Um die mikroRNA Expressionsmenge nach Behandlung der Zellen in Relation zu unbehandelten Zellen zu setzen, werden die ΔCT -Werte von behandelten- und unbehandelten Zellen voneinander abgezogen ($\Delta\Delta\text{CT}$) und in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ eingesetzt. Die Effizienzen, die sich aus den Steigungen der Amplifikationskurven ergeben müssen gleich sein, um die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Formel anwenden zu können und als Ergebnis eine n-fache Expression zu erhalten.

2.4.4 MikroRNA-Array Analyse

Es wurde eine mikroRNA-Array Analyse von unbehandelten und drei h mit TRAIL-behandelt (100 ng/ml) (Abschnitt 2.2.4) Colo357-Zellen ($2,3 \times 10^5$ Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte) nach 24 h Kultivierung durchgeführt. Für die mikroRNA-Array Analyse wurde Gesamt-RNA mit Hilfe des *mirVanaTM kits* (Applied Biosystems) isoliert (Abschnitt 2.4.1). Die mikroRNA-Genexpressionsprofile wurden mittels miRCURY LNA Arrays für mikroRNA Expressionsprofile Version 8.0 (Exiqon, Vedbaek, Dänemark) von der Firma Exiqon durchgeführt. Der Array enthielt Sonden zur Detektion von 328 humanen mikroRNAs.

2.4.5 Transformation

Das Einschleusen von DNA in Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Es wurden 50 μl kompetente Bakterienzellen (One Shot TOP10 Competent Cells; Invitrogen) mit 2 μl der zu transformierenden DNA für 30 min. auf Eis inkubiert und dann durch Hitzeschock für 30 Sekunden in einem auf 42 °C erwärmten Wasserbad transformiert. Der Transformationsansatz wurde für 2 min. auf Eis gestellt und dann mit 250 μl SOC-Medium (2 % Trypton (Sigma), 0,5 % Hefeextrakt (Sigma), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose) für eine Stunde bei 37 °C auf dem Rotationsschüttler Innova 4.000 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland) bei 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 50 μl -, 100 μl - und 150 μl Aliquots der Zellsuspension auf LB-Agarplatten (Sigma) mit Kanamycinsulfat (Invitrogen) ausplattiert, um nur Bakterien mit erfolgreich transformierter Vektor-DNA (Abschnitt 2.1.5) zu selektieren.

2.4.6 Mini-Plasmidpräparation

Für die Mini-Plasmidpräparation wurde das QIAprep Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Um Plasmid-DNA zu isolieren wurden 3 ml LB-Medium (10 g/l Trypton (Sigma), 5 g/l Hefeextrakt (Sigma), 5 g/l NaCl) mit Kanamycinsulfat (Invitrogen) versetzt und mit einer der mit Kanamycinsulfat (Invitrogen) selektierten Bakterien-Einzelkolonien (Abschnitt 2.4.5) angeimpft. Anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 37 °C auf dem Rotationsschüttler Innova 4.000 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific) bei 180 rpm inkubiert. Die Plasmid-Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers und die Konzentration der DNA-Lösung wurde durch Messung der optischen Dichte bestimmt (Abschnitt 2.4.2).

2.4.7 Einfrieren von Bakterienzellen

Zur Lagerung der transformierten Bakterien wurde 1 ml Flüssigkultur mit 1 ml sterilen 20 %igem Glycerin (Merck) versetzt und anschließend bei -80 °C gelagert.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von mikroRNAs auf die TRAIL-induzierte Apoptose im duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC)

3.1.1 TRAIL beeinflusst die Expression von mikroRNAs

Um zu untersuchen, ob der Todesligand TRAIL die Expression von mikroRNA Genen in PDAC-Zellen modulieren kann, wurde zunächst die Sensitivität von Colo357-, Panc89-, BxPc3- und PancTul-Zellen gegenüber TRAIL untersucht. Da die Colo357-Zellen schon nach drei Stunden eine starke Antwort auf TRAIL zeigten (Abbildung 4), wurde diese Zelllinie für die mikroRNA-Array Analyse ausgewählt.

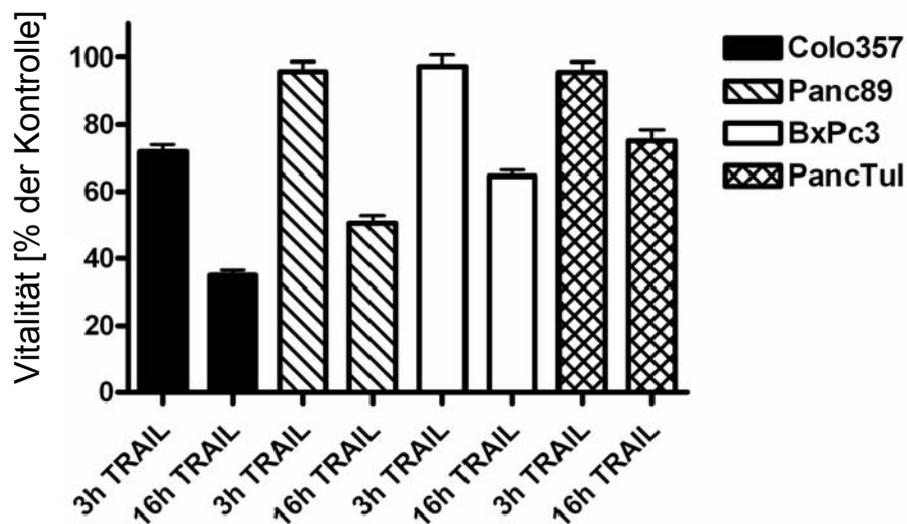


Abbildung 4. TRAIL-induzierte Apoptose bei Pankreaskarzinomzelllinien. 1×10^4 Zellen pro Loch einer 96-Loch Platte wurden ausgesät und nach 24 Stunden für drei und für 16 Stunden mit TRAIL (100 ng/ml) behandelt. Die Zellvitalität der Pankreaskarzinomzelllinien Colo357, Panc89, BxPc3 und PancTul wurde mittels Kristallviolett färbung (n=8) gemessen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen eingesetzt.

Die mikroRNA-Array Analyse wurde bei Colo357-Zellen, die für drei Stunden mit TRAIL behandelt wurden im Vergleich zu unbehandelten Colo357-Zellen in drei Replikaversuchen, durchgeführt. Mit dem mikroRNA-Array kann die Expression von 328 humanen mikroRNA Genen gemessen werden. 158 der 328 mit dem mikroRNA-Array meßbaren humanen mikroRNAs wurden in den Proben erfasst. Durch den Array wurden die Expressionsmengen der mikroRNA-Gene in Form von mikroRNA Vorläufern (*precursor microRNAs*, pre-miRs) als auch in Form von reifen mikroRNAs gemessen. Die Expression von acht von den 158 durch den Array erfassten Expressionen der mikroRNA-Gene war durch TRAIL-Behandlung in Colo357-Zellen beeinflusst. Von diesen wurden nach TRAIL-Behandlung fünf mikroRNAs (mikroRNA-365, mikroRNA-302c*, mikroRNA-432*, mikroRNA-197 und mikroRNA-182) als stärker exprimiert und drei mikroRNAs (mikroRNA-15a, mikroRNA-200a* und mikroRNA-183) als schwächer exprimiert identifiziert (Abbildung 5A).

Anschließend wurden mittels quantitativer RT-PCR spezifisch die reifen Formen der acht deregulierten mikroRNAs untersucht. Wie in Abbildung 5B gezeigt, bestätigte die quantitative RT-PCR Analyse die signifikante Heraufregulation der reifen mikroRNA-197 nach drei Stunden TRAIL-Behandlung in Colo357-Zellen. Die reifen Formen der mikroRNA-365, mikroRNA-182, mikroRNA-15a, mikroRNA-200a* und mikroRNA-183 zeigten keine statistisch relevanten Veränderungen. Des Weiteren identifizierte dieser Test die Herunterregulation der reifen mikroRNA-432* (Abbildung 5B).

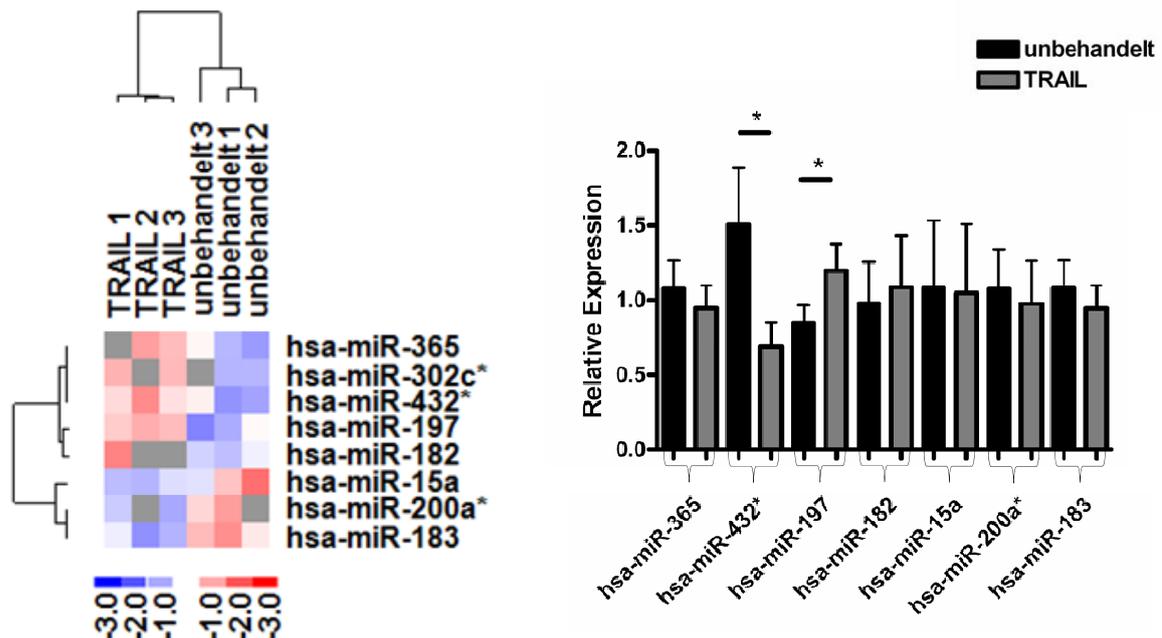


Abbildung 5. TRAIL-induzierte Apoptose induziert mikroRNA-197 Expression in Colo357-Zellen.

(A) Das hierarchische Cluster-Diagramm zeigt acht differentiell exprimierte mikroRNAs von drei Stunden TRAIL-behandelten (100 ng/ml) und unbehandelten Colo357-Zellen, die mittels miRCURY LNA Arrays für mikroRNA Expressionsprofile Version 8.0 (Exiqon) identifiziert wurden. Der Array enthielt Sonden zur Detektion von 328 humanen mikroRNAs. Jede Reihe repräsentiert eine mikroRNA, rot bedeutet eine Expression über und blau unter einem hybridisierten Standard. Grau bedeutet, dass die detektierte mikroRNA Expression schwächer als das Hintergrundsignal war. Das mikroRNA-Cluster ist auf der linken Seite und das Proben-Cluster oberhalb abgebildet. (B) Die Heraufregulation der reifen mikroRNA-197 Genexpression wurde mittels quantitativer RT-PCR mit 24 unterschiedlichen mikroRNA Primersets verifiziert. Als Referenz wurde mikroRNA-320 eingesetzt.

3.1.2 Die Rolle von mikroRNA-197 und mikroRNA-452* in PDAC-Zellen

3.1.2.1 MikroRNA Expressionsmuster der Pankreaskarzinomzelllinien Colo357, Panc89 und PancTul

Um weitere PDAC-Zelllinien im Hinblick auf mikroRNA-Genexpressionen zu untersuchen wurden mikroRNA Expressionsanalysen bei Colo357-, Panc89- und PancTul-Zellen, deren Differenzierungsstadien (Colo357 = G1-G2, Panc89 = G2 und PancTul = G2-3) als unterschiedlich beschrieben sind (Sipos B. *et al.*, 2003), durchgeführt. Mittels quantitativer Real Time-PCR (qRT-PCR) konnten 18 von 24 getesteten mikroRNAs in den drei

Pankreaskarzinomzelllinien detektiert werden. Die identifizierten mikroRNA Expressionsmuster konnten in fünf unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Die mikroRNAs einer Gruppe zeigen ein ähnliches Expressionsprofil. Gruppe I+II zeigen eine ähnliche Expression zwischen den Zelllinien Colo357, Panc89 und PancTul, wobei Gruppe II eine größere Ähnlichkeit aufweist als Gruppe I. Gruppe III zeigt eine geringe Expression in Panc89- und PancTul-Zellen, aber eine hohe Expression in Colo357-Zellen. In der Gruppe IV sind mikroRNAs, die eine hohe Expression in Colo357- und Panc89-Zellen zeigten, aber eine geringe Expression in PancTul-Zellen. Die mikroRNAs der Gruppe V zeigten das gegenteilige Profil der Gruppe IV. Den geringsten Unterschied in der Expression zwischen den Zelllinien zeigte mikroRNA-197 (Abbildung 6). Neben mikroRNA-197 wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auch die in Colo357- im Vergleich zur Panc89-Zelllinie stärker exprimierte mikroRNA-452* näher untersucht, da beide mikroRNAs in den funktionellen Analysen (Abschnitt 3.1.2.2) die Vitalität der Zellen beeinträchtigten.

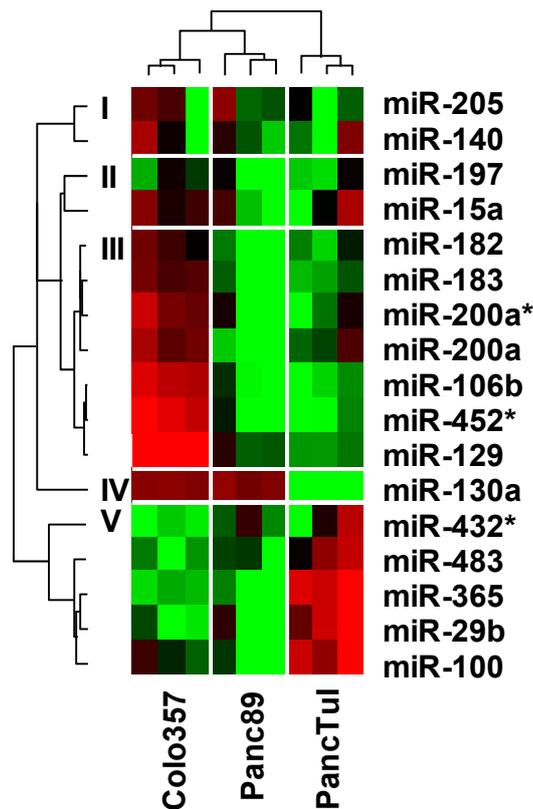


Abbildung 6. MikroRNA Expressionsmuster in Colo357-, Panc89- und PancTul-Zellen. Auf 6-Loch-Platten wurden in dreifacher Ausführung Colo357-, Panc89- und PancTul-Zellen ($2,3 \times 10^5$ Zellen pro Loch) ausgesät. Nach 27 Stunden wurde die gesamte RNA mit dem *mirVanaTM* kit isoliert. Die Quantifizierung der mikroRNA Expressionsmengen erfolgte durch qRT-PCR *Taqman* assays. Die qRT-PCR wurde in zweifacher Ausführung mit 24 unterschiedlichen mikroRNA Primer sets durchgeführt. Die Expression der mikroRNAs wurde mit der Formel $\Delta\Delta CT$ in Relation zur Genexpression der mikroRNA-320, die als endogene Kontrolle eingesetzt wurde, ermittelt. Die Länge der Dendrogramm Äste repräsentieren die Ähnlichkeiten der mikroRNA Expressionsmengen und die Farben der *heatmap* repräsentieren die relativen mikroRNA Expressionsmengen (rot = hoch, schwarz = mittel, grün = niedrig). Die Clustergruppen I-V beschreiben die unterschiedlichen Profilkategorien der mikroRNAs.

3.1.2.2 Einfluss von mikroRNA-452* auf PDAC-Zelllinien

Zur funktionellen Analyse von mikroRNAs, wurden zwei unterschiedliche molekularbiologische Methoden angewandt, um 1. *gain-* und 2. *loss of function-* (engl. Gewinn und Verlust der Funktion) Phänotypen zu erhalten:

1. Durch Überexpression von mikroRNAs wurde die mikroRNA-Aktivität heraufreguliert. Dies geschah durch die Transfektion von doppelsträngigen Vorläufer mikroRNA Molekülen (*precursor microRNAs*, pre-miRs).

2. Unter der Verwendung einer *Knockdown*-Technik wurde sequenzspezifisch die Funktion von reifen mikroRNAs inhibiert. Hierbei wurden einzelsträngige antisense Oligonukleotide (anti-mikroRNAs, anti-miRs) in die Zellen transfiziert.

Um diese beiden molekularbiologischen Methoden einsetzen zu können wurden zunächst die Transfektionsbedingungen von Colo357-, Panc89-, BxPc3 und PancTul-Zellen ermittelt.

Die Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen fand durch die Transfektion mit anti-miRs und pre-miRs, die mit dem rot fluoreszierenden Carbo cyanin (Cy3) von der Firma Applied Biosystems markiert wurden, statt. Für die Pankreaskarzinomzelllinien Colo357 (Abbildung 7), Panc89, BxPc3 und PancTul (Daten nicht gezeigt) ergaben sich hohe Transfektionsraten beim Verhältnis von 1:20 des Transfektionsreagenz *NeoFx* mit OPTI-MEM I Kulturmedium (Invitrogen).

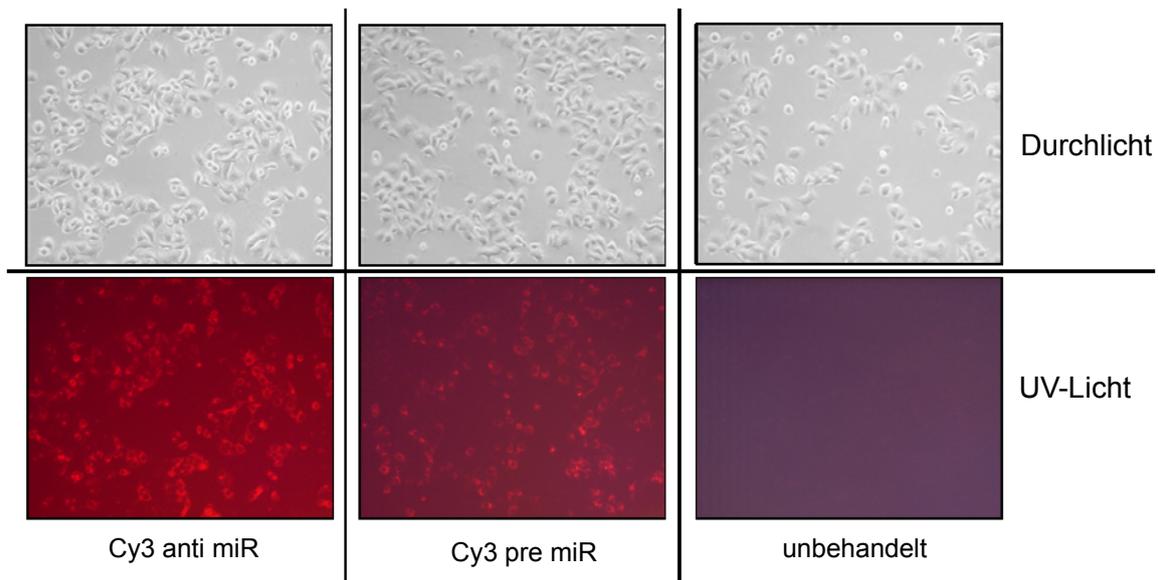
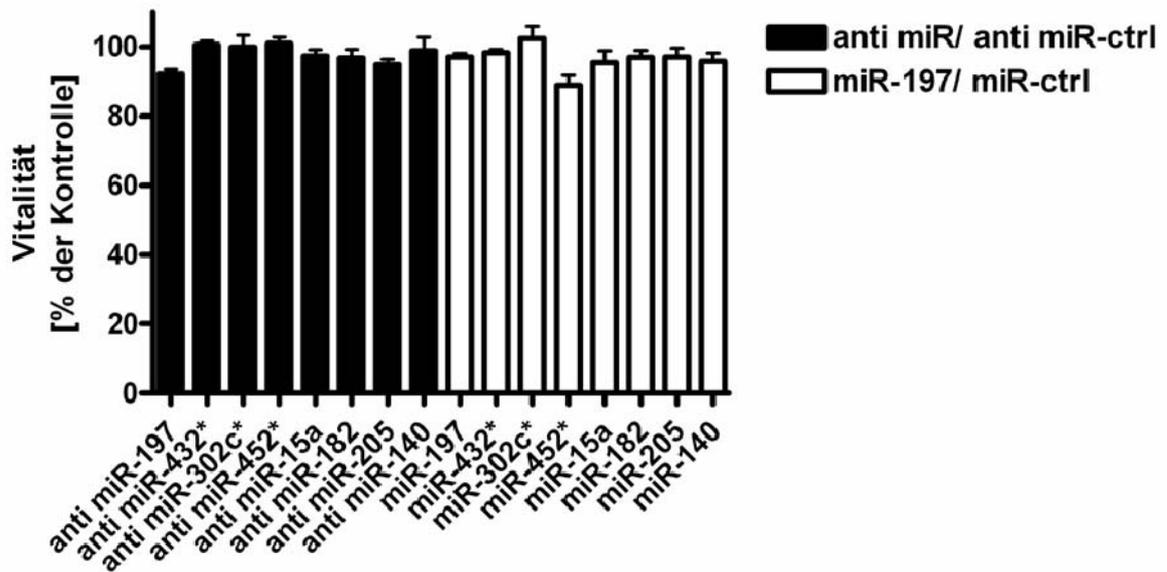


Abbildung 7. Transfektion mit fluoreszenzmarkierten anti-miRs und pre-miRs bei der Pankreaskarzinomzelllinie Colo357. $0,8 \times 10^3$ Colo357-Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte wurden mit Cy3 markierter anti-mikroRNA und pre-mikroRNA mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM für 40 Stunden transfiziert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen abgebildet.

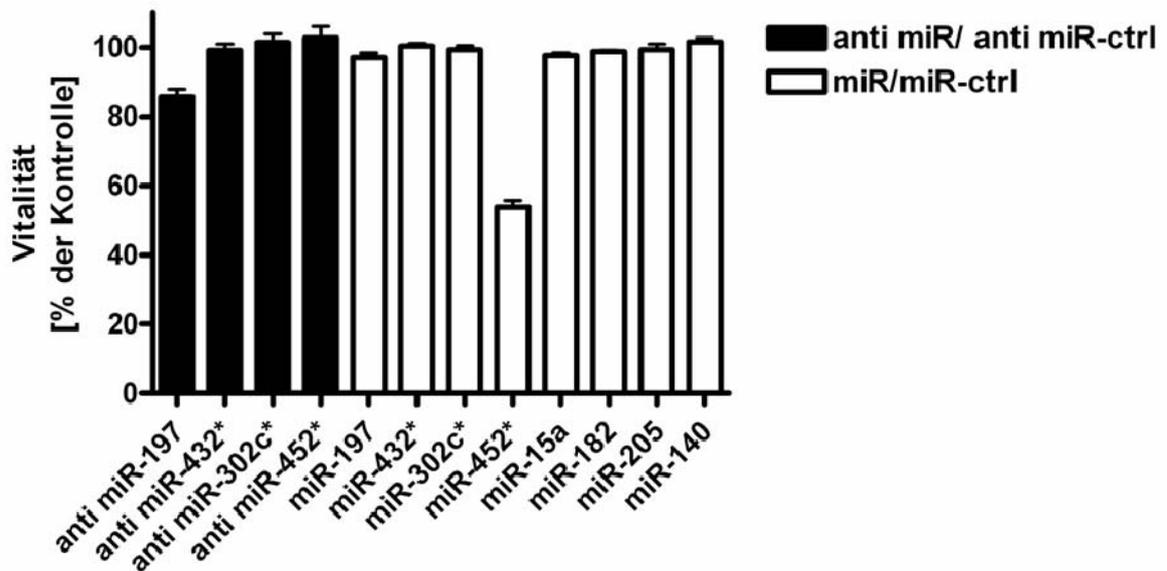
Es wurden Colo357-, Panc89-, BxPc3- und PancTul-Zellen mit anti-mikroRNA- und pre-mikroRNA Molekülen transfiziert, um den Einfluss von mikroRNAs auf den Phänotyp der Zelllinien zu untersuchen. Die Inhibition der mikroRNA-197 reduzierte die Vitalität bei Colo357-Zellen um 10 % und bei Panc89-Zellen um 17% (Abbildung 8). Durch die Überexpression der mikroRNA-452* wurde die Vitalität in Colo357-Zellen um 10 % und in

Panc89-Zellen um 50 % reduziert. Bei den PDAC Zelllinien BxPc3 und PancTul wurden keine signifikanten Veränderungen in der Vitalität nach mikroRNA Inhibition und Überexpression gemessen (Abbildung 8).

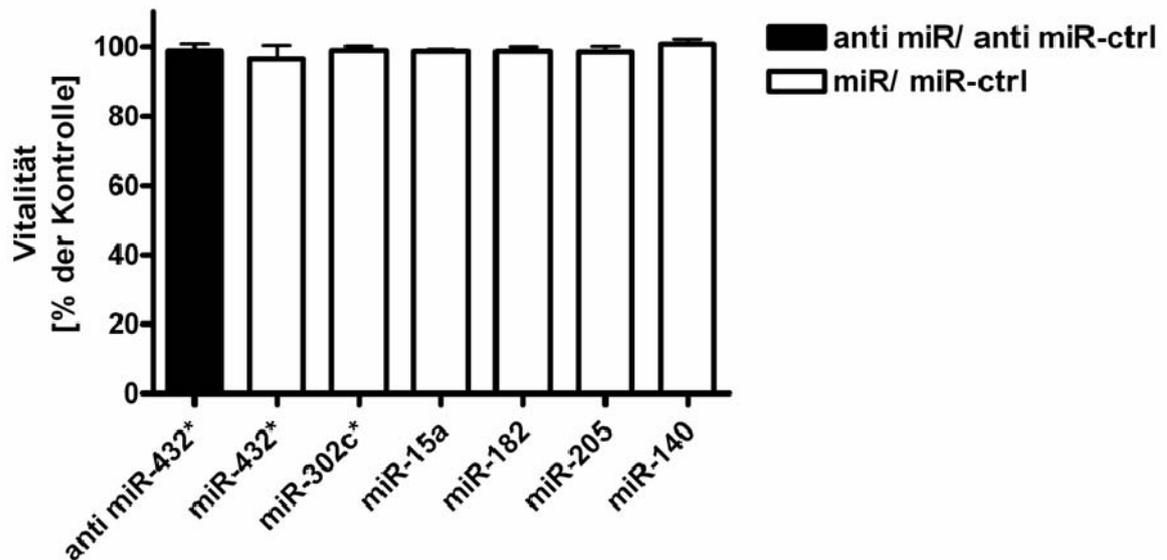
Colo357:



Panc89:



BxPc3:



PancTul:

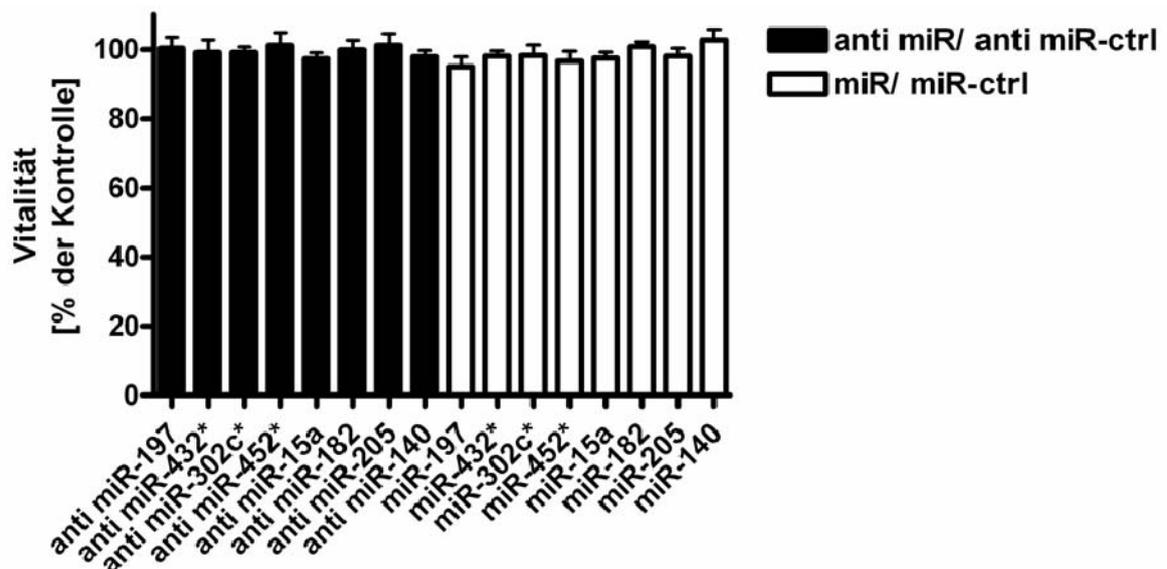


Abbildung 8. Inhibition der mikroRNA-197 und Überexpression der mikroRNA-452* reduzieren die Vitalität in Colo357- und Panc89-Zellen. $0,8 \times 10^3$ Colo357-, Panc89-, BxPc3- und PancTul-Zellen wurden pro Loch einer 96-Lochplatte mit anti-miRs und pre-miRs mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM transfiziert. Nach 40 Stunden Transfektion wurde die Vitalität der Zelllinien mittels Kristallviolett färbung gemessen. Das Verhältnis von anti-miR zu anti-miR-ctrl oder pre-miR zu pre-miR-ctrl transfizierten Zellen wurde abgebildet.

Die Reduktion der Vitalität nach Überexpression der mikroRNA-452* wurde im weiteren Verlauf durch die Bestimmung der Zellzahl (Abbildung 9) und die Messung der ^3H Thymidineinbaurate (Abbildung 10) bestätigt. Die Überexpression der mikroRNA-452* verursacht eine Hemmung der Proliferation bei Panc89-Zellen. Es wurden $2,3 \times 10^5$ Zellen mit pre-mikroRNA-452* und pre-mikroRNA-ctrl transfiziert. Nach 16 Stunden Transfektion mit pre-mikroRNA-452* wurden ungefähr 120.000 und nach 40 Stunden ungefähr 280.000 weniger Zellen gemessen (Abbildung 9).

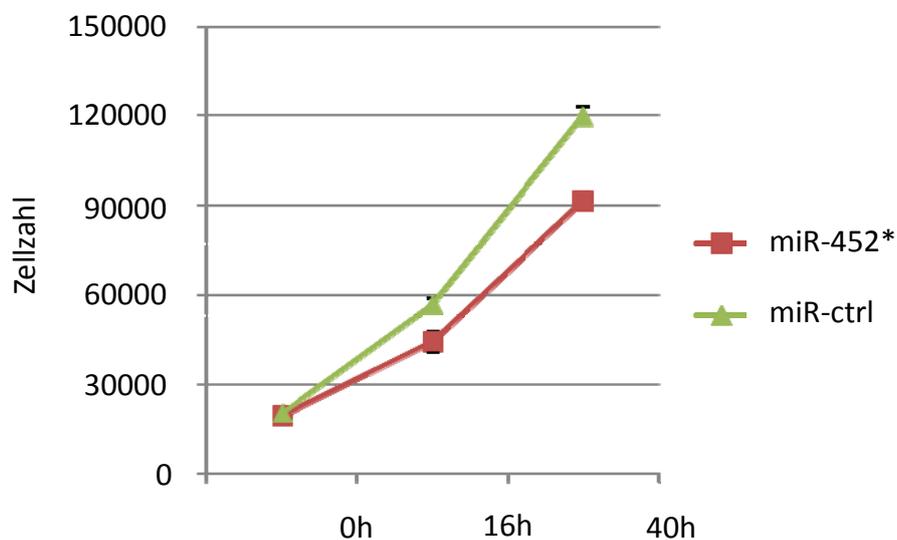


Abbildung 9. MikroRNA-452* hemmt die Proliferation in Panc89-Zellen. Zur Bestimmung des Zellwachstums wurden $2,3 \times 10^5$ Panc89-Zellen mit mikroRNA-452* und mikroRNA-ctrl mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM transfiziert. 16 und 40 Stunden nach Transfektion wurden die Zellzahlen ermittelt.

Die in Abbildung 9 beschriebene Hemmung der Proliferation nach Überexpression der mikroRNA-452* wurden durch die reduzierte ^3H Thymidin Einbaurate in Panc89-Zellen bestätigt. Die Proliferation der Panc89-Zellen wurde um ungefähr 35 % reduziert (Abbildung 10).

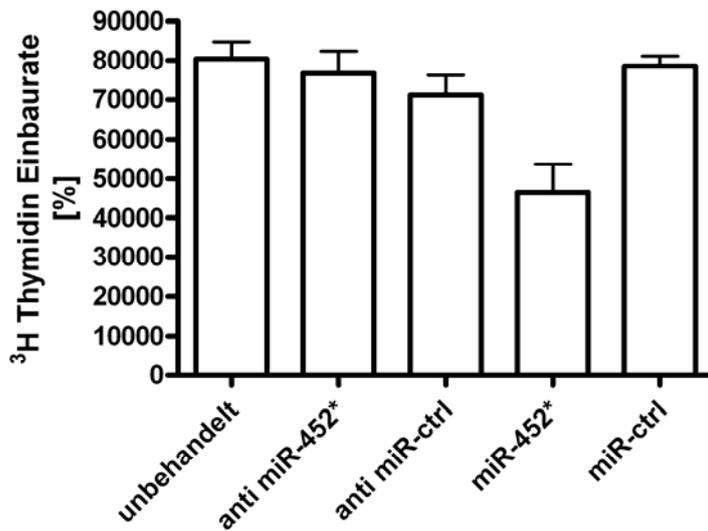


Abbildung 10. Die Überexpression von mikroRNA-452* reduziert die Proliferation von Panc89-Zellen. Die Inhibition und Überexpression der mikroRNA-452* und der zugehörigen Kontrollen in Panc89-Zellen wurden wie bereits in der Legende der Abbildung 8 beschrieben durchgeführt. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit ³H Thymidin für 16 Stunden markiert (370 kBq/μL). Nach 40 Stunden wurde die ³H Thymidin Einbaurrate gemessen (n=6).

Wie in Abbildung 8-10 beschrieben reduzierte die Überexpression der mikroRNA-452* in Panc89-Zellen signifikant die Vitalität. Um zu untersuchen, ob die Reduktion der Vitalität durch Zelltod oder Proliferationshemmung verursacht wird, wurde eine Zellzyklusanalyse nach Propidiumiodidfärbung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Da die Überexpression der mikroRNA-452* keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus in Panc89-Zellen ausübt, wird durch mikroRNA-452* eine Hemmung der Proliferation und kein Zelltod induziert (Abbildung 11).

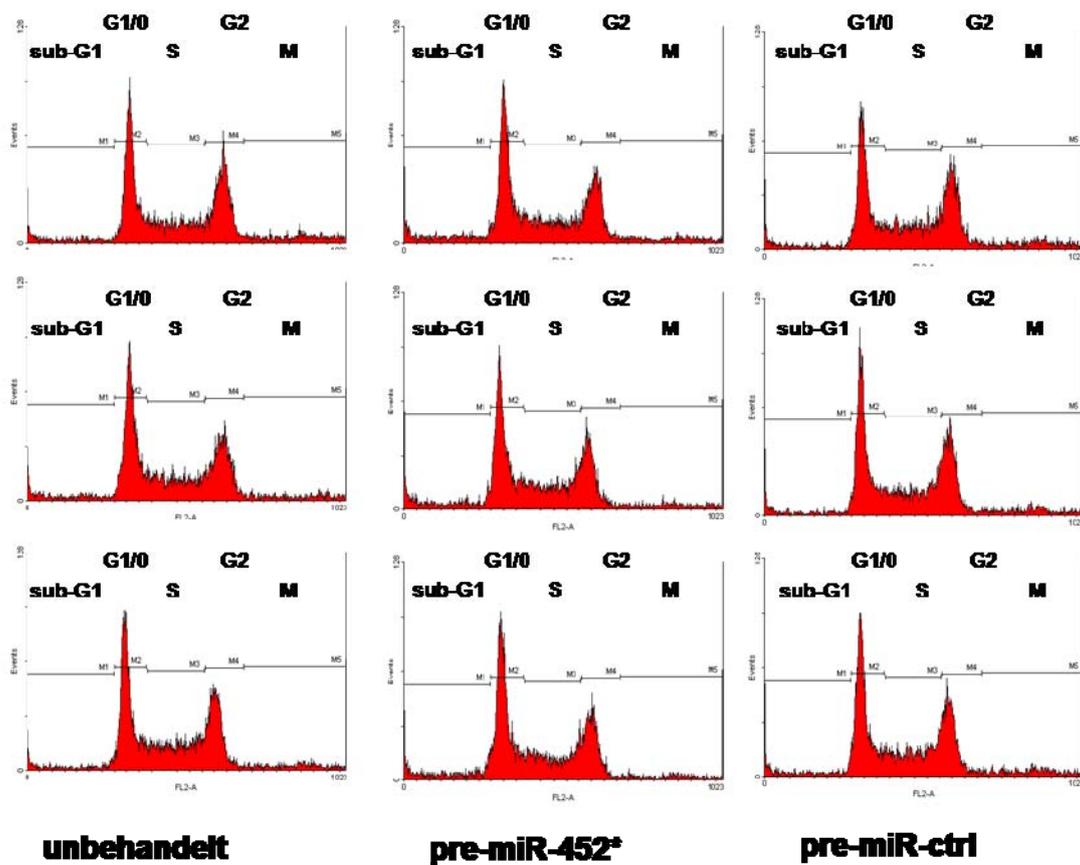


Abbildung 11. Die Überexpression der mikroRNA-452* hat keinen direkten Einfluss auf den Zellzyklus in Panc89-Zellen. MikroRNA-452* wurde mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM in Panc89-Zellen transfiziert. Nach 40 Stunden Transfektion wurde der Zellzyklus von jeweils 10.000 transfizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der DNA-Gehalt wurde mittels Propidiumiodidfärbung gemessen und wurde auf der x-Achse (FL2-A) abgebildet. Die gezählten Fälle wurden auf der y-Achse abgebildet.

3.1.2.3 Einfluss von mikroRNA-197 auf epitheliale Tumorzellen

3.1.2.3.1 Inhibition von mikroRNA-197 reduziert in Abhängigkeit des p38-Signalweges die Vitalität und Proliferation von epithelialen Tumorzellen

Um den Einfluss der mikroRNA-197 auf die Vitalität der Pankreaskarzinomzelllinien Colo357 und Panc89 und auch in einer weiteren Zelllinie (Gebärmutterhalskrebs, HeLa) zu untersuchen, wurde mikroRNA-197 in den Zelllinien überexprimiert beziehungsweise inhibiert. Die Überexpression von doppelsträngigen RNA Molekülen die hergestellt wurden,

um die Funktion der endogenen mikroRNA-197 zu übernehmen, führten zu keiner signifikanten Veränderung der Vitalität in Colo357-Zellen und zu einer leichten Abnahme der Vitalität von Panc89- und HeLa-Zellen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigte die Hemmung der mikroRNA-197 mit kommerziell erhältlichen einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen (anti-miR-197), die dafür hergestellt wurden, um mikroRNA-197 zu binden und in der Funktion zu inhibieren, eine signifikante Reduktion der Vitalität von Colo357- (27%), Panc89- (26%) und HeLa-Zellen (47%) (Abbildung 12).

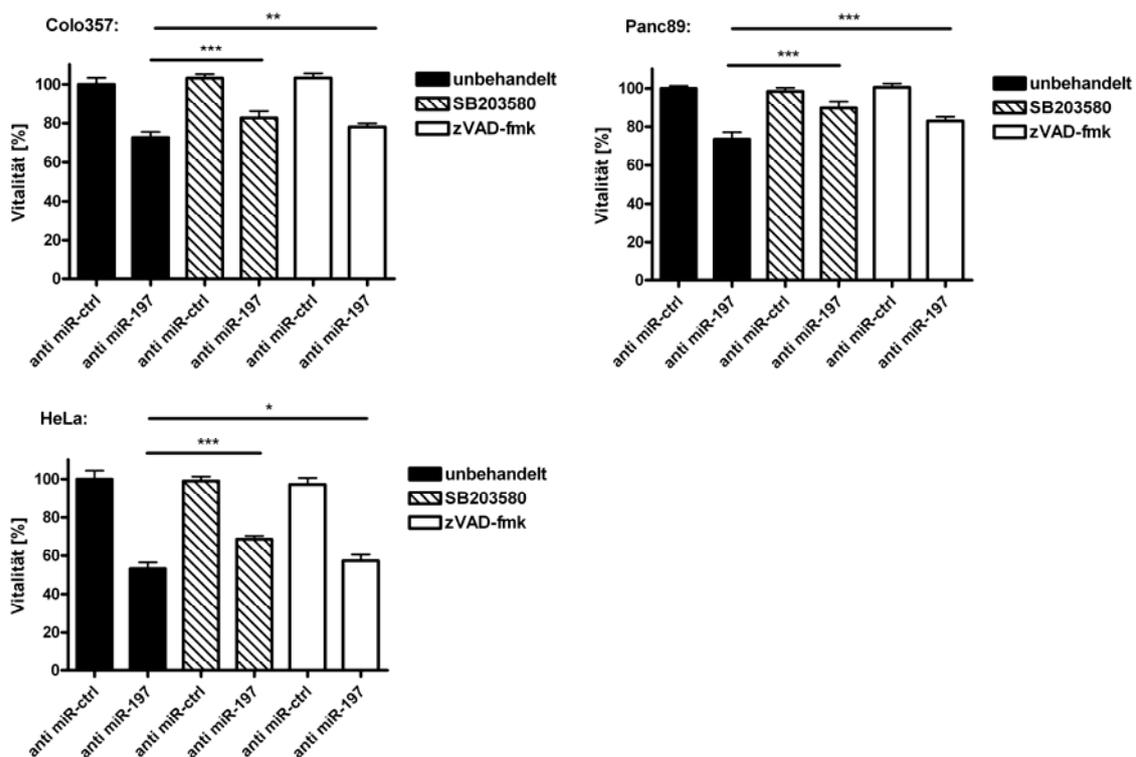


Abbildung 12. Die Inhibition von mikroRNA-197 reduziert p38 abhängig die Vitalität in epithelialen Tumorzellen.

Für die Inhibitionsstudien wurden Colo357-, Panc89-, und HeLa-Zellen (8×10^3 pro Loch einer 96-Loch Platte) entweder mit dem p38 Inhibitor SB203580 mit einer finalen Konzentration von $10 \mu\text{M}$ oder mit dem Caspase Inhibitor zVAD-fmk mit einer finalen Konzentration von $25 \mu\text{M}$ behandelt, bevor sie transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit einer finalen Konzentration von 75 nM mit anti-miR-197 oder anti-miR-ctrl transfiziert. Nach 40 Stunden wurde die Vitalität der Zellen mittels Kristallviolett färbung gemessen (n=6).

Diese Ergebnisse wurden mit dem ^3H Thymidin Einbau-Assay bestätigt. Nach Inhibition der mikroRNA-197 wurde die ^3H Thymidin Einbaurrate von Colo357-Zellen um 17%, von Panc89-Zellen um 25 % und bei HeLa-Zellen um 35 % reduziert (Abbildung 13).

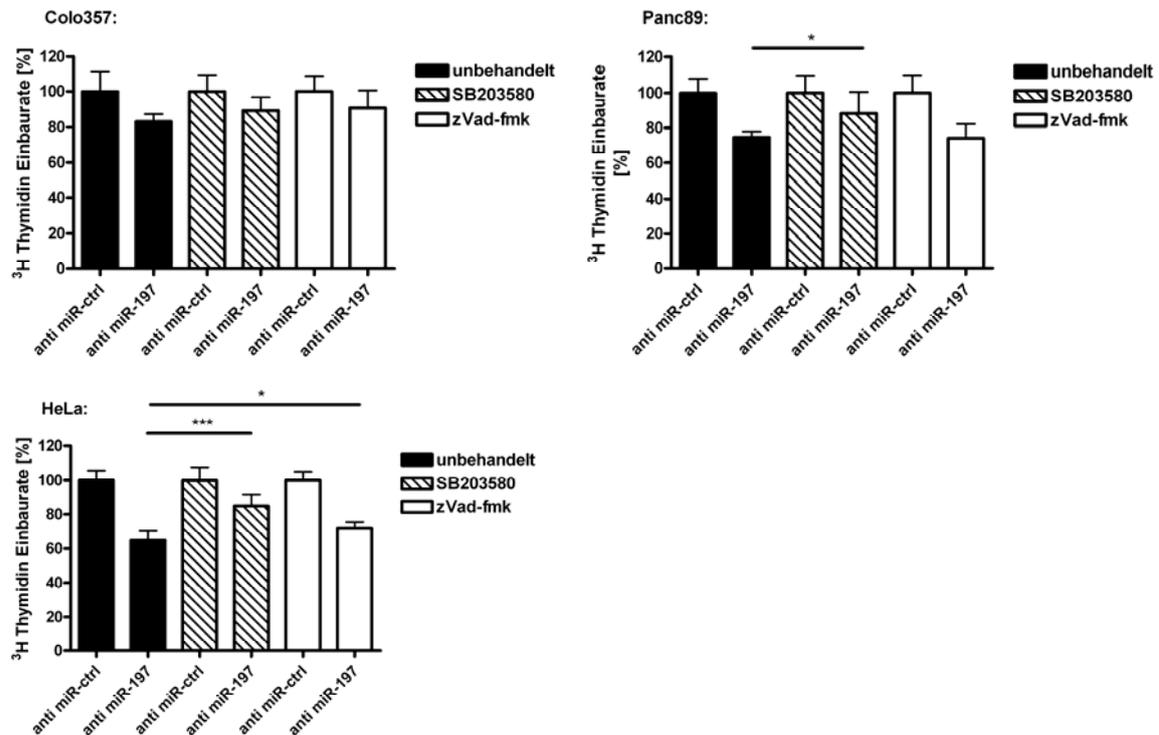


Abbildung 13. Die Inhibition von mikroRNA-197 reduziert die Proliferation in epithelialen Tumorzellen p38 abhängig.

Für die Inhibitionsstudien wurden Colo357-, Panc89-, und HeLa-Zellen wie bereits in der Legende der Abbildung 12 beschrieben, behandelt und transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit ^3H Thymidin für 16 Stunden markiert (370 kBq/ μL). Nach 40 Stunden wurde die ^3H Thymidin Einbaurrate gemessen (n=6).

3.1.2.3.2 Die Kinase p38 vermittelt die Hemmung der Proliferation von epithelialen Tumorzellen nach der Inhibition von mikroRNA-197

Die Analyse von verschiedenen Signaltransduktionswegen zeigte, dass der p38 Signaltransduktionsweg in allen drei Zelllinien nach mikroRNA-197 Inhibition aktiviert wurde. Zusätzlich zur Aktivierung des p38 Signaltransduktionsweges wurde durch die Inhibition der mikroRNA-197 eine Caspase3 Spaltung in allen drei Zelllinien induziert (Abbildung 14).

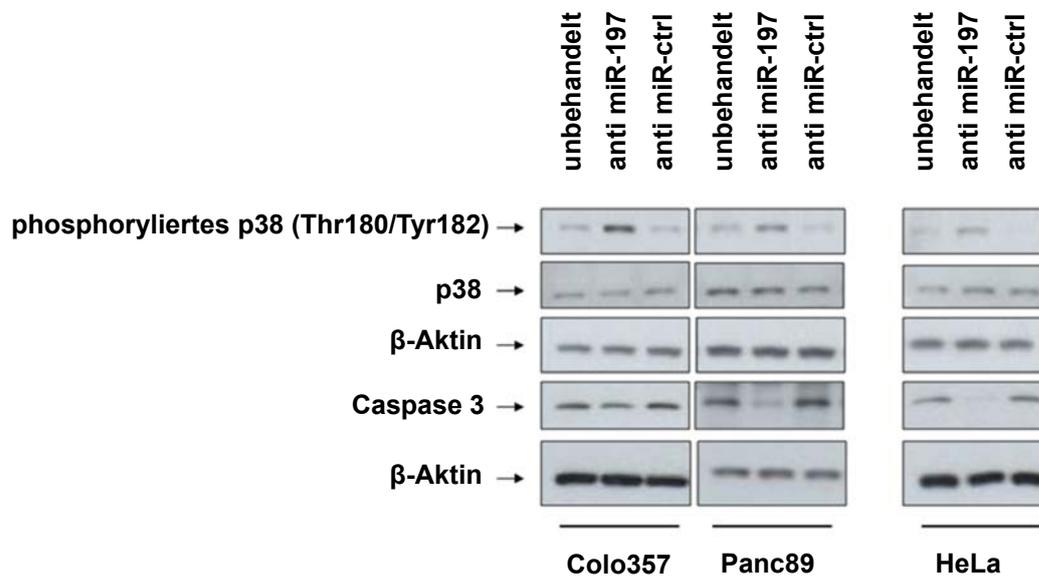


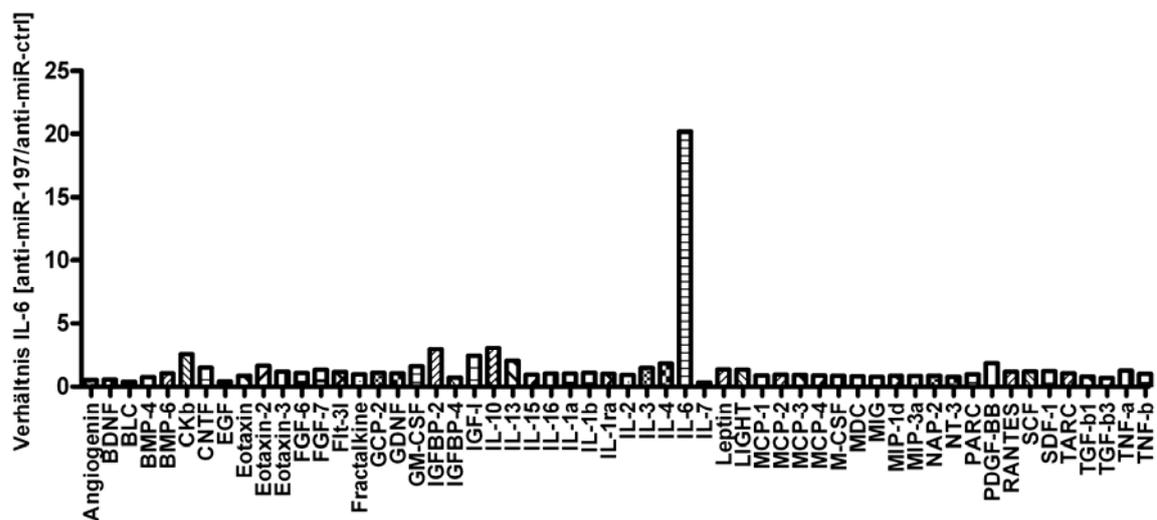
Abbildung 14. Das Ausschalten der mikroRNA-197 führt zur Aktivierung des p38 Signaltransduktionsweges und zur Spaltung von Caspase3. Für die Western Blot Analyse wurden $2,3 \times 10^5$ transfizierte Colo357-, Panc89- und HeLa-Zellen nach 40 Stunden lysiert. 25 µg der Lysate wurden in der Western Blot Analyse eingesetzt. Die folgenden primären Antikörper wurden eingesetzt: anti-p38 und anti-phospho-p38, anti-caspase3 und anti-β-Aktin. Als Beladungskontrolle wurden die Proteinmengen von β-Aktin der jeweiligen Proben parallel bestimmt.

Die Inkubation der Zellen mit dem p38 Map Kinase Inhibitor SB203580 vor der Transfektion mit anti-mikroRNA-197 stellte in allen drei Zelllinien die Vitalität wieder her (10 % bei Colo357-, 16 % bei Panc89- und 15 % bei HeLa-Zellen) (Abbildung 12). Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch die Analyse der Zellproliferation anhand der ^3H Thymidin Einbauraten erhalten (6 %, 13 % und 20%) (Abbildung 13). Die Inkubation der Zellen mit dem Caspase Inhibitor zVAD-fmk vor der Transfektion mit anti-miR-197 stellte nur wenig die Vitalität wieder her (6 % bei Colo357-, 9 % bei Panc89- und 4 % bei HeLa-Zellen) (Abbildung 12) und auch nur mäßig die ^3H Thymidineinbaurate (8 % bei Colo357-, kein Effekt bei Panc89-, 7 % bei HeLa-Zellen) (Abbildung 13). Demzufolge sind sowohl der Signaltransduktionsweg p38, als auch Caspasen an der Hemmung der Proliferation von epithelialen Tumorzellen nach der Inhibition von mikroRNA-197 beteiligt.

3.1.2.3.3 Die Inhibition der mikroRNA-197 beeinflusst die Zytokinsekernierung in Panc89-Zellen

Um weiter die funktionelle Relevanz der mikroRNA-197 zu untersuchen, wurde die Expression von 174 Zytokinen in dem Überstand von Panc89-Zellen nach Inhibition der mikroRNA-197 mit einem Zytokinarray gemessen. Die Expression der Zytokine IL-6, IL-10, I-309, b-NGF und HGF wurden über dreifach herauf reguliert und Expression der Zytokine IL-7 und DR-6 wurde über dreifach herunter reguliert nach Inhibition der mikroRNA-197 im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15 A-C).

A



Es zeigte sich, dass die Hemmung von mikroRNA-197 zu einem dramatischen Anstieg von IL-6 führte (Abbildung 15). Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurde die IL-6-Menge in den Zellkulturüberständen von anti-mikroRNA-ctrl transfizierten und anti-mikroRNA-197 transfizierten Colo357-, Panc89- und HeLa-Zellen mittels kommerziell erhältlichem IL-6 ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass die IL-6 Konzentration in den Überständen der drei Zelllinien nach Inhibition der mikroRNA-197 (bei Colo357 und Panc89 > zweifach und bei HeLa > siebenfach) stark anstieg. Um zu untersuchen, ob der Signaltransduktionsweg p38 oder auch Caspasen für den Anstieg der IL-6 Konzentration verantwortlich sind, wurden die Zellkulturüberstände von anti-mikroRNA-ctrl transfizierten und anti-mikroRNA-197 transfizierten Colo357-, Panc89- und HeLa-Zellen, die zuvor mit p38 und Caspase Inhibitoren behandelt wurden mittels IL-6 ELISA bestimmt. Der Anstieg der IL-6 Konzentration konnte in Colo357-Zellen und HeLa-Zellen durch die Behandlung mit dem p38 Inhibitor SB203580 signifikant reduziert werden. Die durch Inhibition der mikroRNA-197 hervorgerufene IL-6 Sezernierung wurde bei HeLa-Zellen signifikant durch Behandlung mit SB203580 und auch mit dem Caspase Inhibitor zVad-fmk reduziert (Abbildung 16).

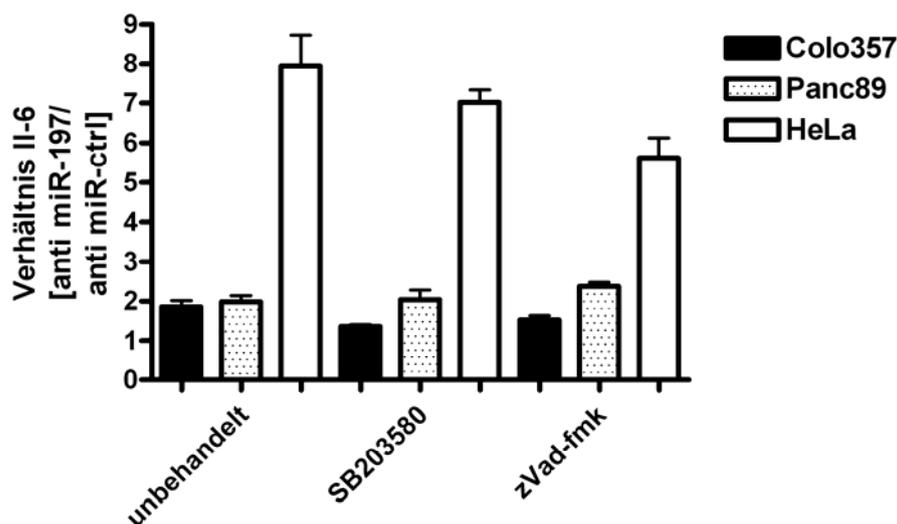
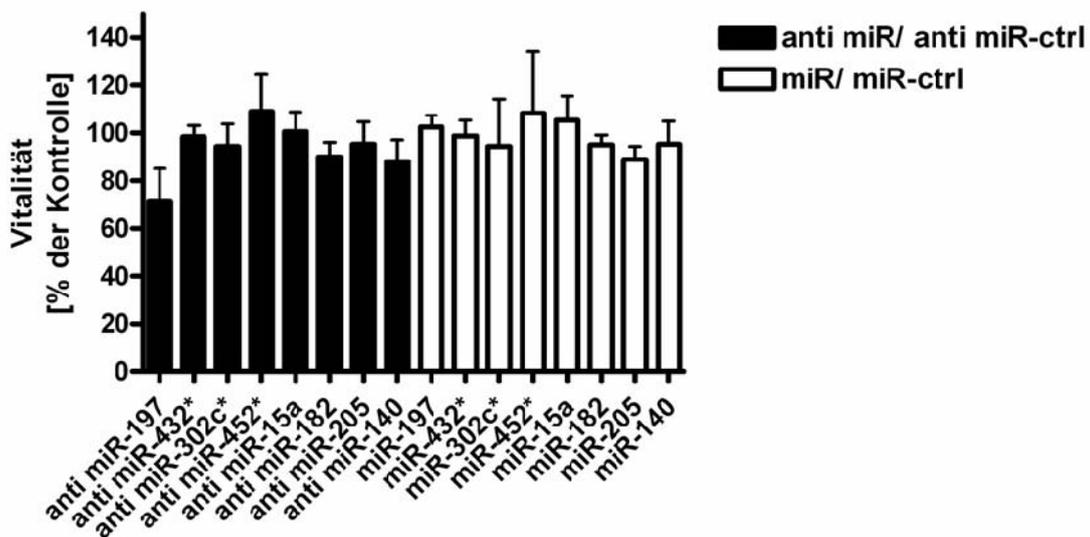


Abbildung 16. Inhibition der mikroRNA-197 induziert die IL-6 Sezernierung in epithelialen Tumorzellen. Die IL-6 Konzentration wurde in den Überständen der epithelialen Tumorzellen Colo357, Panc89 und HeLa mittels IL-6 ELISA (R&D Systems) nach Inhibition der mikroRNA-197 im Verhältnis zur Kontrolle gemessen. Die Zellen wurden entweder mit dem p38 Inhibitor SB203580 mit einer finalen Konzentration von 10 μ M oder mit dem Caspase Inhibitor zVAD-fmk mit einer finalen Konzentration von 25 μ M behandelt, bevor sie mit einer finalen Konzentration von 75 nM mit anti-mikroRNA-197 oder anti-mikroRNA-ctrl transfiziert wurden.

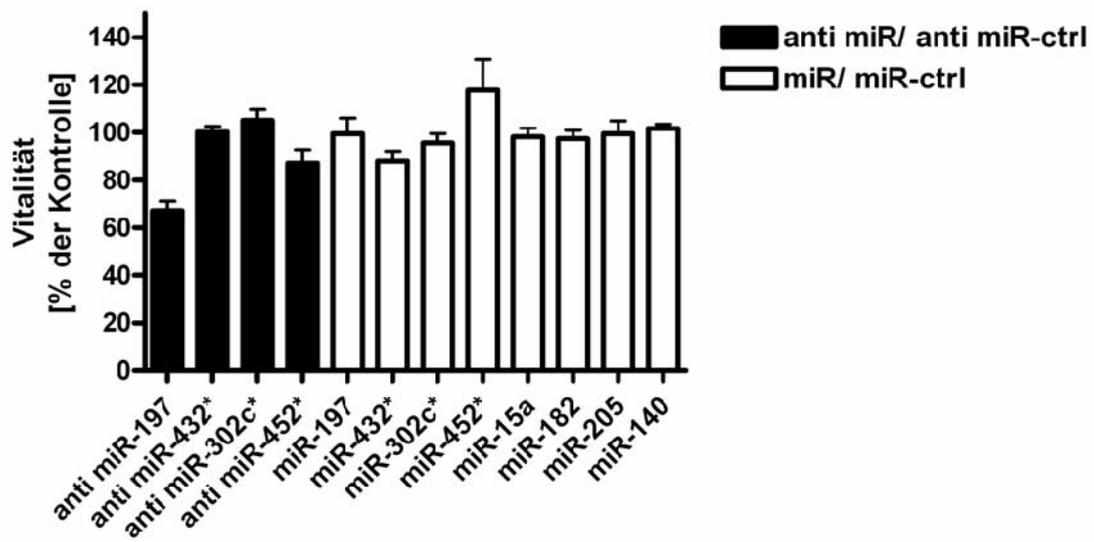
3.1.3 MikroRNAs beeinflussen die TRAIL-induzierte Apoptose in PDAC-Zelllinien

Um den Einfluss von mikroRNAs auf den TRAIL-induzierten Zelltod zu untersuchen, wurden Colo357-, Panc89-, BxPc3- und PancTul-Zellen mit anti-mikroRNA- und pre-mikroRNA-Molekülen transfiziert und anschließend mit TRAIL Apoptose induziert. Sowohl bei der TRAIL-sensitiven Colo357-, als auch bei der TRAIL-resistenteren Panc89-Zelllinie wurde nach TRAIL-Behandlung und Inhibition der mikroRNA-197 die Vitalität signifikant reduziert (bei Colo357 30 % und bei Panc89 30 %) (Abbildung 17). Eine Verdopplung der anti-miR-197 Konzentration resultierte in keinem spezifischen Anstieg der TRAIL-induzierten Apoptose (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren zeigte die Inhibition der mikroRNA-452* und die Überexpression der mikroRNA-432* eine signifikant verstärkte TRAIL-induzierte Apoptose in Panc89-Zellen (Abbildung 17). Bei BxPc3-Zellen, die mit TRAIL behandelt wurden, führte die Überexpression von mikroRNA-302c* und mikroRNA-140 zu einer signifikant reduzierten Vitalität (Abbildung 17). Nach TRAIL-induzierter Apoptose in PancTul-Zellen wurden keine signifikanten Veränderungen, durch Inhibition und Überexpression von mikroRNAs gemessen (Abbildung 17).

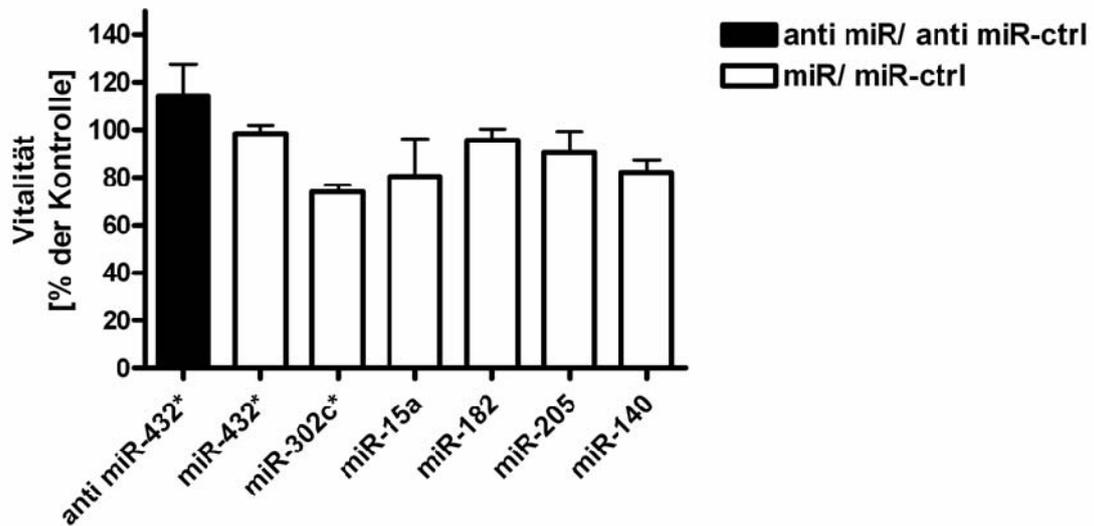
Colo357:



Panc89:



BxPc3:



PancTul:

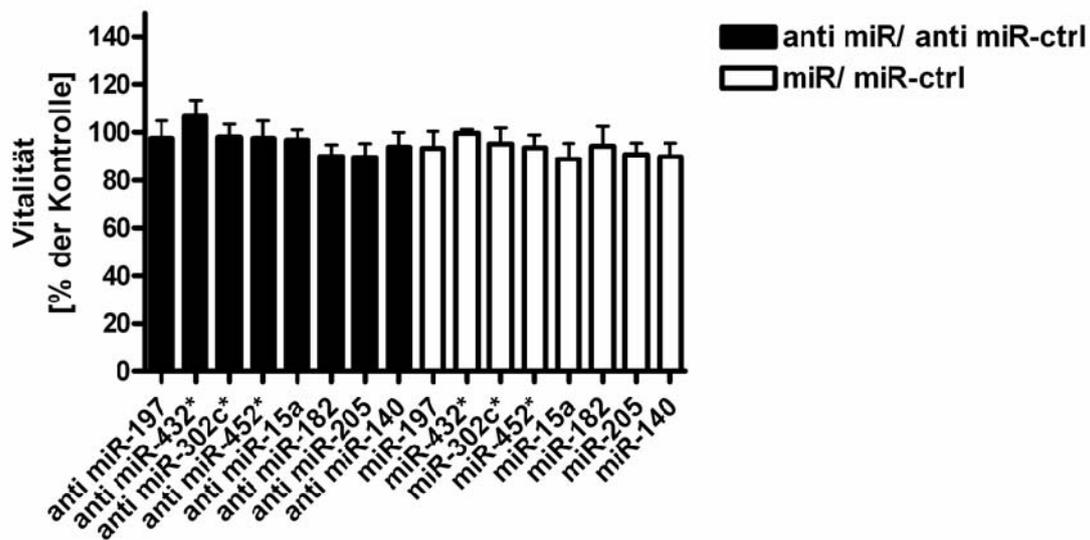


Abbildung 17. MikroRNA-197, mikroRNA-432*, mikroRNA-452*, mikroRNA-302c* und mikroRNA-140 beeinflussen die TRAIL-induzierte Apoptose in PDACs. $0,8 \times 10^3$ Colo357-, Panc89-, BxPc3- und PancTul-Zellen wurden pro Loch einer 96-Lochplatte mit anti-miRs und pre-miRs mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM transfiziert. Nach 24 Stunden Transfektion wurden die Zellen für 16 Stunden mit TRAIL (100 ng/ml) behandelt. Die Vitalität der PDAC Zelllinien wurde mittels Kristallviolett färbung gemessen. Um den Einfluss von anti-mikroRNAs und pre-mikroRNAs auf die TRAIL-induzierte Apoptose abzubilden, wurde das Verhältnis der Vitalität von unbehandelten Zellen im Vergleich zu TRAIL-behandelten Zellen für die vier Pankreaskarzinomzelllinien, die unterschiedliche Apoptoseresistenzen nach TRAIL-Behandlung aufweisen, gleich 100 % gesetzt. Die unbehandelten und TRAIL-behandelten Zellen wurden zuvor mit Kontroll anti-mikroRNAs oder pre-mikroRNAs (anti-miR-ctrl oder pre-miR-ctrl) transfiziert. Nach TRAIL-Behandlung starben 66 % der Colo357-Zellen. Dieser Wert wurde auf 100 % normiert, sodass der Einfluss von anti-mikroRNAs und pre-mikroRNAs auf die TRAIL-induzierte Apoptose bei Colo357-Zellen hervorgehoben wird. Entsprechend wurden bei Panc89-Zellen 50 %, bei BxPc3-Zellen 36 % und bei PancTul-Zellen 25 % auf 100 % normiert.

3.1.3.1 Die FasL induzierte Apoptose wird verstärkt durch die Inhibition der mikroRNA-197

Die deutlichste Sensitivierung nach TRAIL-Behandlung zeigte sich nach der Hemmung von mikroRNA-197 bei Colo357- und Panc89-Zellen (Abbildung 17). Deswegen wurde untersucht ob die Inhibition von mikroRNA-197 auch die Signaltransduktion anderer Todesrezeptoren in Panc89-Zellen beeinflusst. Interessanterweise zeigte sich, dass durch die Inhibition von

mikroRNA-197 auch eine Steigerung der FasL induzierten Apoptose gemessen werden konnte. Es wurde jedoch keine Sensitivierung nach TNF α Behandlung gemessen (Abbildung 18).

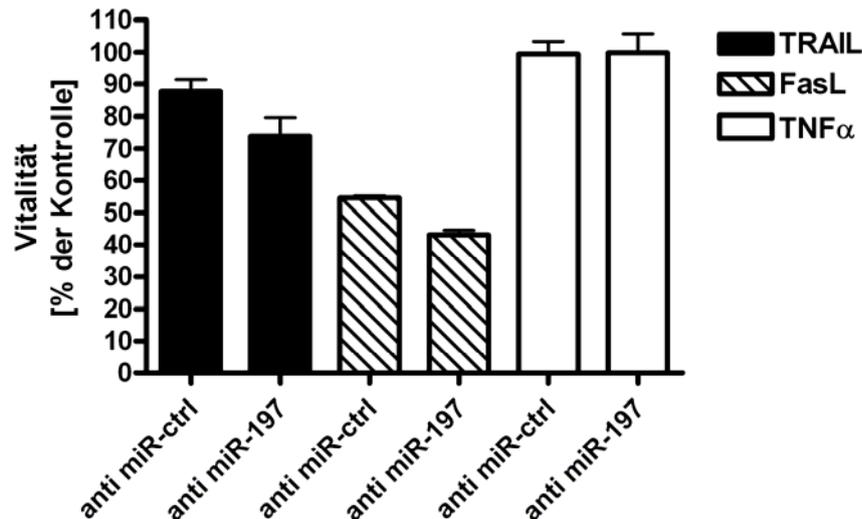
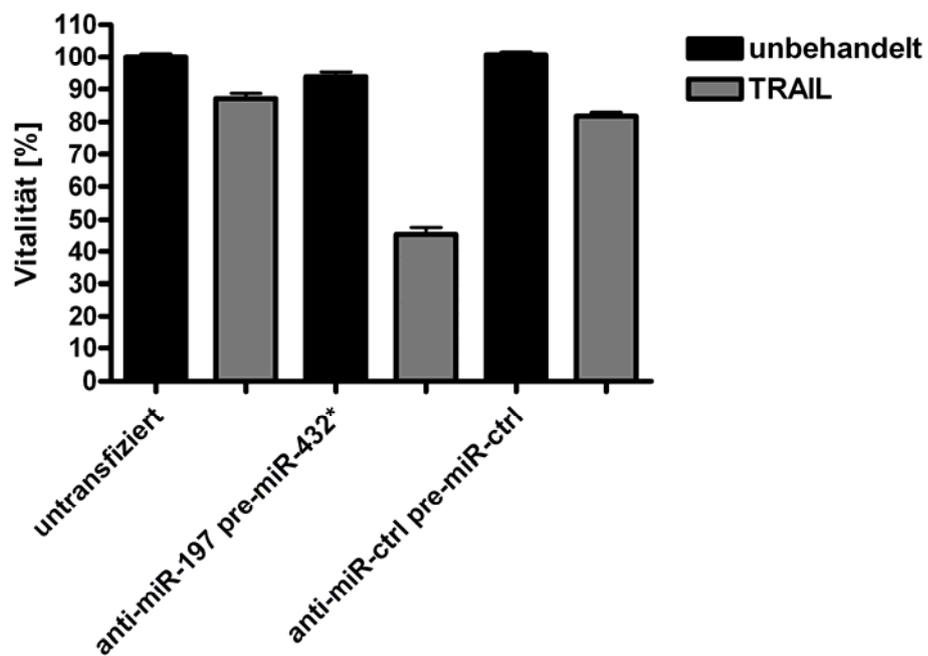


Abbildung 18. Inhibition der mikroRNA-197 verstärkt die TRAIL- und FasL induzierte Apoptose in Panc89-Zellen. $0,8 \times 10^3$ Panc89-Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte wurden mit anti-miR-ctrl und anti-miR-197 mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM transfiziert. Nach 24 Stunden Transfektion wurden die Zellen für 16 Stunden mit TRAIL (100 ng/ml) oder FasL (Flag-CD95L vernetzt durch anti-Flag mAb M2) (100 ng/ml) oder TNF α (50 ng/ml) behandelt. Die Vitalität der Panc89-Zellen wurde mittels Kristallviolett färbung gemessen und prozentual zu unbehandelten Zellen, die als Kontrolle eingesetzt wurden, angegeben.

3.1.3.2 Die Inhibition der mikroRNA-197 und gleichzeitige Überexpression der mikroRNA-432* verstärkt die TRAIL-induzierte Apoptose in Panc89-Zellen nach TRAIL-Behandlung

In den folgenden Versuchen wurde geprüft, ob die Hemmung von mikroRNA-197 mit gleichzeitiger Überexpression von mikroRNA-432* zur weiteren Steigerung des TRAIL-vermittelten Zelltods führt. Hierzu wurden Panc89-Zellen mit anti-mikroRNA-197 und pre-mikroRNA-432* oder mit anti-mikroRNA-ctrl und pre-mikroRNA-ctrl transfiziert und anschließend für 16 Stunden mit TRAIL behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Kristallviolett färbung gemessen. Panc89-Zellen, die mit anti-mikroRNA-197 und pre-mikroRNA-432* gleichzeitig transfiziert wurden, starben um 35 % mehr im Vergleich zu anti-

mikroRNA-ctrl und pre-mikroRNA-ctrl transfizierten Zellen nach TRAIL-Behandlung (Abbildung 19 A). Um festzustellen, ob es sich bei diesem Effekt um Apoptose handelt, wurde parallel der Zelltod mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Hemmung der mikroRNA-197 mit der gleichzeitigen Überexpression der mikroRNA-432* verursachte eine Erhöhung der Apoptose (sub-G1 Fraktion) um 16 % im Vergleich zu Zellen, die nur mit anti-mikroRNA-ctrl und pre-mikroRNA-ctrl transfiziert wurden (Abbildung 19 B).

A

B

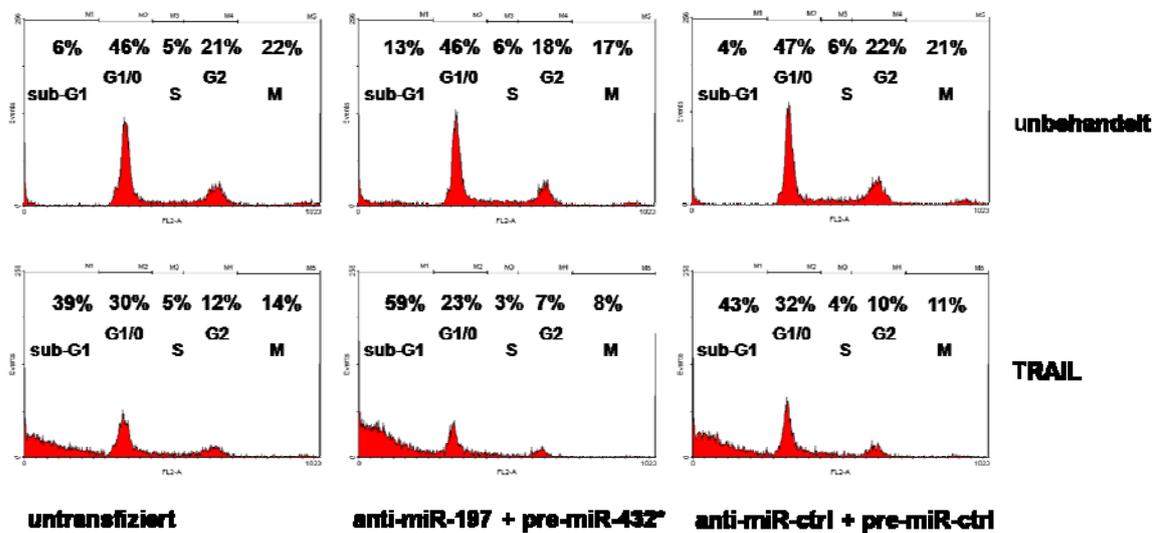


Abbildung 19. Inhibition der mikroRNA-197 und gleichzeitige Überexpression der mikroRNA-432* verstärkt die Apoptose nach TRAIL- Behandlung. Anti-mikroRNA-197 und/oder pre-mikroRNA-432* wurde mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM in Panc89-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden Transfektion wurden die Zellen für 16 Stunden mit TRAIL (100 ng/ml) behandelt. Die Vitalität der Panc89-Zellen wurde mittels Kristallviolett färbung gemessen (A). Das DNA-Profil von 10.000 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der DNA-Gehalt wurde mittels Propidiumiodid färbung gemessen und auf der x-Achse (FL2-A) abgebildet. Die gezählten Fälle wurden auf der y-Achse abgebildet.

3.1.3.3 TRAIL-vermittelte Signaltransduktionswege werden unterschiedlich durch die Inhibition der mikroRNA-197 und Überexpression der mikroRNA-432* bei Panc89-Zellen beeinflusst

Um die Mechanismen, die nach Inhibition von mikroRNA-197 und Überexpression von mikroRNA-432* in Panc89-Zellen induziert werden, zu entschlüsseln, wurden Panc89-Zellen mit anti-mikroRNA-197 oder pre-mikroRNA-432* und den Kontrollen anti-mikroRNA-ctrl und pre-mikroRNA-ctrl transfiziert und mit TRAIL behandelt. Anschließend wurden mittels Western Blot Analysen verschiedene TRAIL-induzierte Signaltransduktionswege untersucht. Wie die Abbildung 20 zeigt führte die Hemmung von mikroRNA-197 in unbehandelten Zellen zu einer PARP-Spaltung, einer reduzierten PKC δ Genexpression und zu einer Phosphorylierung von p38 (Thr180/Tyr182). Nach TRAIL-Behandlung wurde eine verstärkte PARP-Spaltung, eine verstärkte Phosphorylierung von (Thr180/Tyr182) p38 und eine

Herunterregulation von unphosphoryliertem- und phosphoryliertem (Thr505) PKC δ , von phosphoryliertem (Thr183/Tyr185) SAPK/JNK und von Caspase9 nach Inhibition der mikroRNA-197 gemessen.

Die Überexpression der mikroRNA-432* führte zu einer verstärkten PARP-Spaltung nach TRAIL-Behandlung. Weder die Hemmung der mikroRNA-197 noch die Überexpression der mikroRNA-432* veränderten den Expressions- oder Phosphorylierungsstatus von p44/42 (Abbildung 20).

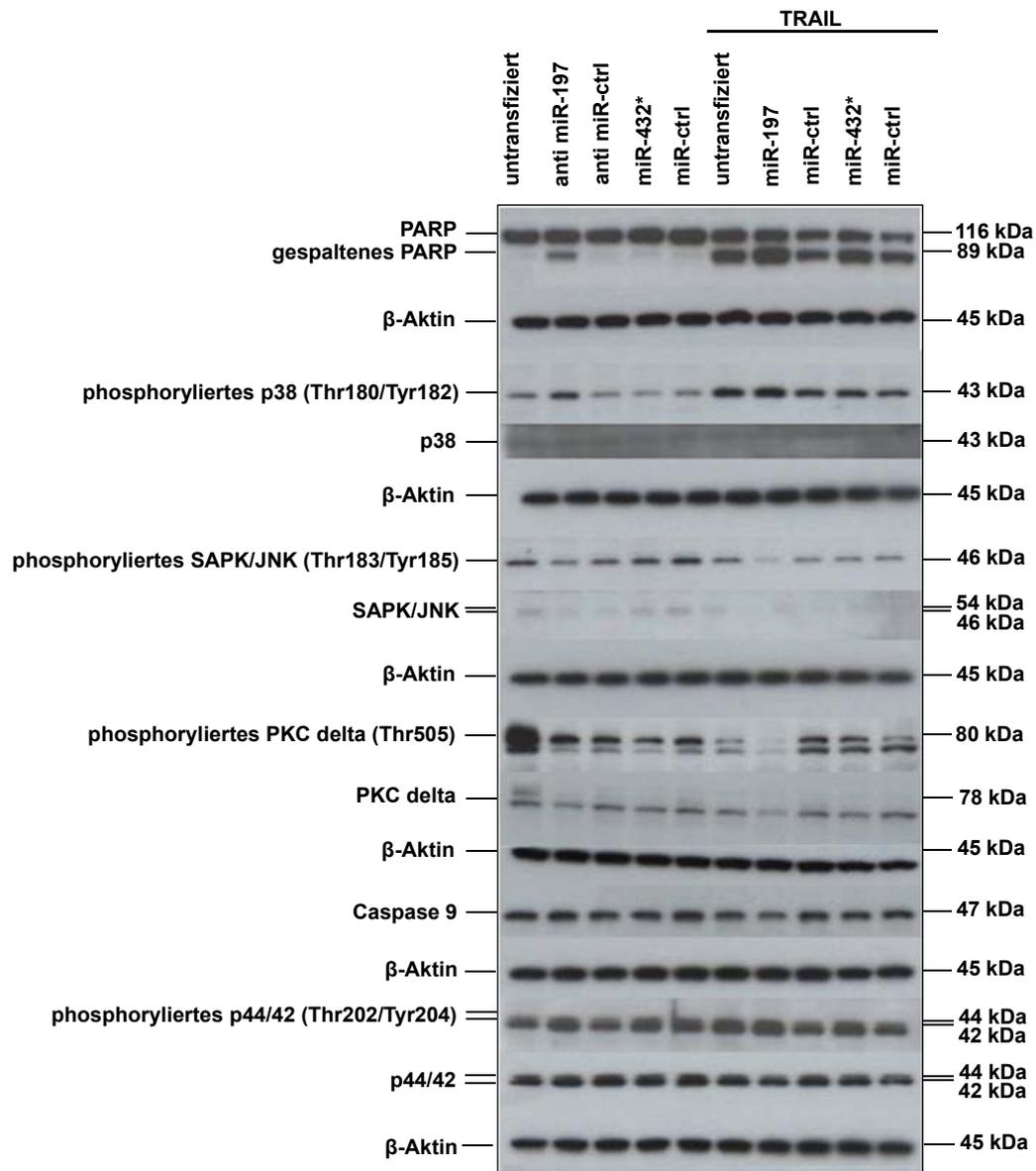


Abbildung 20. Western Blot Analyse nach Inhibition der mikroRNA-197 und Überexpression der mikroRNA-432* der TRAIL-behandelten Panc89-Zellen. Anti-mikroRNA-197 oder pre-mikroRNA-432* wurden mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM in Panc89-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden Transfektion wurden die Zellen für 16 Stunden mit TRAIL (100 ng/ml) behandelt. Die Western Blot Analysen wurden mit 25 μ g der Zelllysate durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden anti-PARP, anti-phospho (Thr180/Tyr182) p38, anti-p38, anti-phospho (Thr183/Tyr185) SAPK/JNK, anti-SAPK/JNK, anti-phospho (Thr505) PKC δ , anti-PKC δ , anti Caspase9, anti-phospho (Thr202/Tyr204) p44/42 und anti-p44/42. Als Beladungskontrolle wurden die Proteinmengen von β -Aktin der jeweiligen Proben parallel bestimmt.

3.1.3.4 Durch Inhibition und Überexpression der mikroRNA-197 werden Todesligand-induzierte Signaltransduktionswege verändert

In den folgenden Experimenten wurde mikroRNA-197 untersucht, da mikroRNA-197 die TRAIL-induzierte Apoptose stärker beeinflusst als mikroRNA-432*. Daher wurde sowohl die Inhibition als auch die Überexpression der mikroRNA-197 in Panc89-Zellen untersucht. Nach Inhibition der mikroRNA-197 wurde eine Heraufregulation von unphosphoryliertem und phosphoryliertem (Ser73) c-jun und von Flip, sowie die Spaltung von Caspase3 gemessen. Nach TRAIL-Behandlung wurde Caspase3 und Caspase7 in Panc89-Zellen herunterreguliert, durch die Inhibition der mikroRNA-197 wurde der Effekt der Caspase7 Herunterregulation verstärkt. Die Überexpression der mikroRNA-197 führte zu einer deutlich reduzierten Menge von Flip. Nach TRAIL-Behandlung führte die Überexpression der mikroRNA-197 zu einer verstärkten Spaltung von Flip(Abbildung 21).

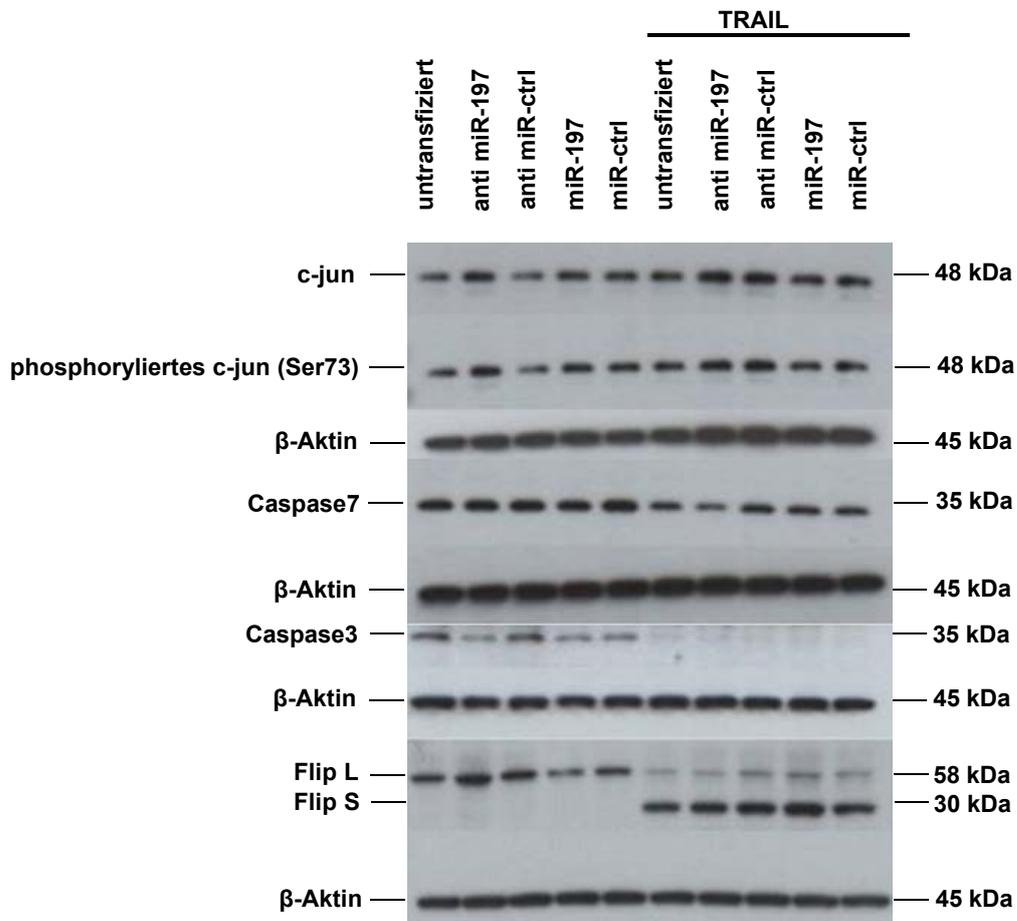


Abbildung 21. Western Blot Analyse nach Inhibition und Überexpression der mikroRNA-197 der TRAIL-behandelten Panc89-Zellen. Anti-mikroRNA-197 oder pre-mikroRNA-197 wurden mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM in Panc89-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden Transfektion wurden die Zellen für weitere 16 Stunden mit TRAIL (100 ng/ml) behandelt. Die Western Blot Analyse wurde mit 25 μ g der Zelllysate durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden anti-c-jun, anti-phospho (Ser73) c-jun, anti-Caspase7, anti-Caspase3, anti-Flip und anti- β -Aktin eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurden die Proteinmengen von β -Aktin der jeweiligen Proben parallel bestimmt.

3.1.3.5 Durch Inhibition und Überexpression der mikroRNA-197 wird die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B in Panc89-Zellen beeinflusst

Da nach Inhibition der mikroRNA-197 eine Heraufregulation von unphosphoryliertem und phosphoryliertem (Ser73) c-jun gemessen wurde und c-jun Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 ist, wurde mittels EMSA die Aktivierung des Transkriptionsfaktors

gemessen. Außerdem wurde auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB gemessen, um festzustellen, ob die TRAIL-induzierte NFκB Aktivierung durch mikroRNA-197 beeinträchtigt wird. Die Ausschaltung von mikroRNA-197 resultierte in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in Panc89-Zellen. Nach 2 Stunden TRAIL-Behandlung wurde der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert. Dieser Effekt wurde durch Inhibition der mikroRNA-197 reduziert (Abbildung 22).

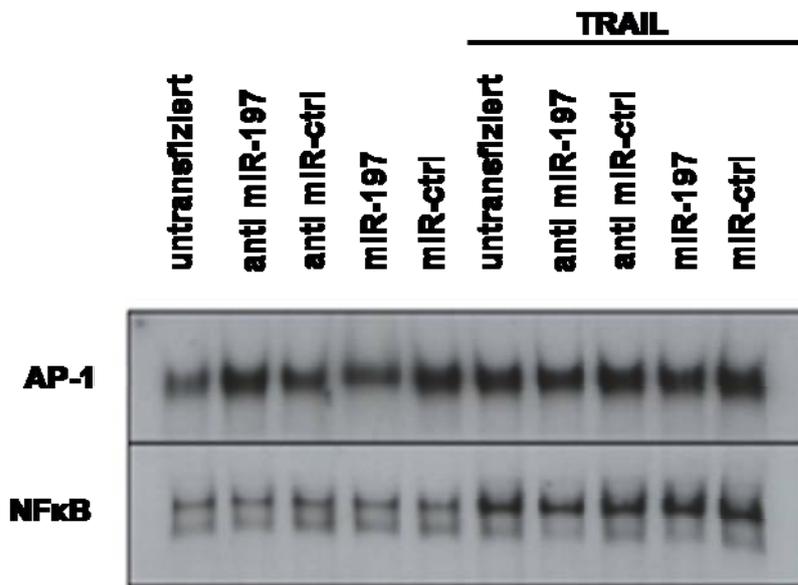


Abbildung 22. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) der Kernextrakte von Panc89-Zellen nach transients Transfektion und TRAIL-Behandlung. 24 Stunden nach Transfektion der anti-miR-197 und pre-miR-197 mit einer finalen Konzentration von 37,5 nM wurden Panc89-Zellen für zwei Stunden mit 100 ng/ml TRAIL stimuliert und deren Kernlysate mittels EMSA untersucht. Als Kontrolle wurden anti-mikroRNA-ctrl und pre-mikroRNA-ctrl unter den gleichen Bedingungen transfiziert.

3.2 MikroRNA-197 reguliert die Expression von Ran GTPase

3.2.1 Inhibition von mikroRNA-197 verändert die Proteinexpression in epithelialen Tumorzellen

Um die Auswirkungen der Hemmung von mikroRNA-197 in den epithelialen Tumorzellen Colo357, Panc89 und HeLa zu untersuchen, wurden Zellextrakte von anti-mikroRNA-197 und anti-mikroRNA-ctrl transfizierten Zellen mittels differentieller Gelelektrophorese mit anschließender MALDI-TOF Analyse untersucht. Wie die Abbildung 23 und Tabelle 5 zeigt, wurde die Genexpression von fünf Proteinen in allen drei untersuchten Zelllinien durch die Hemmung von mikroRNA-197 heraufreguliert und die Expression von neun Proteinen herunterreguliert. Um zu überprüfen, ob die festgestellten Veränderungen der Mengen dieser Proteine auf die direkte Bindung von mikroRNA-197 mit den jeweiligen mRNAs zurückzuführen sein könnten, wurden *in silico* Analysen mit den mikroRNA-Zielsequenz-Vorhersageprogrammen *miRanda* (John *et al.*, 2004), *Target-scan* (Lewis *et al.*, 2005) und *RNA hybrid* (Rehmsmeier *et al.*, 2004) durchgeführt. Bei drei von den fünf Proteinen, die eine erhöhte Menge nach Inhibition der mikroRNA-197 aufwiesen, wurden potenzielle mikroRNA-197 Bindesequenzen auf der 3'-UTR der mRNA durch die Algorithmen vorhergesagt. Es wurde beschrieben, dass Vorhersageprogramme für potenzielle mikroRNA Bindesequenzen viele falschpositive Ergebnisse vorschlagen und diese Fehlerquote durch den parallelen Einsatz verschiedener Algorithmen (Rehmsmeier *et al.*, 2004) signifikant reduziert werden können. Bei dem nach Inhibition der mikroRNA-197 heraufregulierten Protein Ran GTPase wurde von allen drei Algorithmen eine potenzielle Bindesequenz auf der 3'-UTR der RanGTPase mRNA vorhergesagt (Tabelle 5).

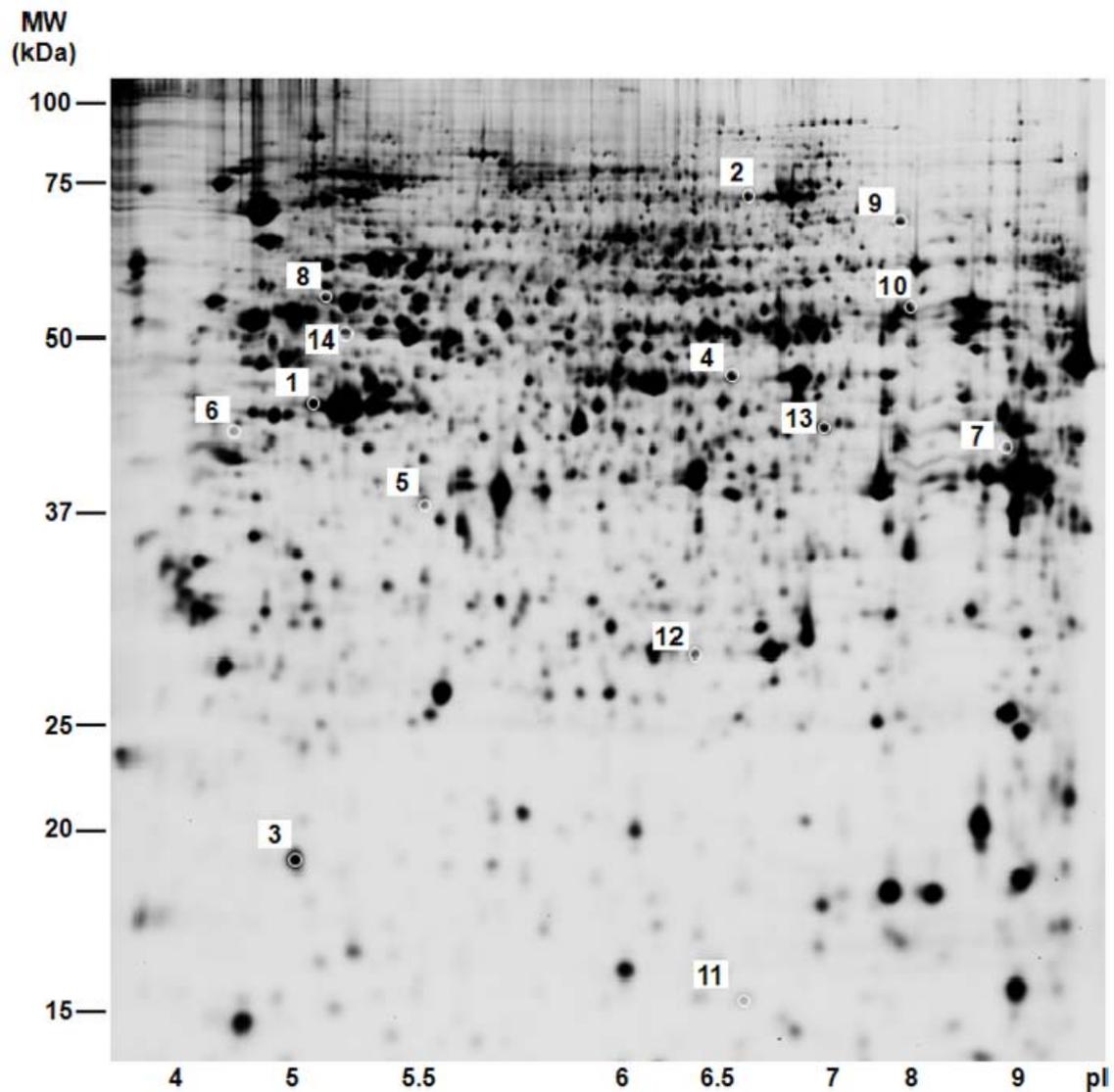


Abbildung 23. Differentielle Gelelektrophorese nach Inhibition der mikroRNA-197 in epithelialen Tumorzellen. Gesamtprotein von anti-mikroRNA-197 und anti-mikroRNA-ctrl transfizierten Colo357-, Panc89- und HeLa-Zellen wurde nach einer Transfektionszeit von 40 Stunden extrahiert und mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder Cy5 für die darauf folgende differentielle Gelelektrophorese markiert. Anschließend wurden die auf der Abbildung nummerierten Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. In der Abbildung ist repräsentativ das Gel in dem Panc89-Zelllysate aufgetrennt wurden gezeigt. Die Nummerierung der eingekreisten Proteine im Gel entspricht der in Tabelle 5 angegebenen Nummerierung.

Tabelle 5. Identifikation von mikroRNA-197 Zielsequenzen durch *in silico* Analysen. Die unterschiedlichen Genexpressionsmengen der Proteine, die mit einem * markiert sind, wurden durch differentielle Gelelektrophorese identifiziert. Die mikroRNA-Zielsequenzen wurden mit den Algorithmen *miRanda* (John *et al.*, 2004), *Target-scan* (Lewis *et al.*, 2005) und *RNA hybrid* (Rehmsmeier *et al.*, 2004) bestimmt.

Nummer der gepickten Proteine (Abbildung 23)	Protein	anti-miR-197 vs anti-miR-ctrl			Zielsequenzen für mikroRNA-197		
		Panc89	Colo357	HeLa	TargetScan 5.0	miRanda	RNAhybrid
1	ACTB	-1.55	-1.50*	-1.38*	—	Position 518-536 der ACTB 3'-UTR	Position 525-545 der ACTB 3'-UTR
2	EEF2	-1.52*	-1.38	-1.10*	—	—	—
3	EIF5A	1.45	1.54*	1.45*	—	Position 260-280 der EIF5A 3'-UTR	Position 259-282 der EIF5A 3'-UTR
4	ENO1	-1.52	-1.37	-1.39*	—	—	—
5	GNB1	1.35	1.32*	1.43*	—	Position 1278-1302 der GNB1 3'-UTR	Position 1292-1321 der GNB1 3'-UTR
6	HASNA1	1.33	1.11*	—	—	—	—
7	HNRNPC2	-1.36	-1.23*	—	—	—	—
8	HSP60	-1.55	-1.45*	-1.22*	—	—	—
9	PFKP	-1.58	-1.65	-1.26*	—	Position 198-225 der PFKP 3'-UTR	Position 197-223 der PFKP 3'-UTR
10	PKM2	-1.28	-1.38	-1.08*	—	—	—
11	RAN	1.33	1.24*	1.18*	Position 276-282 der RAN 3'-UTR	Position 790-812 der RAN 3'-UTR	Position 791-814 der RAN 3'-UTR
12	TIM	-1.27	-1.32*	-1.18*	—	—	—
13	TOMM40	-1.33	—	—	—	—	—
14	TYMP	1.32	1.31*	1.11*	—	—	—

3.2.2 MikroRNA-197 reguliert die Expression von Ran GTPase in epithelialen Tumorzellen

Zur Verifikation der *in silico* Analyse, die Ran GTPase als potenziell von mikroRNA-197 reguliert vorschlug, wurde die Genexpression der Ran GTPase auf Proteinebene nach Inhibition und Überexpression der mikroRNA-197 in den epithelialen Tumorzellen Colo357, Panc89 und HeLa gemessen. Wie in Abbildung 24 gezeigt, führt die Inhibition der mikroRNA-197 zu einer verstärkten Genexpression der Ran GTPase in Panc89- und HeLa-Zellen. Des Weiteren führte die Überexpression von mikroRNA-197 zu einer deutlichen Herunterregulation der Ran GTPase Expression in allen drei Zelllinien (64 % bei Colo357-, 38 % bei Panc89- und 12 % bei HeLa-Zellen).

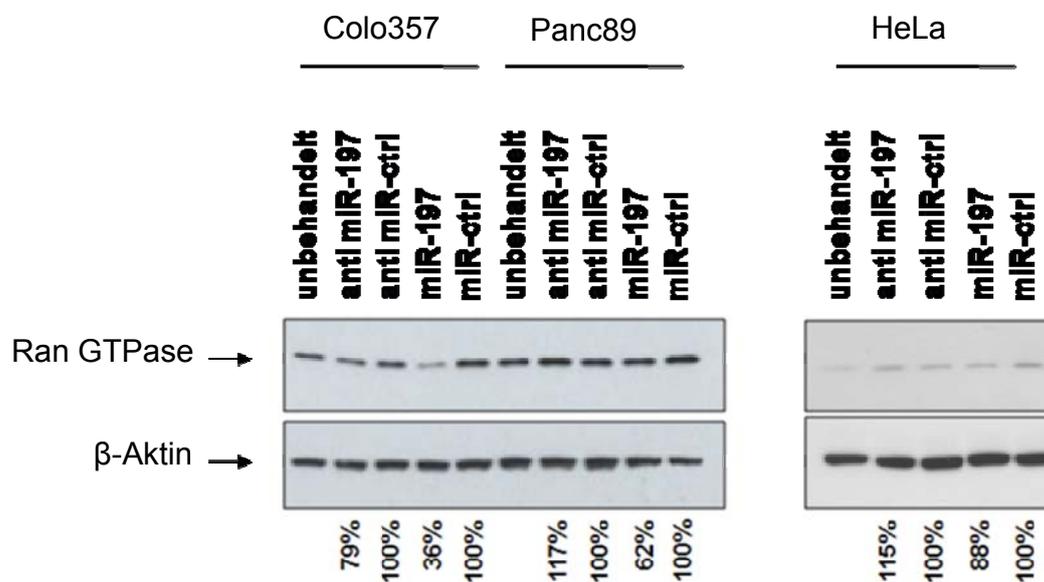
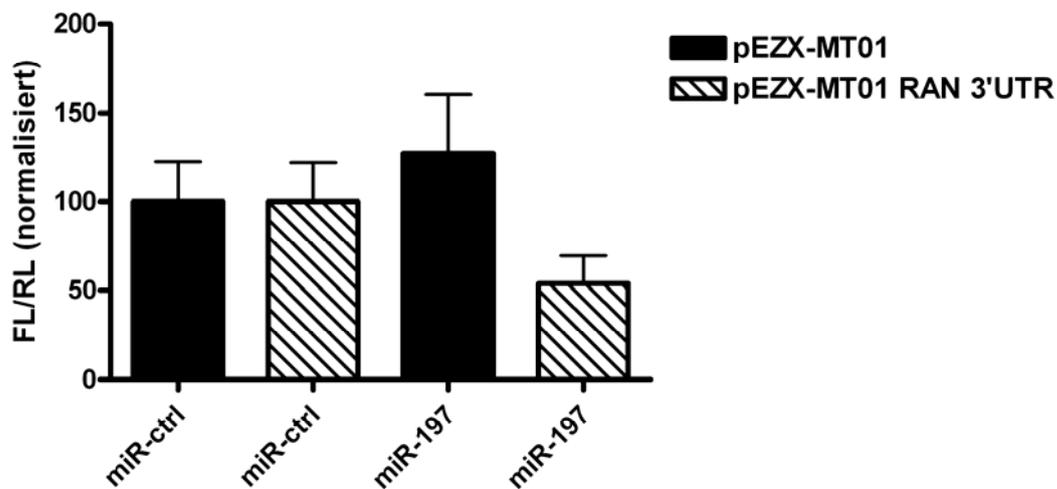


Abbildung 24. MikroRNA-197 reguliert die Ran GTPase Expression in epithelialen Tumorzellen.

Es wurden jeweils 25 μ g Gesamtzelllysat von Colo357-, Panc89- und HeLa-Zellen nach 40 Stunden Inhibition beziehungsweise Überexpression der mikroRNA-197 auf die Expression von Ran GTPase mittels Western Blot Analyse untersucht. Als primäre Antikörper wurden anti-Ran GTPase und anti- β -Aktin eingesetzt. Die relative Ran GTPase Expression wurde densitometrisch mit der Quantity One 1-D Analysis Software 4.6.3 ermittelt und auf die jeweilige Ladungskontrolle (β -Aktin) und Kontrolltransfektion normalisiert und prozentual dargestellt.

Um den zugrunde liegenden Mechanismus der mikroRNA-197 vermittelten Herunterregulation der Ran GTPase-Expression aufzuklären wurde untersucht, ob mikroRNA-197 durch die Bindung an die 3'-UTR der Ran GTPase mRNA die Translation inhibiert. Hierfür wurde ein Reporterkonstrukt, das die 3'-UTR Region der Ran GTPase mRNA am 3'-Ende der Fireflyluciferase enthielt, transient mit mikroRNA-197 in Panc89-Zellen transfiziert. Im Vergleich zum Kontrollvektor wurde nach mikroRNA-197 Transfektion die Luciferaseaktivität um 42 % reduziert (Abbildung 25 A). Vorbehandlung mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid stellte teilweise die Luciferaseaktivität wieder her (Abbildung 25 B).

A



B

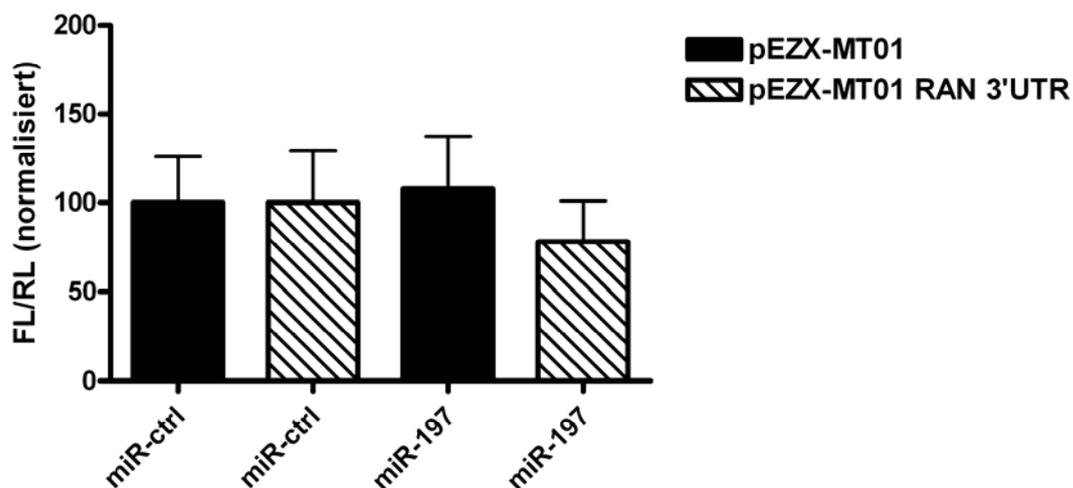


Abbildung 25. MikroRNA-197 reguliert die Expression der Ran GTPase über die Interaktion mit der 3'-UTR der Ran GTPase mRNA. 1×10^6 Panc89-Zellen wurden mittels Elektroporation mit $4 \mu\text{g}$ des Reportervektors pEZX-MT01, der die DNA-Sequenz der 3'-UTR der *Homo sapiens* Ran GTPase mRNA enthielt und dem Kontrollvektor pEZX-MT01 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend im 96-Loch-Format (8×10^3 Zellen pro Loch) mit mikroRNA-197 und mikroRNA-ctrl für 40 Stunden revers transfiziert (A). 38 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 2 Stunden mit $10 \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid behandelt (B). Die Mittelwerte eines repräsentativen Experimentes mit acht Replikaversuchen sind dargestellt. Das Experiment wurde dreimal unabhängig durchgeführt. Die gemessene Aktivität der Fireflyluciferase wurde auf die gemessene Aktivität der Renillaluciferase und auf die mikroRNA-ctrl Kontrolltransfektion normalisiert.

4. Diskussion

Es ist bekannt, dass die Expression von mikroRNA-Genen in Tumorgewebe im Vergleich zu gesunden Gewebe variiert (He *et al.*, 2005). Die Deregulation von mikroRNAs durch extrazelluläre Faktoren, wie zum Beispiel die Liganden von Todesrezeptoren wurde noch nicht ausführlich in der Literatur beschrieben. Das erste Ziel der Arbeit war es demnach die Frage zu beantworten, ob mikroRNAs an der TRAIL-vermittelten zellulären Antwort beteiligt sind.

Die innerhalb der Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass durch eine dreistündige Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 mit dem Todesliganden TRAIL eine erhöhte Menge an reifer mikroRNA-197 und eine reduziertere Menge an reifer mikroRNA-432* in den Zellen nachgewiesen werden kann. Eine derartige direkte Induktion der mikroRNA Genexpression wurde bisher noch nicht beschrieben. In Makrophagen wurde gezeigt, dass die Genexpression des Todesliganden TNF α durch mikroRNA-125b reguliert wird. Die Expression des mikroRNA-125b-Genes wiederum wird durch den extrazellulären Stimulus LPS herunterreguliert (Tili *et al.*, 2007).

Das zweite Ziel der Arbeit war es, die durch den Todesliganden TRAIL in Pankreaskarzinomzellen differentiell regulierte Genexpression der mikroRNAs hinsichtlich deren Bedeutung für die Apoptoseresistenz zu untersuchen. Aufgrund der Komplexität des durch mikroRNAs regulierten Genexpressionsnetzwerkes (Lewis *et al.*, 2003) wurde der Schwerpunkt der funktionellen Charakterisierung auf die Rolle der mikroRNA-197 bei Pankreaskarzinomzellen gelegt, die bisher weitgehend unbekannt ist, um eine Voraussetzung für ein tieferes mechanistisches Verständnis der TRAIL-induzierten Apoptose zu schaffen. Die funktionelle Charakterisierung zeigte, dass TRAIL-vermittelte Signaltransduktionswege durch mikroRNA-197 moduliert werden. Über das Ziel hinaus gelang es, ein Zielgen der mikroRNA-197 zu identifizieren. Neben der mikroRNA-197 wurden auch die nach TRAIL-Behandlung differentiell exprimierte mikroRNA-432* im Hinblick auf Apoptoseresistenz untersucht. Über die unmittelbaren Forschungsziele hinaus wurde auch der Einfluss von mikroRNAs deren Vorläuferformen nach TRAIL-Behandlung als differentiell exprimiert identifiziert wurden (mikroRNA-452*, mikroRNA-302c*, mikroRNA-15a, mikroRNA-182, mikroRNA-205 und mikroRNA-140) im Hinblick auf Apoptoseresistenz untersucht.

4.1 Die Rolle von mikroRNA-197 in Pankreaskarzinomzellen

4.1.1 Das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen ist reduziert nach Inhibition von mikroRNA-197

Im Hinblick auf die pleiotropen Effekte, die charakteristisch für mikroRNAs sind (Alvarez-Garcia *et al.*, 2005; Miska *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2003), hat mikroRNA-197 das Potenzial mehrere Signalwege simultan zu beeinflussen. Allerdings ist über mikroRNA-197 bisher sehr wenig bekannt. Entsprechende Expressionsprofile zeigten, dass mikroRNA-197 in gesunden im Vergleich zu malignen Gewebe bei Leukämie, Brustkrebs, Lungenkarzinom, Nierenkarzinom, Prostatakarzinom und Gebärmutterhalskrebs stärker exprimiert wird (Lu *et al.*, 2005). Weiterhin ist beschrieben, dass die Inhibition von mikroRNA-197 Wachstumsstop in den follikulären Schilddrüsenkrebs Zelllinien FTC-133 und K5 FTC hervorruft (Weber *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit durchgeführte Experimente unterstützen dieses Ergebnis, da die Inhibition der mikroRNA-197 in den Pankreaskarzinomzelllinien Colo357 und Panc89 und auch in einer nicht Pankreaskarzinomzelllinie (HeLa) eine Reduktion der Vitalität und eine Hemmung der Proliferation verursachte. Weiterhin zeigte sich, dass die reduzierte Vitalität und Proliferation in den analysierten epithelialen Tumorzelllinien, zum Teil durch die Phosphorylierung von p38 verursacht wird.

4.1.2 Die Zytokinsezernierung von Pankreaskarzinomzellen ist verändert nach Inhibition von mikroRNA-197

Von 174 mittels Zytokinarray untersuchten Proteinen, zu denen neben unterschiedlichen Zytokinen auch 26 lösliche Rezeptoren gehören, wurde nach Inhibition der mikroRNA-197 in dem Überstand von Panc89-Zellen die Sezernierung des Zytokins IL-6 verstärkt induziert. Neben IL-6 wurde nach Inhibition der mikroRNA-197 im Vergleich zur Kontrolltransfektion bei Panc89-Zellen auch die Sezernierung der Zytokine IL-10, I-309, b-NGF (*nerve growth factor*) und HGF (*hepatocyte growth factor*) induziert und die Sezernierung des Zytokins IL-7 und das Ablösen des DR-6 (*Death receptor-6*) reduziert. Diese Daten sollen in weiterführenden Projekten in der Arbeitsgruppe der Sektion für Molekulare Onkologie wie beim Zytokin IL-6 durch einen spezifischen ELISA verifiziert werden.

Die nach Inhibition der mikroRNA-197 induzierten Wachstumsfaktoren HGF und NGF können anti-apoptotische Funktionen ausüben (Morita *et al.*, 1995; Kosai *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1995). I-309 ist ein auf Monozyten nicht aber auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkendes Zytokin (Miller *et al.*, 1992). DR-6 gehört zu TNF-Rezeptor Familie und wird nach

Inhibition der mikroRNA-197 weniger freigesetzt. Auch wenn der durch DR-6 induzierte Signaltransduktionsweg noch nicht gut charakterisiert ist (Bhardwaj *et al.*, 2003) wurde gezeigt, dass sowohl Apoptose in Tumorzellen induziert werden kann (Gary *et al.*, 2001), als auch anti-apoptotische Mechanismen durch die Rekrutierung von RIP und TRADD und die Aktivierung von NF κ B induziert werden können (Bhardwaj *et al.*, 2003; Karin *et al.*, 2002). Das herunterregulierte IL-7 kann die Tumorzellproliferation reduzieren (Sharma *et al.*, 1999). Eine Heraufregulation des IL-10 hätte eine anti-inflammatorische Wirkung zur Folge (Grütz *et al.*, 2005). Wohingegen IL-6 sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Auswirkungen haben kann (Rose-John *et al.*, 2009). Die innerhalb der Arbeit gemessene Induktion von unphosphoryliertem und phosphoryliertem (Ser73) c-jun und die Aktivierung des Transkriptionsfaktor AP-1, der sich unter anderem aus den Mitgliedern c-Jun, Jun B, c-Fos zusammensetzt (Karin *et al.*, 1997) könnte für die IL-6 Induktion nach Inhibition der mikroRNA-197 verantwortlich sein, da zwei AP-1 Bindesequenzen im humanen IL-6 Promotor gefunden wurden (Tanabe *et al.*, 1988; Ray *et al.*, 1989). Der p38 Signaltransduktionsweg und die Aktivierung von Caspasen hingegen ist in den Pankreaskarzinomzelllinien Colo357 und Panc89 in Bezug auf die Induktion von IL-6 auszuschließen, da durch Inhibition des p38 Signaltransduktionsweges und der Caspasen, die nach mikroRNA-197 Inhibition induzierte IL-6 Sezernierung nicht aufgehoben wurde. Im Gegensatz dazu wurde bei der Zelllinie HeLa die IL-6 Sezernierung nach mikroRNA-197 Inhibition sowohl durch Inhibition des p38 Signaltransduktionsweges, als auch durch Inhibition von Caspasen reduziert. Dieses nach Inhibition der mikroRNA-197 sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirkende Zytokinset würde *in vivo* auf den tumorumgebenden Stromaanteil treffen, der beim duktalem Pankreasadenokarzinom aus Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten besteht (Ryu *et al.*, 2001; Seymour *et al.*, 1994). Die komplexen Pankreastumor-Stroma-Interaktionen beeinflussen das Wachstum (Hartel *et al.*, 2004) als auch die Chemoresistenz des Tumors (Miyamoto *et al.*, 2004; Muerköster *et al.*, 2004). Diese komplexen Tumor-Stroma-Interaktionen wurden in den durchgeführten Zellkulturexperimenten nicht berücksichtigt und könnten *in vivo* auch gegenteilige Effekte hervorbringen. Auch die Tumor-Zell-Interaktionen unterscheiden sich möglicherweise von dem untersuchten Monolayer in der Zellkultur. Ein mögliches Tumor-Zell-Interaktions-Szenario ist im Folgenden dargestellt:

Es wurde beschrieben, dass die Genexpression von mikroRNA-21 durch den IL-6 induzierten STAT3-Signaltransduktionsweg, reguliert wird, da vor dem mikroRNA-21 Gen ein funktioneller STAT3 regulierter Promotor identifiziert wurde (Loffler *et al.*, 2007). MikroRNA-21 ist ein in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiertes Onkogen. *In vitro* Experimente zeigten, dass die Überexpression von mikroRNA-21 die Zellproliferation von

Leberkrebszellen induzierte und die Inhibition der mikroRNA-21 Aktivität die Zellproliferation inhibierte (Meng *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Inhibition der mikroRNA-21-Aktivität die Apoptose in Glioblastomzellen (Corsten *et al.*, 2007) induzierte und signifikant die Invasion von Brustkrebszellen (Zhu *et al.*, 2008) und Prostatakrebszellen (Meng *et al.*, 2007) induzierte. Durch *in vivo* Experimente wurde gezeigt, dass anti mikroRNA-21-Behandlung in einem Xenograft-Modellsystem zu einem reduzierten Wachstum der durch die Brustkrebszelllinien MCF-7 induzierten Tumoren führt (Si *et al.*, 2007) und zu reduzierter Metastasierung von MDA-MB-231-Zellen in der Lunge (Zhu *et al.*, 2008). Es wurde weiterhin berichtet, dass die Inhibition der mikroRNA-21 in Kombination mit dem Todesliganden TRAIL in einem synergistischen Anstieg der Caspase-Aktivität und zu einer deutlichen Reduktion des Tumorwachstums führte (Corsten *et al.*, 2007). Demzufolge wäre es sinnvoll die potenzielle Induktion der mikroRNA-21 durch die IL-6 Sezernierung nach Inhibition der mikroRNA-197 in weiterführenden Experimenten zu untersuchen, um ein besseres Verständnis für die Auswirkungen, die nach Inhibition der mikroRNA-197 in einem *in vivo* Modell zu erwarten wären, zu erlangen.

Weiterhin interessant in tumorbiologischer Sicht ist, dass die verstärkte Expression der mikroRNA-21 zu einer geringeren Sensitivität von Gallengangkrebs zu Gemcitabin induzierter Apoptose führte (Meng *et al.*, 2006), wohingegen die Inhibition der mikroRNA-21-Aktivität die Sensitivität von MCF-Zellen auf das Chemotherapeutika Topotecan erhöhte (Blower *et al.*, 2008).

4.1.3 MikroRNA-197 beeinflusst die TRAIL-induzierte Apoptose bei Pankreaskarzinomzellen

Um ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von TRAIL zu erlangen wurden mikroRNAs, die an der TRAIL-vermittelten zellulären Antwort beteiligt sind, identifiziert und funktionell charakterisiert.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass einige mikroRNAs die TRAIL-induzierte Apoptose beeinflussen können. MikroRNA-29b inhibiert das anti-apoptotische Protein Mcl-1 und verstärkt die TRAIL-induzierte Apoptose in Cholangiozyten (Mott *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde für die mikroRNAs miR-10a, miR-28b, miR-196a, miR-337, miR-96, miR-145, miR-150, miR-155 und miR-188 beschrieben, dass sie die TRAIL-induzierte Caspase3 Aktivierung in Brustkrebszellen beeinflussen (Ovcharenko *et al.*, 2007). Weiterhin wurde beschrieben, dass die Inhibition der mikroRNA-221 und der mikroRNA-222 die TRAIL-induzierte Apoptose in der Lungenkarzinomzelllinie Calu-1 verstärkt (Garofalo *et al.*, 2008).

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss von mikroRNA-197, mikroRNA-432* und mikroRNA-452* auf die TRAIL-induzierte Apoptose in den Pankreaskarzinomzelllinien Colo357 und Panc89 gezeigt werden.

Die Hemmung der mikroRNA-197 verstärkte die TRAIL-induzierte Apoptose und modulierte Apoptose-Signaltransduktionswege in unbehandelten und auch in TRAIL-behandelten Colo357- und Panc89-Zellen. Auf der molekularen Ebene wurde die Modulation von pro-apoptotischen und von anti-apoptotischen Signaltransduktionswegen beobachtet. So führt die Ausschaltung von mikroRNA-197 zur verstärkten PARP-Spaltung sowie zur Steigerung der Phosphorylierung von p38 und gleichzeitig zur Hemmung von TRAIL-induzierten NF κ B-Aktivierung und der Phosphorylierung von SAPK/JNK. Bei der TRAIL-induzierten Apoptose wird die Rolle der JNK Aktivierung kontrovers diskutiert. Frühere Studien haben gezeigt, dass die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung in HeLa-Zellen nicht mit dem Zelltod verbunden ist (Muhlenbeck *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die TRAIL-induzierte Apoptose in humanen Oligodendrozyten die Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges benötigt (Jurewicz *et al.*, 2006). In der Darmkrebszelllinie DLD1 wurde nach TRAIL-Behandlung eine p38-Aktivierung gemessen. Durch das Ausschalten der p38 Aktivierung wurde die TRAIL-induzierte Apoptose in DLD1-Zellen nicht blockiert (Zhang *et al.*, 2004). Übereinstimmend wurde die p38-Aktivierung nach TRAIL-Behandlung auch bei Panc89-Zellen gemessen. Weitere pro-apoptotische Effekte, die nach Inhibition der mikroRNA-197 gemessen wurden, waren die Spaltung der Effektor-Caspase3 in unbehandelten Pankreaskarzinomzellen und nach TRAIL-induzierter Apoptose die Spaltung der Initiator Caspase9 und der Effektor-Caspase7.

Während der TRAIL-induzierten Apoptose führte die Inhibition der mikroRNA-197 zu einer reduzierten Menge von PKC δ -Protein und zur reduzierten Phosphorylierung des PKC δ -Proteins am Threonin 505 (Thr505). PKC δ reguliert die Genexpression von pro-apoptotischen Proteinen und die Phosphorylierung am Thr505 des PKC δ Proteins führt zu einer verstärkten PKC δ Kinaseaktivität (Brodie *et al.*, 2003; Welman *et al.*, 2007). PKC δ und PARP werden durch die aktive Caspase3 gespalten (Brodie *et al.*, 2003; Nicholson *et al.*, 1995). Innerhalb der Arbeit entstandene Daten zeigen, dass neben der Induktion von pro-apoptotischen und pro-inflammatorischen Effekten auch eine Induktion eines anti-apoptotisch wirkenden Proteins gemessen wurde. Das Ausschalten der mikroRNA-197 resultierte in einer Heraufregulation von Flip_L. Flip_L wirkt anti-apoptotisch, indem es die Caspase8-Aktivierung am DISC kompetitiv durch die Bindung von FADD blockiert, aber es wurden auch umgekehrt

durch die Aktivierung der Caspase8 von Flip_L pro-apoptotische Wirkungen beschrieben (Rasper *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 2000).

Da Flip von der mikroRNA Datenbank (www.microrna.org) als potenziell von mikroRNA-197 reguliert geführt wird und die Genexpression von Flip nach mikroRNA-197 Überexpression herunterreguliert wird, kommt Flip als potenzielles Zielgen der mikroRNA-197 in Frage. Von Flip wurden bereits 13 verschiedene Spleißvarianten beschrieben, von denen allerdings erst drei auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten (cFLIP_L, cFLIP_S und cFLIP_R). Ein Sequenzvergleich der potenziellen Ziel-mRNA-Bindesequenzen ergab drei mögliche Regionen, die bei den bisher auf Proteinebene detektierbaren Flip-Varianten in Intron Regionen liegen. Lediglich bei einer Spleißvariante mit fünf Exons, die bisher noch nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, wies die mRNA-Sequenz eine potenzielle mikroRNA-197-Bindesequenz auf. Da mikroRNAs nach dem bisherigen Kenntnistand im Zytoplasma die Translation inhibieren und Introns normalerweise im Kern von der Spleißmaschinerie entfernt werden, kann nicht davon ausgegangen werden, dass Flip direkt von mikroRNA-197 reguliert wird. Dennoch wurde eine Korrelation zwischen der mikroRNA-197 Menge und der Expression des FLIP Gens beobachtet.

Da angenommen wird, dass mikroRNAs durchschnittlich 200 Ziel messengerRNAs haben (Lim *et al.*, 2005) und diese in ihrer Funktion als Regulatoren der Genexpression nicht zwingend degradieren, sondern auch deren Translation inhibieren, wurden weitere Analysen auf Proteinebene durchgeführt (Abschnitt 4.1.4).

4.1.4 MikroRNA-197 reguliert die Ran GTPase Genexpression

Um die Biologie von Tumoren besser zu verstehen, muss von den tumorrelevanten mikroRNAs jede einzelne mikroRNA-induzierte Inhibition der Genexpression aufgeklärt werden. Jedoch ist die Aufklärung der Interaktion einzelner mikroRNAs mit spezifischen mRNAs und deren Regulation mit den zur Verfügung stehenden Techniken eine große Herausforderung. Für die Entdeckung von mikroRNA-Zielsequenzen wird häufig eine Strategie gewählt, bei der in einem ersten Schritt durch bioinformatische Analysen potenzielle Zielsequenzen ermittelt werden, die dann experimentell verifiziert werden (Kuhn *et al.*, 2008). Durch diese Strategie wurden von tumorrelevanten mikroRNAs einige wenige mRNA Zielsequenzen identifiziert. Jedoch reflektiert die Regulation weniger mRNA-Zielsequenzen den Einfluss einer tumorrelevanten mikroRNA nicht wieder. Die funktionelle Charakterisierung von mikroRNAs erfordert wie weiter oben erwähnt die Identifikation von

mikroRNA-Zielsequenzen mittels bioinformatischen Vorhersageprogrammen. In Pflanzen weisen viele mikroRNAs eine perfekte Komplementarität zu den mRNAs der Zielgene auf. Hier haben sich bioinformatische Vorhersageprogramme als äußerst zuverlässig erwiesen (Rhoades *et al.*, 2002). Interessanterweise zeigte sich, dass viele mikroRNA-Zielsequenzen auf mRNA Transkripten die für Transkriptionsfaktoren kodieren positioniert sind und demzufolge unterschiedliche Entwicklungsprozesse in Pflanzen regulieren (Rhoades *et al.*, 2002). Die bioinformatische Vorhersage von mikroRNA Zielsequenzen in Tieren ist weitaus schwieriger, da die mikroRNAs nur eine partielle Komplementarität zu den mRNAs der Zielgene benötigen, um diese in ihrer Translation zu inhibieren (Lewis *et al.*, 2003). Infolgedessen sind bioinformatische Vorhersageprogramme auf Regeln aufgebaut, die aus einigen wenigen bekannten mikroRNA-Ziel-mRNA Interaktionen entstanden sind. Der in dieser Arbeit verwendete Algorithmus *Target-scan* wurde entwickelt, um mikroRNA-Zielsequenzen von Vertebraten zu identifizieren. Der Algorithmus berücksichtigt insbesondere die Sequenz der 5'-Region der mikroRNA Sequenzen, die bei den bekannten mikroRNA-Ziel-mRNA Interaktionen für eine Regulation entscheidend ist. In der ersten Studie in der der Algorithmus *Target-scan* vorgestellt wurde, wurden 11 von 15 vorhergesagten mikroRNA-Ziel-mRNA Interaktionen experimentell mit Reporterkonstrukten verifiziert (Lewis *et al.*, 2003). Die nach Inhibition der mikroRNA-197 deregulierten Proteine wurden mit der aktuellen Version des *Target-scan* Algorithmus (Lewis *et al.*, 2005) und auch mit zwei weiteren mikroRNA-Zielsequenz-Vorhersageprogrammen *miRanda* (John *et al.*, 2004) und *RNA hybrid* (Rehmsmeier *et al.*, 2004) im Hinblick auf potenzielle Zielsequenzen analysiert. Die Anwendung von verschiedenen Algorithmen reduziert signifikant falschpositive Ergebnisse (Rehmsmeier *et al.*, 2004). Da zu erwarten ist, dass nach Inhibition der mikroRNA-197 mikroRNA-Ziel-mRNA-Sequenzen verstärkt translatiert werden, kommen die Proteine als potenzielle, direkt von der mikroRNA-197 regulierte Kandidaten in Frage, deren Menge heraufreguliert wurde. Fünf Proteine wurden nach Hemmung von mikroRNA-197 heraufreguliert, von denen EIF5A, GNB1 und Ran GTPase in der 3'-UTR der zugehörigen mRNA potenzielle Bindesequenzen aufweisen. Die 3'-UTR der mRNA der Ran GTPase wurde von allen drei Algorithmen als potenzielle mikroRNA-197-Zielsequenz vorhergesagt. Experimentell wurde entsprechend gezeigt, dass die Überexpression der mikroRNA-197 zu einer deutlichen Herunterregulation der Ran GTPase Proteinmenge führt. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine direkte Interaktion zwischen der mikroRNA-197 und der mRNA der Ran GTPase möglich sein könnte. Dafür spricht außerdem, dass die Luciferaseaktivität eines Reporterkonstruktes, das die 3'-UTR Region der Ran GTPase mRNA enthielt, im Vergleich zum Kontrollkonstrukt nach mikroRNA-197 Transfektion in Panc89-Zellen deutlich

reduziert wurde. Dieser Effekt wurde wiederum durch den Einsatz eines Translationshemmers (Cycloheximid) wieder aufgehoben.

Die Ran GTPase gehört zur Familie der kleinen GTPasen zu der außerdem Ras, Rho, Rab und Sar1/Arf gehört. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Genexpression der Ran GTPase in verschiedenen Tumoren erhöht ist im Vergleich zu gesunden Zellen (Xia *et al.*, 2008). Ran GTPase beeinflusst unterschiedliche Prozesse im Kern von eukaryotischen Zellen. In der Interphase wird die Kerntransportmaschinerie (Kahana *et al.*, 1999) und in der Mitosephase die mitotische Spindelformierung (Quimby *et al.*, 2003) durch Ran GTPase reguliert. Interessanterweise wird auch der Export von pre-mikroRNAs von Ran GTPase durch die Interaktion mit Exportin5 vermittelt (Bohnsack *et al.*, 2004). Da mikroRNA-197 die Genexpression der Ran GTPase herunterreguliert, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass eine erhöhte mikroRNA-197 Menge über diesen Mechanismus eine Reduktion der reifen mikroRNAs im Zytoplasma und eine Akkumulation der pre-mikroRNAs im Kern zur Folge hätte. Diese Hypothese ließe sich durch die Anwendung einer umfassenden mikroRNA-Array Analyse oder einer entsprechenden quantitativen RT-PCR nach Überexpression der mikroRNA-197 prüfen.

Über mikroRNA-197 wurde in der Literatur bislang sehr wenig beschrieben. Als Folge der mikroRNA-197 Überexpression wurde beschrieben, dass die Proteinmenge des Aktivin A Rezeptors und Tetraspanin 3 in follikulären Schilddrüsenkrebs herunterreguliert wird (Weber *et al.*, 2006). Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass mikroRNA-197 die Proteinmenge von Ran GTPase, durch die direkte Interaktion mit der 3'-UTR der Ran GTPase mRNA, herunterreguliert. Zeitgleich wurde gezeigt, dass die Expression des Fus1 Genes durch mikroRNA-197 in Lungenkarzinomzellen inhibiert wird (Du *et al.*, 2009). Fus1 wurde als Tumorsuppressor beschrieben, der das Wachstum von Tumoren inhibiert. Der Tumorsuppressor induziert Apoptose durch die Aktivierung intrinsischer mitochondrialer Apoptose-Signalwege. Des Weiteren inhibiert Fus1 die Funktion von mehreren tumorrelevanten Tyrosinkinasen (EGFR, PDGFR, c-Abl und c-kit (Ji *et al.*, 2008).

Die eigenen Daten legen den Schluß nahe, dass mikroRNA-197 eine Rolle als Tumorsuppressor durch die Regulation der Expression des Ran GTPase Gens bei Pankreaskarzinomzellen spielt. Allerdings kann auf der Grundlage der in der Literatur beschriebenen Daten mikroRNA-197 auch eine Rolle als Onkogen durch die Regulation der Expression des Fus1 Gens bei Lungenkarzinomzellen einnehmen. Bis heute wurden nur diese beiden mikroRNA-197 Ziel-Gene experimentell identifiziert. Weitere Untersuchungen werden benötigt, um letztlich zu verstehen wie mikroRNA-197 in Tumoren wirkt. Wobei organspezifische Unterschiede zu berücksichtigen sind.

4.1.5 Therapeutisches Potenzial der mikroRNA-197

Ein therapeutischer Einsatz bietet sich an, da mikroRNAs äußerst stabil sind. Es wurden bereits mikroRNAs in der Maus gezielt ein- und ausgeschaltet (Krutzelfeld *et al.*, 2005; Tsuda *et al.*, 2005).

Die innerhalb der Arbeit entstandenen Ergebnisse zeigen, dass mikroRNA-197 eine Tumorsuppressor ähnliche Funktion haben könnte und demzufolge für einen initialen Schritt einer anti-Krebs Therapie Strategie, die auf das Herunterregulieren des Onkogens Ran GTPase abzielt, eingesetzt werden könnte. Als Voraussetzung für diese Form einer anti-Krebs Therapie Strategie müsste die in Abschnitt 4.1.4 aufgestellte Hypothese, dass die mikroRNA-197-Überexpression eine Reduktion der reifen mikroRNAs im Zytoplasma zur Folge hat experimentell widerlegt werden, da dies eher für eine Onkogene- als eine Tumorsuppressor-Funktion der mikroRNA-197 spräche.

Das therapeutische Potential des Wiederherstellens der mikroRNA Menge, wurde kürzlich in einem murinen-Leber-Krebs-Modellsystem gezeigt (Kota *et al.*, 2009). Die Autoren zeigten, dass die Behandlung von Krebszellen mit mikroRNAs, deren Gene hoch exprimiert in gesunden Zellen und niedrig exprimiert in Tumoren waren, keine Nebenwirkungen hatten und die Krebszellproliferation reduzierten und auch Apoptose induzierten. MikroRNA-197 würde sich auch für ein solches Modell eignen, da das Gen der mikroRNA-197 in gesunden Geweben im Vergleich zu einer Vielzahl von Tumoren erhöht exprimiert wird (Lu *et al.*, 2005). Demzufolge wäre mikroRNA-197 ein vielversprechender Kandidat, der in einer neuen anti-Krebs-Therapie eingesetzt werden kann, die darauf abzielt, die mikroRNA-197 Menge wiederherzustellen und dadurch das Onkogen Ran GTPase herunterzuregulieren.

Bei einer kombinatorischen Behandlungsstrategie mit dem Todesliganden TRAIL wäre die Hemmung von mikroRNA-197 sinnvoll. TRAIL induziert nicht nur Apoptose, sondern auch pro-inflammatorische Signaltransduktionswege in PDACs und verursacht die Invasion und Metastasierung der Zellen (Trauzold *et al.*, 2001; Trauzold *et al.*, 2006; Siegmund *et al.*, 2007). Die Inhibition der mikroRNA-197 in Kombination mit TRAIL-Behandlung induzierte in den PDACs nicht nur pro-apoptotische Signaltransduktionswege, sondern hemmte deutlich die TRAIL-induzierte Induktion von NF- κ B. Bei einer derartigen Strategie müsste zuvor experimentell die Inhibition der mikroRNA-197 bei gesunden Zellen untersucht werden, um mögliche Nebenwirkungen auszuschließen. Darüber hinaus ist auch der therapeutische Einsatz eines mikroRNA-Mixes denkbar. Hierfür könnten die Überexpression der pro-apoptotisch wirkenden mikroRNA-432* (Abschnitt 4.2) und die Inhibition der mikroRNA-197 einen Beitrag leisten, um

apoptoseresistente- in apoptosesensitive-Zellen umzuwandeln, die dann mit dem Todesliganden TRAIL effektiver abgetötet werden können.

4.2 Die Inhibition der mikroRNA-452* und die Überexpression der mikroRNA-432* verursachen eine signifikant verstärkte TRAIL-induzierte Apoptose in Panc89-Zellen

Die Rollen von mikroRNA-452* und mikroRNA-432* sind in der Zelle bisher völlig unbekannt. Es wurden noch keine Zielgene, deren Expression durch diese beiden mikroRNAs reguliert werden, in der Literatur beschrieben.

Innerhalb dieser Arbeit entstandene Daten zeigen, dass die Überexpression der mikroRNA-452* die Vitalität der Pankreaskarzinomzelllinien Colo357 und Panc89 reduziert. In Panc89-Zellen ist dieser Effekt im Vergleich zu Colo357-Zellen deutlich ausgeprägter. Interessanterweise unterscheiden sich auch die endogenen mikroRNA-452* Expressionsmengen. In Colo357-Zellen wird mehr endogene mikroRNA-452* exprimiert als in Panc89-Zellen. Dementsprechend zeigte die Überexpression der mikroRNA-452* in Colo357-Zellen geringere Effekte als in Panc89-Zellen. Die durch Überexpression der mikroRNA-452* verursachte Reduktion der Vitalität und der ³H Thymidin-Einbaurrate kann sowohl durch Zelltod oder Proliferationshemmung verursacht werden. Da die Überexpression der mikroRNA-452* keinen signifikanten Einfluss auf die sub-G1 Phase des Zellzyklus in Panc89-Zellen ausübt, wird durch mikroRNA-452* eine Hemmung der Proliferation und kein Zelltod induziert.

Interessanterweise wurde durch die Inhibition der mikroRNA-452* die TRAIL-induzierte Apoptose signifikant in Panc89-Zellen verstärkt. Aufgrund dieses Phänotyps können die molekularen Mechanismen, die durch mikroRNA-452* in den Pankreasadenokarzinom-Zellen ausgelöst werden, dazu beitragen die Apoptoseresistenz der Zellen zu erforschen. MikroRNA-432* wird nach TRAIL-induzierter Apoptose in Colo357-Zellen herunterreguliert. Die Überexpression der mikroRNA-432* verstärkte die TRAIL-induzierte Apoptose. Auf molekularer Ebene zeichnete sich dieser pro-apoptotische Effekt, durch eine verstärkte PARP-Spaltung nach TRAIL-induzierter Apoptose aus, die in unbehandelten Zellen durch die Überexpression der mikroRNA-432* noch nicht zu erkennen war. Demzufolge sind die potenziellen mikroRNA-432* regulierten Zielgene spezifisch in der TRAIL-induzierten Signaltransduktion zu erwarten. Die mikroRNA-Datenbank (www.mirbase.org) führt zur Zeit 800 mikroRNA-Zielgene auf, deren mRNAs potenzielle mikroRNA-mRNA Bindsesequenzen

haben. Eine Analyse der Expression dieser Gene könnte tiefere Einblicke in die Apoptoseresistenz der Pankreasadenokarzinom-Zellen gewähren. Wenn das komplette mikroRNA-432*-mRNA-Netzwerk bekannt sein würde, wäre es zu erwarten, dass durch die mikroRNA-432* regulierten Zielsequenzen auch völlig neue Apoptoseresistenzmechanismen aufgedeckt werden. Diese mikroRNA-432* spezifischen Zielsequenzen könnten im Einzelnen im Hinblick auf Apoptoseresistenzrelevanz analysiert werden, um die pleiotropischen Effekte, die in der Natur der mikroRNAs liegen zu minimieren. Experimentell könnte dies durch den Einsatz von siRNAs erfolgen, die eine geringere Pleiotropie aufweisen, da sie eine 100%ige Komplementarität zu ihren mRNA-Bindesequenzen benötigen. Neue Projekte sollen aufbauend auf diesen Ergebnissen in der Arbeitsgruppe der Sektion für Molekulare Onkologie durchgeführt werden. Da sich die Anzahl der im Menschen identifizierten mikroRNAs in dem Zeitraum, in dem die Daten der Doktorarbeit erstellt wurden, von 2006 (328 identifizierte humane mikroRNAs) bis 2009 (706 identifizierte humane mikroRNAs) mehr als verdoppelt hat und mikroRNA-Expressionsanalysen heutzutage sehr viel preiswerter durchgeführt werden können, sollen mikroRNA-Expressionsanalysen von mehreren TRAIL-sensitiven als auch TRAIL-resistenten Pankreasadenokarzinom-Zellen in weiteren Projekten durchgeführt werden. Diese Daten werden das Verständnis über die bei Pankreasadenokarzinom-Zellen vorliegenden TRAIL-Resistenz-Mechanismen vertiefen, die entsprechend der in dieser Promotion erzielten Ergebnisse nicht nur auf Rezeptor-vermittelten Unterschieden, sondern auch auf ein unterschiedliches mikroRNA-Repertoire der unterschiedlichen Zelllinien zurückzuführen sind.

5. Zusammenfassung

MikroRNAs sind kleine nicht kodierende RNAs die regulierend auf post-transkriptionaler Ebene in die Genexpression eingreifen. TRAIL gehört zur TNF-Superfamilie und induziert Apoptose hauptsächlich in Tumorzellen. PDACs weisen oftmals eine TRAIL-induzierte Apoptoseresistenz auf. Um die mögliche Deregulation der mikroRNA-Genexpression nach TRAIL-Rezeptor Aktivierung zu untersuchen, wurden Colo357-Zellen mit TRAIL behandelt und die Genexpression der mikroRNAs mittels mikroRNA-Array Analyse und qRT-PCR analysiert. Die TRAIL-Behandlung induzierte die Genexpression der reifen mikroRNA-197 und reduzierte die Genexpression der reifen mikroRNA-432* in TRAIL-sensitiven Colo357-Zellen. Des Weiteren wirkte sich das experimentelle Aus- und Anschalten von mehreren mikroRNAs (miR-197, miR-432* und miR-452*) nach TRAIL-induzierter Apoptose in TRAIL-sensitiven Colo357-Zellen und in TRAIL-resistenten Panc89-Zellen auf die Apoptoseinduktion aus. Das Ausschalten der mikroRNA-197 in Panc89-Zellen erhöhte außerdem die Sensibilität gegenüber FasL, aber nicht gegenüber TNF α . Die Inhibition der mikroRNA-197 führte zu einer PARP-Spaltung in unbehandelten Panc89-Zellen. Wohingegen die Überexpression der mikroRNA-432* in Panc89-Zellen zu einer verstärkten PARP-Spaltung nach TRAIL-induzierter Apoptose führte. Das Ausschalten der mikroRNA-197 und das gleichzeitige Anschalten der mikroRNA-432* resultierte in einer verstärkten Apoptose nach TRAIL-Behandlung. Die Ergebnisse zeigen, dass mikroRNA-197 und mikroRNA-432* vielversprechende Kandidaten sein könnten, um TRAIL-resistente PDACs in TRAIL-sensitive PDACs umzuwandeln.

Weiterhin reduzierte das Ausschalten der mikroRNA-197 Genexpression signifikant die Proliferation von Colo357- und Panc89-Zellen durch die Aktivierung des p38 Signaltransduktionsweges und führte auch zur Sezernierung von IL-6 und zu Caspase-abhängigen Zelltod. Ähnlich Effekte wurden auch bei HeLa-Zellen gemessen. Durch differentielle 2D-Gelelektrophorese und anschließende Massenspektrometrie wurde nach Ausschalten der mikroRNA-197 eine Hochregulation der Ran GTPase Genexpression gemessen. MikroRNA-mRNA-Bindesequenzvorhersageprogramme zeigen, dass mikroRNA-197 an die 3'-UTR der mRNA der Ran GTPase binden kann. Dies konnte experimentell verifiziert werden. Da das Gen der Ran GTPase in vielen unterschiedlichen Tumoren überexprimiert wird und die Inhibition in Tumorzellen aber nicht in gesunden Zellen zu Apoptose führt, zeigen diese Daten, dass mikroRNA-197 eine wichtige Rolle in der Malignität

von epithelialen Zellen, durch die Regulation der Ran GTPase-Genexpression, spielen könnte.

6. Summary

MicroRNAs (miRs) are small noncoding RNAs that regulate gene expression at the posttranscriptional level. TRAIL belongs to the TNF superfamily and induces apoptosis preferentially in cancer cells. PDACs are often resistant to TRAIL-induced apoptosis. To examine the putative deregulation of miRs through TRAIL receptor activation, Colo357 cells were treated with TRAIL and expression of miRs using a miR microarray and quantitative RT-PCR were analyzed. TRAIL-treatment increased expression of mature miR-197 and decreased expression of mature miR-432* in TRAIL-sensitive Colo357 cells. Moreover loss and gain of function experiments on TRAIL-sensitive Colo357- and TRAIL-resistant Panc89 cells revealed that modulation of several miRs (miR-197, miR-432* and miR-452*) affected TRAIL induced apoptosis. Inhibition of miR-197 also increased sensitivity to FasL- but not to TNF α -treatment in Panc89 cells. Inhibition of miR-197 led to PARP-cleavage in untreated Panc89 cells. In TRAIL-treated Panc89 cells overexpression of miR-432* led to enhanced PARP-cleavage. Simultaneous inhibition of miR-197 and overexpression of miR-432* in Panc89 cells resulted in enhanced apoptosis upon TRAIL-treatment. These results show that miR-197 and miR-432* could be promising targets to render resistant pancreatic tumour cells TRAIL sensitive.

Furthermore, inhibition of miR-197 expression significantly reduced proliferation of Colo357- and Panc89 cells via activation of p38 pathway and also led to secretion of IL-6 and to caspase-dependent cell death. Similar effects were obtained for HeLa cells. 2D-differential gel analyses with subsequent mass-spectrometry revealed that the expression of Ran GTPase was upregulated upon inhibition of miR-197. Target prediction algorithms recommended that Ran GTPase could be directly regulated by miR-197 at 3'-UTR. Importantly, it could be demonstrated that miR-197 indeed directly targets the 3'-UTR of the mRNA of Ran GTPase and reduces its protein level via posttranscriptional mechanisms. Since Ran GTPase is overexpressed in many different tumor cells and its inhibition results in apoptosis of tumor but not of healthy cells, these findings suggest that miR-197 could play an important role in the malignancy of epithelial cells by regulation of Ran GTPase expression.

7. Literaturverzeichnis

1. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281(5381):1322-1326.
2. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, u. a. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003;9(3):277-279.
3. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer*. 2002;2(6):420-430.
4. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, u. a. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest*. 1999;104(2):155-162.
5. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
6. Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonné R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(22):6593-6597.
7. Berninger RW, Teixeira MF. Alpha 1-antitrypsin: the effect of anticoagulants on the trypsin inhibitory capacity, concentration and phenotype. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. 1985;23(5):277-281.
8. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363-366.
9. Bhardwaj A, Aggarwal BB. Receptor-mediated choreography of life and death. *J. Clin. Immunol*. 2003;23(5):317-332.
10. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, u. a. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol*. 2000;2(4):241-243.
11. Bodmer J, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci*. 2002;27(1):19-26.

12. Bohnsack MT, Regener K, Schwappach B, u. a. Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *EMBO J.* 2002;21(22):6205-6215.
13. 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(2):185-191.
14. Calado A, Treichel N, Müller E, Otto A, Kutay U. Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *EMBO J.* 2002;21(22):6216-6224.
15. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, u. a. 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(24):15524-15529.
16. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, u. a. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(9):2999-3004.
17. 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(21):2733-2742.
18. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009;136(4):642-655.
19. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009;136(4):642-655.
20. Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* 2002;16(19):2491-2496.
21. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, u. a. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(39):13944-13949.
22. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, u. a. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(18):7024-7029.

23. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell.* 2004;16(6):861-865.
24. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, u. a. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* 1997;7(6):813-820.
25. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432(7014):231-235.
26. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 1997;388(6639):300-304.
27. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102(1):33-42.
28. Eis PS, Tam W, Sun L, u. a. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(10):3627-3632.
29. Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene.* 2000;245(1):213-221.
30. Fortin KR, Nicholson RH, Nicholson AW. Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. *BMC Genomics.* 2002;3(1):26.
31. Frese S, Pirnia F, Miescher D, u. a. PG490-mediated sensitization of lung cancer cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis requires activation of ERK2. *Oncogene.* 2003;22(35):5427-5435.
32. Garofalo M, Condorelli GL, Croce CM, Condorelli G. MicroRNAs as regulators of death receptors signaling. *Cell Death Differ.* 2009. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644509> [Zugegriffen Oktober 27, 2009].
33. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, u. a. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene.* 2007;26(28):4148-4157.

34. Gironella M, Seux M, Xie M, u. a. 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(41):16170-16175.
35. Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2005;280(15):14507-14513.
36. Gonzalez-Guerrico AM, Kazanietz MG. Phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via autocrine activation of the extrinsic apoptotic cascade: a key role for protein kinase C delta. *J. Biol. Chem.* 2005;280(47):38982-38991.
37. Gregory RI, Yan K, Amuthan G, u. a. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004;432(7014):235-240.
38. Griffith TS, Stokes B, Kucaba TA, u. a. TRAIL gene therapy: from preclinical development to clinical application. *Curr Gene Ther.* 2009;9(1):9-19.
39. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, u. a. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* 2001;106(1):23-34.
40. Gross A, Yin XM, Wang K, u. a. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 1999;274(2):1156-1163.
41. Grütz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* 2005;77(1):3-15.
42. Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. cFLIPL prevents TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the lysosomal pathway of apoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007;292(5):G1337-1346.
43. Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, u. a. Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J. Biol. Chem.* 2003;278(8):5505-5508.
44. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 2000;404(6775):293-296.

45. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001;293(5532):1146-1150.
46. Han J, Lee Y, Yeom K, u. a. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18(24):3016-3027.
47. Harper N, Farrow SN, Kaptein A, Cohen GM, MacFarlane M. Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J. Biol. Chem*. 2001;276(37):34743-34752.
48. Hartel M, Di Mola FF, Gardini A, u. a. Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior. *World J Surg*. 2004;28(8):818-825.
49. He L, Thomson JM, Hemann MT, u. a. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435(7043):828-833.
50. 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.
51. Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. 1996;4(4):387-396.
52. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, u. a. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834-838.
53. Inomata M, Tagawa H, Guo Y, u. a. MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood*. 2009;113(2):396-402.
54. Iorio MV, Ferracin M, Liu C, u. a. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(16):7065-7070.
55. Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev*. 2002;16(19):2497-2508.
56. Jemal A, Siegel R, Ward E, u. a. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):71-96.

-
57. Ji L, Roth JA. Tumor suppressor FUS1 signaling pathway. *J Thorac Oncol.* 2008;3(4):327-330.
58. Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, u. a. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.* 2004;7(2):113-117.
59. John B, Enright AJ, Aravin A, u. a. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2004;2(11):e363.
60. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, u. a. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120(5):635-647.
61. Jurewicz A, Matysiak M, Andrzejak S, Selmaj K. TRAIL-induced death of human adult oligodendrocytes is mediated by JNK pathway. *Glia.* 2006;53(2):158-166.
62. Kahana JA, Cleveland DW. Beyond nuclear transport. Ran-GTP as a determinant of spindle assembly. *J. Cell Biol.* 1999;146(6):1205-1210.
63. Karin M, Liu ZG, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997;9(2):240-246.
64. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:621-663.
65. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 2002;3(3):221-227.
66. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993;53(17):3976-3985.
67. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, u. a. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001;15(20):2654-2659.
68. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003;115(2):209-216.

69. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, u. a. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*. 2000;12(6):611-620.
70. Kluiver J, van den Berg A, de Jong D, u. a. Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene*. 2007;26(26):3769-3776.
71. Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;293(5538):2269-2271.
72. Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;244(3):683-690.
73. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, u. a. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438(7068):685-689.
74. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
75. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 2004;14(23):2162-2167.
76. Lee Y, Ahn C, Han J, u. a. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-419.
77. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, u. a. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004;117(1):69-81.
78. Lee Y, Kim M, Han J, u. a. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-4060.
79. Lee T, Lee JT, Park J, Kwon TK. Acquired TRAIL resistance in human breast cancer cells are caused by the sustained cFLIP(L) and XIAP protein levels and ERK activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;351(4):1024-1030.

-
80. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, u. a. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*. 2007;120(5):1046-1054.
81. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*. 2007;21(9):1025-1030.
82. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-798.
83. 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(1):15-20.
84. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94(4):491-501.
85. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, u. a. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769-773.
86. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2004;11(6):576-577.
87. Liu Q, Rand TA, Kalidas S, u. a. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science*. 2003;301(5641):1921-1925.
88. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, u. a. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004;305(5689):1437-1441.
89. Lu J, Getz G, Miska EA, u. a. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834-838.
90. Lub-de Hooge MN, de Jong S, Vermot-Desroches C, u. a. Endotoxin increases plasma soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand level mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Shock*. 2004;22(2):186-188.
91. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-98.

-
92. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94(4):481-490.
93. Ma J, Ye K, Patel DJ. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*. 2004;429(6989):318-322.
94. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol. Lett*. 2003;139(2-3):89-97.
95. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*. 2007;315(5818):1576-1579.
96. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell*. 2004;15(2):185-197.
97. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*. 1997;278(5339):860-866.
98. Miller MD, Krangel MS. The human cytokine I-309 is a monocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(7):2950-2954.
99. Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, et al. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*. 2004;28(1):38-44.
100. Morgan RT, Woods LK, Moore GE, et al. Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*. 1980;25(5):591-598.
101. Morita M, Watanabe Y, Akaike T. Protective effect of hepatocyte growth factor on interferon-gamma-induced cytotoxicity in mouse hepatocytes. *Hepatology*. 1995;21(6):1585-1593.
102. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007;26(42):6133-6140.

-
103. Mürköster S, Wegehenkel K, Arlt A, u. a. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res.* 2004;64(4):1331-1337.
104. Mühlenbeck F, Haas E, Schwenzer R, u. a. TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* 1998;273(49):33091-33098.
105. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* 2000;7(1):102-111.
106. Nakielny S, Dreyfuss G. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell.* 1999;99(7):677-690.
107. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, u. a. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 1998;17(2):384-395.
108. Ovcharenko D, Kelnar K, Johnson C, Leng N, Brown D. Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res.* 2007;67(22):10782-10788.
109. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* 1994;78(5):773-785.
110. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, u. a. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408(6808):86-89.
111. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, u. a. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell.* 2008;13(3):272-286.
112. Quimby BB, Dasso M. The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003;15(3):338-344.

113. Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, u. a. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.* 1998;5(4):271-288.
114. Ray A, Sassone-Corsi P, Sehgal PB. A multiple cytokine- and second messenger-responsive element in the enhancer of the human interleukin-6 gene: similarities with c-fos gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* 1989;9(12):5537-5547.
115. Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA.* 2004;10(10):1507-1517.
116. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, u. a. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-906.
117. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, u. a. Prediction of plant microRNA targets. *Cell.* 2002;110(4):513-520.
118. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14(10A):1902-1910.
119. Rose-John S, Mitsuyama K, Matsumoto S, Thaiss WM, Scheller J. Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. *Curr. Pharm. Des.* 2009;15(18):2095-2103.
120. Ryu B, Jones J, Hollingsworth MA, Hruban RH, Kern SE. Invasion-specific genes in malignancy: serial analysis of gene expression comparisons of primary and passaged cancers. *Cancer Res.* 2001;61(5):1833-1838.
121. Sato T, Hanada M, Bodrug S, u. a. Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(20):9238-9242.
122. SCHERER WF, SYVERTON JT, GEY GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 1953;97(5):695-710.

123. Schmidt H, Gelhaus C, Nebendahl M, u. a. 2-D DIGE analyses of enriched secretory lysosomes reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK cells. *Proteomics*. 2008;8(14):2911-2925.
124. Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, u. a. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.
125. Seymour AB, Hruban RH, Redston M, u. a. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1994;54(10):2761-2764.
126. Sharma S, Wang J, Huang M, u. a. Interleukin-7 gene transfer in non-small-cell lung cancer decreases tumor proliferation, modifies cell surface molecule expression, and enhances antitumor reactivity. *Cancer Gene Ther*. 1996;3(5):302-313.
127. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, u. a. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277(5327):818-821.
128. Siegmund D, Klose S, Zhou D, u. a. Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells. *Cell. Signal*. 2007;19(6):1172-1184.
129. Söderström TS, Poukkula M, Holmström TH, Heiskanen KM, Eriksson JE. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8. *J. Immunol*. 2002;169(6):2851-2860.
130. Song J, Liu J, Tolia NH, u. a. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol*. 2003;10(12):1026-1032.
131. Song J, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 2004;305(5689):1434-1437.
132. Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*. 1995;81(4):513-523.

133. Szafranska AE, Davison TS, John J, u. a. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2007;26(30):4442-4452.
134. Tabara H, Yigit E, Siomi H, Mello CC. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*. 2002;109(7):861-871.
135. Taganov KD, Boldin MP, Chang K, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(33):12481-12486.
136. Tan MH, Nowak NJ, Loor R, u. a. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest.* 1986;4(1):15-23.
137. Tanabe O, Akira S, Kamiya T, u. a. Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J. Immunol.* 1988;141(11):3875-3881.
138. Tili E, Michaille J, Cimino A, u. a. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.* 2007;179(8):5082-5089.
139. Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J. Biol. Chem.* 2001;276(19):16484-16490.
140. Trauzold A, Wermann H, Arlt A, u. a. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2001;20(31):4258-4269.
141. Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, u. a. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2006;25(56):7434-7439.
142. Tsuda N, Kawano K, Efferson CL, Ioannides CG. Synthetic microRNA and double-stranded RNA targeting the 3'-untranslated region of HER-2/neu mRNA inhibit HER-2 protein expression in ovarian cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2005;27(5):1299-1306.

143. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, u. a. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*. 2006;124(6):1169-1181.
144. Walczak H, Miller RE, Ariail K, u. a. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* 1999;5(2):157-163.
145. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91(9):3584-3591.
146. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, u. a. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3(6):673-682.
147. Wu H, Xu H, Miraglia LJ, Crooke ST. Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J. Biol. Chem.* 2000;275(47):36957-36965.
148. Xia F, Lee CW, Altieri DC. Tumor cell dependence on Ran-GTP-directed mitosis. *Cancer Res.* 2008;68(6):1826-1833.
149. Yan KS, Yan S, Farooq A, u. a. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. 2003;426(6965):468-474.
150. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, u. a. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):189-198.
151. Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*. 1995;267(5206):2003-2006.
152. Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, u. a. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*. 1998;279(5358):1954-1958.
153. Yeh WC, Itie A, Elia AJ, u. a. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*. 2000;12(6):633-642.
154. 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(24):3011-3016.
155. Yin XM, Wang K, Gross A, u. a. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*. 1999;400(6747):886-891.

-
156. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*. 1997;91(2):243-252.
157. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J*. 2005;24(1):138-148.
158. Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*. 2003;9(1):112-123.
159. Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(16):4776-4785.
160. Zhang L, Zhu H, Davis JJ, u. a. Lack of p38 MAP kinase activation in TRAIL-resistant cells is not related to the resistance to TRAIL-mediated cell death. *Cancer Biol. Ther*. 2004;3(3):296-301.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Holger Kalthoff für die Überlassung des Themas, die stets gute Betreuung und seine fachliche Unterstützung bedanken.

Bei Frau PD Dr. Ania Trauzold möchte ich mich ebenfalls sehr herzlich für die stets gute Betreuung, die konstruktive Kritik und die Laborerfahrungen bedanken.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Matthias Leippe aus der Abteilung Zoophysiologie des Zoologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität Kiel für die Übernahme des Koreferats und für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe MALDI-TOF-Analysen durchzuführen. Danke auch an Herrn Dr. Christoph Gelhaus.

Danke an Herrn Prof. Dr. Ottmar Janssen, Hendrik Schmidt und Melanie Nebendahl aus dem Institut für Immunologie für die Möglichkeit die 2D-Gelelektrophoresen durchzuführen.

Vielen Dank an Herrn Dr. Robert Häsler und an Dorina Oelsner aus dem Institut für klinische Molekularbiologie für die interessanten mikroRNA-Diskussionen und die durchgeführten mikroRNA-spezifischen quantitativen RT-PCRs.

Danke auch an Herrn Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi und Sandra Lächelt vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie für die Möglichkeit die Luziferasemessungen durchzuführen.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Sektion für Molekulare Onkologie im Institut für Experimentelle Tumorforschung Krebszentrum Nord-CCC insbesondere meinen Kollegen Dr. Sanjay Tiwari, Dr. Christian Röder, Dr. Monika Olempska, Christine Engler, Alexandra Kurz, Gökan Alp, Betül Temel, Linda Weber, Carola Conradt-Zenker, Angelika Duttmann Alexander Bernsmeier sowie den ehemaligen Mitarbeitern Dr. Ole Amerpohl, Vera Cloosters, Johannes Lemke, Stefanie Klose und Birgit Fricke für die gute Zusammenarbeit.

Besonders herzlich möchte ich mich schließlich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung bedanken.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Andreas Noack
Geburtsdatum	28.10.1978
Geburtsort	Hannover
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Achterkamp 62 24106 Kiel

Schulische Ausbildung

1985 - 1989	Grundschule Mandelsloh
1989 - 1991	Orientierungsstufe Neustadt am Rübenberge
1991 - 1996	Gymnasium Neustadt am Rübenberge
1996 - 2000	Internatsgymnasium Pädagogium Bad Sachsa
Abschluss	Abitur

Grundwehrdienst

2000 - 2001	Munster
-------------	---------

Studium

2001 - 2006	Biologiestudium (Genetik, Mikrobiologie, Pflanzenbiologie) an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
2005 - 2006	Diplomarbeit am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig in der Abteilung Genregulation und Differenzierung.
seit September 2006	Doktorarbeit Sektion für Molekulare Onkologie im Institut für Experimentelle Tumorforschung Krebszentrum Nord-CCC (Prof. Dr. Holger Kalthoff)

Posterbeiträge

Boldicke T, Lindenmaier W, Schade J, **Noack A**, et al. Novel anti-TLR2 intrabody inhibits TLR2 signalling highly efficiently correlating with severely impaired TLR2 surface expression. 29. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Braunschweig 2006 (EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY Volume: 85 Pages: 118-118 Published: 2006).

Andreas Noack, Robert Häsler, Ole Ammerpohl, Monika Olempska, Holger Kalthoff, Anna Trauzold. Identification of apoptosis-related microRNA-expression. 27th Blankenese Conference: Routes to therapy: From stem cell tailoring to nano knitting in Hamburg 2007.

Andreas Noack, Robert Häsler, Ole Ammerpohl, Monika Olempska, Holger Kalthoff, Anna Trauzold. TRAIL-induced regulation of microRNA-expression. The Inflammatory Barrier Disease Meeting in Kiel 2007.

JH. Egberts, **A. Noack**, B. Schniewind, J. Lemke, H. Kalthoff, A. Trauzold. Entzündung und Krebs: Anti-TNF α -Therapie zur Behandlung des Pankreaskarzinoms Tag der Gesundheitsforschung am UK S-H in Kiel 2008.

Egberts JH, Schniewind B, Schafmayer C, **Noack A**, Tepel J, Faendrich F, Kalthoff H, Trauzold A. Blockade of TNF alpha reduces pancreatic tumor growth and metastasis in a xenotransplantation model. (GASTROENTEROLOGY Volume: 134 Issue: 4 Pages: A455-A455 Published: 2008).

Andreas Noack, Robert Häsler, Ole Ammerpohl, Monika Olempska, Holger Kalthoff, Anna Trauzold. Identification of apoptosis-related microRNA-expression. 6th. European workshop on cell death in Hauenstein 2008.

Johannes Lemke, Torben Redmer, **Andreas Noack**, Claudia Kürbitz, Daniel Heise, Holger Kalthoff, Anna Trauzold. Impact of Catechingallate on Death-Receptor-Mediated Apoptosis. 6th European workshop on cell death in Hauenstein 2008.

Andreas Noack, Robert Häsler, Hendrik Schmidt, Ottmar Janssen, Holger Kalthoff, Anna Trauzold. Inhibition of microRNA-197 modulates proliferation and apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells (PDAC). 15. Internationaler AEK-Kongress in Berlin 2009.

J. Lemke, **A. Noack**, H.Wajant, H. Kalthoff, A. Trauzold. Different Functions of TRAIL-R1 (DR4) and TRAIL-R2 (DR5) in Pancreatic Tumor Cells. 15. Internationaler AEK-Kongress in Berlin 2009.

Andreas Noack, Robert Häsler, Hendrik Schmidt, Ottmar Janssen, Holger Kalthoff, Anna Trauzold. MicroRNA-197 regulates cell proliferation and apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells (PDAC). 32. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Konstanz 2009 (EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY Volume: 88 Pages: 7-7 Published: 2009).

J. Lemke, **A. Noack**, H.Wajant, H. Kalthoff, A. Trauzold. Different Functions of TRAIL-R1 (DR4) and TRAIL-R2 (DR5) in Pancreatic Tumor Cells. Fourth International Symposium of the SFB 415 "*Signal Transduction Research - Basic Principles and Clinical Perspectives*" in Hamburg 2009.

JH. Egberts, V. Cloosters, **A. Noack**, B. Schniewind, H. Wajant, H. Kalthoff, A. Trauzold. Anti-TNF therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. Fourth International Symposium of the SFB 415 "*Signal Transduction Research - Basic Principles and Clinical Perspectives*" in Hamburg 2009.

Vorträge

Andreas Noack. TRAIL-vermittelte mikroRNA Expression in PDAC-Zellen. SFB 415, Borstel, 2007.

Publikationen

Egberts JH, Cloosters V, **Noack A**, Schniewind B, Thon L, Klose S, Kettler B, von Forstner C, Kneitz C, Tepel J, Adam D, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2008 Mar 1;68(5):1443-50.

Noack A, Häsler R, Lächelt S, Schmidt H, Gelhaus C, Cascorbi I, Leippe M, Janssen O, Kalthoff H, Trauzold A. MicroRNA-197 regulates Ran GTPase expression. Mol Cancer. (eingereicht).

Johannes Lemke, **Andreas Noack**, Dieter Adam, Vladimir Tchikov, Uwe Bertsch, Christian Röder, Stefan Schütze, Harald Wajant, Holger Kalthoff, Anna Trauzold. TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. (eingereicht).

Andreas Noack, Robert Häsler, Holger Kalthoff, Anna Trauzold. Impact of microRNAs on TRAIL induced apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells (PDAC). (in Bearbeitung).

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde. Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis angefertigt habe.

Kiel, den

(Andreas Noack)