

**Charakterisierung der funktionellen Bedeutung
der mikroRNA-34a während der Entwicklung
und der Tumorgenese mittels eines
Mausmodells**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Theresa Thor

aus Gelsenkirchen
Juni 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im hämatologisch-onkologischen Labor der Kinderklinik III der Uniklinik Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes H. Schulte

2. Gutachter: PD. Dr. rer. nat. Wiebke Hansen

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Olaf Witt

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Michael Ehrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2012

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Entdeckung der mikroRNAs	1
1.2	Biogenese der mikroRNAs	2
1.3	Die Funktion von mikroRNAs	3
1.4	mikroRNAs während der Tumorgenese	4
1.4.1	miRNAs als Onkogene	4
1.4.2	miRNAs als Tumorsuppressorgene	7
1.5	Die miR-34- Familie	10
1.6	MiR-34a – Funktionen und Zielgene	11
1.7	Die Bedeutung von miRNAs als Biomarker und in zukünftigen Therapien	15
1.7.1	miRNA Mimics	15
1.7.2	Anti-mikroRNAs	16
1.8	Das Medulloblastom	18
1.8.1	Klassifizierung der Medulloblastome	19
1.8.2	Etablierte Mausmodelle des Medulloblastoms	22
1.9	Zielsetzung der Arbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Materialien	26
2.1.1	Chemikalien	26
2.1.2	Geräte	28
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	29
2.1.4	Kits	29
2.1.5	Enzyme	30
2.1.6	Antikörper	30
2.1.7	Plasmide	31
2.1.8	Oligonukleotide	32
2.1.9	Größen- und Molekulargewichtsmarker	33
2.1.10	Mauslinien	33
2.1.11	Häufig verwendete Medien und Lösungen	34
2.1.11.1	Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	34
2.1.11.2	Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten	34
2.1.11.3	Medien für die Bakterienanzucht	36

2.1.11.4	Medien für die Zellkultur	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.1.1	Agarose-Gelelektrophorese von DNA- Fragmenten	38
2.2.1.2	Plasmid-DNA Aufreinigung im großen Maßstab (Maxi- Präparation)	38
2.2.1.3	Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration	38
2.2.1.4	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien der Maus.....	39
2.2.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR) (modifiziert nach Saiki et al., 1985).....	39
2.2.1.6	Isolierung von Gesamt- RNA	41
2.2.1.7	cDNA-Synthese	41
2.2.1.8	Quantitative Real-Time PCR	42
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	42
2.2.2.1	Anzucht und Passagieren von Zellen.....	42
2.2.2.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen	42
2.2.2.2	Zellzahlbestimmung.....	43
2.2.2.3	Transiente Transfektion	43
2.2.2.4	Bestimmung der Zellviabilität nach Transfektion	44
2.2.2.5	Bestimmung der Zellproliferation nach Transfektion.....	44
2.2.2.6	Bestimmung der Apoptose nach Transfektion.....	45
2.2.2.7	Seneszenz- Assay nach Transfektion.....	45
2.2.2.8	Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	45
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.3.1	Herstellung von Proteinlysaten	46
2.2.3.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	46
2.2.3.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.2.3.4	Elektrophoretischer Protein-Transfer (Western Blot).....	48
2.2.3.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immundetektion)	49
2.2.4	Generierung transgener miR-34a <i>knockout</i> -Mäuse.....	50
2.2.4.1	Isolierung genomischer miR-34a DNA und Klonierung des pMirn34a- Vektors	50
2.2.4.2	Transfektion der ES-Zellen.....	50
2.2.4.3	Generierung der chimären Mäuse.....	51
2.2.4.4	Aufbau der kongenen Mauslinie	51
2.2.5	Tierexperimentelles Arbeiten	51
2.2.5.1	Zucht und Haltung	51

2.2.5.2	Entnahme von Schwanzbiopsien und Identifikation der Tiere	52
2.2.5.3	Tötung von Versuchstieren	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Generierung der Mauslinie.....	53
3.1.1	Klonierung des pMirn34a-Targetingvektors zur homologen Rekombination in embryonale Stammzellen	53
3.1.2	Generierung chimärer MiR-34a-Mäuse	54
3.1.2.1	Elektroporation und Selektion der ES-Zellen	55
3.1.2.2	Nachweis der homologen Rekombination	55
3.1.2.3	Generierung chimärer Mäuse und Aufbau der MiR-34a-ko Mauslinie.....	56
3.1.3	Genotypisierung	57
3.1.4	Expression der miR-34a in der Maus	57
3.2	Phänotypisierung der knockout-Maus in der ‚German Mouse Clinic‘	59
3.3	Molekulare Charakterisierung der miR-34a-vermittelten Effekte in vitro	64
3.3.1	miR-34a-Expression im primären Medulloblastom und in Medulloblastomzelllinien.....	64
3.3.2	Effekt der miR-34a Reexpression auf die Zellviabilität.....	66
3.3.3	Effekt der miR-34a Reexpression auf die Zellproliferation.....	67
3.3.4	Effekt der miR-34a Reexpression auf die Apoptose	68
3.3.5	Effekt der miR-34a Reexpression auf den Zellzyklus	70
3.3.6	Effekt der miR-34a Reexpression auf die Seneszenz.....	71
3.3.7	Effekt der miR-34a Re-Expression auf die SIRT1 und MYCN Expression.....	72
3.4	Molekulare Charakterisierung der miR-34a in vivo	73
3.4.1	miR-34a Expression in Mausmodellen des Medulloblastom.....	73
3.4.2	Effekt des miR-34a <i>knockout</i> auf das Tumorwachstum.....	75
3.4.3	Effekt des miR-34a <i>knockout</i> auf SIRT1 und MYCN	76
4	Diskussion	78
4.1	MiR-34a in der normalen Entwicklung	79
4.2	MiR-34a in der Tumorentstehung.....	82
4.3	MiR-34a als Regulator der Medulloblastom- Entstehung	85
5	Zusammenfassung	90
6	Literaturverzeichnis.....	91
7	Anhang	103
7.1	Abkürzungsverzeichnis	103
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	106

7.3	Tabellenverzeichnis	107
8	Danksagung	108
9	Lebenslauf	109
10	Eidesstattliche Erklärungen	110

1 Einleitung

1.1 Die Entdeckung der mikroRNAs

MikroRNAs (miRNAs) sind kleine (18-25nt) endogene, regulatorische RNAs. Den Forschergruppen um Victor Ambros und Gary Ruvkun gelang 1993 der Nachweis, dass das *lin-4* Gen nicht für ein Protein kodiert, sondern für ein kleines, 21 Nukleotid langes, RNA-Molekül, welches den Übergang vom 1. zum 2. Larvenstadium bei *C. elegans* über eine translationale Repression von *lin-14* reguliert (Lee et al. 1993). *Lin-4* ist sequenzspezifisch komplementär zu Regionen im 3'-UTR der *lin-14* mRNA. In diesen Abschnitten wird die Inhibition von *lin-14* durch das *lin-4* Genprodukt vermittelt. Lediglich die *lin-14* Proteinmenge wird reduziert, nicht aber die Menge an *lin-14* mRNA. In späteren Jahren verstärkte sich die Vermutung, dass es sich um eine RNA:RNA Interaktion handelt. Die kleinen RNAs binden an komplementäre Abschnitte des 3'-UTR und führen dann zur Repression der Translation (Olsen & Ambros 1999; Wightman et al. 1993). Erst im Jahr 2000 wurde eine weitere mikroRNA entdeckt, die *let-7* miRNA. Sie ist in der späteren larvalen Entwicklung exprimiert und komplementär zum 3'-UTR der heterochronen *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* und *daf-12* Gene. *Let-7* kontrolliert die Expression dieser Gene. Beide miRNAs (*lin-14* und *let-7*) sind nicht homolog, agieren aber in einer ähnlichen Weise in der Einleitung des Übergangs vom späten larvalen zum adulten Stadium (Reinhart et al. 2000).

Seitdem sind über 15.000 miRNAs in Viren und in unterschiedlichsten Organismen, wie Würmer, Fische, Fliegen und Primaten über zufälliges Klonieren und Sequenzierungen oder computer-basierte Prädiktion identifiziert worden (Ambros et al. 2003; Aravin et al. 2003; Dostie et al. 2003; Houbaviy et al. 2003; Krek et al. 2005; Lagos-Quintana et al. 2002; Lim et al. 2003; Mourelatos et al. 2002).

1.2 Biogenese der mikroRNAs

MiRNAs werden im Nukleus zunächst durch die RNA-Polymerase II in lange Primärtranskripte (pri-miRNA) transkribiert, die mehrere Kilobasen lang sein können (Abb. 1). Diese Vorläufer bilden ihre charakteristischen und typischen Haarnadelstrukturen aus. Sie enthalten sowohl eine 5'-7-Methyl-Guanosin-Cap-Struktur als auch einen 3'-Poly-A-Schwanz (Cai et al. 2004). Nachfolgend prozessiert die RNAse III Drosha die pri-miRNA in ca. 70 nt lange Vorläufermoleküle (pre-miRNAs) (Lee et al. 2003a; Lee et al. 2004). Diese werden über Exportin 5 in einem energieabhängigen Schritt aus dem Nukleus ins Cytoplasma exportiert, wo sie an die RNA-Endonuklease Typ III Dicer und an den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) gebunden werden. Der RISC-Komplex besteht aus dem RNA bindenden Protein (TRBP) und Argonaut 2 (Ago2) (Bohnsack et al. 2004; Chendrimada et al. 2005; Hammond et al. 2000). Ergebnisse neuerer Studien lassen vermuten, dass Ago2 zunächst die pre-miRNA 12nt vom 3'-Ende spaltet, und danach Dicer die Ago2-gespaltene Vorläufer miRNA in den 22nt langen reifen miRNA Duplex spaltet (Diederichs & Haber 2007). Während der aktive reife Strang in den RISC-Komplex geladen wird, wird der andere Strang entfernt und abgebaut (Bartel 2004; Chendrimada et al. 2005; Diederichs & Haber 2007; Hammond et al. 2000). Es gibt miRNAs, bei denen beide Stränge aktiv sind, z.B. miR-142 (Kasashima et al. 2004). Der reife 22nt lange Strang erkennt komplementäre Sequenzen in der 3'-Region von Ziel-mRNAs und führt den miRNA-RISC-Komplex dazu, die Genexpression durch Inhibition der Translation zu reprimieren oder den mRNA-Abbau zu initiieren (Bartel 2004; Chendrimada et al. 2005; Diederichs & Haber 2007; Hammond et al. 2000). Dies ist abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen der Sequenz der miRNA und der Sequenz der Ziel-mRNA: eine vollständige Sequenzhomologie bewirkt die Spaltung und Degradation der mRNA, wohingegen unvollständige Komplementarität eine translationale Repression zur Folge hat (Hutvagner et al. 2004; Olsen & Ambros 1999). Während der miRNA Biogenese können miRNAs die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation steuern, und die Aufklärung dieser Mechanismen könnte das Verstehen der miRNA Deregulation in diversen Krankheiten erleichtern.

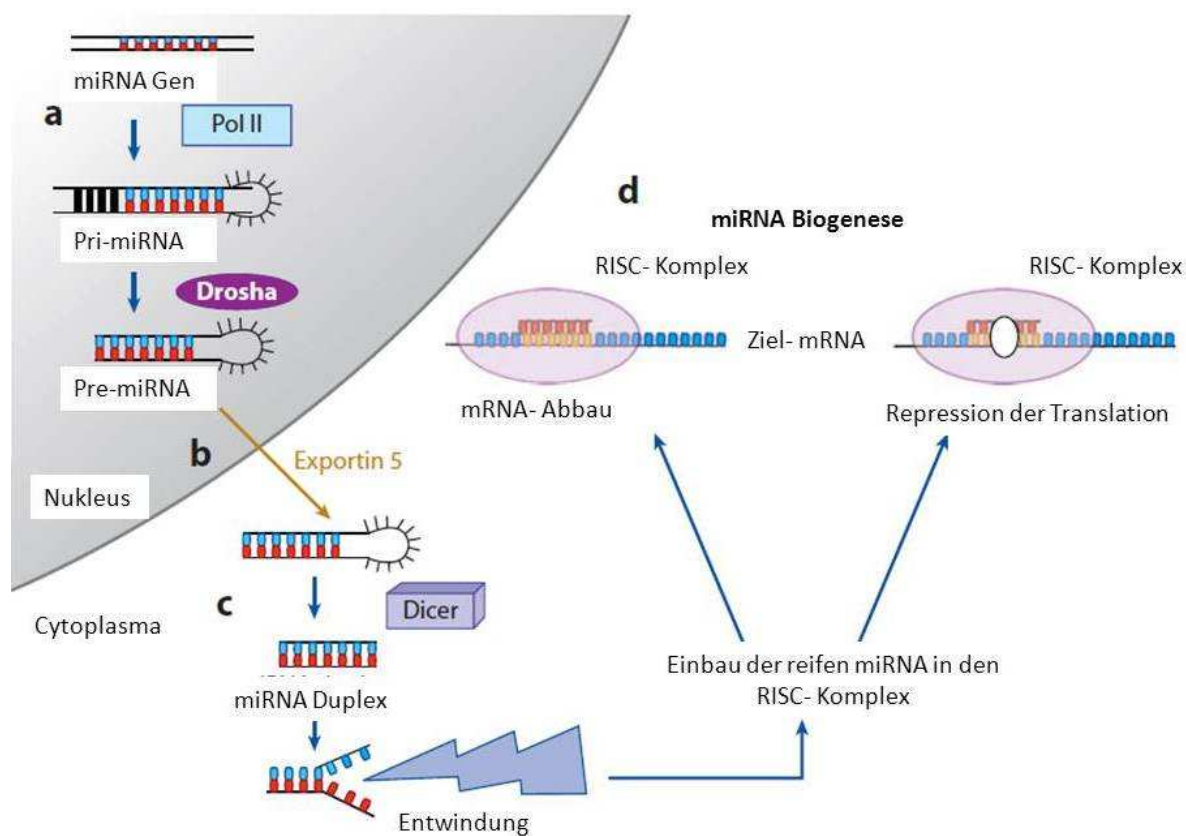


Abb. 1: Die mikroRNA Biogenese.
modifiziert nach (Garzon & Croce 2011)

1.3 Die Funktion von mikroRNAs

Genomische Analysen von miRNAs zeigen, dass mehr als 50% der Säugetier-miRNAs in Introns proteinkodierender Gene oder nicht proteinkodierender Gene liegen (Rodriguez et al. 2004). miRNAs machen 2% der proteinkodierenden Gene in Säugetieren aus, regulieren bis zu 30% der Gene und sind an vielen biologischen Prozessen, wie Entwicklung, Zelldifferenzierung, Zellzyklusregulation, Zellproliferation, Apoptose oder dem allgemeinen Metabolismus beteiligt (Boehm & Slack 2005; Carleton et al. 2007; Harfe 2005; Kim et al. 2006; Lau et al. 2001).

Um noch unbekannte Ziel-mRNAs zu identifizieren, werden verschiedene Computerprogramme, wie TargetScan (Lewis et al. 2003), Miranda (John et al. 2004) oder PicTar (Krek et al. 2005) verwendet. Diese Programme durchsuchen den 3'-UTR nach mehreren konservierten Regionen mit einer Komplementarität zu den entsprechenden

miRNAs. Diese sogenannte *Seed*-Sequenz besteht aus 6-8 Nukleotiden am 5'-Ende der miRNA. Auch wird die Konservierung der Bindestelle in anderen Organismen überprüft.

1.4 mikroRNAs während der Tumorgenese

Die Tumorentstehung ist das Ergebnis von abnormem Zellwachstum und unter anderem kann eine Dysregulation der Apoptose zu einer Formierung eines Tumors führen. miRNAs sind nicht nur im Normalgewebe und im Tumorgewebe differentiell exprimiert, sondern auch im Primärtumor und im metastasierten Gewebe (Tavazoie et al. 2008; Yanaihara et al. 2006).

1.4.1 miRNAs als Onkogene

Per definitionem ist die Expression onkogener mikroRNAs bei Krebserkrankungen erhöht. Solche ‚OnkomiRs‘ fördern die Entstehung und Progression des Tumors durch Inhibition eines Tumorsuppressorgens und/oder eines Gens, das an der Kontrolle der Zelldifferenzierung oder Apoptose beteiligt ist (Esquela-Kerscher & Slack 2006).

miR-155

Eine der ersten als Onkogen identifizierten mikroRNAs ist die miR-155 (Metzler et al. 2004). Die Nukleotide 241-262 des BIC (B-Zellen Integrationscluster) enkodieren die pri-miRNA dieser miRNA, die aus 1421 Basenpaaren besteht und auf Chromosom 21 lokalisiert ist. miR-155 ist in diversen Tumorentitäten hochreguliert (Calin et al. 2005; Cheng et al. 2005; Garzon et al. 2008; Greither et al. 2010; Kluiver et al. 2005; Metzler et al. 2004; Volinia et al. 2006; Yamanaka et al. 2009). Garzon et al. gelang 2008 der Nachweis, dass miR-155 transgene Mäuse im Alter von ca. neun Monaten eine akute lymphoblastische Leukämie bzw. hochgradige Lymphome entwickeln, mit einer vorangehenden polyklonalen Prä-B-Zellproliferation. Die Akkumulation der Prä-B-Zellen wird über einen durch die miR-155 vermittelten *Knockdown* von Ship und c/EBP β initiiert (Costinean et al. 2009).

miR-21

Die miR-21 zeigt eine große evolutionäre Konservierung zwischen den verschiedenen Spezies. Im *Homo sapiens* ist das *MIRN21* Gen auf dem Chromosom 17 lokalisiert, dicht angesiedelt an das zehnte Intron des Gens *TMEM49* (Transmembranprotein 49) (Fujita et al. 2008a). Einige Studien belegen das onkogene Potenzial der miR-21 (Asangani et al. 2008; Chan et al. 2005; Si et al. 2007; Zhu et al. 2008). Antisense- Inhibition der miR-21 führt zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose über Aktivierung von Caspase in Neuroepithelzellen (Sathyan et al. 2007).

miR-221/222

Zu denen im Krebs am stärksten deregulierten miRNAs gehört die miR-221/222. Die Expression der miR-221/222 ist in soliden Tumoren, im Thyroidkarzinom, im Leberkrebs und in Melanomzellen hochreguliert (Di Leva et al. 2010; Felicetti et al. 2008; Fornari et al. 2008; Pallante et al. 2006). Eine erhöhte miR-221/222- Expression führt zu gesteigerter Proliferation, Apoptose und Migration verschiedener Tumorzelllinien (Garofalo et al. 2009; Garofalo et al. 2008; le Sage et al. 2007). Pineau et al. untersuchten die miRNA Expression in 104 Proben hepatocellulären Karzinoms (HCC), in 90 zirrhotischen Lebern, in 21 gesunden Leberproben und in 35 HCC-Zelllinien. miR-221/222 war die am stärksten hochregulierte miRNA in den Tumorproben, förderte zudem das Zellwachstum über den Cyclin-abhängigen Kinase (CDK)-Inhibitor p27^{Kip1} und das Fortschreiten der Krankheit von gesunder Leber, über Leberzirrhose bis hin zu einem ausgewachsenen Tumor. Das Tumorwachstum konnte über spezifische AntimiR- 221/222 inhibiert werden (Pineau et al. 2010).

miR-106b-93-25

Das miR-106b-93-25 Cluster besteht aus den hoch konservierten miR-106b, miR-93 und miR-25, die in diversen Krebsarten akkumuliert sind, wie z. B. Prostatakarzinom, Neuroblastoma und Myelom. Das Polycistron fungiert über die Suppression von p21 und Bim als Onkogen (Petrocca et al. 2008).

miR-17-92

Ein weiteres Beispiel für ein mikroRNA-Polycistron ist das miR-17-92 Cluster, welches aus sechs miRNAs besteht, miR-17-5p, -18, -19a, -19b, -20a, und -92-1. Es ist auf dem humanen Chromosom 13q31 lokalisiert, einer Region, die in einigen Lymphomen und soliden Tumoren amplifiziert ist (Hayashita et al. 2005; Ota et al. 2004). Mäuse, die für miR-17-92 defizient sind, sterben kurz nach Geburt an einer Lungenhyperplasie. Des Weiteren ist das Cluster an

der Entwicklung der B-Zellen beteiligt. Eine miR-17-92-Abwesenheit führt zu einem Anstieg der Menge des proapoptotischen Proteins Bim und inhibiert die Transition der Pro-B zu Prä-B-Zellen (Manni et al. 2009).

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass miRNAs als Onkogene agieren können (Zusammenfassung siehe Tabelle 1). Der therapeutische Gebrauch von miRNAs kann sowohl die Tumorzellen gegenüber Medikament-induzierter Apoptose sensibilisieren, als auch ihr Überleben, Proliferation und Migration inhibieren. Ein *Knockdown* dieser miRNAs über Antisense-Oligonukleotide inhibiert somit die Entwicklung eines Krebs-assoziierten Phänotyp und weist Potenzial einer miRNA-basierten Therapie auf (Inomata et al. 2009; Park et al. 2009a; Wang et al. 2010; Yamanaka et al. 2009) (siehe Abschnitt 1.7).

Tabelle 1: Die in humanen Tumoren überexprimierten miRNAs
Übersicht in (Garofalo & Croce 2011)

miRNA- Gen	Lokalisation	miRNA Target	Deregulierung im Tumor	Referenz
miR-155	21q21.3	Ship, c/EBPβ, Pu.1, Cutl1, Pcalm	hochreguliert in pädiatrischem Burkitt Lymphom, Hodgkin Krankheit, non-Hodgkin Lymphom, CLL, Brust- und Lungenkrebs, Kolon- und Pankreaskarzinom	(Calin et al. 2005; Cheng et al. 2005; Garzon et al. 2008; Greither et al. 2010; Kluiver et al. 2005; Metzler et al. 2004; Volinia et al. 2006; Yamanaka et al. 2009)
miR-21	17q23.1	Pten, PDCD4	überexprimiert in Brust-, Magen-, Lungen- und Prostatakrebs, Cervikal-, Kopf- und Nacken- und Kolorektalkarzinom, Glioblastom	(Asangani et al. 2008; Cai et al. 2004; Chan et al. 2005; Cheng et al. 2005; Corsten et al. 2007; Ebert et al. 2007; Fujita et al. 2008a; Park et al. 2009a; Sathyan et al. 2007; Si et al. 2007; Yamanaka et al. 2009; Zhu et al. 2008)
miR-221/222	Xp11.3	Pten, TIMP3, p27, p57, Bim, DDIT4, FOXO3A	hochreguliert im Leberkarzinom, CLL, Melanom, Glioblastom, Lungen-, Brust-, Thyroid- und Prostatakrebs	(Di Leva et al. 2010; Felicetti et al. 2008; Fornari et al. 2008; Galardi et al. 2007; Garofalo et al. 2009; Garofalo et al. 2008; le Sage et al. 2007; Pallante et al. 2006; Pineau et al.

				2010)
miR-106b-93-25 Cluster	7q22.1	p21/Cip1, Bim	überexprimiert in Magen-, Prostata-, Darm- und Pankreaskarzinom, Neuroblastoma und Myelom	(Petrocca et al. 2008)
miR-17-92 Cluster	13q31.3	p63, E2F1, p21, Bim	hochreguliert in Lungen- und Kolonkarzinom, Lymphom, Medulloblastom und Myelom	(Hayashita et al. 2005; Inomata et al. 2009; Manni et al. 2009; Ota et al. 2004; Scherr et al. 2007; Wang et al. 2010)

1.4.2 miRNAs als Tumorsuppressorgene

Eine miRNA kann als Tumorsuppressor agieren, wenn ihr Funktionsverlust an der Transformation von einer gesunden in eine maligne Zelle beteiligt ist. Dieser Funktionsverlust (*loss-of-function*) einer mikroRNA kann durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. genomische Deletion, Mutationen oder epigenetisches Silencing, ausgelöst werden (Calin et al. 2002; Calin et al. 2005). In malignen Zellen ist die Expression von Tumorsuppressoren herunterreguliert. Sie inhibieren Onkogene und/oder die Zelldifferenzierung und Apoptose (Übersicht in Tabelle 2) (Bandyopadhyay et al. 2010; Esquela-Kerscher & Slack 2006).

miR-15/16

Das miR-15/16 Cluster ist auf dem Chromosom 13q14 lokalisiert. Deletionen oder Punktmutationen treten mit einer hohen Frequenz in CLL und einigen anderen soliden Tumoren auf (Bandi et al. 2009). Die miR-15/16-Expression korreliert invers mit der Bcl-2 Expression (Cimmino et al. 2005). In immunsupprimierten Nacktmäusen führt eine ektopische miR-15a/16-1-Expression zu einer signifikanten Suppression der Tumorigenität von leukämischen MEG-01 Zellen. Als beschriebene Zielgene außer Bcl-2 sind noch CCDN1 und WNT3A zu nennen, die zahlreiche tumorigene Faktoren im Prostatakrebs fördern (Bonci et al. 2008). Die Daten lassen vermuten, dass miR-15a/16-1-Gene natürliche Antisense-Interaktoren von Bcl-2 oder wohlmöglich noch von anderen Onkogenen sind, und diese genutzt werden können, um das Tumorwachstum in therapeutischer Hinsicht zu unterdrücken

(Garofalo & Croce 2011). Klein et al. zeigten 2010, dass eine Deletion des miR-15a/miR16-1-Clusters in Mäusen zu einem CLL-assoziierten Phänotyp führt, vergleichbar mit dem einer humanen CLL (Klein et al. 2010).

let-7

Der Verlust eines der Mitglieder der let-7-Familie resultiert in einer Überexpression von RAS, einem Onkogen, das bei der Pathogenese von diversen Tumoren eine essentielle Rolle spielt (Johnson et al. 2005). 2007 konnten Sampson et al. in Lymphomzellen nachweisen, dass eine Überexpression von let-7a zu einer Abnahme von Myc auf mRNA- und Proteinebene führt (Sampson et al. 2007).

miR-29

Im Gallengangkarzinom ist die miR-29 herunterreguliert. Als endogener Regulator beeinflusst diese miRNA-Familie (miR-29a, miR-29b, miR-29c) die Expression des Mcl-1-Proteins. Die Mitglieder der miR-29-Familie unterdrücken direkt p85 alpha, die regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid 3-Kinase, und CDC42, eine Rho GTPase. Beide regulieren p53 negativ, so dass in Abhängigkeit von p53 Apoptose induziert wird (Mott et al. 2007; Park et al. 2009b).

mir-122

Eine weitere tumorsuppressive mikroRNA wurde im Leberkarzinom näher charakterisiert. MiR-122 ist im Primärtumor signifikant herunterreguliert und die Reexpression dieser miRNA in metastasierenden Zellen reduziert das Migrations- und Invasionsverhalten *in vitro* und die Tumor- und Angiogenese *in vivo* (Tsai et al. 2009).

miR-34

Die miR-34-Familie beinhaltet drei Mitglieder, miR-34a, miR-34b und miR-34c. MiR-34b und c werden durch Prozessierung eines bicistronischen Transkripts auf Chromosom 11q23 generiert. He et al. verglichen miRNA-Expressionsprofile von wildtyp und p53-defizienten Zellen und wiesen nach, dass die miR-34a/b/c-Expression mit dem p53-Status korreliert. Zu den Zielgenen der miR-34-Familie gehören Cyclin E2 (CCNE2), CDK4 und MET. siRNA-vermittelte Herunterregulierung dieser Zielgene führt zu einem G₁-Arrest. Im Gegensatz dazu führt eine ektopische miR-34-Expression zu einem Anstieg des Genprodukts von Rb, einhergehend mit einer geringeren Aktivität des CDK4 und CCNE2-Komplexes (He et al. 2007). Als weitere Zielgene wurden im Neuroblastom Bcl-2 und MYCN identifiziert (Cole et

al. 2008). Die miR-34-Familie ist im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom herunterreguliert und wird als viel versprechender prognostischer Biomarker beschrieben. Eine Reexpression der miR-34 in Pankreaszelllinien, sowohl über miRNA-Mimics als auch über Infektionen mit Lentiviren, inhibiert das Zellwachstum und die Zellinvasion, induziert Apoptose und einen G₁ und G₂/M-Arrest, und sensibilisiert die Zellen gegen Chemotherapie und Bestrahlung (Gallardo et al. 2009).

Tabelle 2: Die in humanen Tumoren am stärksten herunterregulierten miRNAs.
Übersicht in (Garofalo & Croce 2011)

miRNA Gen	Lokalisation	miRNA Target	Deregulierung im Tumor	Referenz
miR-15/16	13q14.2	Bcl-2, CCND1, WNT3A	herunterreguliert in CLL, DLBCL, Myelom, Hypophysenadenom, Prostata- und Pankreaskarzinom	(Bandi et al. 2009; Bonci et al. 2008; Calin et al. 2002; Cimmino et al. 2005; Klein et al. 2010; Tolcher et al. 2005)
let-7	17q23.1	Ras, Myc, HMGA2	heruntermoduliert im Liposarkom, CLL, gastritischen, Lungen-, Prostata-, Brust-, Ovarial- und Kolon-Tumoren	(Johnson et al. 2005; Lee & Dutta 2007; Sampson et al. 2007; Takamizawa et al. 2004)
miR-34a miR-34b/c	1p36 11q23	CCNE2, MET, Bcl2, MycN, Notch1/Notch2, CDK4/6	herunterreguliert im Pankreaskarzinom und Burkitt Lymphom ohne Myc- Translokalisierung, hypermethyliert im Kolonkarzinom	(Cole et al. 2008; Gallardo et al. 2009; He et al. 2007; Li et al. 2009)
miR-29	7q22.1	Mcl-1, CDC42	heruntermoduliert in CLL und Gallengangkarzinom, Kolon-, Brust- und Lungenkrebs	(Garzon et al. 2009b; Mott et al. 2007; Park et al. 2009b)
miR-122	13q31.3	ADMA17	herunterreguliert in HCC	(Tsai et al. 2009)

1.5 Die miR-34- Familie

In Säugern umfasst die miR-34-Familie drei miRNAs, die von zwei unterschiedlichen Genen kodiert werden. Die miR-34a wird durch ein eigenes Transkript enkodiert, miR-34b und c besitzen ein gemeinsames Primärtranskript (Abb. 2). Die zwei miRNA-Gene haben gewebsspezifische Funktionen. miR-34a ist in Mäusen ubiquitär exprimiert, mit der höchsten Expression im Gehirn, wohingegen die miR-34b/c eine starke Expression im Lungengewebe aufweist (Bommer et al. 2007; Lodygin et al. 2008).

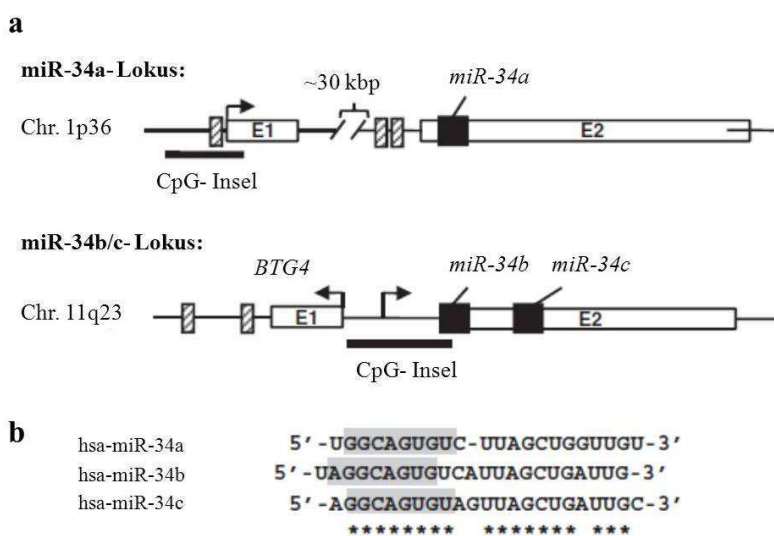


Abb. 2: Vergleich der Mitglieder der miR-34- Familie, miR-34a, miR-34b und miR-34c
Übersicht in (Hermeking 2010).

- Struktur des genomischen Lokus des humanen miR-34a und miR-34b/c Gens; weiße und schwarze Boxen = Exons und miRNA Hairpins; schraffierte Boxen = p53- Bindungsstellen; schwarze dicke Linien = CpG Islands
- Sequenz Alignment der reifen miR-34a, miR-34b und miR-34c; die Seed- Sequenz ist grau hervorgehoben

Die Mitglieder der miR-34- Familie sind direkte Zielgene von p53 und deren Hochregulierung führt zu Apoptose und Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase (Bommer et al. 2007; Chang et al. 2007; Corney et al. 2007; He et al. 2007; Raver-Shapira et al. 2007; Tarasov et al. 2007). Die Transfektion der miR-34-Gene in humane Fibroblasten induziert zelluläre Seneszenz, was eine permanente Form des Zellzyklus-Arrest darstellt (He et al. 2007). Einbringen einer siRNA – spezifisch für miR-34-Zielgene – führt zu einem G₁-Arrest und phänotypisiert somit den Effekt einer miR-34-Expression. Zellzyklus-Arrest und Apoptose sind Endpunkte der p53 Aktivität. miR-34-Gene können als wichtige Mediatoren der Tumorsuppression über p53 fungieren (Abb. 3). Deregulation der p53-induzierten mRNAs über miR-34 könnte bei der Feinsteuerung der p53-Antwort hilfreich sein und so

unkontrollierten und irreversiblen Antworten infolge einer p53-Aktivierung vorbeugen (Cohen et al. 2006).

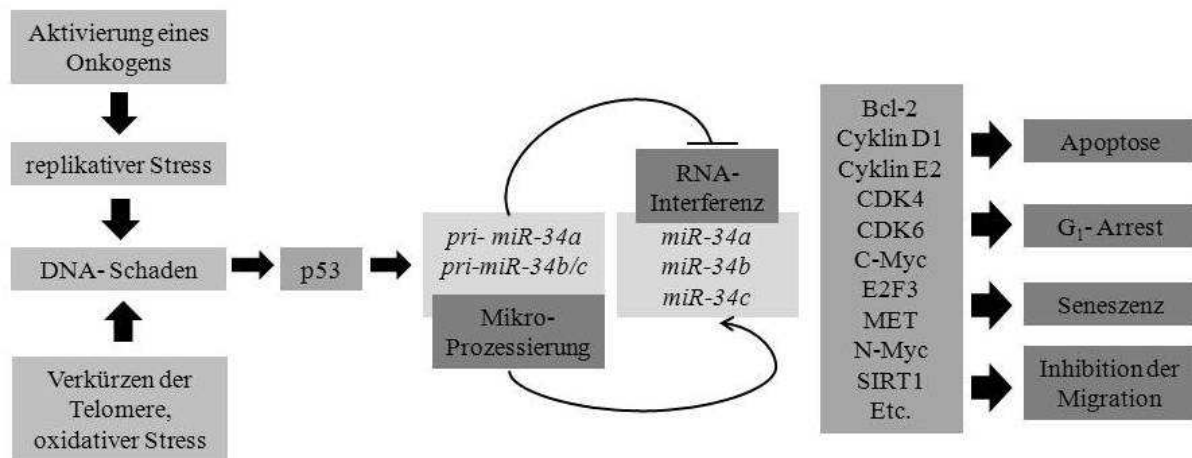


Abb. 3: Die miR-34-Familie als Mediator der Tumorsuppression durch p53.
modifiziert nach (Hermeking 2010)

1.6 MiR-34a – Funktionen und Zielgene

MiR-34a ist durch direkte und indirekte Hemmung der Expression von zahlreichen Proteinen an multiplen tumorsuppressiven Signalwegen beteiligt (Abb. 4). MiR-34a ist auf dem Chromosom 1p36 lokalisiert, das in vielen Tumorentitäten homozygot, im Neuroblastom heterozygot, deletiert ist. Funktionelle Screens für Gene mit tumorsuppressiver Funktion auf 1p36 identifizierten miR-34a als ein solches in pädiatrischen Neuroblastomen (Cole et al. 2008). Im Neuroblastom korreliert der Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity* = LOH) mit einer MYCN Amplifikation. Der LOH und die Amplifikation des Onkogens MYCN sind zudem mit einem aggressiven Phänotyp assoziiert. Wei et al zeigten, dass MYCN ein direktes Zielgen von miR-34a ist und dass ein 1p36 LOH mit einer miR-34a Herunterregulierung korreliert. Von den untersuchten miRNAs verursachte die miR-34a durch Induktion von Apoptose die stärkste signifikante Unterdrückung des Zellwachstums und setzte die DNA-Synthese in MYCN amplifizierten Neuroblastomzelllinien herab. Quantitative RT-PCR Daten verdeutlichten, dass primäre Neuroblastome mit einem 1p36-Verlust eine geringere Menge an miR-34 exprimieren, als solche mit normaler Kopienanzahl von 1p36 (Wei et al. 2008).

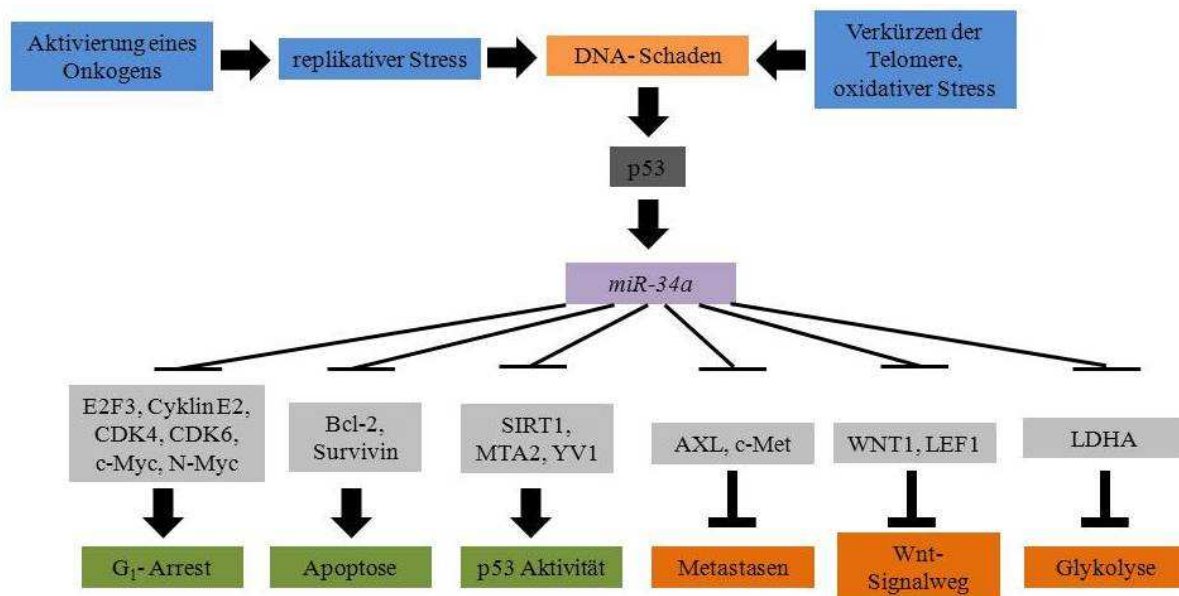


Abb. 4: Schematisches Modell der Regulation durch miR-34a.
modifiziert nach Kaller et al. 2011

Die Inaktivierung der miR-34a-Expression in Zelllinien verschiedener Tumore (Brust, Lunge, Kolon, Niere, Blase, Pankreas und Melanom) und im primären Melanom ist auf eine aberrante CpG-Methylierung des 34a-Promotors zurückzuführen. Eine Reexpression von miR-34a induziert in Prostata- und Pankreaskarzinom über die Inhibition von CDK6 Seneszenz und Zellzyklusarrest (Lodygin et al. 2008).

In 11 von 15 Pankreaskarzinomen ist die Expressionshöhe der miR-34a sehr niedrig oder nicht mehr detektierbar. Eine durch miR-34a-induzierte Apoptose ist abhängig von der Anwesenheit von Wildtyp p53 (Chang et al. 2007). Welch et al. wiesen nach, dass eine ektopische miR-34a-Reexpression in Neuroblastomzelllinien Apoptose initiiert. miR-34a war in primären Neuroblastomen mit einer ungünstigen Prognose und in humanen Zelllinien im Vergleich zu gesundem Nebennierengewebe niedriger exprimiert, im Vergleich zu gesundem Nebennierengewebe. Eine Reexpression dieser miRNA in drei NB-Zelllinien führte zu einer Reduktion der Zellproliferation über Induktion eines Caspase-abhängigen apoptotischen Signalwegs. Als möglichen Mechanismus wurde diskutiert, dass miR-34a direkt an die für E2F3 kodierende mRNA bindet und somit das Level an E2F3 Protein signifikant vermindert. E2F3 ist ein transkriptioneller Induktor der Zellzyklus-Progression (Welch et al. 2007). Eine miR-34a-Inaktivierung verstärkt die p53-vermittelte Apoptose in Zellen, die zuvor genotoxischem Stress ausgesetzt waren. Folglich stellt miR-34a ein direktes proapoptisches transkriptionelles Target von p53 dar, das einige der p53-induzierten biologischen Effekte vermitteln kann (Raver-Shapira et al. 2007). Bcl-2 ist ein weiteres Zielgen von miR-34a. miR-

34a-defiziente embryonale Mausfibroblasten (MEFs) zeigten einen Anstieg der spontanen Apoptose nach Differenzierung (Bommer et al. 2007).

AXL ist ein Mitglied der TAM (Tyro-AXL-Mer) Rezeptortyrosinkinase (RTK) Familie. AXL ist in verschiedenen Aspekten der Tumorentstehung beteiligt, wie Zellmigration, Proliferation und Invasion (Holland et al. 2005; Vajkoczy et al. 2006). Erhöhte Expression von AXL korreliert mit einem verstärkten metastatischen Potenzial in Brustkrebs-Zellen (Zhang et al. 2008). Eine weitere RTK, c-MET, ist ein direktes Target von miR-34a (Corney et al. 2010). MiR-34a könnte die Suppression von Metastasierungen durch gemeinsame Herunterregulierung verschiedener RTKs, die an der Zellinvasion und Metastasierung beteiligt sind, vermitteln.

LEF1/ TCF-1- α ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Aktivierung des *Wnt*-Signalweges die Transkription der *downstream* Targets, wie c-MYC, induziert. Wnt1 wurde von Hashimi et al. als direktes Zielgen von miR-34a identifiziert, was die Annahme verstärkt, das miR-34a das onkogene *Wnt-Signalling* unterdrückt (Hashimi et al. 2009). Konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges über Verlust von APC oder über aktivierende Mutationen von β -Katenin wurde in 90% aller Kolorektalkarzinome beobachtet (Wood et al. 2007).

P53 inhibiert die Glykolyse über Aktivierung der miR-34a, welche wiederum direkt die Laktat Dehydrogenase (LDHA) reprimiert. LDHA ist als Schlüsselenzym bei der aeroben Glykolyse erforderlich. Pharmakologische oder siRNA-vermittelte Inhibition von LDHA schützt vor Proliferation der Tumorzellen. miR-34a- induziert die Herunterregulation von LDHA und beeinflusst so die tumorsuppressiven Mechanismen durch p53 positiv (Dang et al. 2008; Fantin et al. 2006; Kaller et al. 2011).

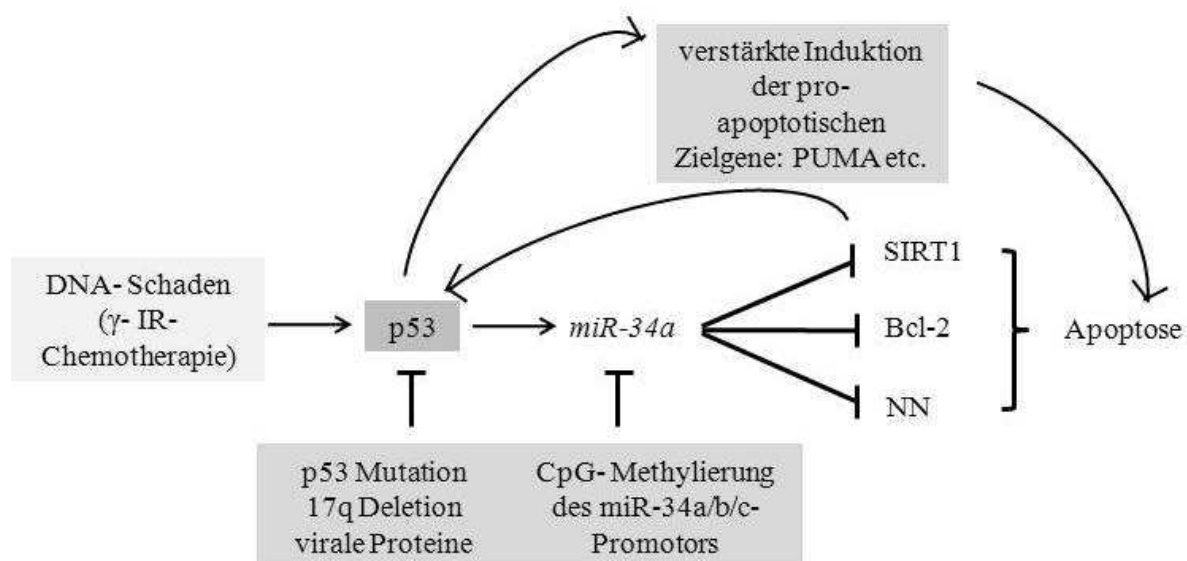


Abb. 5: Der p53/miR-34a Signalweg reguliert die Apoptose.
 modifiziert nach Hermeking 2010

Weiterhin reguliert miR-34a die SIRT1 mRNA, was zu einer translationalen Repression von SIRT1 führt. SIRT1 ist eine NAD-abhängige Deacetylase, die die Apoptose bei Antwort auf oxidativen und genotoxischen Stress steuert. Inhibition der miR-34a sorgt für eine gesteigerte Expression an acetyliertem p53 und erhöht die Expression von p21 und PUMA, die transkriptionale Zielgene von p53 sind und den Zellzyklus und die Induktion von Apoptose regulieren (Yamakuchi et al. 2008). Weiterhin führt miR-34a vermittelte Herunterregulation von SIRT1 zu Apoptose in wildtyp Kolonkarzinomzellen, jedoch nicht in Tumorzellen, denen p53 fehlt. Es ist beschrieben, dass p53, miR-34a und SIRT1 einen positiven Feedback-Loop ausbilden, bei dem eine Repression von SIRT1 zu weiterer Aktivierung von p53 führt (siehe Abb. 5). Da die SIRT1 Aktivität NAD-abhängig ist, kann der metabolische Status einer Zelle die Effektivität dieser Regulation beeinflussen. Verlust der miR-34a aufgrund von genetischen oder epigenetischen Mechanismen unterbricht diesen Regelkreis, was in geringerer p53-Aktivität resultiert. Dies würde einen selektiven Vorteil für die Tumorzellen darstellen. Auch Fujita et al. wiesen die Regulation von SIRT1 durch miR-34a nach, jedoch beobachteten sie diesen Effekt nur auf transkriptionellem, und nicht auf posttranskriptionellem Niveau (Fujita et al. 2008b).

Die Expression von miR-34a ist in seneszenten HUVECs (human umbilical vein endothelial cells), im Herzen und in der Milz von älteren Mäusen erhöht. Eine Überexpression der miRNA induziert über SIRT1-Herunterregulation Seneszenz in Endothelzellen und inhibiert die Zellproliferation (Ito et al. 2010). Ito et al. wiesen SIRT1 als Zielgen von miR-34a in HUVECs nach, wobei SIRT1 die Fähigkeit von miR-34a, Seneszenz zu induzieren, blockiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass miRNAs mit endothelialer Seneszenz assoziiert sind und dazu dienen können, die Auswirkungen der Alterung auf das Gefäßsystem zu vermitteln. Zhao et al. untersuchten die Rolle der miR-34a in endothelialen Vorläuferzellen (EPCs). Die Überexpression von miR-34a beeinträchtigte signifikant die EPC-vermittelte Angiogenese *in vitro*. Sie führte des Weiteren zu einer signifikant erhöhten EPC-Alterung, parallel mit einer verminderten SIRT1-Reduktion. Darüber hinaus führte der *Knockdown* von SIRT1 zu einer verminderten EPC-vermittelten Angiogenese und erhöhte somit die Seneszenz. Schließlich erhöhte die Überexpression von miR-34a das Niveau des SIRT1-spezifischen Transkriptionsfaktors FoxO1. Abschließend beeinträchtigt miR-34a die EPC-vermittelte Angiogenese durch Induktion der Seneszenz über Hemmung von SIRT1 (Zhao et al. 2010).

In humanem Glioblastomen und Medulloblastomzellen dereguliert eine miR-34a-Überexpression die Proteinexpression von c-Met und CDK6. Auch die Expression von Notch1 und Notch2 führt zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums. Transiente Transfektion inhibiert die Zellproliferation, die Zellzyklusprogression, das Zellüberleben und

die Zellinvasion in Glio- und Medulloblastomzelllinien. Dies lässt vermuten, dass miR-34a ein potentiell Therapeutikum gegen Hirntumore darstellt (Li et al. 2009). Auch kann die Detektion einer miR-34a Expression als möglicher Prediktor auf ein Ansprechen der Therapie genutzt werden. Die Reexpression der miR-34a kann im Hinblick auf eine Chemotherapie-Resistenz nützlich sein. Nach Administration des MDM2-Inhibitors Nutlin-3 auf normale humane Fibroblasten wird miR-34a (und auch miR-34b/c) induziert und ein gesteigertes Seneszenzverhalten aufgrund einer p53-Aktivierung beobachtet. Demnach wären Nutlin-3 oder ähnliche Therapeutika Kandidaten für eine neoadjuvante Therapie in Tumoren mit funktionellem p53 (Kumamoto et al. 2008). Systemische Behandlung mit miR-34a Mimetika führen zu einer Inhibition des Tumorwachstums in Maus-Xenografts und zu einer Suppression der Proliferation in Prostatakrebs-Stammzellen (Liu et al. 2011; Trang et al. 2011; Wiggins et al. 2010). Ektopische miR-34a Expression könnte demnach in Zukunft eine Option für die Tumorthherapie darstellen.

1.7 Die Bedeutung von miRNAs als Biomarker und in zukünftigen Therapien

Im Laufe der Jahre wurden vielfältige Funktionen von miRNAs aufgezeigt (s. Abschnitt 1.3). Zudem sind mikroRNAs in humanen Tumoren differentiell exprimiert, weisen als Targets Tumor- und Onkogene auf und können so zur Krebsentwicklung beitragen. Sie rücken dadurch immer mehr in den Fokus als mögliche diagnostische und therapeutische Marker. Eine Methode der therapeutischen Intervention ist die Modulation der miRNA Expression. Die vielversprechendsten therapeutischen Ansätze hierzu sind der Einsatz von miRNA Mimics und anti- miRNA Oligonukleotiden (AMOs).

1.7.1 miRNA Mimics

MiRNA Mimics werden zur Steigerung der miRNA-Expression eingesetzt. Diese kleinen, chemisch- modifizierten doppelsträngigen RNA-Moleküle imitieren endogene reife miRNAs.

Über solche synthetischen miRNA Mimics kann die Expression von deregulierten Onkogenen inhibiert werden.

Garzon et al. zeigten in AML-Zelllinien und im Primärtumor, dass eine Überexpression von miR-29a und miR-29b durch eine Herunterregulierung des Mcl-1 Proteins das Zellwachstum inhibiert und Apoptose induziert. Diese Experimente weisen der miR-29b eine tumorsuppressive Rolle zu und ermöglichen es, synthetische miR-29b Oligonukleotide als ein Ansprechen auf eine Behandlung bei AML zu nutzen (Garzon et al. 2009b). Nachteile dieses Ansatzes sind, dass miRNA-Mimic Oligonukleotide nur einen transienten Effekt haben, sie nicht stabil sind, und mehrere Gaben nötig wären.

Die Technik der Vektor-basierten miRNA Expression, um stabil exprimierte miRNAs zu erhalten, nutzten Takamizawa et al. Im Lungenkarzinom waren die Expressionslevel der *let-7* Familie *in vitro* und *in vivo* signifikant herunterreguliert. Über Konstrukte, die die reife miRNA von zwei *let-7*- Isoformen, *let-7a* und *let-7f*, unter der Kontrolle eines Polymerase III H1-RNA Promotors synthetisierten, transfizierten sie *let-7* in Lungenkrebszellen, die daraufhin ein vermindertes Zellwachstum zeigten (Takamizawa et al. 2004).

1.7.2 Anti-mikroRNAs

Anti-mikroRNA-Oligonukleotide (AMOs) wurden generiert, um direkt mit den endogenen miRNAs zu interagieren (Weiler et al. 2006). Jedoch zeigte sich, dass die Effizienz unmodifizierter AMOs gering war. In Folge dessen wurde über Modifikationen dieser AMOs (Verwendung von 2'-O-Methyl- und 2'-O-Methoxyethyl-Gruppen) versucht, die Effizienz und die Stabilität der Inaktivierung von miRNAs zu erhöhen.

2'-O-Methyl Anti-mikroRNA Oligonukleotide (2'-OME-AMOs)

Die miR-125b wurde über 2'-OME-AMOs in PC-3- und HeLa-Zellen herunterreguliert, was zu einer Reduktion der Zellproliferation in beiden Zelllinien führte (Lee et al. 2005). Bibliotheken von 2'-O-Methyl-Anti-miRNA Oligonukleotid-Inhibitoren wurden angelegt, um die miRNAs zu identifizieren, die die Zellproliferation und Apoptose beeinflussen. Die Effizienz dieser miRNA Inhibitoren wurde ermittelt, indem eine miRNA-Bindungsstelle in die 3'-untranslatierte Region eines Luziferase Reporters kloniert wurde. Die miRNA-Inhibitoren unterdrückten somit die Reporter-Gen-Aktivität (Cheng et al. 2005).

Auch wenn die Hemmung von miRNAs *in vitro* und *in vivo* erfolgreich ist, weist die Methode der 2'-OME-AMOs Limitierungen auf. Eine direkte Messung der Hemmung von miRNAs ist schwierig, da aufgrund der Entstehung von miRNA-Duplizaten keine Degradation induziert wird. Die einzige Möglichkeit, die Effizienz der AMOs nachzuweisen, besteht in der Messung der Expressionshöhe eines Reportergens, welches die Zielsequenz der miRNA in regulatorischen Bereichen enthält. Die Gruppe um Carlos Croce zeigte jedoch, dass auch die externe Zugabe der miRNA in Gegenwart des 2'-OME-AMOs den *Knockdown* nicht rückgängig machen kann (Garofalo & Croce 2011). Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass jede miRNA mehrere hundert mRNAs als Target besitzt. Diese Regulation könnte dafür verantwortlich sein, dass adverse oder keine zielgerichteten Effekte durch eine miRNA-vermittelte Therapie sichtbar werden (Garofalo & Croce 2011).

2'-O-Methoxyethyl Anti-mikroRNA Oligonukleotide (2'-MOE-AMOs)

2'-MOE-modifizierte Oligonukleotide besitzen eine höhere Affinität und Spezifität zu RNAs. In einem Screening wurden insgesamt 86 miRNAs mittels MOE-AMOs in Präadipozyten inhibiert und daraufhin der Effekt der Adipozyten-Differenzierung charakterisiert. Der Vergleich des miRNA Expressionsprofils von differenzierten und nicht-differenzierten Adipozyten zeigte, dass eine miRNA, miR-143, am Differenzierungsprozess über die Regulation von ERK5 beteiligt war. Eine Behandlung mit MOE-AMO gegen die miR-143 inhibierte diesen Prozess (Esau et al. 2004).

LNA Antisense Oligonukleotide

Locked Nucleic Acids (LNA) sind eine Klasse von Nukleinsäure-Analoga, in denen die Ribose-Einheit mit einer zusätzlichen Methylenbrücke zwischen dem 2'-Sauerstoff- und dem 4'-Carbon-Atom modifiziert ist. Der Einbau der LNA Monomere in Oligonukleotide oder siRNA-Konstrukte erhöhte die Nukleaseresistenz signifikant, stabilisierte die Duplex-Struktur und verstärkte die Mismatch-Diskriminierung (Braasch et al. 2003). Pineau et al brachten über Lipofektion ein gegen miR-221 und miR-222 gerichtetes-LNA-modifiziertes Oligonukleotid in Leberkarzinomzellen ein. Die Behandlung mit den sog. AntagomiRs (AntiMiRs) führte zu einer Reduktion des Zellwachstums in den Zelllinien. Der Einsatz von synthetischen Inhibitoren gegen miR-221 könnte ein vielversprechender Ansatz bei der Behandlung von Leberkarzinomen darstellen (Pineau et al. 2010). Ein über LNA-vermittelter miR-221 und miR-222 *knockdown* erhöhte die p27^{Kip1} Expression und reduzierte die Klonogenität humaner PC3- Zellen (Galardi et al. 2007). Elmen et al. zeigten erstmals in nicht-humanen Primaten, dass die einfache systemische Abgabe einer unkonjugierten LNA-

AntimiR wirksam die in der Leber exprimierte miR-221 antagonisiert. Verabreichung der LNA-AntiMir über intravenöse Injektionen in afrikanische grüne Meerkatzen resultierte in der Ausbildung von stabilen Heteroduplices zwischen der LNA-AntimiR und der miR-221. Diese Ergebnisse heben den Nutzen von systemisch verabreichten LNA-AntimiRs bei der Erforschung der miRNA-Funktionen in Primaten hervor, und zeigen das Potenzial dieser Strategien als neue Klasse von Therapeutika für krankheits-assoziierte miRNAs (Elmen et al. 2008).

mikroRNA „Sponge“ Technologie

Ebert et al. nutzten die sogenannten ‚miRNA sponges‘, um die Interaktion zwischen den miRNAs und deren Zielgenen zu inhibieren. Diese ‚sponges‘ sind synthetische mRNAs mit multiten Bindungsstellen für miRNAs, welche wie Schwämme die korrespondierenden mRNAs anziehen und so die miRNA-Zielgen Interaktion inhibieren sollen. *In vitro* zeigten sie vergleichbare Ergebnisse wie die chemisch-modifizierten AMOs, jedoch muss ihre Funktionalität *in vivo* noch aufgeklärt werden (Ebert et al. 2007).

1.8 Das Medulloblastom

Das Medulloblastom (MB) ist ein primärer Tumor des Zentralnervensystems (ZNS), der aus Gewebe des sich entwickelnden Gehirns oder Rückenmarks entsteht. Es gehört zur Familie der „primitiven neuroektodermalen Tumore“ (PNET), die aus extrem unreifen und undifferenzierten Zellen des ZNS hervorgehen. MBs sind für mehr als 25% der Krebs-assoziierten Todesfälle bei Kindern verantwortlich. Es gibt eine Inzidenz von fünf Neuerkrankungen pro 1.000.000 Kinder (Farwell et al. 1984). Mit ca. 25% aller ZNS-Tumore ist das Medulloblastom der häufigste maligne solide Tumor im Kindesalter mit einem Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen dem fünften und siebten Lebensjahr. Jungen sind häufiger betroffen als Mädchen (Geschlechterverhältnis etwa 1,5:1). Das Behandlungskonzept für Patienten mit einem Medulloblastom beinhaltet die neurochirurgische Tumorentfernung, Bestrahlung und eine Chemotherapie. Auch wenn die Fortschritte in der Strahlenonkologie und Chemotherapie zu einer stetigen Verbesserung der Überlebensraten führen, sind die Spätfolgen wie Morbidität und therapiebedingte

Nebeneffekte (z.B. Hörverlust, intellektuelle Defizite, Kleinwuchs) enorm (Gajjar et al. 2006). Medulloblastome können in wenigen Fällen über den Liquorweg zur Bildung von Metastasen innerhalb des Zentralnervensystems und außerhalb des ZNS in Knochen und Knochenmark disseminieren, was mit einer sehr schlechten Prognose einhergeht (Pizer & Clifford 2009). Bei Kindern und Jugendlichen mit einem Medulloblastom beträgt die Überlebensrate nach 5 Jahren insgesamt über 50%, bei Kinder ohne Metastasen werden Überlebensraten bis zu 80 bis 90% erreicht (Gilbertson & Ellison 2008).

1.8.1 Klassifizierung der Medulloblastome

Medulloblastome entstehen aus undifferenzierten embryonalen Vorläuferzellen. Nach der Klassifizierung der World Health Organization (WHO) 2007 gibt es fünf histopathologische Untergruppen von Medulloblastomen (Übersicht in Gilbertson & Ellison 2008) Medulloblastome mit wenigen differenzierten Neuronen, desmoplastische Medulloblastome, bei denen Tumorzellen Differenzierung zeigen und von einer extrazellulären Matrix umgeben sind, Medulloblastome mit Nodularität, anaplastische Medulloblastome und anaplastische großzellige Medulloblastome.

Über mRNA- Expressionsprofile von humanen MBs wurden vier Subgruppen von Medulloblastomen mit distinkten mRNA Signaturen identifiziert (Ferretti et al. 2005; Kool et al. 2008; Northcott et al. 2011; Thompson et al. 2006). Diese molekularen Subtypen unterscheiden sich in Bezug auf die zugrunde liegenden Signaltransduktionswege, die in MBs fehlreguliert sind, und beinhalten Veränderungen im Wnt-, Shh-Signalweg, im Myc-Signalweg und in bisher nicht-identifizierten genetischen Abnormitäten. Molekulare Veränderungen dieser Signalwege beinhalten sowohl *loss-of-function* und *gain-of-function* Mutationen, als auch Veränderungen der Signalweg-Regulatoren auf mRNA- und Proteinebene.

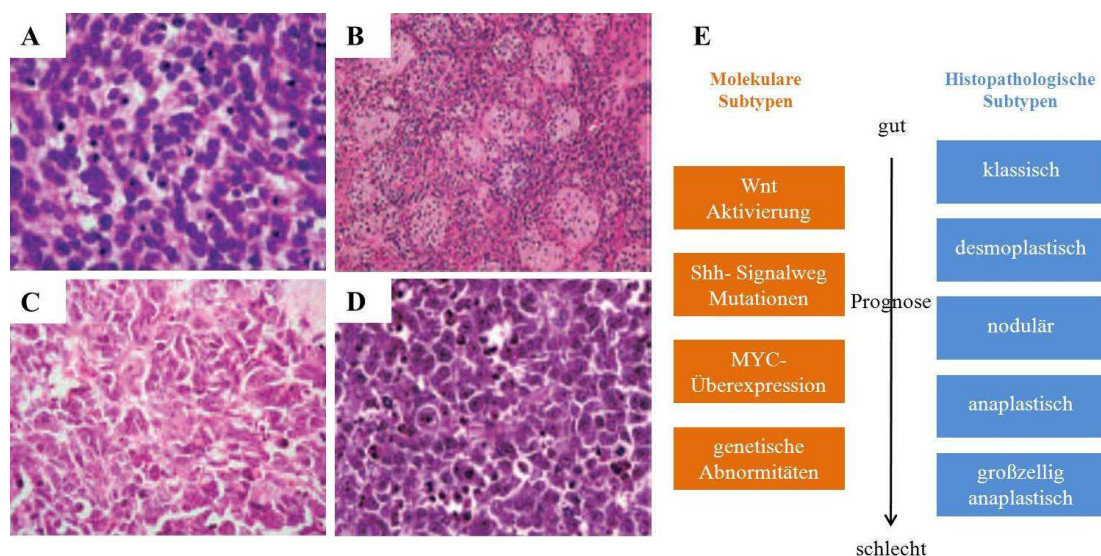


Abb. 6: Klassifizierung der humanen Medulloblastome.

modifiziert nach (Hatten & Roussel 2011)

- A – klassisches MB; charakterisiert durch viele uniforme Zellen mit großen Nuklei
- B – noduläres/ desmoplastisches MB
- C – anaplastisches MB; polymorphe Zellen; starke Apoptose
- D – großzelliges anaplastisches MB; Gruppe von großen Zellen mit vesikulären Nuklei und einem Nukleolus
- E – Subtypen der MB werden durch Histopathologie oder nach molekularen Marker definiert

Der Shh/ Ptch Signaltransduktionsweg im Medulloblastom

Medulloblastome mit Mutationen im *Sonic Hedgehog/ Patched*-Signalweg repräsentieren ~25% aller MBs. Das Mitogen *Sonic Hedgehog* (Shh) bindet mit hoher Affinität an den Transmembranrezeptor *Patched* (Ptch), der aus zwei Isoformen, Ptch1 und Ptch2 besteht (Hatten 1999). Durch diese Bindung verliert Ptch seine inhibierende Wirkung auf *Smoothened* (Smo), ein sieben-transmembranales, G-Protein gekoppeltes Rezeptorprotein, das die Transkriptionsfaktoren Gli1 und Gli2 aktiviert und den transkriptionalen Repressor Gli3 inaktiviert (Wechsler-Reya & Scott 2001). Aktivierung des Shh-Signalwegs induziert die Cycline D1 und D2, die an der Regulierung des Zellzyklus und an der Expression von MYCN beteiligt sind. MYCN unterdrückt die Expression von zwei Cdk-hemmenden Proteine, p18^{Ink4c} und p27^{Kip1}. Diese induzieren die Phosphorylierung der tumorsuppressiven Proteine Rb und p107, was in einer Progression des Zellzyklus resultiert (Knoepfler et al. 2002; Zindy et al. 2007). Rb und p107 sind für die normale cerebrale Entwicklung und für das Überleben von granulären cerebralen Progenitorzellen (GCPs) essentiell. Gewebsspezifische Inaktivierung von Rb bei gleichzeitigem Fehlen von p53 induziert in Mäusen Medulloblastome (Behesti & Marino 2009; Marino et al. 2000). *Loss-of-function* Mausmodelle, in denen Ptch1 in der Keimbahn deletiert ist, zeigen, dass ein Verlust von Ptch1 Medulloblastome induziert. Diese Tumore ähneln histopathologisch dem

desmoplastischen MB (Goodrich et al. 1997; Lee et al. 2003b; Marino et al. 2000; Oliver et al. 2005). Mitglieder der MYC-Familie sind in Medulloblastomen überexprimiert (Eberhart et al. 2004; Swartling et al. 2010). Ektope Expression von MYC/MYCN in GCPs induziert in $p53^{-/-}$ oder *Ptch1* heterozygoten Mäusen Medulloblastome mit 100 %iger Inzidenz nach orthotoper Transplantation in naive Empfängertiere (Zindy et al. 2007). Diese Studien belegen die zentrale Rolle für Mitglieder der Myc-Familie während der MB-Pathogenese (Swartling et al. 2010). Blockieren des Shh-Signalweges inhibiert die Proliferation und das Überleben von MB-Zellen und stellt so ein potentielles therapeutisches Ziel in der MB-Behandlung dar (Blazek et al. 2007; Bommer et al. 2007).

Der Wnt-Signalweg im Medulloblastom

Der Wnt-Signalweg wird aktiviert, wenn Wnt an den sieben-Transmembranrezeptor *Frizzled* bindet, der das Protein *Disheveled* aktiviert. *Disheveled* hat zwei Funktionen: Hemmung der β -Catenin-Aktivierung und Regulierung der Aktin-Stressfasern. β -Catenin ist Teil eines Komplexes, der aus der Kinase GSK-3 β , Axin1 und 2, APC und CK1a besteht. Deregulierung des Signalweges tritt in 10-15% der humanen MBs auf (Gibson et al. 2010; Gilbertson & Ellison 2008). Mutationen in APC induzieren eine konstitutive Aktivierung des nuklearen β -Catenins, das über Bindung an den Transkriptionsfaktor TCF/LEF die Transkription der Targets Cyclin D1 und c-Myc induziert (Marino 2005). Mutationen in β -Catenin wurden auch im humanen Medulloblastom gefunden (Thompson et al. 2006). Neben der aktivierenden Mutation von β -Catenin zeigten diese MBs auch einen Kopienverlust des Chromosoms 6. Monosomie 6 repräsentiert einen prognostischen Faktor der Wnt-Tumor-Subgruppe, die mit einem guten Überleben korreliert (Gajjar et al. 2006).

Notch2-induzierte Signalwege im Medulloblastom

Notch Signalwege sind an der Stammzellerneuerung, Zelldetermination und an der Proliferation beteiligt. Interzelluläre Notch Signalwege werden durch das Zusammenspiel zweier Zelltypen aktiviert, wobei die eine Zelle die membrangebundenen Liganden Delta1-4 und Jagged exprimiert, welche wiederum auf der anderen Zelle eine Aktivierung der Transmembranrezeptoren Notch1-4 bewirken. Studien weisen Notch1 keine Rolle bei der MB-Entstehung zu, jedoch ist eine hohe Expression von Notch2 in humanen MBs detektierbar. Aktivierung von Notch2 unterstützt die GCP-Neurogenese und Defekte von Notch2 während der GCP-Neurogenese sind mit Medulloblastomen assoziiert (Fan et al. 2004; Julian et al. 2010; Solecki et al. 2001)

BMPs als negativ Regulatoren im Medulloblastom

BMP-vermittelte Signalwege inhibieren die Proliferation und induzieren postnatal die Differenzierung von GCPs und GCP-ähnlichen Tumorzellen (Massague 1996; Massague et al. 2005). Einige Studien zeigten, dass sich in der postnatalen Kleinhirnentwicklung und in Shh-getriebenen MBs BMPs negativ gegen die Shh-induzierte Proliferation richten. Dadurch induzieren sie irreversible neuronale Differenzierung (Rios et al. 2004). BMP2 antagonisiert die Shh-abhängige Proliferation durch TIEG-1 Expression. TIEG-1 reprimiert die MYCN-Expression (Alvarez-Rodriguez et al. 2007). TIEG-1-Überexpression führt zu Zellzyklusarrest und zur Induktion von Apoptose in den GCPs (Ben-Arie et al. 1997; Helms et al. 2000). Hemmung der Transkriptionsfaktoren Atoh1/Math1, welche für proliferierende GCPs spezifisch sind, vermindert die MB-Formierung, wohingegen die Überexpression die Differenzierung induziert. BMP-Signalwege antagonisieren somit über Blockade der Zellteilung die Shh-Signaltransduktionswege und induzieren terminale neuronale Differenzierung über Mechanismen, bei denen Veränderungen die Expressionshöhe an Atoh1 entscheidend sind. Gene, die den BMP-Signalweg regulieren, sind in murinen und humanen MBs herunterreguliert. BMPs können als potente Inhibitoren gegen Medulloblastome fungieren (Ayrault et al. 2010; Zhao et al. 2008).

1.8.2 Etablierte Mausmodelle des Medulloblastoms

Die geläufigsten und am meisten genutzten Mausmodelle des Medulloblastoms rekapitulieren MBs der Shh-Subgruppe. Inaktivierung des Tumorsuppressorgens Ptch oder Expression einer konstitutiven Form des Proto-Onkogens Smo induzieren spontan Medulloblastome *in vivo* (Goodrich et al. 1997; Hallahan et al. 2004; Hatton et al. 2008; Weiner et al. 2002). Die entstandenen Tumore zeigen ein molekulares Profil, das ein Shh-getriebenes humanes Medulloblastom widerspiegelt (Hallahan et al. 2004; Pomeroy et al. 2002).

Um die Effekte eines Verlustes von Ptch *in vivo* zu erforschen, wurde die *ptch^{neo67} knockout* Maus generiert. In der Mauslinie sind die Exone 6 und 7 durch eine Neomycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Homozygote Inaktivierung von Ptch führte aufgrund von Entwicklungsstörungen, wie Neuralrohr- und Herzdefekten zu einer frühen embryonalen Letalität (9. bis 10. embryonaler Tag) (Goodrich et al. 1997; Hahn et al. 1998). Heterozygote *ptch* Mäuse entwickeln mit einer Inzidenz von 8% in einem Alter von 12 Wochen und mit 30% zwischen der 12. und 25. Woche spontan Medulloblastome. Klinische Symptome wie

Ataxie, Verlust der Pflegegewohnheiten und Kopfschiefhaltung sind zu beobachten. Heterozygote *ptch* Mäuse entwickeln nicht nur MBs, sondern auch mit hoher Inzidenz Rhabdomyosarkome (RMS) und Basalzellkarzinome (Goodrich et al. 1997; Wetmore et al. 2000). Verlust von p53 beschleunigt die Entstehung und die Inzidenz von Medulloblastomen, bei homozygoten Tieren zeigt sich eine 95%ige Inzidenz im Alter von 12 Wochen (Wetmore et al. 2000). Die Inaktivierung von p53 führt zur genetischen Instabilität und nachfolgend zu genetischen Alterationen, die zur Tumor-Transformation führen (Dyer 2004; Raffel 2004). Kimura et al. zeigten, dass Medulloblastome aus *ptch* Mäusen eine hohe Expression von Gli1, aber nicht von Gli2, zeigen. Die Tumorzinzidenz der *ptch*^{+/-} Tiere war vergleichbar mit der von *ptch*^{+/-}; Gli1^{+/-}, was daraufhin deutet, dass eine Haploinsuffizienz nicht entscheidend war. Dennoch wiesen *ptch*^{+/-}; Gli1^{+/-} eine gesteigerte Gli2 Expression auf. Erhöhte Expression an Gli2 könnte somit eine erniedrigte Expression von Gli1 kompensieren. Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression des Gli1^{+/-} - Transkriptes aus *ptch*^{+/-}; Gli1^{+/-} in MBs gemessen. Die Gli2 Expression war erhöht, da Gli1 ein Target von Gli2 ist (Kimura et al. 2005).

Swartling et al. untersuchten die Rolle von MYCN im Medulloblastom *in vivo*. Um zu zeigen, dass eine Fehlexpression von MYCN die Entstehung von Medulloblastomen initiieren kann, wurde MYCN zielgerichtet unter der Kontrolle des Tet-Systems im Kleinhirn exprimiert. Die entstandenen Tumore zeigten die Pathologie von „klassischen“ oder „großzellig anaplastischen“ Tumoren. Sie demonstrierten, dass über MycN - unabhängig von Shh - Medulloblastome induziert werden können (Swartling et al. 2010).

Transgene Mausmodelle, die eine aktivierte Form von Smo nutzen, wurden ebenfalls generiert. Die Mutation befindet sich in der sieben Transmembrandomäne von Smo und resultiert in einer Shh-Liganden unabhängigen Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege. Das SmoM2-Modell nutzt ein ubiquitär exprimiertes CreER Transgen, um das mutierte SmoM2 über Tamoxifengabe zu induzieren und den Signalweg zu aktivieren. Die sporadische Cre-Aktivität allein resultiert in diesem System in einer 27%igen Tumorzinzidenz (Mao et al. 2006).

Das SmoA1-Mausmodell bedient sich des NeuroD2 (ND2) Promotors, um die SmoA1 Expression in cerebralen granulären neuronalen Progenitorzellen zu steuern. Transgene Mäuse, bei denen die aktive Form des Smo-Gens spezifisch in GNPs überexprimiert ist, bilden mit erhöhter Frequenz Medulloblastome aus und zeigen eine frühe granuläre Zellhyperproliferation. Es wurden drei Linien von ND2:SmoA1 transgenen Mäuse mit unterschiedlicher Expressionshöhe etabliert. Die Linie mit dem höchsten Expressionsniveau entwickelt Medulloblastome mit einem Altersmedian von 25,7 Wochen und fast 50%iger

Inzidenz. In Linien mit einer niedrigeren Transgen-Expression wurden keine Tumore beobachtet. Eine hohe Expression von aktiviertem Smo ist demnach für die Aktivierung des Shh-Signalweges essentiell (Hallahan et al. 2004). In homozygoten Smo/Smo Mäusen konnten Hatton et al zeigen, dass die Inzidenz auf 94% erhöht ist, bei einem Altersgipfel von 2 Monaten (Hatton et al. 2008). Lee et al. untersuchten die Ereignisse, die der Tumorentstehung vorausgehen und analysierten dazu pathologische Veränderungen im Cerebellum 8 Wochen alter SmoA1-Mäuse. In 80% der Mäuse mit hoher Expression des Transgens konnte dabei exzessive granuläre Zellproliferation gefunden werden (Lee et al. 1997). Das SmoA1-Mausmodell ist ein Modell mit einer hohen Inzidenz an Tumorbildung, die keinen p53 Verlust oder andere genetische Mutationen aufweisen. Dadurch wird es ermöglicht, die Krankheitsprogression schon in frühen Stadien zu beobachten und auch neue Behandlungsmöglichkeiten zu testen.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die Rolle der miR-34a in der Tumorgenese, insbesondere in der Pathogenese des Medulloblastoms, zu charakterisieren und ihr mögliches Potential als therapeutisches Target zu beurteilen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welche Bedeutung hat die mikroRNA-34a in der Entwicklung eines Gesamtorganismus?

Diese Fragestellung wurde anhand der Analyse transgener knockout Mäuse, die eine Deletion im miR-34a Gen besitzen, untersucht. Um einen Überblick über die physiologische Rolle der miR-34a in der Entwicklung und im adulten Organismus zu erhalten, und mögliche phänotypische Auffälligkeiten aufzudecken, durchliefen die knockout Mäuse zunächst eine aufwändige phänotypische Charakterisierung in Kooperation mit der „German Mouse Clinic“.

2. Welche Bedeutung hat diese tumorsuppressive miRNA für die Tumorentstehung?

Zur Beurteilung der Auswirkungen eines miR-34a-Knockouts wurden drei Gruppen von Mäusen über einen längeren Zeitraum beobachtet. Wildtyp, hetero- und homozygote Tiere wurden gezüchtet und auf Auffälligkeiten und spontaner Tumorentwicklung hin untersucht.

3. Welche Bedeutung hat die miR-34a als Regulator der Medulloblastom- Progression?

Die funktionelle Bedeutung und der Effekt einer miR-34a Reexpression wurde in vitro im Hinblick auf die Viabilität, die Proliferation, das Seneszenz- und das Apoptose-Verhalten von Medulloblastomzellen untersucht. Mittels Western Blot-Analysen sollte aufgezeigt werden, welche Wirkung eine miR-34a-Überexpression auf die Expression bekannter Zielgene ausübt. In vivo wurde die Medulloblastomentstehung in transgenen Mausmodellen in Ab- und Anwesenheit von miR-34a untersucht und die entstandenen Tumore im Hinblick auf miRNA-regulierte Moleküle auf Proteinebene verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Agarose	Peqlab (Erlangen)
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich (USA)
Ampicillin- Natriumsalz	Sigma Aldrich (USA)
Amphotericin	Invitrogen (Karlsruhe)
β- Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (USA)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	J.T. Baker Chemicals (Niederlande)
complete, Mini Protease Inhibitoren	Roche (Mannheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dithioerythritol (DTE)	Sigma Aldrich (USA)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Sigma Aldrich (USA)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA (Pasching)
Forene 100%	Abbot (Wiesbaden)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)- ethansulfonsäure (HEPES)	Roth (Karlsruhe)

Isopropanol	Sigma Aldrich (USA)
L- Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Luminol	Sigma Aldrich (USA)
Magermilchpulver	Saliter
Methanol	VWR International (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Promega (Mannheim)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich (USA)
nicht- essenzielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen (Karlsruhe)
NP-40	Sigma Aldrich (USA)
Opti- MEM I	Invitrogen (Karlsruhe)
OrangeG	Chroma- Gesellschaft (Köngen)
Paraformaldehyd 4,5%	Morphisto (Frankfurt am Main)
p- Coumarsäure	Sigma Aldrich (USA)
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin- Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
PhosSTOP Phosphatase Inhibitoren	Roche (Mannheim)
PonceauS	Serva (Heidelberg)
Propidiumiodid	Sigma Aldrich (USA)
Qiazol	Qiagen (Hilden)
Rinderserum Albumin (BSA)	New England Biolabs (Frankfurt)
Rotiphorese Gel 30	Roth (Karlsruhe)
RotiQuant	Roth (Karlsruhe)
Tätowierungs- Tinte	Starbrite Colors (USA)
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Serva (Heidelberg)
Thiazolylblau	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
TritonX-100	Merck (Darmstadt)
Tween-20	Roth (Karlsruhe)
Trypsin/ EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Roth (Karlsruhe)

2.1.2 Geräte

Agarose- Gelelektrophoresekammern	Peqlab (Erlangen)
Allegra X-22R Zentrifuge	Beckmann Coulter (Krefeld)
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Biodoc Analyzer Geldokumentation	Biometra (Göttingen)
CO ₂ Inkubator	Biomedis (Gießen)
Cytomics FC500	Beckman Coulter (Krefeld)
EL-800 Microplate Reader	Bio-Tek Instruments (Bad Friedrichshall)
Enduro 250V Power Supply	Labnet (Ried im Innkreis)
Fusion FX7	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
GFL 3005 Schüttler	Heidolph (Schwabach)
Laborwaage EW420-3NM	Kern & Sohn (Balingen- Frommen)
Mikro22R Kühlzentrifuge	Hettich (Kirchlengern)
Mini- PROTEAN 2 Westernblotzubehör	Biorad (München)
Modulus Microplate Reader	Turner Biosystems/ Promega (Mannheim)
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab (Erlangen)
Multipette Stream	Eppendorf (Hamburg)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
RM5- Assistant Rollschüttler	Braun (Melsungen)
Rotixa 50 RS Zentrifuge	Hettich (Mühlheim a. d. Ruhr)
Rührer	IKA Labortechnik (Staufen)
Schüttelwasserbad	GFL (Burgwedel)
StepOne Plus Real- Time- PCR	Applied Biosystems (USA)
Sterilbank HERA-Safe HS12	Heraeus (Hanau)
Thermal Cycler C1000	Biorad (München)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5415D + Rotor	Eppendorf (Hamburg)
Vortex	Heidolph (Schwabach)
Z1 Coulter Partikel Counter	Beckmann Coulter (Krefeld)
Zellkulturbank	Gelaide Flow Laboratories (Meckenheim)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Combitips (0,5; 2,5; 5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Cryoröhrchen	Simport (Kanada)
Einwegpipetten (2ml; 5 ml; 5 ml; 10 ml)	Greiner bio- one (Frickenhausen)
Eppendorfgefäße (0,2; 1,5; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Injekt-F 1 ml Einmalspritzen	Braun (Melsungen)
Kanülen 0,4 mm Durchmesser	Braun (Melsungen)
Parafilm	Pechinery (USA)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
PCR- Tubes	Axygen (USA)
Pinzetten	Finescience Tools (Heidelberg)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg)
PMMA- Einmalküvetten	Roth (Karlsruhe)
PP- Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner bio- one (Frickenhausen)
Protran Nitrozellulose	GE Healthcare (Freiburg)
Ohrlochzange	Finescience Tools (Heidelberg)
Scheren	Finescience Tools (Heidelberg)
Skalpelle	Servopax (Wesel)
Zentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter (Krefeld)
Zellkulturflaschen (25cm ² ; 75cm ²)	Corning (Kaiserslautern)
Zellkulturschalen (96- Loch; 6- Loch)	Corning (Kaiserslautern)
Zellschaber 28cm	Greiner bio- one (Frickenhausen)
Zellulose Blot Papier 3mm dick	GE Healthcare (Freiburg)

2.1.4 Kits

BrdU Cell Proliferation ELISA	Roche (Mannheim)
Cell Death Detection Kit	Roche (Mannheim)
Cellular Senescence Assay Kit	Biocat (Heidelberg)
ECL Plus Western Blotting Detection	GE Healthcare (Freiburg)

miRNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
miScript Reverse Transcriptase Kit	Qiagen (Hilden)
miScript SYBR Green PCR-Kit	Qiagen (Hilden)
peqGold Tissue DNA Kit	Peqlab (Erlangen)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.5 Enzyme

HiPerfect Transfektionsagenz	Qiagen (Hilden)
GoTaq Hot Start Polymerase (+5x Puffer)	Promega (Mannheim)
Nukleotid- Mix (dNTP)	Bio- Budget (Krefeld)
Proteinase K	Peqlab (Erlangen)
RNAse A	Peqlab (Erlangen)
<i>Taq</i> - DNA-Polymerase	GE Healthcare (Freiburg)

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Firma	eingesetzte Verdünnung
anti-β- Aktin (A5441)	Sigma- Aldrich (USA)	1:2000
anti- c- Myc (#9402)	Cell Signalling (Frankfurt am Main)	1:1000
anti- DLL1 (ab85346)	Abcam (UK)	1:500
anti- E2F3 (ab11843)	Abcam (UK)	1:1000
anti- Gapdh	Millipore (Schwalbach)	1:2000
anti- N-Myc (#9405)	Cell Signalling (Frankfurt am Main)	1:500
anti- N- Myc (sc-53993)	Santa Cruz (Heidelberg)	1:200
anti- p53 (sc-71817)	Santa Cruz (Heidelberg)	1:500
anti- SIRT1 (#2310)	Cell Signalling (Frankfurt am Main)	1:1000
anti- SIRT1 (#2028)	Cell Signalling (Frankfurt am Main)	1:1000

Main)

Sekundärantikörper	Firma	eingesetzte Verdünnung
anti- mouse IgG HRP (NA9340V)	GE Healthcare (Freiburg)	1:2000
anti- rabbit IgG HRP (NA9340V)	GE Healthcare (Freiburg)	1:2000
anti- goat IgG HRP (ab97110)	Abcam (UK)	1:2000

2.1.7 Plasmide

Der in dieser Arbeit genutzte Vektor, pEZX-MR04, der Firma GeneCopoeia kodiert für einen eGFP Reporter, dem ein miRNA-Gen nachgeschaltet ist. Der eGFP Reporter ermöglicht die Kontrolle der Transfektions- oder Transduktionseffizienz. Dieser steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Der Vektor dient zur quantitativen Analyse von miRNAs, die einen Einfluss auf die Genregulation besitzen. Das Plasmid besitzt als Selektionsmarkter ein Ampicillin-, sowie ein Puromycinresistenzgen und verfügt des Weiteren über einen Replikationsursprung (pUC Ori) zur Replikation in Bakterien. Dem miRNA-Gen nachgeschaltet befindet sich ein „SV40 polyA“ Signal“ zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Abbildung 7 stellt die schematische Darstellung der Vektorkarte dar.

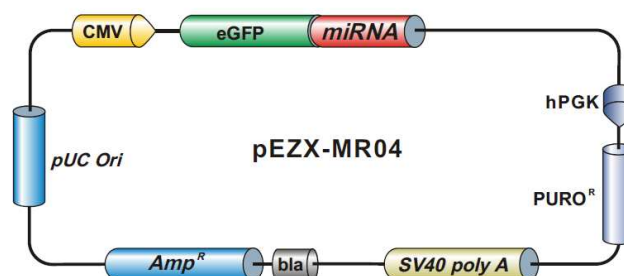


Abb. 7: Vektorkarte von pEZX-MR04.

(GeneCopoeia Datenblatt)

2.1.8 Oligonukleotide

Zur PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten aus transgenen Mäusen wurden die Oligonukleotide von der Firma MWG-Operon bezogen.

	Sequenz 5' – 3'	Produktlänge	Annealing-Temp.
β -Aktin	fwd: ACAAGGTCAAACTCAGCAACAAGT rev: GCTGAGAGGGAAATTGTTTATTACA	189 bp	56°C
miR-34a cond	fwd: CTCAGCCATCCTGTTGAGG rev: GATGTGAAACAACAGCGACC	407 bp	60°C
miR-34a conv	fwd: CTCAGCCATCCTGTTGAGG rev: CTCAGGCAGAGTTGCAT	257 bp	60°C
Gen-Cre	fwd: ACGACCAAGTGACAGCAATG rev: CTCGACCAGTTTAGTTACCC	350 bp	61°C
Flpe	fwd: CACCTAAGGTCCTGGTTCGTCA rev: CCCAGATGCTTTCACCCTCACT	343 bp	61°C
ptch ^{+/-}	Neo-L: AGTGCCAGCGGGGCTGCTAAA Pst4KF: GGGAGGGGATTTTCAGCAGAATGTT mPTC11R: CTGCCTGTTATGTGGTTCAAACCG	400 bp	60°C
SmoA1	fwd: AATCTCTGCTTTTCCTGCGTTGGG rev: CTCGGTCATTCTCACACTTG	700 bp	62°C

Primer für quantitative *Real-time*-PCR

	Cat.-Nummer	Firma
Hs_RNU6B_1	MS00007497	Qiagen
Hs_miR-34a_1	MS00003318	Qiagen
Mm_miR-34a_1	MS00001428	Qiagen

Primer zur Herstellung der 5'-, 3'- und Neo- Sonde

	Primer	5' -3'-Sequenz
5'-Sonde	fwd	GCTGAAGGTGGGGCCTCAGCCAATC
	rev	TCTGCTCCCAGGGCTGCGCGTCACC
3'-Sonde	fwd	TCTAGGTCCCTGCCCCTACCAATC

	rev	AGCACCATGGGCTAAACTAGGCTC
neo-Sonde	fwd	ATGGGATCGGGATTG
	rev	GCTCGATGCGATGTTTC

2.1.9 Größen- und Molekulargewichtsmarker

DNA-Größenmarker

100bp DNA Leiter (Invitrogen)

Banden bei (bp):

100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900,
1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2070

Protein-Molekulargewichtsmarker

“Page Ruler Unstained Protein Ladder”
(Thermo Scientific)

Banden bei (kDa):

10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120,
150, 200

2.1.10 Mauslinien

Mausstamm

bereitgestellt durch:

C57BL/6-Tg(Neurod2-Smo*^{A1})199Jols/J

James Olson, Fred Hutchinson Cancer Research
Center (USA)

ptch^{+/-}

Heidi Hahn, Institut für Humangenetik; Georg-
August-Universität Göttingen

miR-34a ko

Schramm/ Schulte, Uniklinikum Essen:
Kinderklinik 3

C57Bl/6N

Taconic Artemis (Köln)

2.1.11 Häufig verwendete Medien und Lösungen

2.1.11.1 Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

50x TAE:	2 M TRIS Base 127 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt ad 1000 ml aqua deion.
Laufpuffer:	1x TAE 0,5µg/ml EtBr
5x DNA- Probenpuffer:	5 ml Glycerin 0,2 ml 50x TAE 0,01g (0,001%) Orange G ad 10 ml aqua deion.

2.1.11.2 Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten

RIPA-Puffer:	50 mM pH 7,4 HEPES 150 mM NaCl 1% Triton X-100 1% NP 40 0,1% SDS 5 Tabl. PhosSTOP Phosphatase Inhibitoren (mini) 5 Tabl. cOmplete Protease Inhibitoren (mini) ad 50ml aqua deion.
4x LDS-Ladepuffer:	0,666 g Tris/HCl 0,682 g Tris Base 0,8 g LDS 0,006 g EDTA 3 g Glycerin 0,75 ml 1% Coomassie 0,25 ml 1% Phenolrot ad 10 ml aqua deion.

bei -20°C aufbewahren

hinzufügen von β - Mercaptoethanol: 50 μ l auf 500 μ l 4x LDS- Ladepuffer

Upper 4x TrisCl/ SDS pH 6,8 Buffer: 0,5 M Tris Base
0,4% SDS
ad 250 ml aqua deion.

Lower 4x TrisCl/ SDS pH 8,8 Buffer: 1,5 M Tris Base
0,4% SDS
ad 500 ml aqua deion.

10x GTS-Laufpuffer: 144,2 g Glicin
30,3 g Tris/ HCl
10 g SDS
ad 1000 ml aqua deion. (pH 8,3)

10x Transferpuffer: 250 mM TRIS Base
1,9 M Glycin
ad 1000 ml aqua deion.

1x Blotpuffer: 20% Methanol
ad 1000 ml 1x Transferpuffer

Blotto-Puffer: 25 g (5%) Trockenmilchpulver
50 mM TRIS- HCl
80 mM NaCl
2 mM CaCl₂
1 ml (0,2%) NP-40
ad 500 ml aqua deion.

PonceauS-Färbelösung: 0,13 mM Ponceau S
5% Essigsäure

TBS 10x: 87,6 g NaCl
60,5 g Tris-HCl, pH7,5
ad 1000 ml aqua deion.

1x TBS-T:	200 ml 10x TBS 4 ml Tween-20 ad 2000 ml aqua deion.
ECL-Detergenzien:	Stocklösung I: 250 mM Luminol (0,44 g/ 10 ml DMSO) 90 mM p- Coumarsäure (0,15 g/ 10 ml DMSO) aliquotieren und lagern bei -20°C Gebrauchslösung I: 2,5 mM Luminol (500 µl von Stocklösung I) 0,4 mM p- Coumarsäure (220 µl Stocklösung I) 100 mM Tris- HCl pH 8,5 (5 ml Tris- HCl pH 8,5) ad 50 ml aqua deion. dunkel lagern bei 4°C Stocklösung II: 1 M Tris- HCl pH 8,5 (60,57 g/ 500 ml aqua) lagern bei 4°C Gebrauchslösung II : 100 mM Tris- HCl pH 8,5 (5 ml Stocklösung II) ad 50 ml aqua deion. lagern bei 4°C

2.1.11.3 Medien für die Bakterienanzucht

LB-Medium :	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 g NaCl ad 950 ml aqua deion. mit 10 N NaOH auf pH 7 eingestellt ad 1000 ml aqua deion.
Amp-Medium:	100µg/ml Ampicillin in LB-Medium

2.1.11.4 Medien für die Zellkultur

HD-MB3:	RPMI- Medium 10% FCS 1% Amphotericin 1% Penicillin/ Streptomycin 1% NEAA
ONS-76:	RPMI- Medium 10% FCS 1% Amphotericin 1% Penicillin/ Streptomycin 1% L- Glutamin
UW-228, Daoy:	RPMI- Medium 10% FCS 1% Amphotericin 1% Penicillin/ Streptomycin
Einfriermedium:	10% DMSO 90% FCS
MTT-Reagenz:	0,1 mM Thiazolylblau ad 10 ml PBS
MTT-Lysereagenz:	10 g SDS 100 ml DMSO 0,6 ml Essigsäure 100 %

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA- Fragmenten

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 2%igen (w/v) Agarose-TAE-Gelen, die mit einer 1:20000 Verdünnung von Ethidiumbromid (Stammlösung: 1 mg/ml) versetzt wurden. Die aufzutragende DNA wurde mit 5-fachem Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt. Der Probenpuffer lieferte eine visuelle Kontrolle über das Laufverhalten des Gels. Zur Größenbestimmung wurden parallel DNA-Standards aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 100V. Die Auswertung der Agarosegele erfolgte an einem Geldokumentationsgerät der Firma Biometra.

2.2.1.2 Plasmid-DNA Aufreinigung im großen Maßstab (Maxi- Präparation)

Zur Gewinnung größeren Mengen gereinigter DNA in größeren Mengen wurde das Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. 250 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde sedimentiert und nach Angaben des Herstellers über die Ionenaustauschersäulen gereinigt. Die erhaltene DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.3).

2.2.1.3 Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Für die Messung genügte schon 1 µl einer Lösung. Um die Reinheit zu bestimmen, wurde zusätzlich eine photometrische Bestimmung bei 280 nm durchgeführt. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht 33 µg ssDNA/ml. Über den Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} ließ sich die Reinheit der DNA bestimmen. Der Idealwert liegt zwischen 1,8 und 2,0. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 µg ssRNA/ml. Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} sollte für eine reine RNA etwa 1,9 - 2,1 sein.

2.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien der Maus

Maximal 0,8 cm Mausschwanz wurden in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Isolierung genomischer DNA, wurde das peqGOLD Tissue DNA Kit der Firma Peqlab genutzt. Den Mausschwanzstücken wurde 400 µl DNA Lysis Buffer T und 20 µl Proteinase K sowie 15 µl RNase A (20 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 Sekunden gevortext und anschließend für 2-3 Stunden bei 50 °C in einem Thermoschüttler inkubiert. Der Lyseansatz wurde für 30 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 400 µl DNA Binding Buffer je 400 µl eingesetztem DNA Lysis Buffer T zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde auf die PerfectBind DNA Säule, die in einem 2ml Sammelgefäß steckte, geladen und für 1 Minute bei 10000 x g zentrifugiert. Nachdem der Säulendurchfluss verworfen wurde, wurde die Säule wieder in das Sammelgefäß eingesetzt und 650 µl des DNA Waschpuffers auf die Säule pipettiert. Nach erneuter 1-minütiger Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Säulendurchfluss verworfen und nochmals mit 650 µl Waschpuffer gewaschen. Um die PerfectBind DNA- Säule zu trocknen, wurde diese in ein neues 2 ml Collection Tube gegeben und 2 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gesteckt und 200 µl Elutionspuffer auf die Säule pipettiert und danach für 1 Minute bei 6000 x g zentrifugiert.

2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) (modifiziert nach Saiki et al., 1985)

Die PCR wird zur Vervielfältigung von spezifischen DNA- oder cDNA-Sequenzen verwendet. Künstlich synthetisierte Oligonukleotide (Primer) binden sequenzspezifisch an die Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Eine PCR besteht aus drei Schritten: Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation. Im ersten Reaktionsschritt der Amplifikation (Denaturierung) werden die Proben auf 95°C erhitzt, so dass das dsDNA-Template in ihre Einzelstränge dissoziiert. Die Proben werden im nächsten Schritt auf die erforderliche Anlagerungs- Temperatur heruntergekühlt. Diese ist abhängig von der Schmelztemperatur und dem GC-Gehalt der Primer. Die Primer lagern sich dabei an die Matrize an. Im dritten Schritt, der Elongation, synthetisiert die DNA-Polymerase die neuen DNA-Stränge bei einer Temperatur von 72°C. Die DNA-Polymerase besitzt die Fähigkeit einen zur einzelsträngigen DNA-Matrize komplementären Strang zu synthetisieren. Eine PCR besteht aus 30-40 Zyklen, wobei sich mit jedem Zyklus die Zahl der DNA-Doppelstränge verdoppelt, d. h. die DNA-Menge steigt exponentiell an.

DNA-Amplifikationen wurden auf einem Biorad Thermal Cycler C1000 durchgeführt. Für die Genotypisierung, bis auf für die PCR zur Genotypisierung der *ptch*-Mäuse, wurde folgendes Pipettierschema pro Probe verwendet:

Reaktionsansatz: 2 μ l genomische DNA
 10 μ l 5x PCR- Puffer
 2 μ l 25 mM MgCl₂
 1 μ l 10 mM dNTP- Mix
 1 μ l 20 pmol Oligonukleotid A
 1 μ l 20 pmol Oligonukleotid B
 0,25 μ l Taq- Polymerase
 Ad 50 μ l bidest Wasser

Die Genotypisierungs-PCR für das *ptch*^{+/-}-Allel hatte folgendes Pipettierschema:

Reaktionsansatz: 2 μ l genomische DNA
 10 μ l 5x PCR- Puffer
 2 μ l 25 mM MgCl₂
 1 μ l 10 mM dNTP- Mix
 1 μ l 20 pmol Pst4KF
 0,5 μ l 20 pmol Neo-L
 0,5 μ l 20 pmol mPtc11R
 0,25 μ l Taq- Polymerase
 Ad 50 μ l bidest Wasser

Alle PCRs liefen nach folgendem Programm ab, wobei die Anlagerungs-Temperatur von der Art der verwendeten Primer und die Elongationszeit von der Länge des zu amplifizierenden Fragments (1 Minute pro 1kb) abhängt:

	Temp. [°C]	Zeit [sek]	
	95	300	Denaturierung
30x	[95	Denaturierung
		55-65	Annealing
		72	Elongation
		72	600

Je 20 µl eines PCR-Ansatzes wurden anschließend über die Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.1.6 Isolierung von Gesamt- RNA

Die Isolierung von miRNA aus Zellkulturzellen und Gewebe erfolgte mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Für die RNA-Isolierung aus humanen Zelllinien wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70-80% in Zellkulturflaschen wachsen gelassen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 750 µl QIAzol und einem Zellschaber vom Boden der Flasche gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 140 µl Chloroform wurde das Gefäß für 15 Sekunden vorsichtig geschüttelt und anschließend für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Durch eine 15minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C wurde eine Phasentrennung erreicht, in der sich die miRNA in der wässrigen Phase befindet. Diese Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die miRNA mit 1,5 fachen Volumen Ethanol (100%) gefällt. Bis zu 700 µl der Probe wurde in eine miRNeasy Zentrifugationssäule, die in einem 2 ml Sammelgefäß steckte, pipettiert und für 15 Sekunden bei 8000 x g und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 700 µl RWT-Waschpuffer auf die Säulenmatrix pipettiert und erneut für 15 Sekunden und bei 8000 x g zentrifugiert. Für den zweiten und dritten Waschschrift wurden je 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und erst für 15 Sekunden, dann für 2 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Die Elution der miRNA erfolgte mittels 40 µl RNase freien Wassers in ein neues 1,5ml Zentrifugenröhrchen. Die Konzentration der miRNA wurde photometrisch gemessen (siehe Kapitel 2.2.1.3).

2.2.1.7 cDNA-Synthese

Das miScript Reverse Transkriptase Kit der Firma Qiagen wurde für die cDNA-Synthese aus der isolierten miRNA verwendet. Es wurden jeweils 800 ng bis 1 µg miRNA in variablen Volumina (durch „X“ gekennzeichnet) eingesetzt. Das folgende Pipettierschema wurde verwendet:

5x miScript RT- Puffer (enthält dNTPs und Primer)	4 µl
miScript Reverse Transkriptase Mix	1 µl
miRNA (800 ng bis 1 µg)	X µl
RNase freies Wasser	X µl

Gesamtvolumen

ad 20 μ l

Der gesamte Mix wurde für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reverse Transkriptase wurde anschließend bei 95°C für 5 Minuten inaktiviert.

2.2.1.8 Quantitative Real-Time PCR

In der Real- Time PCR kann die Anzahl gebildeter DNS- Kopien schon während des Reaktionsverlaufes, also nach jedem einzelnen Zyklus, erfasst werden. Dafür müssen sich Farbstoffe mit der neu gebildeten DNS verbinden und somit eine Bestimmung der Template-Menge erlauben. SYBR® Green ist ein interkalierender Farbstoff, der sich an die DNA anlagert. Durch die Bindung kann die Intensität der Fluoreszenz gemessen werden. Die Messung erfolgt am Ende des Elongationsschrittes, wenn die größte Menge an doppelsträngiger DNA präsent ist. Das fluoreszierende Signal ist dabei proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA. Es wurde das StepOne Plus Real-Time-PCR System von Applied Biosystems und die Oligonukleotide der Fa. Qiagen verwendet. Nach Herstellerangaben wurde weiter verfahren. Normiert wurde die Genexpression auf die Menge an RNU6B.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht und Passagieren von Zellen

Zellen, die in den Gewebekulturflaschen konfluent gewachsen sind, mussten auf neue Kulturflaschen verteilt werden. Die Ablösung der Zellen erfolgt nach Waschen mit PBS durch eine kurze Inkubation in 0,5% Trypsin/ 0,2% EDTA. Durch Zugabe des zweifachen Volumens des jeweiligen Zellkulturmediums wurde der Prozess der Trypsinierung gestoppt, die Zellen auf neue Flaschen ausgesät und weiter kultiviert (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit).

2.2.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Für die Lagerung von Zelllinien wurden die Zellen nach Trypsinierung durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 800 rpm pelletiert und in 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Die

Zellsuspension wurde in Cryoröhrchen transferiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst schnell in einem $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 ml Greiner- Röhrchen überführt, entsprechendes Medium wurde hinzugeben, die Zellen bei 800 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und in Kulturflaschen mit dem jeweiligen Medium gegeben.

2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Zellanalysegerät Coulter Counter der Firma Beckmann genutzt. Das Messprinzip beruht auf der Tatsache, dass Veränderungen des elektrischen Widerstands gemessen werden. Die zu messenden Zellen wurden dazu in einer Elektrolytlösung resuspendiert. Beim Durchwandern der Zellen durch die Kapillare verdrängen diese eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolyten. So ändert sich der elektrische Widerstand in Abhängigkeit von der Zellgröße.

2.2.2.3 Transiente Transfektion

Der in dieser Arbeit genutzte Vektor, pEZX-MR04, trägt eine Ampicillin- und Puromycinresistenz zur Selektion in Pro- und Eukaryoten. Er trägt zudem das eGFP Reportergen, was eine Sichtkontrolle der Transfektionseffizienz ermöglicht. Die in dieser Arbeit zu untersuchende miR-34a ist dem Reportergen nachgeschaltet, das Vektorkonstrukt wurde als pEZX-MiR-34a bezeichnet.

Es wurden Medulloblastomzellen in 96 oder 6- Loch-Platten, je nach Versuchsaufbau, ausgesät. 24 Stunden später wurde der Transfektionsmix wie folgt angesetzt: Zunächst wurde die entsprechende Menge Transfektionsagens in Opti-MEM verdünnt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurden 250 ng des Plasmids in Opti-MEM gelöst. Anschließend wurden beide Komplexe 1:1 gemischt und für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Zellen wurde die entsprechende Menge des Transfektionsmix tropfenweise zugegeben, die Platten vorsichtig geschüttelt und unter Zellkulturbedingungen 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wird das Medium ausgetauscht und so lange wie benötigt (48-120 Stunden) in Kultur gehalten. Der leere Vektor pEZX-MR04 wurde als Kontrolle transfiziert.

Für einen 6-Loch-Ansatz galt folgendes: Die 2,5 ml Medium wurden von den Zellen, die am Vortrag ausplattiert wurden, abgesaugt, und 1150 μl frisches Medium hinzugegeben. 0,3 μl

HiPerfect wurden in 99,7 μl Opti-MEM pipettiert, gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 250 ng Vektor- DNA in 100 μl Opti-MEM pipettiert. Anschließend wurden beide Transfektionskomplexe vermischt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Zellen wurden die 200 μl des Transfektionsmix tropfenweise zugegeben, die Platten vorsichtig geschüttelt und unter Zellkulturbedingungen 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wird das Medium ausgetauscht.

Für einen 96-Loch-Ansatz galt folgendes: Die 100 μl Medium wurden von den Zellen, die am Vortrag ausplattiert wurden, abgesaugt, und 50 μl frisches Medium hinzugegeben. 0,3 μl HiPerfect wurden in 24,7 μl Opti-MEM pipettiert, gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 250 ng Vektor-DNA in 25 μl Opti-MEM pipettiert. Anschließend wurden beide Transfektionskomplexe vermischt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Zellen wurden die 50 μl des Transfektionsmix tropfenweise zugegeben, die Platten vorsichtig geschüttelt und unter Zellkulturbedingungen 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium ausgetauscht.

2.2.2.4 Bestimmung der Zellviabilität nach Transfektion

Es wurden verschiedene Medulloblastom-Zelllinien auf ihre Viabilität nach Reexpression der miR-34a im MTT Assay untersucht. 20 μl MTT-Lösung wurden in die Vertiefungen einer 96 Lochplatte gegeben. Die Testung auf Vitalität der Zellen erfolgte nach festgelegten Zeitpunkten (48-120 Stunden) mit dem Tetrazoliumsalm (MTT; 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid). Bei Spaltung bildet diese Substanz wasserunlösliche, blaue Formazankristalle. Diese Umwandlung findet nur in lebenden, stoffwechselaktiven Zellen statt, indem MTT durch ein mitochondriales Enzym, die Succinat-Dehydrogenase, umgewandelt wird. Nach 2stündiger Inkubation wurde das Formazan durch Gabe von 100 μl des MTT-Lysereagenz aus den Zellen herausgelöst und die Absorption bei 570 nm photometrisch im ELISA Reader gemessen.

2.2.2.5 Bestimmung der Zellproliferation nach Transfektion

Die Menge an proliferierenden Zellen wurde mit Hilfe des „*Cell Proliferation ELISA*“ (Roche) quantifiziert. Der Assay beruht auf dem Prinzip, dass während der Inkubation mit 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) das Pyrimidinanalogen anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Das eingebaute Thymidinanalogen wird mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper detektiert. Der Farbumschlag und damit die gemessenen

Absorptionswerte korrelieren direkt mit dem Proliferationsverhalten der Zellen. Es wurde nach dem Handbuch verfahren und zuletzt erfolgte die Messung bei 450 nm.

2.2.2.6 Bestimmung der Apoptose nach Transfektion

Zur Bestimmung der Apoptose wurde der „*Cell Death Detection* ELISA“ kit (Roche) verwendet, der DNA-Fragmente als Kennzeichen der mittleren Phase der Apoptose nachweist. Der Assay basiert auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip, bei dem Peroxidase-gekoppelte murine monoklonale Antikörper gegen DNA und Histonkomplexe genutzt werden. Dies erlaubt die Quantifizierung von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion der Zellysate. Die Anzahl apoptotischer Zellen korreliert mit der Menge der Nukleosomen. Die Nukleosome können nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrates durch die Peroxidase anhand der Farbintensität des Reaktionsproduktes abgelesen werden. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.2.2.7 Seneszenz- Assay nach Transfektion

Zelluläre Seneszenz wird in vielen Zellen aufgrund begrenzter Zellteilungskapazität oder nach irreparablen Schäden aktiviert. So werden weitere Zellteilungen verhindert. Tumorzellen setzen diesen Vorgang außer Kraft und können sich unbegrenzt teilen. Seneszente Zellen zeigen gemeinsame biochemische Marker, wie die Expression der Seneszenz- assoziierten β -Galaktosidase (β -Gal). Der Nachweis der β -Gal-Aktivität erfolgt fluorometrisch mittels eines 96- Loch „Cellular Senescence Assay Kit“ der Firma Cell Biolabs. Der Versuch wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.8 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mittels der Durchflusszytometrie ist die Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften möglich. Propidium Iodid (PI) ist ein DNA interkalierender Farbstoff, wobei die PI-Menge Rückschlüsse auf die DNA-Menge innerhalb der Zellen ermöglicht. Zunächst wurden die Zellen abtrypsiniert und bei 4 °C und 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 1200 rpm, 5 Minuten) erfolgte ein weiterer Waschschritt mit PBS. Der nach dem Zentrifugieren entstandene Überstand wurde verworfen und in 600 μ l kaltem PBS aufgelöst. Jedem Ansatz wurden 1400 μ l auf -20 °C temperiertes Ethanol hinzugefügt, gevortext und die Proben bis zur Messung auf Eis im Kühlraum bei 4 °C

aufbewahrt (1 Std. bis mehrere Tage). Die Zellsuspension wurde bei 4°C und 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und einmalig mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert, 12,5 µl RNase A (finale Konzentration: 0,2-0,5 mg/ml) hinzugegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurde 10µl einer verdünnten PI-Lösung (finale Konzentration: 10 µg/ml) den Zellen zugesetzt. Anschließend erfolgte die direkte Analyse im Durchflusszytometer. Es wurden die Werte von je 5000 lebenden Zellen aufgenommen.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Um Proteinlysate aus Zellkulturzellen zu erhalten, wurden Zellen in Zellkulturschalen ausgesät, und nach definierten Zeitpunkten (48-120 Stunden) abtrypsiniert und für 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet 3mal mit ca. 5 ml PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert und das erhaltene Lysat für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Schritt gewährleistet das Aufbrechen der Zellwände. Nachfolgend wurde das Zelllysate für 20 Minuten bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und anschließend die Konzentration der Proteinlysate mittels eines Bradford- Tests bestimmt.

2.2.3.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Um die Konzentration von Proteinlysaten zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliantblue G250 verschiebt sich in Anwesenheit von Proteinen von 465 nach 595 nm. Diese Verschiebung des Absorptionsmaximums geht mit einem Farbumschlag von rot nach blau einher, der mit der Proteinkonzentration korreliert. In Küvetten wurden die Proteinproben mit dem entsprechenden Reagens vermischt. Ein Leerwert (Blank), der kein Protein enthält, sowie Standardproben mit definierter Proteinkonzentration wurden angesetzt. Der Ansatz musste für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Während der Inkubationszeit trat die

Farbreaktion ein. Nach der Inkubationszeit wurde die Extinktion der verschiedenen Proben im Photometer gemessen. Zunächst wurde der Reagenzleerwert von allen zu messenden Proben abgezogen und die Kalibrierungsgerade wurde mittels der Standards erstellt. Zuletzt wurden die Proben durchgemessen und der Proteingehalt anhand der Eichgerade berechnet. Nachfolgend ist das Pipettierschema einer solchen Bradford- Proteinbestimmung aufgelistet:

Das Bradford- Reagenz wurde 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

BSA wurde 1:20 mit Aqua dest. verdünnt (Endkonzentration 0,5 mg/ml).

Standardreihe:

Konzentration [μg]	0	1	3	5	7	9	10
BSA [μl]	0	2	6	10	14	18	20
Aqua dest [μl]	50	48	44	40	36	32	30

Die Ansätze wurden mit 950 μl der verdünnten Bradford-Lösung vermischt und die Eichgerade ermittelt und gespeichert.

2 μl des Proteinlysates wurden mit 48 μl Aqua dest. gelöst und mit 950 μl Bradford-Lösung vermischt.

Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben im Photometer gemessen.

2.2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli verwendet. Das Prinzip basiert auf der Trennung der Proteine durch den Molekularsiebeffekt einer polymerisierten Gelmatrix aus Acrylamid und N,N'-Bisacrylamid. Grundlage bildeten Acrylamidgele, die aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestehen. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Abstandshalter werden an die Seiten eingelegt und die Platten mit Klammern aufeinander befestigt. Zunächst wird das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um mögliche sich bildende Luftblasen zu verdrängen. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen. Zum Gießen der 10%igen Trenn- bzw. 4%igen Sammelgele wurden folgende Ansätze (ausreichend für zwei 0,75 mm dicke Minigele) zusammenpipettiert:

10%iges Trenngel (10ml Ansatz)	4%iges Sammelgel (4ml Ansatz)
4,2 ml Wasser	2,48 ml Wasser
2,5 ml 4x TrisCl/ SDS pH 8,8	1 ml 4x TrisCl/ SDS pH 6,8
3,3 ml 30%ige Acrylamid	0,52 ml 30%ige Acrylamid
50 µl 10 % APS	20 µl 10 % APS
5 µl TEMED	5 µl TEMED

Ein geeigneter Kamm wurde eingesetzt, um die entsprechenden Aussparungen für die Geltaschen zu erhalten. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese besteht aus zwei Kammern, die mit GTS-Laufpuffer befüllt wurden. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Kamm entfernt. Die mit 5x SDS-Ladepuffer versetzten Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, in einer Eppendorf- Tischzentrifuge anzentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert. Markerproteine, deren Molekulargewicht bekannt ist, wurden parallel zu den zu untersuchenden Proteinen aufgetrennt, um das Molekulargewicht der Proteine zu ermitteln. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 120V für eineinhalb Stunden. Der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und die Analyse der Proteine erfolgte im anschließenden Western Blot.

2.2.3.4 Elektrophoretischer Protein-Transfer (Western Blot)

Der Western Blot dient zur Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Beim hier verwendeten Nassblot-Verfahren findet der elektrophoretische Transfer in einem Puffertank statt, der vollständig geflutet ist. Das elektrische Feld ist hierbei senkrecht zum Gel angelegt, die Proteine wandern zur Anode und werden auf die Nitrozellulosemembran übertragen, auf der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. In späteren Schritten können so die Proteine durch Einsetzen von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Bevor der Blot zusammengesetzt wurde, wurden die Nitrozellulosemembran, die Schwämmchen und die zugeschnittenen Whatman-Papiere in einer Wanne mit Transferpuffer getränkt. Die verwendete Vorrichtung bestand aus zwei miteinander verbundenen Gittern (klare und schwarze Seite). Auf die schwarze Seite legte man zuerst ein Schwämmchen, darauf zwei Whatman-Papiere und das Acrylamidgel, von dem man zuvor das Sammelgel entfernt hatte. Das Gel wurde mit der Nitrozellulosemembran bedeckt. Darauf wurden erneut zwei Whatman-Papiere und ein Schwämmchen gelegt. Die Gitter wurden zusammengeklappt und

mit weißen Schiebern fixiert, so dass der Blot luftblasenfrei geschlossen wurde. Anschließend wurde der Blot in das Blotmodul eingesetzt, wobei die Membran der Anode, das Acrylamidgel der Kathode zugewandt war. Die Pufferkammer wurde mit etwa 650 ml Transferpuffer befüllt, so dass das Gel und die Membran vollständig bedeckt waren. Der Transfer wurde bei 70 mA (2 Gele: 150 mA) über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran zur Markierung der Größenstandards und zur Überprüfung der Effizienz des Transfers mit einer PonceauS-Färbelösung gefärbt und anschließend bis zur gewünschten Bandenintensität in Wasser entfärbt. Die Banden der Marker-Proteine wurden eingezeichnet.

2.2.3.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immundetektion)

Nach dem Abwaschen der Färbelösung von der Membran müssen unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert werden. Die Membran wurde in BLOTTO (*bovine lacto transfer techniques optimizer*) für etwa 45 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Der immunologische Nachweis wird mit Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine durchgeführt. Dazu wurde der erste Antikörper in geeigneter Verdünnung (in TBS-T-Puffer) auf die Nitrozellulosemembran gegeben und bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran zwei Mal für 15 Minuten in TBS-T-Puffer unter Schütteln gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Der Zweitantikörper ist gegen konstante Domänen der schweren Ketten des Erstantikörpers gerichtet. Zudem ist dieser mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, deren Enzymreaktion den spezifischen Nachweis des erwünschten Proteins erlaubt. Der Sekundärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (in TBS-T-Puffer) auf die Membran gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach weiteren zwei Waschschritten von 15 Minuten mit dem TBS-T-Puffer erfolgte die Detektion mittels ECL-Reagenzien (*Enhanced Chemoluminescence*). Hierbei findet eine durch die Peroxidase katalysierte Reduktion von H_2O_2 mit gleichzeitiger Oxidation von Luminol statt. Hierzu wurden gleiche Volumina der Detektionsreagenzien 1 und 2 plus H_2O_2 gemischt (500 μ l Lösung A und 500 μ l Lösung B plus 500 μ l H_2O_2), direkt auf die Proteinseite der Membran gegeben, so dass die Flüssigkeit durch die Oberflächenspannung der Membran zurückgehalten wurde. Nach einer Inkubation für 2 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit mit einem Whatman-Papier abgenommen und der noch leicht feuchte Blot luftblasenfrei zwischen zwei Folien gelegt. Die Exposition erfolgte in dem Fusion FX7 zwischen 5 Sekunden und 10 Minuten (je nach Antikörper).

2.2.4 Generierung transgener miR-34a *knockout*-Mäuse

Das sogenannte „*Gene targeting*“ bedeutet, das ein Gen verändert bzw. ausgeschaltet wird. Ziel war es, das gesunde miR-34a Gen durch eine funktionslose Mutante zu ersetzen. Die Injektion des linearisierten Expressionsplasmid in Oozyten und die Herstellung transgener Mäuse wurde der Fa. Taconic Artemis (Köln) durchgeführt.

2.2.4.1 Isolierung genomischer miR-34a DNA und Klonierung des pMirn34a-Vektors

Für die Klonierung des zu transfizierenden Targetingplasmids wurde zuerst ein geeigneter BAC-Klon identifiziert, um aus diesem genomische DNA des murinen miR-34a-Gens zu isolieren.

Um ein Gen bzw. ein Protein erfolgreich zu inaktivieren, ist es nötig, in einen kodierenden Bereich Selektionsmarker einzusetzen. Der Targetingvektor enthielt dazu eine Neomycin-Resistenzkassette, die in den kodierenden Bereich des zu deletierenden Gens eingebaut ist, welches darauf kein sinnvolles Genprodukt mehr bilden kann. Durch positive Selektion mit Geneticin (G418) können Zellen identifiziert werden, bei denen ein Einbau des miR-34a-Konstruktes in das Genom stattgefunden hat. Das Thymidinkinase-Gen (TK) aus dem Herpes-Simplex Virus wurde als zweiter Marker an das Ende des Konstruktes kloniert. Dieser wurde bei einer homologen Rekombination nicht im Genom integriert, wohl aber, wenn der Einbau an einer beliebigen anderen Stelle integriert wurde. Nach Gabe von Gancyclovir (negative Selektion) starben die Zellen ab, die die TK integriert haben. Diese Selektionsschritte dienten zur Identifizierung jener Zellen, bei denen die Integration des DNA-Konstruktes gezielt in das Genom stattgefunden hat.

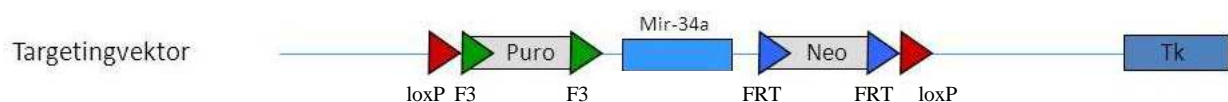


Abb. 8: Targetingvektor zur Deletion des miR-34a Gens.

Schematisch dargestellt ist der Targetingvektor. Tk- Thymidinkinase- Kasette; Puro = durch 2 F3-Erkennungssequenzen flankierte Puromycin- Kasette; Neo = Neomycin- Resistenzkassette, flankiert von FRT- Sequenzen; loxP- Erkennungssequenzen flankieren das Konstrukt

2.2.4.2 Transfektion der ES-Zellen

Die C57Bl/6N ES-Zelllinie wurde auf mitotisch inaktiviertem Feeder Layer, der MEFs in DMEM (plus 20% FBS und 12000u/ ml LIF) beinhaltet, in Kultur gehalten. 1×10^7 Zellen und

30 µg des linearisierten pMirn34a- Vektors wurden bei 240 V und 500 F in die ES-Zellen elektroporiert. An Tag 2 startete eine positive Selektion über eine Puromycin- (1 µg/ ml) und G418 (200 µg/ ml)-Zugabe. An Tag 5 nach der Elektroporation wurde die Behandlung mit Gancyclovir (2µM, zur negativen Selektion). Die ES-Klone wurden an d8 isoliert, mittels Southern Blot wurde die korrekte homologe Rekombination nachgewiesen und die homolog rekombinierten ES-Zellklone erneut in Kultur genommen und vermehrt.

2.2.4.3 Generierung der chimären Mäuse

Aus superovulierten Balb/c Weibchen wurden an Tag 3 *post coitum* Blastozysten isoliert. Für die Mikroinjektion wurden die Blastocysten in DMEM, versetzt mit 15% FCS und Mineralöl, gehalten. Mit einer Mikroinjektions-Pipette wurden rekombinante ES-Zellklone in das Blastozoele einer Blastozyste injiziert und nachfolgend in den Uterus scheinchwangerer (Tag 2,5 *post coitum*) NMRI-Weibchen implantiert. Man bezeichnet die Nachkommen als sog. Chimäre, da sie sich sowohl aus Zellen der manipulierten ES-Zellen (C57Bl/6N) als auch aus Zellen der Blastozyste (Balb/c) entwickelten. Der Grad der Chimärität wurde über die unterschiedliche Fellfarbe (schwarz: C57Bl/6N oder weiß: Balb/c) festgelegt. Ein hoher Bl/6-Anteil ergab eine schwarz gefleckte Fellfarbe und deutete auf eine hohe Wahrscheinlichkeit hin, dass diese Mäuse die manipulierten ES-Zellen auch in ihren Keimzellen integriert haben.

2.2.4.4 Aufbau der kongenen Mauslinie

Hochgradig chimäre Tiere wurden mit C57Bl/6 Weibchen verpaart, so dass man davon ausging, dass bei einer solchen Verpaarung der Chimären mit Wildtypieren, die genetische Veränderung über die Spermatozoen weitergeben wurde. Heterozygote Nachkommen („Foundertiere“; F1) aus der ersten Verpaarung wurden zum Aufbau der transgenen Mauslinie eingesetzt.

2.2.5 Tierexperimentelles Arbeiten

2.2.5.1 Zucht und Haltung

Die verwendeten Mausstämme (siehe Kapitel 2.2.10) wurden im S1-Bereich des zentralen Tierlaboratoriums des Uniklinikums Essen gezüchtet. Die Haltung der Tiere erfolgte in IVC-

Käfigen bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und einer Temperatur von 20 ± 2 °C. Als Einstreu wurden autoklavierte Späne verwendet. Das pelletierte Futter wurde von der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH bezogen. Die Wasserversorgung sowie die Fütterung erfolgte *ad libitum*.

2.2.5.2 Entnahme von Schwanzbiopsien und Identifikation der Tiere

Schwanzbiopsien und gleichzeitige Markierung der Fußsohlen mit feinen Nadeln und Tusche wurden an 5-8 Tage alten Jungtieren vorgenommen. Im Alter von etwa drei Wochen wurden die Jungtiere von ihren Müttern abgesetzt. Die Mäuse wurden nach den Geschlechtern sortiert, die Tuschemarkierungen zugeordnet und durch eine Ohrlochmarkierung gekennzeichnet, da die Markierung durch Tusche nach 3-5 Monaten verblassen kann. Gleichzeitig mit der Markierung wurden die Tiere in einer Datenbank gelistet. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR (siehe Kapitel 2.2.1.5) aus genomischer DNA der isolierten Schwanzspitzen (siehe Kapitel 2.2.1.4). Für die einzelnen Mausstämme wurden spezifische Oligonukleotide und PCR- Bedingungen genutzt.

2.2.5.3 Tötung von Versuchstieren

Zur histologischen Probengewinnung wurden die erwachsenen Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung der Mauslinie

Um die spezifischen Funktionen der miR-34a zu testen und, um die Prozesse, die diese miRNA reguliert, beobachten zu können, wurden miR-34a knockout Mäuse generiert. Durch das *in vivo*-Modell können so mögliche Effekte des miR-34a Gen-Knockouts bestimmt werden.

Die Klonierung des Targetingvektors, die Kultivierung, die Transfektion, das Screening auf homologe Rekombination der ES- Zellen der Maus, die Blastocysteninjektion und die Blastocystenimplantation zur Generierung der chimären Mäuse wurde von der Firma Taconic Artemis (Köln) unter regelmäßiger gegenseitiger Absprache durchgeführt.

3.1.1 Klonierung des pMirn34a-Targetingvektors zur homologen Rekombination in embryonale Stammzellen

Voraussetzung für die Generierung von genetisch veränderten Tieren ist die Konstruktion eines Targetingvektors. BAC-DNA Banken standen kommerziell zur Verfügung, um die dafür benötigte genomische DNA zu isolieren. Nach der Entwicklung von geeigneten Primern, die in der Firma für das nachfolgende *Screening* eingesetzt wurden, konnte der geeignete BAC-Klon mit der RP23 BAC-Datenbank identifiziert, und der gewünschte Targetingvektor kloniert und sequenziert werden.

Abbildung 9 zeigt die schematische Darstellung des Rekombinationsvektors und die zur Deletion verwendete Rekombinationsstrategie.

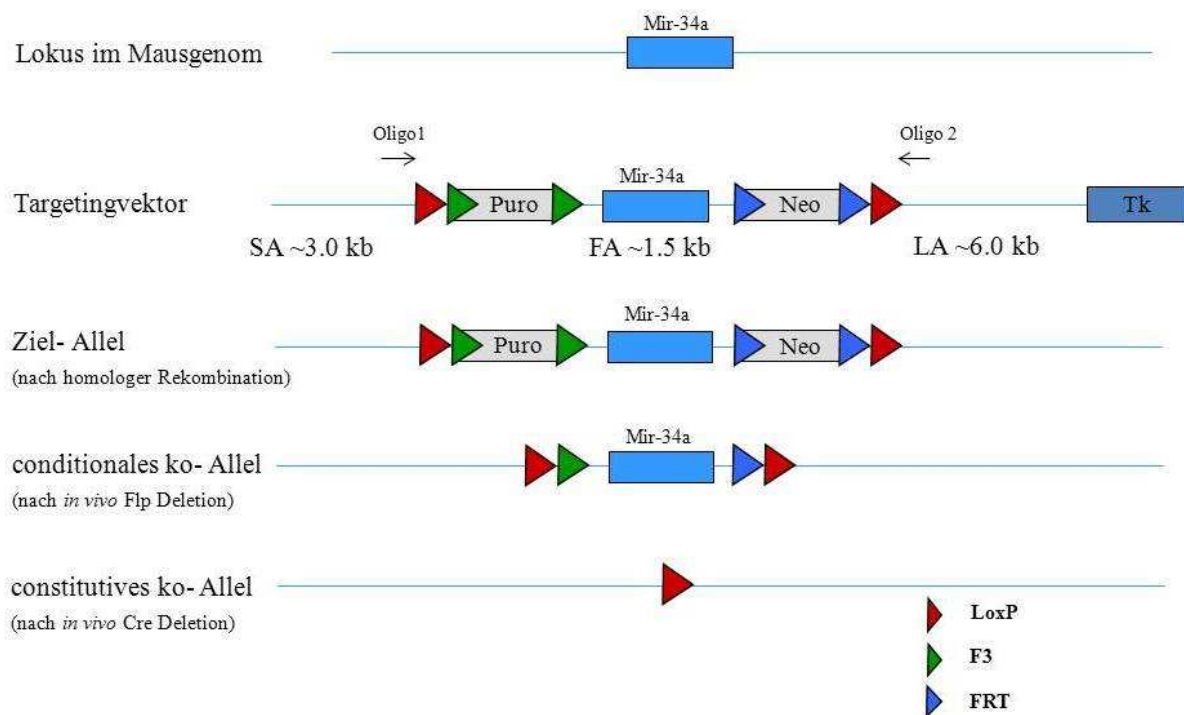


Abb. 9: Strategie zur Inaktivierung des MiR-34a Gens.

Dargestellt ist oben ein Ausschnitt des wildtypischen, genomischen Allels, gefolgt von der schematischen Darstellung des Targetingvektors.

Tk = Thymidinkinase Expressionskassette des Herpes Simplex Virus; Neo = durch 2 FRT Erkennungssequenzen flankierte, Neomycinresistenz Expressionskassette; Puro = durch 2 F3 Erkennungssequenzen flankierte, Puromycin Expressionskassette; loxP Erkennungssequenzen flankieren das Konstrukt.

Das durch homologe Rekombination entstandene Ziel- Allel ist mittig dargestellt.

Das konditionale Ko- Allel wird nach *in vivo* Flp- Deletion mit Entfernung der Selektionsmarker erhalten. Nach Cre- vermittelter *in vivo*- Deletion entsteht der konstitutive Ko.

3.1.2 Generierung chimärer MiR-34a-Mäuse

Embryonale Stammzellen wurden mit dem pMirn34a-Targetingvektor transfiziert und durch Zugabe von Geneticin (G418), Puromycin und Gancyclovir mehrere Tage selektioniert. Aus den Neomycin- resistenten Zellklonen wurde die DNA isoliert, mit Restriktionsenzymen geschnitten und mittels Southern Blot die Klone ermittelt, die den Homologiebereich des Targetingkonstruktes korrekt ins Genom integriert hatten. Nach Blastozysten-Injektion der positiven Zellklone wurden diese in den Uterus einer Amme transferiert. Die Identifizierung von chimären Nachkommen erfolgte über die Fellfarbe.

3.1.2.1 Elektroporation und Selektion der ES-Zellen

Für die Transfektion embryonaler Stammzellen wurde der pMirn34a-Targetingvektor vor der Elektroporation mit *NotI* linearisiert. 1×10^7 murine C57Bl/6N embryonale Stammzellen wurden mit 30 µg des linearisierten Konstruktes elektroporiert und durch Zugabe von G418 (positive Selektion) und Puromycin an d2 und Gancyclovir (negative Selektion) an d5 nach Elektroporation selektioniert. Aus den Neomycin-resistenten Zellklonen wurde an d8 die DNA von ES-Zellklonen isoliert.

3.1.2.2 Nachweis der homologen Rekombination

Für die Southern-Blot Analyse wurde die DNA der isolierten ES- Zellklone auf eine Membran übertragen und mit der jeweiligen Sonde hybridisiert. Die Sonden wurden durch PCR-Amplifikation genomischer DNA unter Verwendung von Oligonukleotiden hergestellt. ES-Zellklone, die das Targeting-Konstrukt homolog integriert hatten, wurden mittels Southern- Blot-Hybridisierung identifiziert (Tabelle 3).

Tabelle 3: erwartete Fragmentgrößen der Southern-Blot Analyse

Enzym	Sonde	erwartete Fragmentgröße vom	
		Wt- Allel	Mut- Allel
Bgl II	5`- Sonde	9,7 kb	9,7 kb
Afl II	3`- Sonde	10,5 kb	13,6 kb
HpaI	Neo- Sonde		16,3 kb

Durch Southern Blot-Analyse nach BglII, MscI und EcoRI- Verdau und Hybridisierung mit der 5`-Sonde wurde zunächst kontrolliert, bei welchen der 283 Neomycin-resistenten ES-Zellklone der 5`-Homologiebereich des Targetingvektors an der richtigen Stelle in den pMirn34-Lokus integriert wurde. Die Überprüfung ergab, dass sechs davon (B-B7, B-C7, B-C11, C-E11, C-F10, C-G5) zusätzlich zum Wildtyp-Allel auch das rekombinante Allel tragen. Diese ES- Zellklone wurden daraufhin auf korrekte homologe Rekombination im 3`-Bereich durch Verdau mit BglII und AflII und Hybridisierung mit der 3`-Sonde untersucht. Bei den sechs Klonen war auch der 3`-Homologiebereich korrekt rekombiniert. Über Verdau mit AflII, HpaI und NsiI und Hybridisierung mit der neo- Sonde wurde die Einzel- Integration überprüft. Alle sechs getesteten ES- Zellklone wiesen eine Einzel-Integration auf. Abbildung 10 zeigt exemplarisch jeweils ein Southern Blot mit der 5`-Sonde, 3-Sonde und der neo-Sonde.

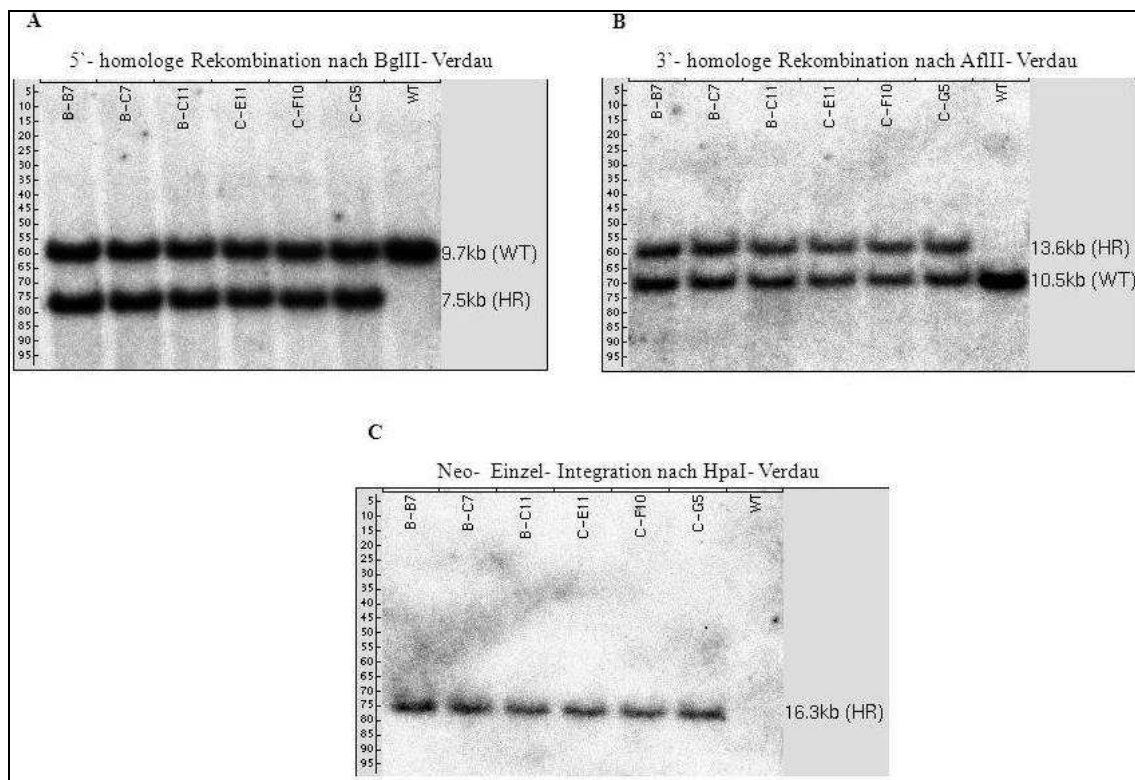


Abb. 10: Southern-Blot der ES-Zellklone auf 5'- und 3'-homologe Rekombination und Einzelintegration (Quelle: Taconic Artemis; Köln).

- (A) BglII-Verdau und Hybridisierung mit 5'-Sonde. Zusätzlich zur 9,7kb wt-Bande zeigt sich ein zweites Signal bei 7,5kb, welches durch die homologe Rekombination entstanden ist
 (B) AflII-Verdau und Hybridisierung mit 3'-Sonde. Zusätzlich zur 10,5kb wt-Bande zeigt sich ein zweites Signal bei 13,6kb, welches durch die homologe Rekombination entstanden ist
 (C) HpaI-Verdau und Hybridisierung mit der neo- Sonde. Es entsteht eine Bande bei 16,3kb, welche auf eine Einzelintegration hinweist.

Der homolog rekombinante ES-Zellklon B-B7 wurden erneut in Kultur genommen.

3.1.2.3 Generierung chimärer Mäuse und Aufbau der MiR-34a-ko Mauslinie

Nach Gabe von Hormonen wurden superovulierte Balb/c Weibchen mit Balb/c Männchen verpaart. Die Blastocysten-Isolierung aus dem Weibchen erfolgte an Tag 3,5 *post coitum*. 10-15 C57Bl/6N ES-Zellen wurden in jeden Blastocysten injiziert und nach Erholung in den Uterus scheinträchtiger NMRI-Weibchen implantiert. Chimäre Nachkommen wurden anhand ihrer Fellfärbung (schwarz/weiß) identifiziert. Zum Nachweis der Keimbahntransmission wurden drei männliche miR-34a ko-Chimäre mit weiblichen C57Bl/6N Mäusen verpaart und die Nachkommen auf schwarze Fellfarbe untersucht. Dies wurde für mindestens drei Generationen durchgeführt.

Zum Aufbau der MiR-34a-defizienten Mauslinie wurden die Nachkommen mit dem Cre-Deletor Stamm verkreuzt, um die Deletion des MiR-34a Gens zu erreichen (Abb. 9). In jeder folgenden Generation wurden die miR-34a Nachkommen entsprechend des C57Bl/6N Hintergrundes mit Tieren dieser Inzuchtstämme verpaart.

3.1.3 Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurden Schwanzbiopsien der Mäuse genommen, die genomische DNA isoliert und mittels PCR auf erfolgreiche Deletion hin untersucht. Die Größe der Amplifikate wurde mit der vorliegenden Sequenz berechnet. Beim Wildtyp-Allel amplifiziert das Primerpaar (Oligos 1+2) (siehe Kapitel 2.1.8) eine 1379bp große Bande, beim rekombinanten Allel eine Bande von 257bp Länge. Bei der Genotypisierung ergab sich demnach bei Wildtyp-Mäusen nur eine Bande von 1379bp Länge, bei heterozygoten Mäusen 2 Banden von 1379bp und 257bp Länge und bei homozygoten Mäusen eine 257bp große Bande (Abb. 11).

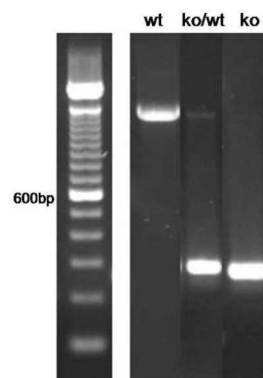


Abb. 11: PCR-Ergebnis zur Genotypisierung der miR-34a *knockout* Mäuse.

3.1.4 Expression der miR-34a in der Maus

Um zu gewährleisten, dass die weiteren Experimente mit einem deletierten miR-34a- Gen in der Maus durchgeführt werden, wurde die miR-34a-Defizienz in verschiedenen Organen von wildtyp, hetero- und homozygoten Tieren nachgewiesen. Dazu wurde aus den entsprechenden Organen miRNA extrahiert und die miR-34a Expression mittels RT-qPCR gemessen. Um eine Normalisierung durchzuführen, wurde parallel dazu auch eine Messung der ubiquitär exprimierten RNU6B durchgeführt. Von den Organen wurden mindestens drei verschiedene Proben untersucht. Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung.

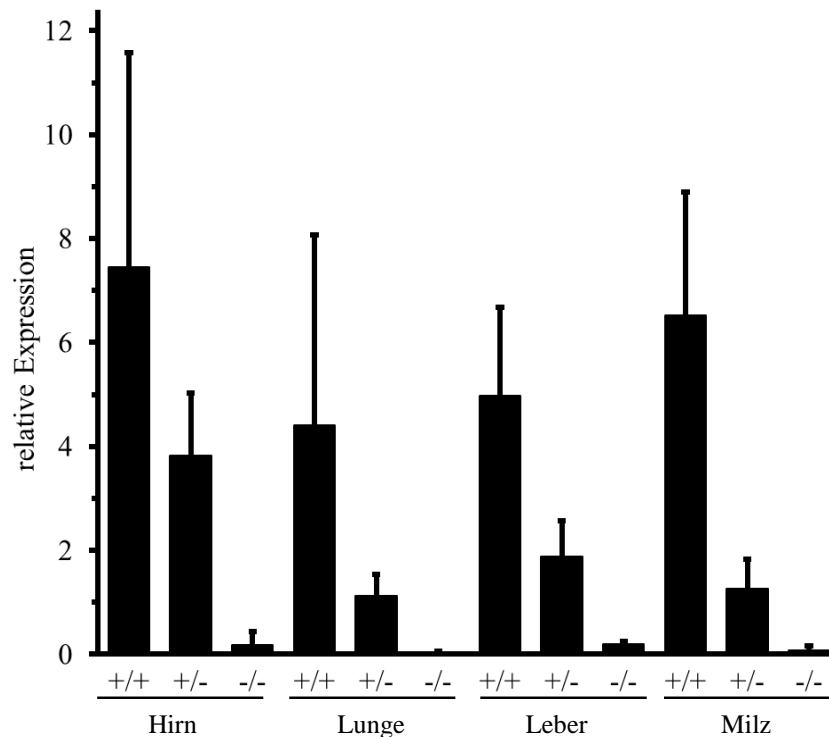


Abb. 12: Nachweis der miR-34a-Defizienz auf RNA Ebene in verschiedenen Organen.

+/+ = wildtyp, +/- = heterozygot, -/- = homozygot. Es wurde eine qRT-PCR nach Extraktion der Gesamt-miRNA durchgeführt und die miR-34a-Expression im Hirn, in der Lunge, in der Leber und in der Milz gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Normalisiert wurde auf die ubiquitär exprimierte RNU6B RNA.

Die Expressionsstärke der miR-34a war in den verschiedenen untersuchten Wildtyp-Organen sehr variabel. Sie reichte von einer niedrigen Expression in der Lunge bis zu sehr hoher Expression im Hirn. Die miR-34a-Expression ist Gendosis abhängig. In heterozygoten *knockout*-Tieren sank die Expressionshöhe der miR-34a wie erwartet herab. Die gemessene Expression in den homozygoten *knockout* Mäusen liegt im Bereich des Hintergrundrauschens. Der Verlust der genetischen Information für miR-34a im homozygoten *Knockout* führt demnach konsequenterweise zum vollständigen Verlust der miR-34a Expression.

3.2 Phänotypisierung der *knockout*-Maus in der ‚German Mouse Clinic‘

Um Auffälligkeiten im Verhalten oder etwaige Unterschiede im Überleben festzustellen, wurden die miR-34a *knockout* Mäuse über einen Zeitraum von 15-17 Monaten beobachtet (Tabelle 4). Die *knockout* Mäuse waren lebensfähig und fertil, zeigten eine normale Entwicklung und keine ersichtlichen phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu wt-Mäusen.

Tabelle 4: Auflistung der Beobachtungskohorte

Genotyp	Eingangsnummer	Geburtsdatum	Todesdatum	Beobachtungszeit Tage	Beobachtungszeit Monate
ko/wt	56396-379	02.06.2009	17.10.2010	495	17
	56396-382	02.06.2009	17.10.2010	495	17
	56726-68	06.06.2009	17.10.2010	491	16
	56724-55	10.06.2009	17.10.2010	487	16
	58615-1	25.07.2009	17.10.2010	442	15
	58615-2	25.07.2009	17.10.2010	442	15
	58615-3	25.07.2009	17.10.2010	442	15
	58615-4	25.07.2009	17.10.2010	442	15
ko/ko	56868-1114	16.06.2009	17.10.2010	481	16
	56868-1116	16.06.2009	17.10.2010	481	16
	56396-378	02.06.2009	17.10.2010	495	17
	56636-356	02.06.2009	17.10.2010	495	17
	56636-357	02.06.2009	17.10.2010	495	17
	56636-354	02.06.2009	17.10.2010	495	17
	56637-352	02.06.2009	17.10.2010	495	17
	56637-1xl/1xr	02.06.2009	17.10.2010	495	17
wt	56637-lu	02.06.2009	17.10.2010	495	17
	58609-1884	31.07.2009	17.10.2010	437	15
	58609-1885	31.07.2009	17.10.2010	437	15
	58609-1887	31.07.2009	17.10.2010	437	15
	58610-1890	31.07.2009	17.10.2010	437	15
	C57Bl/6N-1	05.06.2009	17.10.2010	492	16
	C57Bl/6N-2	05.06.2009	17.10.2010	492	16
	C57Bl/6N-3	05.06.2009	17.10.2010	492	16
	C57Bl/6N-4	05.06.2009	17.10.2010	492	16
56726-70	06.06.2009	17.10.2010	491	16	

Um eine Aussage über die Verteilung der Genotypen zu treffen, wurden die Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen hinsichtlich des Genotyps (wt, ko/wt, ko/ko) ausgezählt. Zur Auswertung wurde der Chi-Square-Test angewendet, um festzustellen, ob die beobachtete

Genotyp-Verteilung der Mendelschen-Verteilung entspricht. Das Ergebnis der Auszählung und des Chi-Square-Tests sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Chi-Square-Unabhängigkeitstest.

Genotyp	beobachtete Anzahl	erwartete Anzahl	erwartete Prozentwerte	erwartete Frequenz	Chi-Square-Wert	Freiheitsgrad	p-Wert
wildtyp	28	37,25	25	1	2,2	2	0,3
ko/wt	86	74,5	50	2			
ko/ko	35	37,5	25	1			

Zu Grunde gelegt wurde die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Anzahl an den verschiedenen Genotypen gibt. Der hohe p-Wert mit 0,3 konnte diese Hypothese bestärken und die beobachteten Verhältniszahlen entsprachen demnach der Mendelschen Regel.

In Kooperation mit der ‚German Mouse Clinic‘ (GMC) wurden umfassende standardisierte Phänotyp-Analysen durchgeführt. Diese Screens konnten Einblicke in die Funktion des deletierten miR-34a-Gens für den adulten Gesamtorganismus liefern. 36 miR-34a homozygote *knockout* Mäuse und 37 C57Bl/6N Mäuse wurden in die GMC transferiert, wo diese zunächst vier Wochen Zeit zur Akklimatisierung in der neuen Umgebung bekamen. Anschließend wurden die Tiere im Alter von acht Wochen in zwei Gruppen unterteilt, um die zwei angebotenen Pipelines zu durchlaufen. Die Mäuse der ersten Pipeline (Tabelle 6) durchliefen zuerst einen morphologischen Gesamtkörper *Check-up*, gefolgt von der Überleitung in den kardiovaskulären Screen. Nach Bestimmung des Blutdrucks wurde der Energiemetabolismus mittels indirekter Kalorimetrie analysiert. Eine Woche später wurde der intraperitoneale Glukosetoleranztest (IpGTT) durchgeführt, gefolgt von der Übergabe der Mäuse zurück in den Dymorphologie-Screen für Röntgenuntersuchungen und Knochendichte (DXA)-Analysen. Im Alter von 15 Wochen wurden Blutproben zur Bestimmung der Plasmawerte genommen. Nach Bestimmung der Augengröße wurden noch Lungenfunktions-Analysen vorgenommen. Für spätere molekulare Untersuchungen wurden die Organe der Mutanten weggefroren.

Tabelle 6: zusammenfassende Auflistung der verschiedenen Tests in der ersten Pipeline

Screen	Test	Alter in Wochen	Alter in Tagen
Dymorphologie	morphologische Beobachtung	8	61
Kardiovaskular	Blutdruck	10	75

Metabolismus	Kalorimetrie	11	82
Klinische Chemie	IpGTT	12	89
Metabolismus	minispec MRI	12	89
Dysmorphologie	DXA, X-Ray	13	96
Klinische Chemie	Blutzucker	14	103
Auge	Augengröße	15	110
Lunge	spontanes Atemmuster	16	117
Molekulare Phänotypisierung	Expressions- Profiling	16	117

Die zweite Pipeline (Tabelle 7) startete für eine Dauer von drei Wochen mit verschiedenen Verhaltens- und neurologischen Tests. Nachfolgend durchliefen die Mäuse den nozizeptiven Screen und den Augen-Screen. Im Alter von 14 Wochen wurde Blut für Untersuchungen hinsichtlich der klinischen Chemie, der Immunologie, der Allergie und für den kardiovaskulären Screen entnommen. Drei Wochen nach der ersten Blutentnahme erfolgte diese noch ein zweites Mal, um mögliche Ergebnisse zu reproduzieren und um Steroidlevel zu bestimmen. Am Ende der Screens der zweiten Pipeline wurden alle Mäuse makro- und mikroskopisch in der Pathologie untersucht.

Tabelle 7: zusammenfassende Auflistung der verschiedenen Tests in der zweiten Pipeline

Screen	Test	Alter in Wochen	Alter in Tagen
Neurologie	Griffstärke &SHIRPA	8	61
Verhalten	Open Field	8	61
Neurologie	Rotarod	9	68
Verhalten	akustische Schreckreaktion und PPI	1	75
Nozizeption	Hotplate- Test	11	82
Auge	Ophthalmoscope & Spaltlampe	12	89
Klinische Chemie	klinische Chemie und Hämatologie	13	96
Immunologie	FACS- Analysen der PBCs und Immunoglobulin- Konzentration	13	96
Allergie	IgE	13	96
Steroidmetabolismus	Steroide im Blutplasma	16	117
Klinische Chemie	klinische Chemie und Hämatologie	16	117
Pathologie	makroskopische und histologische Analysen	16	117

In Tabelle 8 sind alle Ergebnisse des Primär-Screens zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Primär-Screens der initialen Testreihe

Screen	Ziel	Methode	Phänotyp [ja/nein]	Phänotyp-Beschreibung
Dysmorphologie	morphologische Analyse des Körpers, des Skeletts, der Knochen und Knorpel	morphologische Beobachtung	nein	
		Knochendichte	nein	
		X-Ray	nein	
Verhalten	Lokomotion, Angst-assoziiertes Verhalten, sensorische Motorik	Open Field	ja	gesteigerte Angstreaktion
		akustische Schreckreaktion und Präpulsinhibition	ja	Defizite in der Präpulsinhibition
Neurologie	Messung der muskulären, spinocerebralen, sensorischen und autonomen Funktion	SHIRPA- Protokoll	ja	einige Tiere zeigten einen Tremor, eine abnormale Gangart und weniger Schwanz-Elevation
		Griffstärke	ja	2- Pfoten- Stärke ist reduziert
		Laktat	nein	
		Rotarod	nein	
Auge	Messung von morphologischen Veränderungen	Funduskopie	nein	
		Laserinterferenz- Biometrie	nein	
		Spaltlampen- Biomikroskopie	nein	
Nozizeption	Detektion von verändertem Schmerz- Verhalten	Hotplate Assay	ja	Hypoalgesie
Energie-Metabolismus	Messung des Körpergewichts, der Temperatur, der Aktivität, des O ₂ -Verbrauchs, der CO ₂ -Produktion	indirekte Kalorimetrie	nein	
		Ganzkörperzusammensetzung durch Minispec NMR	nein	
Klinische Chemie und Hämatologie	Determinaton von klinisch- chemischen und hämatologischen Parametern	Blut- Autoanalyzer	nein	
		ABC- Tierblut- Counter	nein	
		IpGTT	nein	
Immunologie	Analyse der peripheren Blutproben hinsichtlich immunologischer Parameter	Durchflusszytometrie	nein	Leicht erhöhte Frequenz an CD19+ Zellen in männlichen Mutanten; höhere Anteil an CD44 exprimierenden Zellen; niedriger Anteil an CD62L innerhalb des T-Zellen Clusters
		Immunglobulin- Level	nein	
Allergie	Analyse des IgE- Level	IgE Level	nein	
Steroid-Metabolismus	Analyse der Steroidhormone im Blutplasma: DHEA und Testosteron	DHEA Level mittels ELISA	nein	leicht erhöht in Weibchen
		Testosteron- Level mittels ELISA	nein	
Kardiovaskular	Messung der funktionalen kardiovaskulären Parameter	Blutdruckmessung	nein	
		Herz- Gewicht	nein	

Lunge	Messung von Veränderungen im Atmungsverhalten	Ganzkörper-Plethysmographie	ja	niedrigere Respirationsraten bei den <i>ko</i> -Weibchen während Ruhephasen
Molekulare Phänotypisierung	RNA- Expressions-Profiling	DNA- Chip Technologie	ja	Verändertes Expressionsmuster im Thymus
Pathologie	Mikroskopische und makroskopische Untersuchung	Immunhistochemie	nein	
		Histologie	nein	

Beispielhaft ist in Abbildung 13 die Immunhistologie anhand von HE-Färbungen diverser Organe dargestellt. In der Organhistologie waren keine Unterschiede zwischen den Wildtyp-Kontrollen (C57Bl/6N) und den miR-34a *knockout* Mäusen auszumachen.

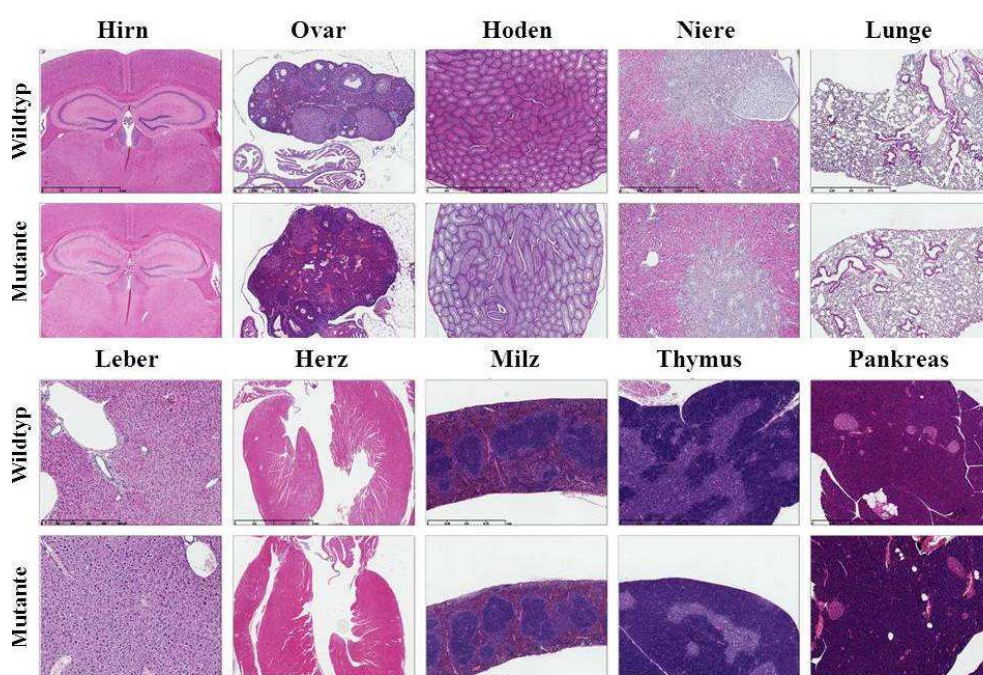


Abb. 13: HE-Färbung der verschiedenen Organen.

Dargestellt sind repräsentative Bilder der immunhistochemisch gefärbten Organe von Kontrollmäusen und miR-34a *ko* Tieren.

Koronare Schnitte: Hirn (2,5x), Ovar (5x), Hoden (2,5x), Nieren (5x) und Lunge (5x)

Sagittale Schnitte: Leber (10x), Herz (5x), Milz (5x), Thymus (5x), Pankreas (5x)

Einige Ergebnisse der Primärscreens wiesen nach der Auswertung auf mögliche phänotypische Auffälligkeiten hin. Daher wurden erneut miR-34a homozygote *knockout* Mäusen und entsprechenden Kontrolltiere gezüchtet und zur GMC nach München transferiert. In den umfangreichen Sekundärscreens konnten die Ergebnisse aus der ersten Versuchsrunde nicht bestätigt werden. Das Urteil der dortigen kooperierenden Wissenschaftler nach erneuter Prüfung aller Ergebnisse war, dass die miR-34a *knockout* Mäuse keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypieren zeigten.

3.3 Molekulare Charakterisierung der miR-34a-vermittelten Effekte *in vitro*

In 30-40% aller Neuroblastome finden sich Verluste des Chromosomenabschnitts 1p36, auf dem die miR-34a liegt (Cole et al. 2008). Ein Verlust der Heterozygotie von 1p36 korreliert mit einer MYCN-Amplifikation und ist mit einer Herunterregulierung der miR-34a assoziiert (Cole et al. 2008; Wei et al. 2008). In Medulloblastomzellen ist die miR-34a ebenfalls signifikant erniedrigt (Guessous et al. 2010). Daher wurde die miR-34a-Expression zunächst in primären humanen Medulloblastomen und in verschiedenen humanen Medulloblastomzelllinien untersucht.

Weiterhin wurden die Auswirkungen einer miR-34a Überexpression auf biologische Veränderungen, wie Viabilität, Proliferation, Apoptose, Seneszenz, den Zellzyklus und auf die Expression in der Literatur beschriebener Zielgene hin näher charakterisiert. Medulloblastomzellen wurden dafür mit dem Plasmid pEZX-miR-34a und einem Kontrollplasmid (pEZX-MR04) transfiziert (siehe Kapitel 2.1.7 und 2.2.2.3).

3.3.1 miR-34a-Expression im primären Medulloblastom und in Medulloblastomzelllinien

In zahlreichen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die miR-34a-Expression in humanen MB-Zellen und im Primärtumor erniedrigt ist (Guessous et al. 2010; Li et al. 2009). Um dies zu verifizieren, wurde zunächst der Expressionsstatus der miR-34a im primären Medulloblastom untersucht (Abb. 14). Um einen Vergleich mit gesundem Gewebe als Referenz zu ermöglichen, wurde in 21 gesunden Kleinhirnproben ebenfalls die Expressionshöhe dieser miRNA analysiert. Interessanterweise zeigte sich im Tumorgewebe eine ca. 3-fach erniedrigte Expression der miR-34a im Vergleich zum Normalgewebe.

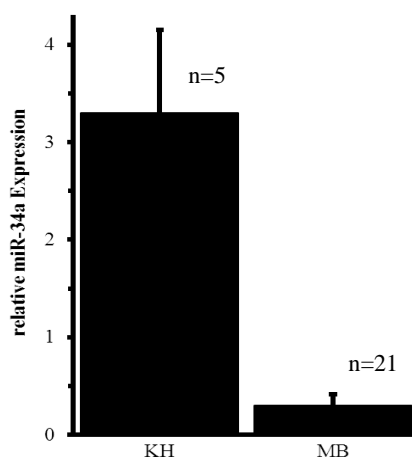


Abb. 14: miR-34a Expressionshöhe im Kleinhirn und Medulloblastom

Die miR-34a Expression im Tumor im Vergleich zum Kontrollgewebe wurde mittels RT- qPCR bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Normalisiert wurde auf die ubiquitär exprimierte RNU6B RNA.

In einem nächsten Schritt wurde die miR-34a-Expression im Kleinhirn mit der in den vier adhären wachsenden Medulloblastomzelllinien HD-MB3, ONS-76, Daoy und UW-228 verglichen (Abb. 15). Alle 4 Zelllinien wurden ursprünglich aus malignem Gewebe des Kleinhirns etabliert. Es wurde von allen Zelllinien Gesamt-RNA isoliert und die miR-34a und die ubiquitär exprimierte RNU6B Expression gemessen. Die Messung der RNU6B diente zur anschließenden Normalisierung der miR-34a Werte. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung.

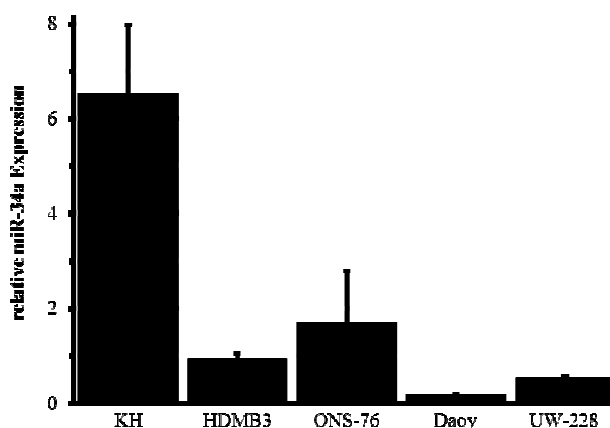


Abb. 15: miR-34a Expression in humanen Medulloblastomzelllinien

Die Expressionshöhe der miR-34a in vier verschiedenen Medulloblastomzellen wurde mittels RT-qPCR untersucht. Als Vergleichsgewebe wurde normales Kleinhirngewebe eingesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Normalisiert wurde auf die ubiquitär exprimierte RNU6B RNA.

In den untersuchten Zelllinien war eine vergleichbare ähnlich geringe miR-34a-Expression nachweisbar. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die miR-34a-Expression in

den humanen MB-Zelllinien und im primären Medulloblastom im Vergleich zum Kontrollgewebe herunterreguliert vorliegt.

3.3.2 Effekt der miR-34a Reexpression auf die Zellviabilität

Da es sich bei der mikroRNA-34a um einen putativen Tumorsuppressor handelt, wurde als erster Schritt der Einfluss einer Reexpression von miR-34a auf die Vitalität und auf die Proliferation von Medulloblastomzellen (ONS-76, HD-MB3, Daoy und UW-228) mittels eines kolorimetrischen MTT-Assays gemessen. Die Abbildung 16 zeigt das Wachstum dieser Zellen nach 48h, 72h, 96h und 120h.

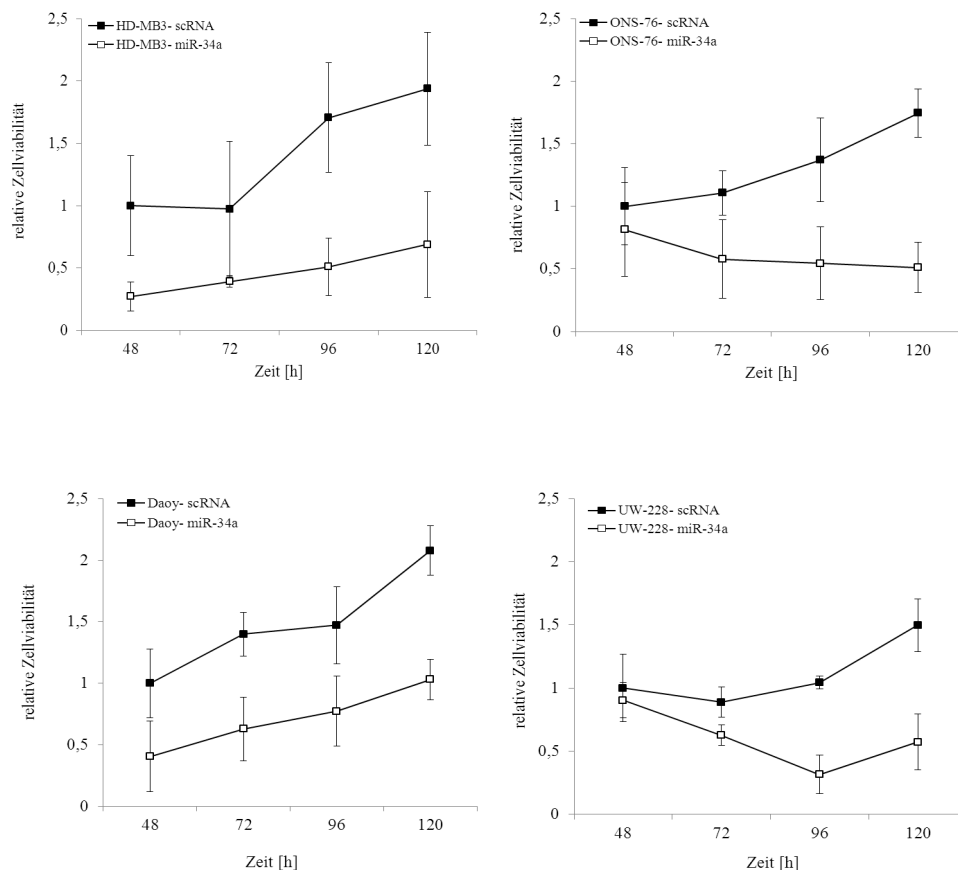


Abb. 16: Wachstumsverhalten der Zelllinien HD-MB3, ONS-76, Daoy und UW-228 nach Behandlung mit miR-34a gemessen im MTT- Zellviabilitätstest.

Die Zellviabilität wurde über einem Zeitraum von 48-120 Stunden gemessen. Als Kontrolle wurde eine scrambled- RNA transfiziert. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Ein Einfluss der *scrambled*-RNA auf das Proliferationsverhalten der Zellen war nicht zu verzeichnen. Überexpression von miR-34a hingegen vermindert die Zellviabilität, die

spätestens nach 72h erkennbar war. ONS-76 zeigten die am stärksten unterschiedliche Kinetik im Zeitverlauf nach einer miR-34a-Überexpression.

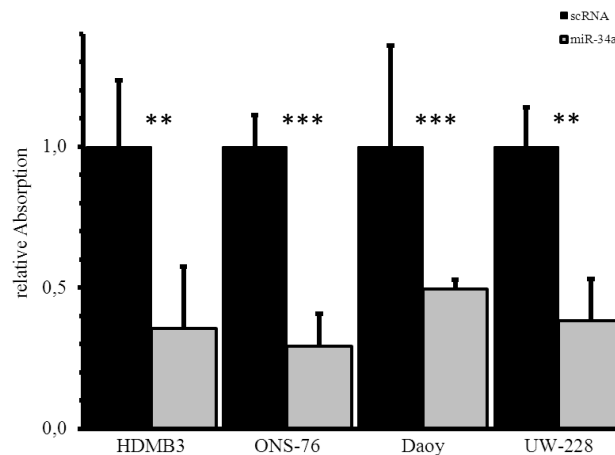


Abb. 17: Darstellung der Viabilität von HD-MB3, ONS-76, Daoy und UW-228 120h nach Transfektion mit miR-34a.

Im MTT-Zellviabilitätsassay wurde als Kontrolle und als Vergleich die scrambled RNA eingesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ im t-Test

HD-MB3 und UW-228 zeigten bei 120h nach Transfektion eine Abnahme der Zellproliferation um 60% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 17). Bei den ONS-76 konnte im Vergleich zur Kontrolle eine Reduzierung der Viabilität um 70% beobachtet werden. Durch Überexpression der miR-34a konnte die Proliferation in der Zelllinie Daoy um 50% gegenüber den unbehandelten Zellen verringert werden. In allen getesteten MB- Zellen führte eine miR-34a Reexpression somit zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität.

3.3.3 Effekt der miR-34a Reexpression auf die Zellproliferation

Eine Eigenschaft einer malignen Zelle ist die ungehemmte Proliferation bzw. das unbegrenzte replikative Potential. Wie sich die tumorsuppressive miR-34a nach Reexpression in den MB-Zellen auf das Proliferationsverhalten dieser Zellen auswirkt, wurde mittels eines „Cell Proliferation ELISA“ untersucht. Hier erfolgte die Messung der Proliferation von Medulloblastomzellen, die mit miR-34a transfiziert wurden, anhand des BrdU-Einbaus während der DNA-Synthese. Als Zelllinien wurden erneut die adhärent wachsenden ONS-76, HD-MB3, Daoy und UW-228 gewählt. Es zeigte sich eine Abnahme der Proliferation der Medulloblastomzellen 120 Stunden nach Transfektion mit dem Plasmid pEZX-miR-34a und damit verbundener Reexpression von miR-34a.

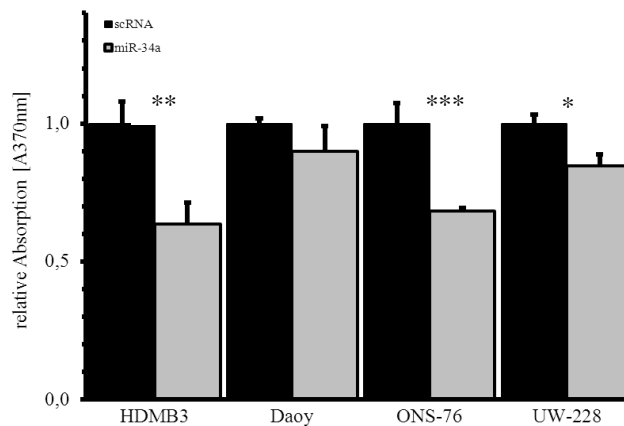


Abb. 18: Darstellung des relativen Proliferationsvermögens von mit miR-34a transfizierten HD-MB3, ONS-76, Daoy und UW-228 nach 120h, gemessen mittels „Cell Proliferation ELISA“.

Als Kontrollzellen dienten Zellen, die mit dem Leerplasmid transfiziert wurden (=scrambled). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ im t-Test

Die Inkubation mit miR-34a führte zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation bei den HD-MB3, ONS-76 und UW-228 Zellen, allerdings nicht in den Daoy-Zellen im Vergleich zu den mit dem Leerplasmid transfizierten Kontrollzellen (HD-MB3 $p = 0,00064$, ONS-76 $p = 0,00014$ und UW-228 $p = 0,012$) (Abb. 18). Eine proliferationshemmende Rolle der miR-34a konnte somit in drei von vier MB- Zellen nachgewiesen werden.

3.3.4 Effekt der miR-34a Reexpression auf die Apoptose

Veränderungen im Gen für das Protein p53 führen zu einer Umlagerung großer Teile des Erbguts von Krebszellen. Ein vererbter p53-Defekt ist mit einer äußerst aggressiven Gruppe von Hirntumoren (Shh-Medulloblastome) bei Kindern assoziiert (Rausch et al. 2012). P53 hält als „Wächter des Genoms“ nach DNA-Schäden die Zellteilung auf, so dass die Defekte repariert werden können. Sind die Schäden irreparabel, sorgt p53 für die Einleitung der Apoptose. Die in dieser Arbeit verwendeten MB-Zellen tragen zum Teil eine p53-Mutation. p53-Mutationen treten in Daoy (C242F) (Raffel et al. 1993) und in UW-228 (T155N) Zellen auf. HD-MB3 und ONS-76 Medulloblastomzellen besitzen einen R72P SNP im p53-Gen, welcher weder die p53-Expression noch die Funktion beeinflusst. Jedoch zeigten insbesondere diese wildtyp p53 exprimierenden Zellen eine stark erhöhte MDM2 mRNA Expression, welche wiederum in eine Dysfunktion von p53 resultiert (Kunkele et al. 2012).

MiR-34a ist ein direktes Target von p53 (Raver-Shapira et al. 2007). Um den Effekt auf die Apoptose nach Reexpression der tumorsuppressiven miR-34a nachzuweisen, wurden die MB-Zellen erneut mit dem pEZX-miR-34 Plasmid transfiziert und die Apoptoserate der Zellen mit Hilfe des „Cell Death Detection Kits“ untersucht. Der Test beruht auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip (siehe Kapitel 2.2.2.6).

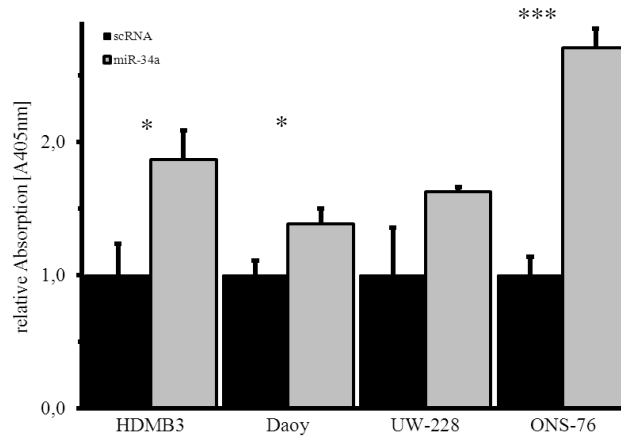


Abb. 19: Anteil der apoptischen Zellen der untersuchten Medulloblastomzellen 120h nach Behandlung mit miR-34a gemessen mittels „Cell Death Detection Kit“.

Als Kontrollzellen dienten Zellen, die mit dem Leerplasmid transfiziert wurden (=scrambled).

Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ im t-Test

Bei unstimulierten, nicht-transfizierten Medulloblastomzellen war der Anteil an apoptotischen Zellen signifikant niedriger als bei den mit miR-34a-überexprimierten Zellen. Dabei zeigte sich, dass die ONS-76 die deutlichste Erhöhung des Anteils an apoptotischen Zellen aufwies. Die statistische Signifikanz der Überexpression der miR-34a im Vergleich zur Kontrolle betrug $p < 0,001$ (Abb. 19). Die verwendeten Medulloblastomzelllinien tragen entweder eine p53-Mutation (Daoy, UW228) oder sind wildtyp p53 (HD-MB3, ONS-76), wobei eine MDM2-Überexpression in HD-MB3 und ONS-76 Zellen dazu führt, dass p53 funktionell deletiert wird. Wenn p53 mutiert oder inaktiviert ist, kann die Zelle nicht mehr auf Stresssignale mit Zellzyklussarrest und Zelltod reagieren und die Tumorentstehung wird begünstigt. Durch Überexpression der miR-34a, einem Target von p53, wird u.a. die Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 gehemmt, welches in einer gesteigerten Apoptoserate resultiert (Bommer et al. 2007). Die Ergebnisse ließen somit vermuten, dass miR-34a p53-induzierte Effekte (wie Apoptose) vermittelt.

3.3.5 Effekt der miR-34a Reexpression auf den Zellzyklus

MiR-34a reduziert sowohl auf mRNA und Proteinebene das Cyclin D1 (CCND1) und die Cyclin-abhängige Kinase 6 (CDK6). Diese Herunterregulation von CCND1 und CDK6 führt zu einem G₁-Arrest (Sun et al. 2008). Ein weiteres Zielgen von miR-34a ist E2F3, welches ein Regulator der Zellzyklus-Progression ist (Tazawa et al. 2007; Welch et al. 2007).

Um zu überprüfen, ob eine erhöhte Expression von miR-34a auch in Medulloblastomzellen ausreicht, den programmierten Zelltod und einen G₁-Arrest auszulösen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Es wurden jeweils 6×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte mit pEZX-miR-34a transfiziert. Nach 120 Stunden wurden die Zellen für FACS-Analysen vorbereitet.

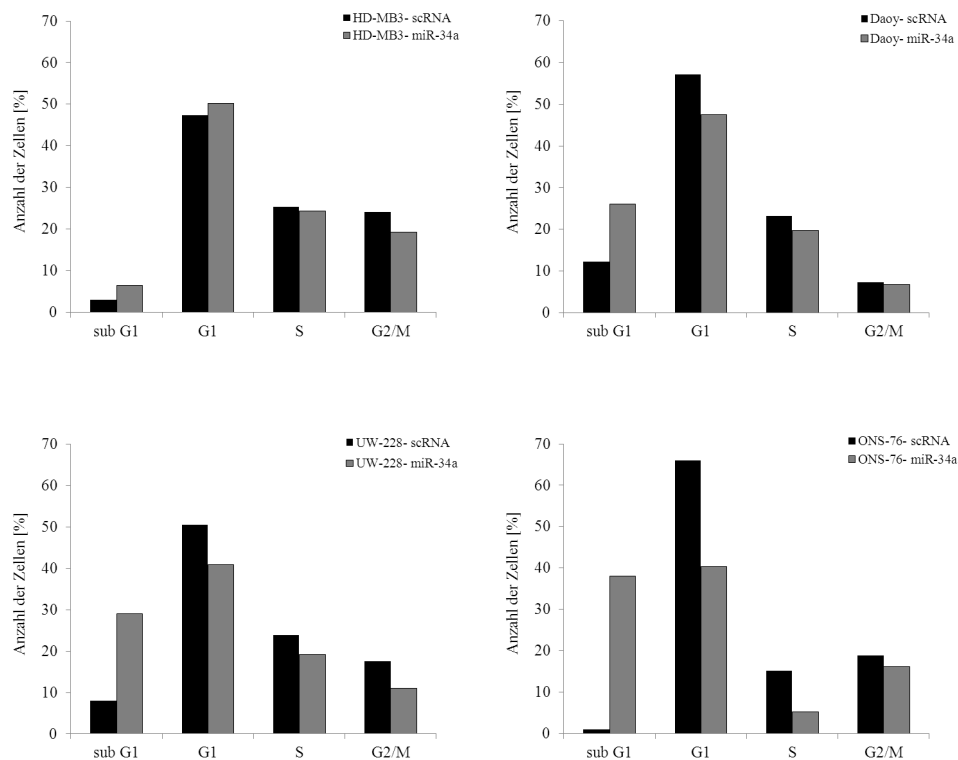


Abb. 20: Zellzyklusverteilung von HD-MB3-, Daoy-, UW-228- und ONS-76- Zellen 120h nach Transfektion mit miR-34a.

Dargestellt ist die Verteilung der behandelten MB- Zellen innerhalb der verschiedenen Phasen des Zellzyklus gemessen mittels FACS- Analyse. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem pEZX-MR04- Vektor transfiziert.

Die Überexpression von miR-34a in Medulloblastomzellen führte zu einem Anstieg der Apoptose (Abb. 19). Abbildung 20 zeigt die Zellzyklusphasen-Verteilung der behandelten Zellen 120 Stunden nach Transfektion.

Wurden HD-MB3 Zellen mit miR-34a behandelt, stieg der Anteil der apoptotischen Zellen von 2% auf 8% an. Nach 120 Stunden befanden sich 51% in der S/G₂/M-Phase gegenüber 56% unbehandelten Zellen.

Daoy-Zellen zeigten einen deutlicheren Effekt. 29% der mit miR-34a transfizierten Zellen verblieben in der Sub-G₁-Phase, gegenüber 12%. 31% der unbehandelten Zellen gingen in die S/G₂/M-Phase über, im Vergleich dazu, waren es bei den transfizierten Daoy nur 26%.

Die mit miR-34a behandelten UW-228-Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des sub-G₁-Phaseanteils im Vergleich zu den Kontrollzellen. Ebenso unterschied sich der S/G₂/M-Phaseanteil der behandelten Zellen mit 30% von den unbehandelten Zellen mit 41% signifikant.

Die Bestimmung der apoptotischen Zellen (Sub-G₁-Peak) ergab bei den mit miR-34a transfizierten ONS-76 38% gegenüber einem Anteil von 1% bei den Kontrollzellen. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der Zellzyklusprogression war zu erkennen. 29% der unbehandelten ONS-76-Zellen, im Vergleich zu 22% der miR-34a ONS-76-Zellen, befanden sich in der S/G₂/M-Phase.

Insgesamt zeigten behandelte und unbehandelte HD-MB3-Zellen nur einen geringfügigen Unterschied hinsichtlich der Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus. In den anderen mit miR-34a transfizierten Medulloblastomzelllinien war ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils der sich in der Sub-G₁-Phase befindlichen Zellen zu verzeichnen, mit bis zu 40% bei den ONS-76. Demnach war in diesen Zellen eine Überexpression der mikroRNA-34a hinreichend, um den programmierten Zelltod auszulösen.

3.3.6 Effekt der miR-34a Reexpression auf die Seneszenz

Die Reexpression von miR-34a in Prostata- und Pankreas-Krebszellen induziert Seneszenz und bewirkt über die Herunterregulation von CDK6 einen Zellzyklusarrest (Lodygin et al. 2008). Seneszente Zellen weisen verschiedene biochemische Marker, wie die Expression der Seneszenz-assoziierten sauren β -Galaktosidase Aktivität, auf. Das 96-Loch „Cellular Senescence Assay Kit“ von Cell Biolabs stellt eine effiziente Methode dar, die zelluläre Seneszenz über ein fluorimetrisches Substrat und anschließende Messung der Seneszenz-assoziierten sauren β -Galaktosidase-Aktivität festzustellen.

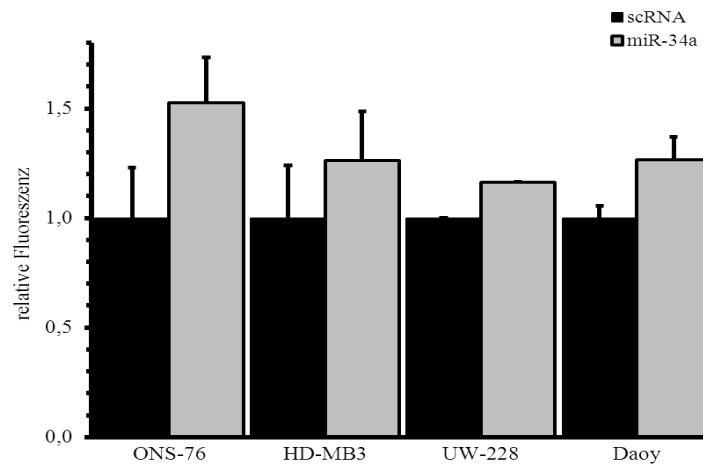


Abb. 21: Darstellung der relativen Fluoreszenz als Maß der Seneszenz von mit miR-34a transfizierten HD-MB3, ONS-76, Daoy und UW-228 nach 120h.

Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Die deutlichsten Unterschiede und Effekte zwischen den mit dem Leerplasmid transfizierten Zellen und den mit miR-34a transfizierten Zellen zeigten ONS-76- Zellen. Die Inkubation mit miR-34a- Plasmid führte jedoch auch in den anderen drei getesteten Medulloblastomzelllinien zu einem Anstieg der zellulären Seneszenz.

3.3.7 Effekt der miR-34a Re-Expression auf die SIRT1 und MYCN Expression

Als beschriebene Zielgene der miR-34a sind u. a. SIRT1 und MYCN angegeben (Fujita et al. 2008b; Ito et al. 2010; Wei et al. 2008; Yamakuchi et al. 2008). P53 induziert miR34a, welches über eine Inhibition von SIRT1 die p53 Aktivität steigern soll. Ein weiterer Effekt einer miR-34a-Expression ist die Kontrolle des Zellzyklus über die Herunterregulierung von z.B. MYCN (reviewed in (Kaller et al. 2011)). Die Regulation des Zellzyklus über Induktion von Apoptose konnte bereits mittels eines *Cell Death* EISA gezeigt werden (Abb. 20). Abbildung 22 stellt die Westernblot-Analysen hinsichtlich dieser Zielgene der miR-34a dar. 120 Stunden nach Transfektion mit miR-34a, welches zu einer Überexpression dieser mikroRNA in den entsprechenden Zellen führt, zeigte sich eine Herunterregulierung der Zielgene SIRT1 und MYCN.

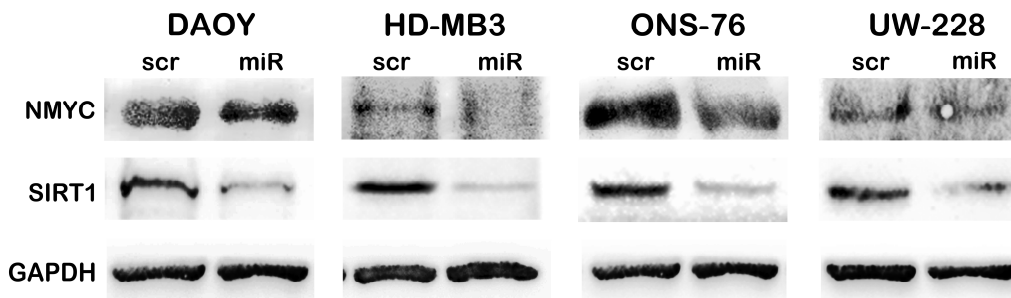


Abb. 22: Proteinexpression der Zielgene MYCN und SIRT1 nach Reexpression der miR-34a in Daoy, HD-MB3, ONS-76 und UW-228 Medulloblastomzellen mittels Western Blot- Analysen.
Als Ladungskontrolle diente die Detektion von GAPDH.

Die Ergebnisse der Proteinbiochemie bestätigten SIRT1 und MYCN als direkte Zielgene der miR-34a.

3.4 Molekulare Charakterisierung der miR-34a *in vivo*

Um den Einfluss der miR-34a *in vivo* näher zu charakterisieren, wurden die miR-34a *knockout* Mäuse mit Mausmodellen des Medulloblastoms verpaart. Als Medulloblastom-Mausmodelle wurden die *ptch*^{+/-} (Hahn et al. 1998) und die ND2:SmoA1 (Hallahan et al. 2004) Mäuse gewählt. Beide Linien sind dadurch gekennzeichnet, dass sie mit einer unterschiedlichen Penetranz spontan Medulloblastome ausbilden, die histologisch dem humanen Medulloblastom ähneln. Die entstandenen Tumore sollten auf mRNA- und Proteinebene näher charakterisiert werden.

3.4.1 miR-34a Expression in Mausmodellen des Medulloblastom

In humanen Medulloblastomzelllinien und im Primärtumor konnte eine signifikant erniedrigte miR-34a-Expression nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.1). Um entsprechende *in vivo* Analysen durchführen zu können, wurde zunächst die miR-34a-Expression in murinen Medulloblastomen gemessen. Aus Kleinhirnen verschiedener Mäuse wurde die miRNA und cDNA isoliert und anschließend die miR-34a-Expression mittels Real-Time-PCR validiert.

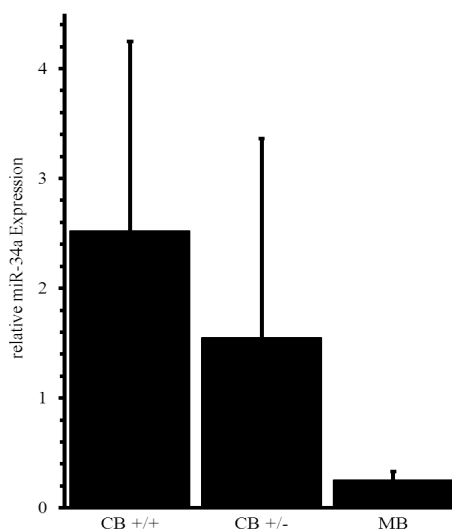


Abb. 23: miR-34a Expression in SmoA1 transgenen Mäusen.

Die Expressionshöhe der miR-34a wurde in Wildtyp, in SmoA1 transgenen Mäusen ohne Tumor und in SmoA1 transgenen Mäusen mit einem Tumor mittels RT- qPCR untersucht und verglichen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Normalisiert wurde auf die ubiquitär exprimierte RNU6B RNA.

CB+/+ = Wildtyp Maus; CB +/- = heterozygote SmoA1 transgene Maus ohne Befund; MB = SmoA1 transgene Maus mit Medulloblastom

Im Cerebellum von SmoA1 Mäusen, die ein Medulloblastom entwickelten, war die miR-34a-Expression im Vergleich zum Kleinhirn von Wildtyp-Mäusen stark erniedrigt.

Auch in den $ptch^{+/-}$ -Mäusen war die miR-34a-Expression signifikant herunterreguliert. In Kleinhirnen von $ptch^{+/-}$ transgenen Tieren, die histologisch keinen Tumorbefund aufwiesen, ist die Expressionshöhe der miR-34a vergleichbar mit dem Kleinhirn von Wildtyp-Mäusen.

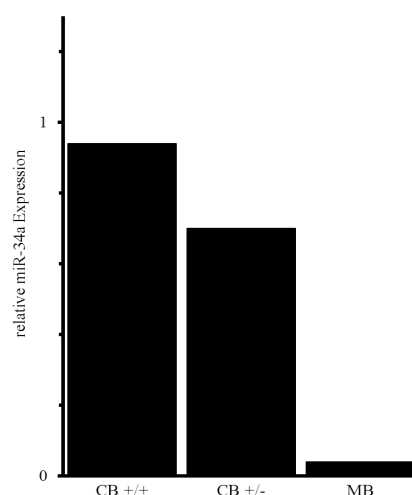


Abb. 24: miR-34a Expression in ptch transgenen Mäusen.

Die Expressionshöhe der miR-34a wurde in Wildtyp, in $ptch^{+/-}$ Mäusen, die keinen Tumore entwickelten, und in $ptch^{+/-}$ Mäusen mit einem Medulloblastom mit Hilfe der RT- qPCR gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Normalisiert wurde auf die ubiquitär exprimierte RNU6B RNA.

CB+/+ = Wildtyp Maus; CB +/- = heterozygote ptch transgene Maus ohne Befund; MB = ptch transgene Maus mit Medulloblastom

Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich auch im murinen Modell eine reduzierte Expression der miR-34a im Tumorgewebe.

3.4.2 Effekt des miR-34a *knockout* auf das Tumorwachstum

Um die Funktion der miR-34a auf die Tumorprogression aufzuklären und die Inzidenz der Tumorentstehung in An- und Abwesenheit von miR-34a abzuschätzen, wurden die generierten *knockout* Mäuse mit zwei Mausmodellen verkreuzt, die sich durch eine spontane Tumorentstehung auszeichnen.

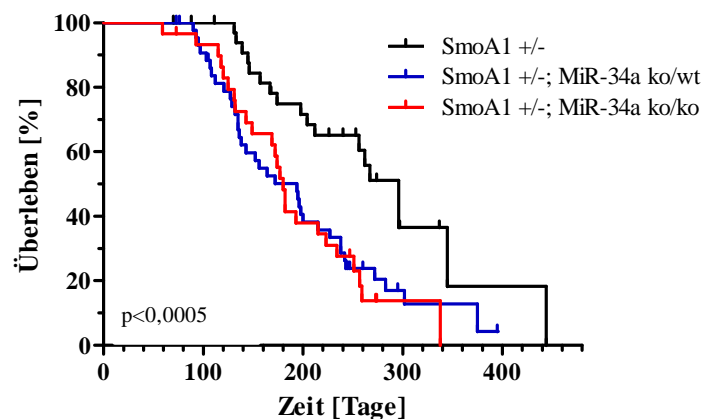


Abb. 25: Kaplan- Meier Überlebenskurve der SmoA1- Mäuse

Die Kaplan-Meier Überlebenskurve zeigt, dass ein miR-34a *knockout* die Medulloblastom-Entstehung beschleunigt (blaue und rote Kurve). Der Endpunkt wurde beim Auftreten von ersten Symptomen (Auswölbung des Schädels im Bereich des Hinterkopfes, Kopfschiefhaltung, Linksdrehung beim Laufen, ungepflegtes Fell, Inaktivität bis hin zur Lethargie, Ataxie), die auf eine Medulloblastom- Entstehung hinwies, definiert. Der p- Wert bezieht sich auf den Vergleich des ereignisfreien Überlebens der SmoA1^{+/-}- Mäuse (schwarze Kurve) und dem Auftreten der ersten Symptome bei den doppelt transgenen SmoA1; MiR-34 Mäusen (rote Kurve).

SmoA1 transgene Mäuse wurden mit den miR-34a *knockout* Mäusen verkreuzt. Die Abbildung 25 zeigt die Kaplan- Meier- Überlebenskurven der Mäuse mit den verschiedenen Genotypen. Die miR-34a doppeltransgenen Mäuse zeigten ein signifikant geringeres Überleben als SmoA1-Mäuse, als Hinweis auf eine Beschleunigung der Tumorentstehung und/oder -progression durch den miR-34a *knockdown*.

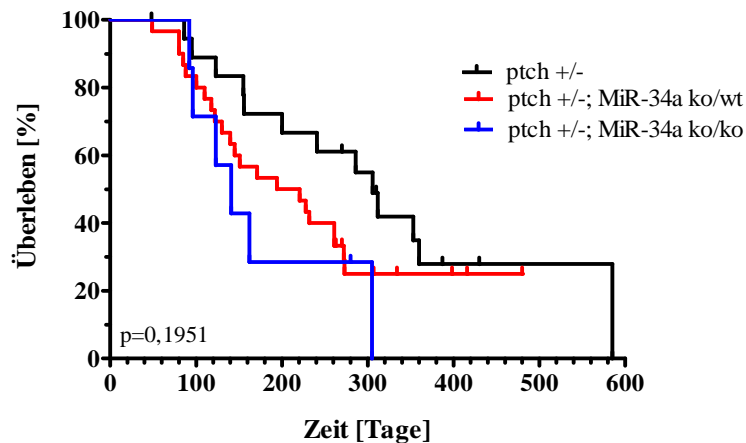


Abb. 26: Kaplan-Meier Überlebenskurve der $ptch^{+/-}$ Mäuse

Die Kaplan-Meier Überlebenskurve zeigt, dass ein *miR-34a knockout* die Medulloblastom-Entstehung beschleunigt (blaue und rote Kurve). Der Endpunkt wurde beim Auftreten von ersten Symptomen (Auswölbung des Schädels im Bereich des Hinterkopfes, Kopfschiefhaltung, Linksdrehung beim Laufen, ungepflegtes Fell, Inaktivität bis hin zur Lethargie, Ataxie), die auf eine Medulloblastom-Entstehung hinwiesen, definiert. Der p-Wert bezieht sich auf den Vergleich des ereignisfreien Überlebens der $ptch^{+/-}$ Mäuse (schwarze Kurve) und dem Auftreten der ersten Symptome bei den doppelt transgenen $ptch$; *MiR-34* Mäusen (blaue Kurve).

Ein zweites Mausmodell für spontane Medulloblastom-Entstehung (sogenannte $ptch^{+/-}$ Mäuse) wurde mit den *miR-34a knockout* Tieren verpaart und auch deren Nachkommen über einen längeren Zeitraum auf Tumorentwicklung beobachtet. Die Inzidenz der Tumormorphierung der $ptch^{+/-}$ Mäuse ist mit 14% deutlich niedriger als die der *SmoA1* Mäuse mit ca. 48%. Dennoch war eine Tendenz zu beobachten, dass ein *miR34a-knockout* auch in den $ptch^{+/-}$ Mäusen die Entstehung von Medulloblastomen beschleunigt. Mit Hilfe beider Mausmodelle konnte nachgewiesen werden, dass ein *miR-34a knockout* die Tumorentstehung und die Tumorentwicklung *in vivo* beschleunigt.

3.4.3 Effekt des *miR-34a knockout* auf SIRT1 und MYCN

Anhand der Kaplan-Meier Überlebenskurven war ersichtlich, dass ein *miR-34a knockout* die Tumormorphierung und den Verlauf negativ beeinflusst. Um die Bedeutung der *miR-34a* als Regulator der MB-Entstehung funktionell zu charakterisieren, wurden die entstandenen Tumore hinsichtlich der Expression der Zielgene der *miR-34a* untersucht. Die Medulloblastome wurden präpariert und Lysate für die Proteinexpression gewonnen. Die Expression der bekannten Zielgene SIRT1 und MYCN wurde proteinbiochemisch untersucht.

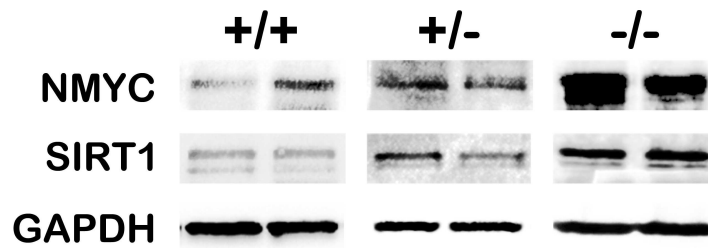


Abb. 27: Proteinexpression der Zielgene MYCN und SIRT1 in SmoA1 Mäusen.

+/+ = SmoA1 heterozygote Mäuse mit Tumor; +/- = doppel-transgene Mäuse: SmoA1 heterozygot; miR-34a ko/wt; -/- = doppel-transgene Mäuse: SmoA1 heterozygot; miR-34a ko/ko
Als Ladungskontrolle diente die Detektion von GAPDH.

Es war eine deutliche Hochregulation der Zielgene dieser miRNA in den miR-34a doppeltransgenen Mäusen zu erkennen. Besonders auffällig war der Unterschied einer sehr hohen MYCN-Expression zwischen den SmoA1; MiR-34a ko/wt und den SmoA1; MiR-34a ko/ko Mäusen.

In vitro zeigte sich eine Suppression der miR-34a-Zielgene nach Reexpression dieser miRNA (siehe Kapitel 3.3.7). Proteinbiochemische Analysen der Tumore *in vivo* wiesen eine Hochregulation der bekannten und zuvor untersuchten Zielgene nach.

4 Diskussion

MikroRNAs sind kurze, nicht-kodierende RNAs, welche durch sequenzspezifische Interaktion mit mRNAs deren Translation reprimieren oder die Degradation fördern (Bartel 2004). MiRNAs regulieren bis zu 30% der Gene und sind an vielen physiologischer Prozesse, wie Entwicklung, Differenzierung, Kontrolle des Zellzyklus und Apoptose beteiligt (Boehm & Slack 2005; Carleton et al. 2007; Harfe 2005; Kim et al. 2006; Lau et al. 2001). In vielen Tumorentitäten sind miRNAs dereguliert (Garzon et al. 2009a), indem sie als Onkogen die Expression eines Tumorsuppressorgens oder als Tumorsuppressorgen die Expression eines Onkogens inhibieren (Esquela-Kerscher & Slack 2006). Die tumorsuppressive miR-34a ist auf dem Chromosom 1p36 lokalisiert, das in einigen Tumorentitäten deletiert ist (Cole et al. 2008). Weiterhin ist die miR-34a in verschiedenen Tumorentitäten, wie auch dem Medulloblastom, herunterreguliert.

Eine Analyse der miR-34a-Expression im primären humanen Medulloblastom und in Medulloblastomzelllinien zeigte eine signifikante Herunterregulierung im Vergleich zu normalem Cerebellum. Eine Reexpression der miR-34a in adhären humanen Medulloblastomzelllinien reduzierte die Viabilität und die Proliferation der Zellen und ließ andererseits die Seneszenz- und Apoptoserate ansteigen. Proteinbiochemisch konnte nachgewiesen werden, dass eine miR-34a-Überexpression zu einer Herunterregulierung von miR-34a- Targets führt. Dazu gehörten die für die Proliferation wichtigen Targets SIRT1, MYC und E2F3.

In etablierten Mausmodellen des Medulloblastoms, ND2:SmoA1 und *ptch*^{+/-}, die mit unterschiedlicher Inzidenz spontan Tumore bilden, zeigte sich eine signifikante Suppression der miR-34a in den entstandenen Medulloblastomen im Vergleich zu Proben des gesunden murinen Kleinhirns. Die Funktion der miR-34a *in vivo* wurde daraufhin mittels zielgerichteter Transgenese in Mäusen analysiert. Es wurde eine transgene Mauslinie mit einer Deletion im MiR-34a Gen generiert. Die entsprechenden Mäuse erwiesen sich als lebensfähig und fertil. Umfangreiche, standardisierte Phänotyp-Untersuchungen von mehr als 300 Parametern, die in der German Mouse Clinic durchgeführt wurden, zeigten keine signifikanten phänotypischen Auffälligkeiten. Die *knockout* Mäuse wurden mit den SmoA1 und *ptch*^{+/-} Tieren verkreuzt und über einen längeren Zeitraum wurde die Tumorentstehung und -inzidenz beobachtet. Die doppelt transgenen Mäuse zeigten ein signifikant geringeres Überleben als die Mäuse mit

wildtyp miR-34a. Die Analyse der Tumore, in denen die miR-34a fehlte, zeigte eine sehr starke Hochregulation der Zielgene SIRT1 und MYCN.

4.1 MiR-34a in der normalen Entwicklung

Die Generierung einer *Knockout*-Maus für das miR-34a Gen sollte zu einem besseren Verständnis der funktionellen Bedeutung dieser tumorsuppressiven miRNA in der Entwicklung des Gesamtorganismus beitragen.

Um zu gewährleisten, dass die Untersuchungen und weiteren Experimente mit einem funktionierendem *Knockout* im miR-34a Gen durchgeführt wurden, erfolgte der Nachweis des *Knockouts* auf DNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR. Die DNA aus wildtyp, hetero- und homozygoten Mäusen wurde isoliert und die PCR-Analyse ergab, dass das miR-34a Gen tatsächlich inaktiviert ist und somit ein Komplet-*Knockout* vorliegt. In den untersuchten Geweben Hirn, Lunge, Leber und Milz zeigte sich, dass die miR-34a mit unterschiedlicher Intensität exprimiert ist. Die stärkste Expressionshöhe der miRNA war im Hirn auszumachen. Auch konnte nachgewiesen werden, dass die miR-34a-Expression von der Gendosis abhängig ist. Die Expression der miRNA war in den heterozygoten Mäusen signifikant erniedrigt im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. In den miR-34a *knockout* Mäusen ist die Expression der miR-34a nicht nachweisbar, im Vergleich zur reduzierten Expression in den heterozygoten Mäusen.

Die gezüchteten Tiere wurden über einen längeren Zeitraum im Hinblick auf etwaige Auffälligkeiten und auf ein eventuell unterschiedlich langes Überleben beobachtet. Die miR-34a *knockout* Mäuse (sowohl hetero- als auch homozygote Tiere) waren lebensfähig, fertil und zeigten keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen. Um weitere Einblicke in die Funktion des deletierten Gens für den Gesamtorganismus zu erhalten, sind in Zusammenarbeit mit der ‚German Mouse Clinic‘ in München umfangreiche und standardisierte Phänotyp-Analysen durchgeführt worden. Mausmutanten wurden dort zunächst in einem primären Screen, der viele physiologische Bereiche abdeckt, analysiert. Es wurden Untersuchungen in den Bereichen Verhalten, Knochen- und Knorpel-Entwicklung, Neurologie, klinische Chemie, Entwicklung des Auges, Immunologie, Allergie, Steroidmetabolismus, Energiemetabolismus, Lungenfunktion, Seh- und Schmerzempfinden,

Kardiovaskulärsystem, molekulare Phänotypisierung über Genexpressionsprofile und Pathologie vorgenommen (Gailus-Durner et al. 2005). Nach den umfassenden primären Phänotypenanalysen der miR-34a hetero- und homozygoten *knockout* Mäuse wiesen die Daten nicht darauf hin, dass ein Verlust der miR-34a mit einem Phänotyp assoziiert ist. Jedoch umfassen diese Screens nur basale Tests. Interessante Ausreißer, die in den primären Assays entdeckt werden, können in mehr detaillierten und fokussierten sekundären oder tertiären Screens weiter analysiert werden. Die Sekundär- bzw. Tertiärscreens beinhalten auch einige Challenging-Experimente, wie z.B. die Infektion mit Listerien. Im Allergie-Sekundärscreen werden Mäuse einem allergenen Aerosol ausgesetzt, nachdem sie zuvor mit dem Allergen sensibilisiert wurden. Multiple humorale und zelluläre Parameter, die mit einer Allergie-Antwort in der Lunge assoziiert sind, werden daraufhin untersucht. Da die getesteten miR-34a *knockout* Mäuse im Vergleich zu den getesteten wt-Kontrollen keinerlei signifikante Hinweise auf phänotypische Auffälligkeiten zeigten, wurde auf die Durchführung sekundärer und tertiärer Screens verzichtet.

In den letzten Jahren wurden einige *knockout* Mäuse einer miRNA etabliert, um die komplexen Vorgänge in der Gesamtheit eines lebenden Organismus *in vivo* zu untersuchen. Durch diese Mausmodelle lässt sich der Zusammenhang der Deletion einer miRNA oder miRNA-Clustern und Krankheitsbild direkt nachweisen und wiederum können therapeutische Ansätze zur Krankheitsbehandlung gefunden werden.

Die Deletion der Region 13q14, die für das DLEU/miR15a/16-1 Cluster kodiert, führte zu einer Ausprägung des Phänotyps einer heterogenen B-Zellen-Autonomie, die das Spektrum einer CLL-Pathogenese widerspiegelt. Eine miR-15a/16-a Deletion steigert über die Modulation der Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind, die Proliferation von humanen und murinen B- Zellen (Klein et al. 2010). Mäuse, die defizient für das miR-17-92 Cluster sind, sterben kurz nach der Geburt an einer Lungenhyperplasie und weisen einen Defekt des ventrikulären Septums auf. Paraologe miRNAs des miR-17-92 Clusters sind die miR-106a und 106b. Deletion einer dieser beiden miRNAs führte zu keinen phänotypischen Auffälligkeiten. Embryos, in denen die miR-106b und miR-17-92 deletiert vorlag, starben an Tag 15 der Embryonalentwicklung (Ventura et al. 2008).

Ein Beispiel für eine weitere miRNA *knockout* Maus, die ohne externe Einflüsse keine phänotypischen Veränderungen zeigt, stellt die miR-21 *knockout* Maus dar. Hier können Immundefekte auftreten, wenn die Mäuse mit einer hochdosierten Fettdiät gefüttert werden. Es gibt Hinweise, dass eine Deletion von miR-21 die Inzidenz von chemisch- induzierten epidermalem Karzinom reduziert (Ma et al. 2011). Ein weiteres Beispiel für die funktionelle Bedeutung von miRNAs zeigt die Mir-290-295 *knockout* Maus, die einen inkompletten

letalen Phänotyp aufweist. Überlebende homozygote Weibchen sind steril aufgrund einer reduzierten Oozyten-Anzahl (Medeiros et al. 2011).

Ein möglicher Erklärungsansatz, warum die miR-34a *knockout* Maus keine phänotypischen Auffälligkeiten aufweist, wäre, dass das miR-34a ko-Gen ein direktes Target des Tumorsuppressors p53 ist. Auch für p53 wurde Anfang der 90er Jahre eine *knockout* Maus etabliert, um neue Erkenntnisse hinsichtlich der Funktion zu gewinnen (Donehower et al. 1992; Jacks et al. 1994). Mutationen im p53-Gen sind die am häufigsten beobachteten genetischen Läsionen in humanem Krebs. Mäuse, die die p53-Deletion homozygot tragen, erscheinen zunächst ohne ersichtliche Veränderungen, sie können im Alter von ca. sechs Monaten Lymphome entwickeln (Donehower et al. 1992). Donehower et al. untersuchten eine große Anzahl der p53-defizienten Mäuse und deren wt-Geschwister in zwei unterschiedlichen genetischen Hintergründen, 129/Sv und C57Bl/6, über einen Zeitraum von 2 Jahren. Hetero- und homozygote p53 ko-Tiere zeigten im 129/Sv-Background eine erhöhte Tumorrage, im Vergleich zu den beobachteten Mäusen mit gemischtem genetischem Hintergrund (129/Sv; C57Bl/6). Nur die p53^{-/-} Mäuse im 129/Sv sensitiven Hintergrund entwickelten maligne Teratome (Donehower et al. 1995). Da die miR-34a-ko Mäuse genetisch aus dem Mausstamm C57Bl/6N abstammen, ist es denkbar, dass auch hier ein stamm-spezifischer Phänotyp ausgebildet werden könnte. Diese Hypothese ließe sich durch Rückkreuzung der miR-34a ko in den erwähnten 129/Sv-Stamm testen. Ein Beispiel eines Mausmodells, welches auf einem stamm-spezifischen Phänotyp beruht, ist die TH-MYCN Maus. Bei der TH-MYCN-transgenen Maus wird humanes MYCN in der Neuralleiste unter dem Ratten Tyrosin Hydroxylase (TH)-Promotor exprimiert (Weiss et al. 1997). In diesem Modell entstehen Neuroblastome mit einer sehr hohen Frequenz im 129x1/SvJ genetischen Hintergrund. Über 33% der hemizygot transgenen Mäuse und 100% der homozygot transgenen Mäuse entwickeln Tumore. In anderen murinen genetischen Hintergründen ist eine sehr niedrige Tumorrage zu verzeichnen, wie die 5% Tumorentstehungsrate im Bl/6 Stamm zeigt (Weiss et al. 1997).

Neben der mikroRNA-34a gibt es nur wenige miRNAs, die nach p53-Aktivierung induziert werden und demnach direkte Targets von p53 repräsentieren (Chang et al. 2007; Raver-Shapira et al. 2007; Tarasov et al. 2007). Eine durch p53 induzierte miRNA ist die miR-182, die während der Entwicklung der Retina eine wichtige Rolle übernimmt (Loscher et al. 2007; Xu et al. 2007). Hetero- und homozygote *knockout* Mäuse für miR-182 waren morphologisch unauffällig, lebensfähig und fertil. Auch nach immunhistochemischen Analysen von miR-182-defizienten Retinae waren keine ersichtlichen strukturellen Abnormitäten in der Retina festzustellen (Jin et al. 2009).

Choi et al. beschrieben, die Generierung von MiR-34a *knockout* Mäusen, die mit einer erwarteten Mendelschen Ratio geboren wurden und keine sichtbaren Abnormitäten in der Entwicklung oder der Pathologie aufwiesen (Choi et al. 2011). Des Weiteren führte eine Überexpression von miR-34a, miR-34b oder miR-34c zu einer Reduktion der Proteinexpression von Nanog, Sox2 und n-MYC in embryonalen Stammzellen (ESCs). In miR-34a; miR-34b/c defizienten induzierten pluripotenten Stammzellen wiesen Choi et al. eine gesteigerte Expression des MYCN Proteins nach (Choi et al. 2011).

4.2 MiR-34a in der Tumorentstehung

Die generierten *knockout* Mäuse zeigen, wie schon beschrieben, keine phänotypischen Veränderungen. Auch nach einem längeren Beobachtungszeitraum von mehreren Monaten entwickeln die miR-34a *knockout* Mäuse keine spontanen Tumore und verhalten sich unauffällig. Auch die miR-34a *knockout* Mauslinie von Choi et al. zeigten keinen Trend zu einer spontanen Tumorentstehung. Wenn miR-34a^{-/-} murine Mausfibroblasten (MEFs) für die Reprogrammierung zu pluripotenten Stammzellen induziert wurden, beobachteten sie einen signifikanten Anstieg der Effizienz der Reprogrammierung, ohne dass die Differenzierungsfähigkeit abnahm (Choi et al. 2011). Donehower et al. verglichen, wie der genetische Hintergrund sich auf die spontane Tumorentstehung in homozygot p53-defizienten Mäusen auswirkt. Im mixed 129/C57Bl/6 Background entwickelten sie jediglich mit einer etwas erhöhten Frequenz Lymphome (Donehower et al. 1995).

p53 und miR-34a

Wenn p53 mutiert oder inaktiviert ist, kann die Zelle nicht mehr auf Stresssignale mit Zellzyklussarrest und Zelltod reagieren und die Tumorentstehung wird begünstigt. Eine Ausnahme bilden die neuroektodermalen Tumore, wie das Retinoblastom und das Neuroblastom, bei denen in Primärtumoren vornehmlich wildtyp p53 vorliegt. Die Dysfunktion von p53 resultiert entweder aus seiner nicht-funktionellen Konformation oder einer zytoplasmatischen Sequestration des wildtyp p53-Proteins (Moll et al. 1995; Ostermeyer et al. 1996).

MiR-34a ist ein direktes Target von p53 (Chang et al. 2007; Raver-Shapira et al. 2007; Tarasov et al. 2007). Die in dieser Arbeit verwendeten MB-Zellen weisen zum Teil eine p53-

Mutation. p53-Mutationen treten in Daoy (C242F) (Raffel et al. 1993) und in UW-228 (T155N) Zellen auf. HD-MB3 und ONS-76 Medulloblastomzellen sind wildtyp p53, zeigten jedoch eine MDM2-Überexpression, was mit einer funktionellen Deletion von p53 einhergeht (Kunkele et al. 2012). Die Expression der miR-34a ist im Medulloblastom erniedrigt. Die Tumore entstehen in Abhängigkeit der Expression/der Herunterregulierung von miR-34a. Durch Überexpression der miR-34a wird u.a. die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 gehemmt, welches in einer gesteigerten Apoptoserate resultiert (Bommer et al. 2007). Im Einklang mit bereits publizierten Daten konnte gezeigt werden, dass über eine miR-34a Reexpression die E2F3-, MYCN- und SIRT1-Expression gehemmt wird, was mit einem G₁-Arrest und einer gesteigerten p53-Aktivität einhergeht (Cole et al. 2008; Wei et al. 2008; Welch et al. 2007; Yamakuchi et al. 2008). Die Ergebnisse ließen somit Rückschlüsse zu, dass miR-34a p53-induzierte Effekte vermittelt.

Ein interessanter Aspekt, der im Rahmen der Doktorarbeit nicht untersucht wurde, wäre sicherlich, wie eine miR-34a *knockout* Maus auf Stress reagiert, und ob es zu einem Stress-induzierten Phänotyp, durch Bestrahlung oder durch die Überexpression eines Onkogens, kommt. In nicht-gestressten Zellen sorgt p53 für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. P53 ist direkt an der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden beteiligt, wobei es bei zu starken Schädigungen die Zellteilung unterdrückt bzw. Apoptose einleitet (Janus et al. 1999). Die Schädigung der DNA kann durch chemische Substanzen, durch UV-Strahlung, durch oxidativen Stress und auch durch die Aktivierung von Onkogenen ausgelöst werden (Oren 2003; Vogelstein et al. 2000; Vousden & Lane 2007). Über verschiedene Signaltransduktionswege kommt es zur Akkumulation und Stabilisierung von p53, welches bestimmte Zielgene transkriptionell aktiviert oder reprimiert (Maltzman & Czyzyk 1984). Die Expression der Zielgene kann u.a. den Zellzyklus-Arrest oder die Induktion von Apoptose bewirken. Die Entscheidung zwischen Zellzyklus-Arrest und Apoptose ist vom Grad der p53-Akkumulation abhängig, niedrigere p53-Spiegel führen zum G₁-Arrest und höhere p53-Konzentrationen induzieren Apoptose (Aylon & Oren 2007). Onkogener Stress wird durch ARF und DNA-Schäden durch die Kinase ATM vermittelt. Die deregulierte Expression von Onkogenen, d.h. onkogener Stress, induziert durch Überexpression von z.B. Myc oder Ras, führt zur Aktivierung von ARF, welches MDM2 bindet. MDM2 verhindert die Ubiquitinierung und Degradation von p53. Dadurch wird p53 aktiviert (Bates et al. 1998; Stott et al. 1998).

He et al. untersuchten die miRNA Expressionen in wildtyp und p53-defizienten Mausfibroblasten. Die miR-34-Expression korrelierte mit dem p53-Status (He et al. 2007). In

MEFs, die eine Tetrazyklin-regulierte p53-shRNA exprimieren, stieg nach Hemmung der shRNA die endogene p53-Aktivität graduell innerhalb von 6-8 Tagen an (Dickins et al. 2005). Die Re-Aktivierung von p53 führte zu einer Induktion von pri-miR-34s und reifen miR-34s. Pri-miR-34s und reife miR-34s wurden nach Bestrahlung in verschiedenen Mausgeweben, Milz, Kolon, Thymus und Niere, p53-abhängig induziert. Nach DNA-Schädigung wurde die miR-34 nur in MEFs, die für p53 wildtyp sind, induziert. Onkogenen Stress untersuchten sie in einem Leberkarzinom-Mausmodell, in dem die Tumorgenese durch aktiviertes Ras und kontinuierliche Hemmung von p53 getrieben wird. Die Expression aller drei Mitglieder der miR-34-Familie war erhöht (He et al. 2007; Xue et al. 2007).

LNAs gegen mir-34a schützen wildtyp-p53 exprimierende Lungenkrebszellen bis zu einem gewissen Grad vor Apoptose, die durch DNA-Schäden induziert wurde. Auch die Gruppe um M. Oren untersuchte in Mäusen, ob p53 miR-34a *in vivo* induzieren kann. In wt und p53 *knockout* Mäusen wurden die miR-34a-Spiegel in der Lunge nach Ganzkörperbestrahlung gemessen. Dies induzierte erhöhte miR-34a-Spiegel in den wildtyp Tieren, jedoch nicht in den p53 *knockout* Mäusen. Demnach wurde miR-34a nicht in den p53-*ko* Tieren induziert und dies deutet daraufhin, dass diese Induktion p53 abhängig ist (Raver-Shapira et al. 2007).

Um die Ergebnisse von He et al. (He et al. 2007; Xue et al. 2007) zu bestätigen, wäre als mögliches Experiment denkbar, zunächst murine embryonalen Fibroblasten aus den miR-34a *knockout* Mäusen und aus entsprechenden Kontrolltieren zu isolieren und zu kultivieren. Nach Bestrahlung der MEFs könnte die miR-34a und p53-Expression mittels quantitativer Real-Time-PCR und mittels Western Blot ermittelt werden, und die Frage beantwortet werden, ob nach Radiation durch p53 die miR-34a-Expression hochreguliert, die Expression der Zielgene gehemmt und Apoptose induziert wird. Ein weiterer potentieller Ansatz zur Aufklärung der p53-miR-34a-Achse wäre, den miR-34a *knockout* und wildtyp Mäusen ein Chemotherapeutikum, z.B. Cisplatin, zu verabreichen und auch hier eine mögliche Hochregulierung der miR-34a Expression durch p53 Induktion nachzuweisen.

P53 wird während der Behandlung mit Cisplatin in Nierenzellen und Nierengewebe aktiviert. Bhatt et al. vermuteten, dass miR-34a unter den Bedingungen einer Cisplatin-Nephrotoxizität induziert wird. *In vitro* untersuchten sie die miR-34a Expression nach Cisplatin-Behandlung in BUMPT-Zellen. miR-34a wurde während dieser Behandlung hochreguliert. Um die Rolle von p53 in der Cisplatin-induzierten miR-34a-Expression weiter aufzuklären, führten sie Experimente mit p53 *knockout* Mäusen durch. Sie verabreichten p53^{-/-} Tieren intraperitoneal Cisplatin, die Kontrolltiere bekamen Kochsalz. In wildtyp Tieren war eine erhöhte miR-34a Expression zu messen, in den p53-defizienten Mäusen war die durch Cisplatin vermittelte miR-34a Induktion aufgehoben. Ihre Ergebnisse lassen vermuten, dass die miR-34a durch p53

während der Cisplatin- induzierten Nephrotoxizität induziert wird, und sie eine zytoprotektive Rolle für das Zellüberleben einnehmen könnte (Bhatt et al. 2010).

4.3 MiR-34a als Regulator der Medulloblastom- Entstehung

Bisher ist der Mechanismus, wie p53 und die miR-34-Familie die Regulation ihrer Targets beeinflussen und dadurch Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung vermitteln, nicht vollständig aufgeklärt.

MiR-34a ist auf dem Chromosom 1p36 lokalisiert, welches im Neuroblastom und in anderen Tumorentitäten deletiert ist (Cole et al. 2008). Ein 1p36 LOH korreliert im Neuroblastom mit einer MYCN-Amplifikation. Das Neuroblastom ist ein ektodermaler Tumor, wie das Medulloblastom. In Smo transgenen Mäusen entstehen Medulloblastome auch in Abhängigkeit von der Präsenz und Hochregulation von MYCN (Hallahan et al. 2004).

In Mäusen ist die miR-34a ubiquitär exprimiert, und zeigt die stärkste Expression im Gehirn (Bommer et al. 2007). Guessous et al. konnten in Gliom- und Medulloblastomzelllinien nachweisen, dass eine miR-34a-Expression die Zellproliferation, die Zellzyklus-Progression, das Zellüberleben, die Zellmigration und die Zellinvasion inhibiert (Guessous et al. 2010). Aus diesem Grund wurden als Zellkulturmodell Medulloblastomzellen gewählt. Ziel der Untersuchungen in den Medulloblastomzelllinien war es, die Mechanismen der Aktivierung und Reexpression des Tumorsuppressorgens zu erforschen.

Der Einfluss von miR-34a auf die Zellproliferation wurde mit Hilfe eines Zellproliferation-ELISAs untersucht, der auf dem Prinzip beruht, dass die Messung der proliferierenden Zellen mit der Menge an eingebautem BrdU korreliert. In allen vier getesteten MB-Zellen (ONS-76, Daoy, HD-MB3 und UW-228) gelang der Nachweis, dass eine miR-34a Reexpression zu einer Abnahme der Proliferation führt, wie es auch schon in der Literatur beschrieben ist (Welch et al. 2007). Mit Hilfe des ‚Cell Death Detection‘ Assays konnte in den miR-34a re-exprimierten Zellen eine deutliche Steigerung des Apoptosespiegels im Vergleich zu unstimulierten, nicht- transfizierten Medulloblastomzellen gemessen werden. Auch FACS-Analysen zeigten einen Anstieg der Zellen in der subG₁-Phase, was für eine Induktion von Apoptose spricht. Die hier vorliegenden Daten bestätigen die schon veröffentlichten Funktionen der miR-34a in anderen Tumorentitäten (Chang et al. 2007; Raver-Shapira et al.

2007; Welch et al. 2007). Im Einklang mit der von Welch beschriebenen Herunterregulation von E2F3 durch miR-34a fand sich zudem ein G₁-Arrest. Auch Lodygin et al. beschrieben den Seneszenz-assoziierten Phänotyp der miR-34a im Prostata- und Pankreaskarzinom (Lodygin et al. 2008). Um die Expression von miR-34a-Zielgenen zu analysieren, wurden aus den mit miR-34a transfizierten Zellen Proteine isoliert und Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde die Expression von n-MYC, SIRT1 untersucht und die Regulation miR-34a-abhängiger Regulation dieser Proteine gefunden. Die in dieser Arbeit gezeigte Herunterregulierung der Zielgene von miR-34a konnte somit vorangehende Studien bestätigen. In MYCN-amplifizierten Neuroblastomzellen führte eine miR-34a-Expression zur Induktion von Apoptose und zu einer Reduktion des Zellwachstums (Cole et al. 2008; Wei et al. 2008). Eine gehemmte SIRT1-Expression infolge einer miR-34a-Überexpression konnten Yamakuchi et al. in Kolonkarzinomzellen nachweisen. Sie führten erstmals die Theorie an, dass p53, miR-34a und SIRT1 eine positive Rückkopplungsschleife formen. Die miR-34a vermittelte Repression von SIRT1 führt demnach zu einer weiteren Aktivierung von p53 (Yamakuchi et al. 2008).

Um die Interaktion und den Mechanismus zwischen miR-34a, SIRT1 und MYCN *in vivo* näher zu charakterisieren, wurde das Mausmodell ND2:SmoA1 eingesetzt. Die Aktivierung des Shh-Pathways über eine transgene Expression einer konstitutiven Form von Smo in Maus- GNPs führte zu einer frühen granulären Zell-Hyperproliferation. Medulloblastome entstanden wie erwartet im Alter von 5-7 Monaten mit einer 48%igen Inzidenz (Hallahan et al. 2004). Die Tumorentstehung war zudem abhängig von der Expression und Hochregulierung von MYCN (Swartling et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit diesem Mausmodell die Rolle von SIRT1 in einem MYC-getriebenen Tumormodell analysiert werden. Die miR-34a *knockout* Mäuse wurden mit den SmoA1 Mäusen verpaart und die Nachkommen auf Tumorentstehung beobachtet. Die doppelt transgenen Tiere entwickelten im Alter von 3-5 Monaten und mit einer erhöhten Inzidenz Medulloblastome. In den Tumoren der untersuchten miR-34a *knockout* Mäusen konnte auf Proteinebene ein Expressionsunterschied der miR-34a-Zielgene im Vergleich zu den wildtyp Tieren gefunden werden. Die Analyse der Tumore ergab, dass es zu einer erhöhten Expression von SIRT1 und MYCN in den SmoA1;MiR-34a ko/wt kam, im Vergleich zu den SmoA1;MiR-34a wt/wt Mäusen. Interessanterweise gab es auch noch Unterschiede im Expressionslevel zwischen den Doppeltransgenen SmoA1;MiR-34a ko/wt und den SmoA1;MiR-34a ko/ko. Tiere mit einem homozygoten *knockout* für miR-34a wiesen eine signifikante Hochregulierung der Zielgene SIRT1 und MYCN auf.

Die Gruppe um Glenn Marshall untersuchte den Regelkreis zwischen SIRT1 und MYCN im Neuroblastom. Sie zeigten, dass eine Überexpression von MYCN die SIRT1-Expression dereguliert, welches die Zellproliferation in Neuroblastomzellen induziert. In prä-karzinogenen Zellen von TH- MYCN transgenen Mäusen war die Genexpression von SIRT1 erhöht, im Vergleich zu gesunden Zellen in wildtyp Tieren. Zusammenfassend wiesen die Daten darauf hin, dass MYCN die Genexpression von SIRT1 in gesunden, prä-karzinogenen und Krebszellen beeinflusst, dass eine Hochregulierung von SIRT1 die Zellproliferation fördert und, dass MYCN die SIRT1-Expression während der Transformation einer prä-karzinogenen Zelle zu einem malignem Zelltyp hochreguliert. Eine Repression von SIRT1 reduzierte die Phosphorylierung des ERK-Proteins, des n-MYC-Proteins an S62 und förderte so die Degradation des Proteins n-MYC (Marshall et al. 2011). Phosphoryliertes ERK stabilisierte die Myc-Proteine über die Phosphorylierung von Myc an S62 (Greasley et al. 2000; Otto et al. 2009; Sears et al. 2000) und MKP3 dephosphoryliert und inaktiviert das ERK-Protein (Groom et al. 1996; Kawakami et al. 2003). Marshall et al. wiesen in ihren Experimenten nach, dass SIRT1 über die Repression der MKP3-Expression das n-MYC-Protein stabilisiert, was zur Phosphorylierung von ERK und zur Phosphorylierung des Proteins n-MYC an S62 führt. Als potentiellen Signalweg vermuteten sie, dass MYCN und SIRT1 einen positiven Feedback-Loop formieren, der die Gen-Expression von MKP3 reprimiert, was zu einer Phosphorylierung von Erk und demnach auch zu einer Phosphorylierung von n-MYC an S62 und zu einer Stabilisierung des n-MYC-Proteins führt (Marshall et al. 2011).

Ein weiteres Modell zur Aufklärung der Rolle der miR-34a während der MB-Entstehung beschrieben de Antonellis et al. Eine miR-34a-Überexpression resultierte *in vitro* in einer Hemmung des Notch-Liganden Delta-like 1 (Dll1), in einer Inhibition des Notch2-Signalwegs und in einer Aktivierung des Notch1- Rezeptors (de Antonellis et al. 2011). Eine Interaktion zwischen p53 und dem Notch-Signalweg ist bekannt. P53 inhibiert die Prozessierung von Notch über eine transkriptionelle Inhibition von Presenilin1 (Laws & Osborne 2004). Die Gruppe um Massimo Zollo postulierte nun einen neuen Mechanismus, bei dem p53 mit dem Notch-Signaltransduktionsweg interferiert. Eine über p53-vermittelte miR-34a-Hochregulation resultierte in einer Hemmung von Dll1. Eine miR-34a-Überexpression verminderte *in vivo* die Tumorlast in tumortragenden Nacktmäusen, was auf eine anti-tumorigene Rolle der miR-34a in pädiatrischen Tumoren deutet (Marshall et al. 2011). Die *in vitro* Analysen dieser Arbeit lassen keine Rückschlüsse darauf zu, dass Dll1 ein direktes Zielgen von miR-34a ist. Nach miR-34a Reexpression konnte proteinbiochemisch keine erhöhte Dll1- Expression in den Medulloblastomzelllinien gemessen werden.

Medulloblastome in $ptch^{+/-}$ Mäusen ähneln denen des desmoplastischen Subtypes in humanen Medulloblastomen. Die Gruppe um Scott Pomeroy beschrieb in diesem Modell eine Assoziation des Überlebens mit der TRKC/NTRK3- Expression. Je höher die Expression von TRKC/NTRK3 war, desto länger war die Gesamtüberlebensdauer der Tiere (Segal et al. 1994). Allerdings ähnelte die Morphologie, die Inzidenz und die Altersverteilung der Tumore mit $trkC^{+/-};ptch^{+/-}$ Mäusen trotz relativ niedriger $trkC$ -Expression denen aus $ptch^{+/-}$ Mäusen. Eine $trkC$ -Mutation beeinflusste demnach nicht die frühe Medulloblastom-Tumorgenese. Sie unterstützten die Hypothese, dass die Medulloblastom-Tumorgenese ein mehrstufiger Prozess sei, beginnend mit einer Mutation im $ptch$ -Gen, die eine Klasse von granulären Vorläuferzellen prädisponiert die Proliferation anzuhalten. Nachfolgend kann es durch transformierende Ereignisse oder weitere Mutationen kommen, die als „zweiter Hit“ die Medulloblastom-Entwicklung vorantreiben. Maustumore mit einem reduzierten Expressionsspiegel des Neurotrophin-3 Rezeptors ($trkC/Ntrk3$) zeigten ein geringeres Level an Apoptose, was die wichtige Rolle von TrkC-Signalwegen in der Regulierung einer späteren Phase des Tumorwachstums bestärkt (Kim et al. 2003).

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit produziert wurden, lassen vermuten, dass der Mechanismus, den Marshall et al. beschreiben, zutrifft (Marshall et al. 2011). Eine Hemmung von MiR-34a führt zu einer Hochregulierung von SIRT1 und MYCN, was zu einer beschleunigten Medulloblastom-Entstehung führt. Eine verstärkte MYCN- Expression induziert ein erhöhtes SIRT1- Expressionslevel. MiR-34a reprimiert diesen positiven Feedback-Loop zwischen MYCN und SIRT1 (Abb. 28).

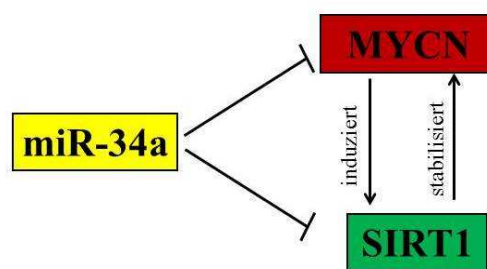


Abb. 28: miR-34a als Regulator der positiven Rückkopplungsschleife zwischen SIRT1 und MYCN

Mraz et al konnten zudem zeigen, dass die miR-34a bei Patienten mit einer CLL, die p53 Mutationen aufweist, niedriger exprimiert ist, im Vergleich zu Patienten ohne Befund (Mraz et al. 2009). Guessous et al. zeigten, dass die miR-34a in humanem Glioblastom reprimiert ist und konnten nachweisen, dass eine miR-34a Expression das Tumorwachstum *in vivo* inhibiert (Guessous et al. 2010). Die Detektion der miR-34a könnte als Prädiktor auf mögliches

Therapieansprechen genutzt werden. Die subkutane Verabreichung eines miR-34a/Atelokollagen Komplexes hemmte das Tumorwachstum in Mäusen (Tazawa et al. 2007). Des Weiteren könnte die Wiederherstellung der miR-34a-Aktivität von Nutzen sein, Resistenzen gegenüber Chemotherapie zu vermeiden. Nach Gabe eines MDM2-Inhibitors, Nutlin 3, auf humane Fibroblasten, wurde die Induktion der miR-34a und miR-34b/c, sowie Seneszenz beobachtet. In Krebszellen mit wildtyp p53 führte die durch Nutlin-3 vermittelte miR-34a-Aktivität zu Apoptose. (Kumamoto et al. 2008).

Wenige miRNAs wirken nur auf ein Target. Eine einzelne miRNA kann ungefähr 200 Transskripte, direkt oder indirekt, regulieren. Ein einzelnes proteinkodierendes Gen kann somit durch mehr als eine miRNA moduliert werden. Dadurch können über die Modulierung einer einzigen miRNA, mehrere Signalwege gleichzeitig reguliert werden. Eine miRNA-gerichtete Therapie stellt somit eine potentiell effektive Tumorthherapieoption dar, als die pharmakologische Ausschaltung einer einzelnen Genfunktion.

Umfassende Kenntnisse über die Targets, die zugrundeliegenden Mechanismen der Regelkreise sowie die Abschätzung der Effekte der miR-34 sind dabei von klinischer Relevanz für die Beurteilung und Vorhersage möglicher Nebeneffekte einer miR-34a-basierten Therapie. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern wichtige Hinweise für die vielfältigen Funktionen der miR-34a, die Mechanismen und die beteiligten onkogenen Signalwege bei der Medulloblastom-Entstehung. Ein Vorteil einer miR-34a-basierten Therapie im Medulloblastom ist, dass über die miR-34a-Überexpression gleich mehrere Targets und mehrere Signalwege beeinflusst werden können. Pharmakologische Inhibition des Notch und Shh-Signalwegs könnte das Überleben von Medulloblastomzellen zusätzlich beeinflussen. Die miR-34a Reexpression führt zur simultanen Herunterregulierung mehrerer Zielgene (MYCN, SIRT1, E2F3) und Signalwege, was eine Resistenzentwicklung erschwert. Ektopye miR-34-Expression könnte zukünftig eine Therapieoption nicht nur im Medulloblastom, sondern auch in anderen Tumorentitäten darstellen.

5 Zusammenfassung

MikroRNAs (miRNAs) sind kurze, nicht-kodierende RNAs, welche durch sequenzspezifische Interaktion mit mRNAs deren Stabilität und Translation regulieren. miRNAs regulieren eine Reihe wichtiger Funktionen während der Entwicklung, der Differenzierung, der Zellzyklusprogression und der Apoptose. Vorangehende Studien haben eine Beteiligung von miRNAs an der Initiation und der Progression im Krebs aufgezeigt. MiR-34a ist in einigen Tumorentitäten herunterreguliert, so z.B. im Medulloblastom. In primären humanen Medulloblastomen und in den untersuchten Medulloblastomzelllinien war die miR-34a im Vergleich zu normalem humanen Kleinhirngewebe herunterreguliert. Eine miR-34a-Überexpression *in vitro* reduzierte die Zellviabilität und die Zellproliferation und führte andererseits zum Anstieg der Apoptose-Rate und der Seneszenz. Des Weiteren wurde die Herunterregulierung der miR-34a Zielgene, MYCN, SIRT1 und E2F3, im Western Blot nachgewiesen. Der Effekt der manipulierten miR-34a-Expression *in vivo* wurde mittels zielgerichteter Transgenese in Mäusen untersucht. Hierfür wurden Mäuse generiert, die eine Deletion im miR-34a Gen aufweisen und somit keine funktionelle miR-34a exprimieren können. MiR-34a-defiziente Mäuse waren lebensfähig und fertil. Um einen Überblick über die physiologische Rolle der miR-34a im adulten Organismus zu bekommen wurden 80 Tiere in einem standardisiertem Screen, der mehr als 300 Parameter umfasst, in der German Mouse Clinic (GMC) phänotypisiert. Die Charakterisierung in der GMC ergab keine phänotypischen Auffälligkeiten in der miR-34a defizienten Maus. In einem etablierten Medulloblastom-Mausmodell, der ND2:SmoA1 Maus, zeigte sich eine tumorgewebsspezifische Suppression der miR-34a. Eine Verkreuzung der miR-34a-defizienten Mäuse mit ND2:SmoA1-Mäusen führte zu einer Beschleunigung der Tumorbildung. Die Tumore wurden morphologisch und auf Proteinebene näher charakterisiert. Interessanterweise waren SIRT1 und n-MYC sehr stark in den Medulloblastomen der doppelt transgenen SmoA1;MiR-34a ko/ko Mäuse exprimiert. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die mikroRNA-34a für die Hirnentwicklung im Normalgewebe nicht essentiell ist, dass ihr Verlust aber in prädisponierten Mäusen die Tumorbildung beschleunigt. Strategien zur Reexpression der miR-34a könnten in Zukunft eine effektive Tumorthherapie darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Alvarez-Rodriguez R., Barzi M., Berenguer J. et al. (2007): Bone morphogenetic protein 2 opposes Shh-mediated proliferation in cerebellar granule cells through a TIEG-1-based regulation of Nmyc. *J Biol Chem* 282, 37170-37180.
2. Ambros V., Bartel B., Bartel D.P. et al. (2003): A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9, 277-279.
3. Aravin A.A., Lagos-Quintana M., Yalcin A. et al. (2003): The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 5, 337-350.
4. Asangani I.A., Rasheed S.A., Nikolova D.A. et al. (2008): MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128-2136.
5. Aylon Y., Oren M. (2007): Living with p53, dying of p53. *Cell* 130, 597-600.
6. Ayrault O., Zhao H., Zindy F. et al. (2010): Atoh1 inhibits neuronal differentiation and collaborates with Gli1 to generate medulloblastoma-initiating cells. *Cancer Res* 70, 5618-5627.
7. Bandi N., Zbinden S., Gugger M. et al. (2009): miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 69, 5553-5559.
8. Bandyopadhyay S., Mitra R., Maulik U. et al. (2010): Development of the human cancer microRNA network. *Silence* 1, 6.
9. Bartel D.P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
10. Bates S., Phillips A.C., Clark P.A. et al. (1998): p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.
11. Behesti H., Marino S. (2009): Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 435-445.
12. Ben-Arie N., Bellen H.J., Armstrong D.L. et al. (1997): Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* 390, 169-172.
13. Bhatt K., Zhou L., Mi Q.S. et al. (2010): MicroRNA-34a is induced via p53 during cisplatin nephrotoxicity and contributes to cell survival. *Mol Med* 16, 409-416.
14. Blazek E.R., Foutch J.L., Maki G. (2007): Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67, 1-5.
15. Boehm M., Slack F. (2005): A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science* 310, 1954-1957.

16. Bohnsack M.T., Czaplinski K., Gorlich D. (2004): Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.
17. Bommer G.T., Gerin I., Feng Y. et al. (2007): p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 17, 1298-1307.
18. Bonci D., Coppola V., Musumeci M. et al. (2008): The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 14, 1271-1277.
19. Braasch D.A., Jensen S., Liu Y. et al. (2003): RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42, 7967-7975.
20. Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. (2004): Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966.
21. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M. et al. (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15524-15529.
22. Calin G.A., Ferracin M., Cimmino A. et al. (2005): A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353, 1793-1801.
23. Carleton M., Cleary M.A., Linsley P.S. (2007): MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 6, 2127-2132.
24. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. (2005): MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65, 6029-6033.
25. Chang T.C., Wentzel E.A., Kent O.A. et al. (2007): Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26, 745-752.
26. Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E. et al. (2005): TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
27. Cheng A.M., Byrom M.W., Shelton J. et al. (2005): Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 33, 1290-1297.
28. Choi Y.J., Lin C.P., Ho J.J. et al. (2011): miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol* 13, 1353-1360.
29. Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M. et al. (2005): miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
30. Cohen S.M., Brennecke J., Stark A. (2006): Denoising feedback loops by thresholding-- a new role for microRNAs. *Genes Dev* 20, 2769-2772.
31. Cole K.A., Attiyeh E.F., Mosse Y.P. et al. (2008): A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol Cancer Res* 6, 735-742.
32. Corney D.C., Flesken-Nikitin A., Godwin A.K. et al. (2007): MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res* 67, 8433-8438.
33. Corney D.C., Hwang C.I., Matoso A. et al. (2010): Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 16, 1119-1128.

34. Corsten M.F., Miranda R., Kasmieh R. et al. (2007): MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res* 67, 8994-9000.
35. Costinean S., Sandhu S.K., Pedersen I.M. et al. (2009): Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood* 114, 1374-1382.
36. Dang C.V., Kim J.W., Gao P. et al. (2008): The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 51-56.
37. de Antonellis P., Medaglia C., Cusanelli E. et al. (2011): MiR-34a targeting of Notch ligand delta-like 1 impairs CD15+/CD133+ tumor-propagating cells and supports neural differentiation in medulloblastoma. *PLoS One* 6, e24584.
38. Di Leva G., Gasparini P., Piovan C. et al. (2010): MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 102, 706-721.
39. Dickins R.A., Hemann M.T., Zilfou J.T. et al. (2005): Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat Genet* 37, 1289-1295.
40. Diederichs S., Haber D.A. (2007): Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097-1108.
41. Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L. et al. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.
42. Donehower L.A., Harvey M., Vogel H. et al. (1995): Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice. *Mol Carcinog* 14, 16-22.
43. Dostie J., Mourelatos Z., Yang M. et al. (2003): Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA* 9, 180-186.
44. Dyer M.A. (2004): Mouse models of childhood cancer of the nervous system. *J Clin Pathol* 57, 561-576.
45. Eberhart C.G., Kratz J., Wang Y. et al. (2004): Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 441-449.
46. Ebert M.S., Neilson J.R., Sharp P.A. (2007): MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 4, 721-726.
47. Elmen J., Lindow M., Schutz S. et al. (2008): LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896-899.
48. Esau C., Kang X., Peralta E. et al. (2004): MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279, 52361-52365.
49. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. (2006): Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-269.
50. Fan X., Mikolaenko I., Elhassan I. et al. (2004): Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* 64, 7787-7793.
51. Fantin V.R., St-Pierre J., Leder P. (2006): Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9, 425-434.
52. Farwell J.R., Dohrmann G.J., Flannery J.T. (1984): Medulloblastoma in childhood: an epidemiological study. *J Neurosurg* 61, 657-664.

53. Felicetti F., Errico M.C., Bottero L. et al. (2008): The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 68, 2745-2754.
54. Ferretti E., De Smaele E., Di Marcotullio L. et al. (2005): Hedgehog checkpoints in medulloblastoma: the chromosome 17p deletion paradigm. *Trends Mol Med* 11, 537-545.
55. Fornari F., Gramantieri L., Ferracin M. et al. (2008): MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27, 5651-5661.
56. Fujita S., Ito T., Mizutani T. et al. (2008a): miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol* 378, 492-504.
57. Fujita Y., Kojima K., Hamada N. et al. (2008b): Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 114-119.
58. Gailus-Durner V., Fuchs H., Becker L. et al. (2005): Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nat Methods* 2, 403-404.
59. Gajjar A., Chintagumpala M., Ashley D. et al. (2006): Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. *Lancet Oncol* 7, 813-820.
60. Galardi S., Mercatelli N., Giorda E. et al. (2007): miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* 282, 23716-23724.
61. Gallardo E., Navarro A., Vinolas N. et al. (2009): miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 30, 1903-1909.
62. Garofalo M., Croce C.M. (2011): microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51, 25-43.
63. Garofalo M., Di Leva G., Romano G. et al. (2009): miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell* 16, 498-509.
64. Garofalo M., Quintavalle C., Di Leva G. et al. (2008): MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncogene* 27, 3845-3855.
65. Garzon R., Calin G.A., Croce C.M. (2009a): MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 60, 167-179.
66. Garzon R., Croce C.M. (2011): MicroRNAs and cancer: introduction. *Semin Oncol* 38, 721-723.
67. Garzon R., Heaphy C.E., Havelange V. et al. (2009b): MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 114, 5331-5341.
68. Garzon R., Volinia S., Liu C.G. et al. (2008): MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 3183-3189.
69. Gibson P., Tong Y., Robinson G. et al. (2010): Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* 468, 1095-1099.

70. Gilbertson R.J., Ellison D.W. (2008): The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol* 3, 341-365.
71. Goodrich L.V., Milenkovic L., Higgins K.M. et al. (1997): Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277, 1109-1113.
72. Greasley P.J., Bonnard C., Amati B. (2000): Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* 28, 446-453.
73. Greither T., Grochola L.F., Udelnow A. et al. (2010): Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 126, 73-80.
74. Groom L.A., Sneddon A.A., Alessi D.R. et al. (1996): Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J* 15, 3621-3632.
75. Guessous F., Zhang Y., Kofman A. et al. (2010): microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle* 9, 1031-1036.
76. Hahn H., Wojnowski L., Zimmer A.M. et al. (1998): Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med* 4, 619-622.
77. Hallahan A.R., Pritchard J.I., Hansen S. et al. (2004): The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer Res* 64, 7794-7800.
78. Hammond S.M., Bernstein E., Beach D. et al. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
79. Harfe B.D. (2005): MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 15, 410-415.
80. Hashimi S.T., Fulcher J.A., Chang M.H. et al. (2009): MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood* 114, 404-414.
81. Hatten M.E. (1999): Expansion of CNS precursor pools: a new role for Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 2-3.
82. Hatten M.E., Roussel M.F. (2011): Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci* 34, 134-142.
83. Hatton B.A., Villavicencio E.H., Tsuchiya K.D. et al. (2008): The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer Res* 68, 1768-1776.
84. Hayashita Y., Osada H., Tatematsu Y. et al. (2005): A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 65, 9628-9632.
85. He L., He X., Lim L.P. et al. (2007): A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.
86. Helms A.W., Abney A.L., Ben-Arie N. et al. (2000): Autoregulation and multiple enhancers control Math1 expression in the developing nervous system. *Development* 127, 1185-1196.
87. Hermeking H. (2010): The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 17, 193-199.

88. Holland S.J., Powell M.J., Franci C. et al. (2005): Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res* 65, 9294-9303.
89. Houbaviy H.B., Murray M.F., Sharp P.A. (2003): Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5, 351-358.
90. Hutvagner G., Simard M.J., Mello C.C. et al. (2004): Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2, E98.
91. Inomata M., Tagawa H., Guo Y.M. et al. (2009): MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 113, 396-402.
92. Ito T., Yagi S., Yamakuchi M. (2010): MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 398, 735-740.
93. Jacks T., Remington L., Williams B.O. et al. (1994): Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4, 1-7.
94. Janus F., Albrechtsen N., Dornreiter I. et al. (1999): The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* 55, 12-27.
95. Jin Z.B., Hirokawa G., Gui L. et al. (2009): Targeted deletion of miR-182, an abundant retinal microRNA. *Mol Vis* 15, 523-533.
96. John B., Enright A.J., Aravin A. et al. (2004): Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363.
97. Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J. et al. (2005): RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647.
98. Julian E., Dave R.K., Robson J.P. et al. (2010): Canonical Notch signaling is not required for the growth of Hedgehog pathway-induced medulloblastoma. *Oncogene* 29, 3465-3476.
99. Kaller M., Liffers S.T., Oeljeklaus S. et al. (2011): Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell Proteomics* 10, M111 010462.
100. Kasashima K., Nakamura Y., Kozu T. (2004): Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 403-410.
101. Kawakami Y., Rodriguez-Leon J., Koth C.M. et al. (2003): MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol* 5, 513-519.
102. Kim H.K., Lee Y.S., Sivaprasad U. et al. (2006): Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol* 174, 677-687.
103. Kim J.Y., Nelson A.L., Algon S.A. et al. (2003): Medulloblastoma tumorigenesis diverges from cerebellar granule cell differentiation in patched heterozygous mice. *Dev Biol* 263, 50-66.
104. Kimura H., Stephen D., Joyner A. et al. (2005): Gli1 is important for medulloblastoma formation in Ptc1+/- mice. *Oncogene* 24, 4026-4036.
105. Klein U., Lia M., Crespo M. et al. (2010): The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 17, 28-40.

106. Kluiver J., Poppema S., de Jong D. et al. (2005): BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 207, 243-249.
107. Knoepfler P.S., Cheng P.F., Eisenman R.N. (2002): N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 16, 2699-2712.
108. Kool M., Koster J., Bunt J. et al. (2008): Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One* 3, e3088.
109. Krek A., Grun D., Poy M.N. et al. (2005): Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500.
110. Kumamoto K., Spillare E.A., Fujita K. et al. (2008): Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* 68, 3193-3203.
111. Kunkele A., De Preter K., Heukamp L. et al. (2012): Pharmacological activation of the p53 pathway by nutlin-3 exerts anti-tumoral effects in medulloblastomas. *Neuro Oncol*.
112. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A. et al. (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
113. Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G. et al. (2001): An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
114. Laws A.M., Osborne B.A. (2004): p53 regulates thymic Notch1 activation. *Eur J Immunol* 34, 726-734.
115. le Sage C., Nagel R., Egan D.A. et al. (2007): Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J* 26, 3699-3708.
116. Lee J., Platt K.A., Censullo P. et al. (1997): Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124, 2537-2552.
117. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
118. Lee Y., Ahn C., Han J. et al. (2003a): The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
119. Lee Y., Kim M., Han J. et al. (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060.
120. Lee Y., Miller H.L., Jensen P. et al. (2003b): A molecular fingerprint for medulloblastoma. *Cancer Res* 63, 5428-5437.
121. Lee Y.S., Dutta A. (2007): The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 21, 1025-1030.
122. Lee Y.S., Kim H.K., Chung S. et al. (2005): Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *J Biol Chem* 280, 16635-16641.
123. Lewis B.P., Shih I.H., Jones-Rhoades M.W. et al. (2003): Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
124. Li Y., Guessous F., Zhang Y. et al. (2009): MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res* 69, 7569-7576.

125. Lim L.P., Glasner M.E., Yekta S. et al. (2003): Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.
126. Liu C., Kelnar K., Liu B. et al. (2011): The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 17, 211-215.
127. Lodygin D., Tarasov V., Epanchintsev A. et al. (2008): Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 7, 2591-2600.
128. Loscher C.J., Hokamp K., Kenna P.F. et al. (2007): Altered retinal microRNA expression profile in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Genome Biol* 8, R248.
129. Ma X., Kumar M., Choudhury S.N. et al. (2011): Loss of the miR-21 allele elevates the expression of its target genes and reduces tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10144-10149.
130. Maltzman W., Czyzyk L. (1984): UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4, 1689-1694.
131. Manni I., Artuso S., Careccia S. et al. (2009): The microRNA miR-92 increases proliferation of myeloid cells and by targeting p63 modulates the abundance of its isoforms. *FASEB J* 23, 3957-3966.
132. Mao J., Ligon K.L., Rakhlin E.Y. et al. (2006): A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer Res* 66, 10171-10178.
133. Marino S. (2005): Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med* 11, 17-22.
134. Marino S., Vooijs M., van Der Gulden H. et al. (2000): Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev* 14, 994-1004.
135. Marshall G.M., Liu P.Y., Gherardi S. et al. (2011): SIRT1 promotes N-Myc oncogenesis through a positive feedback loop involving the effects of MKP3 and ERK on N-Myc protein stability. *PLoS Genet* 7, e1002135.
136. Massague J. (1996): TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85, 947-950.
137. Massague J., Seoane J., Wotton D. (2005): Smad transcription factors. *Genes Dev* 19, 2783-2810.
138. Medeiros L.A., Dennis L.M., Gill M.E. et al. (2011): Mir-290-295 deficiency in mice results in partially penetrant embryonic lethality and germ cell defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14163-14168.
139. Metzler M., Wilda M., Busch K. et al. (2004): High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39, 167-169.
140. Moll U.M., LaQuaglia M., Benard J. et al. (1995): Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4407-4411.
141. Mott J.L., Kobayashi S., Bronk S.F. et al. (2007): mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26, 6133-6140.
142. Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S. et al. (2002): miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16, 720-728.

143. Mraz M., Malinova K., Kotaskova J. et al. (2009): miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia* 23, 1159-1163.
144. Northcott P.A., Korshunov A., Witt H. et al. (2011): Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* 29, 1408-1414.
145. Oliver T.G., Read T.A., Kessler J.D. et al. (2005): Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. *Development* 132, 2425-2439.
146. Olsen P.H., Ambros V. (1999): The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216, 671-680.
147. Oren M. (2003): Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10, 431-442.
148. Ostermeyer A.G., Runko E., Winkfield B. et al. (1996): Cytoplasmically sequestered wild-type p53 protein in neuroblastoma is relocated to the nucleus by a C-terminal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15190-15194.
149. Ota A., Tagawa H., Karnan S. et al. (2004): Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 64, 3087-3095.
150. Otto T., Horn S., Brockmann M. et al. (2009): Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 15, 67-78.
151. Pallante P., Visone R., Ferracin M. et al. (2006): MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 13, 497-508.
152. Park J.K., Lee E.J., Esau C. et al. (2009a): Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 38, e190-199.
153. Park S.Y., Lee J.H., Ha M. et al. (2009b): miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol* 16, 23-29.
154. Petrocca F., Visone R., Onelli M.R. et al. (2008): E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 13, 272-286.
155. Pineau P., Volinia S., McJunkin K. et al. (2010): miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 264-269.
156. Pizer B.L., Clifford S.C. (2009): The potential impact of tumour biology on improved clinical practice for medulloblastoma: progress towards biologically driven clinical trials. *Br J Neurosurg* 23, 364-375.
157. Pomeroy S.L., Tamayo P., Gaasenbeek M. et al. (2002): Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415, 436-442.
158. Raffel C. (2004): Medulloblastoma: molecular genetics and animal models. *Neoplasia* 6, 310-322.
159. Raffel C., Thomas G.A., Tishler D.M. et al. (1993): Absence of p53 mutations in childhood central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Neurosurgery* 33, 301-305; discussion 305-306.

160. Rausch T., Jones D.T., Zapatka M. et al. (2012): Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* 148, 59-71.
161. Raver-Shapira N., Marciano E., Meiri E. et al. (2007): Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 26, 731-743.
162. Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M. et al. (2000): The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
163. Rios I., Alvarez-Rodriguez R., Marti E. et al. (2004): Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling. *Development* 131, 3159-3168.
164. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L. et al. (2004): Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902-1910.
165. Sampson V.B., Rong N.H., Han J. et al. (2007): MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* 67, 9762-9770.
166. Sathyan P., Golden H.B., Miranda R.C. (2007): Competing interactions between microRNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium. *J Neurosci* 27, 8546-8557.
167. Scherr M., Venturini L., Battmer K. et al. (2007): Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. *Nucleic Acids Res* 35, e149.
168. Sears R., Nuckolls F., Haura E. et al. (2000): Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14, 2501-2514.
169. Segal R.A., Goumnerova L.C., Kwon Y.K. et al. (1994): Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12867-12871.
170. Si M.L., Zhu S., Wu H. et al. (2007): miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26, 2799-2803.
171. Solecki D.J., Liu X.L., Tomoda T. et al. (2001): Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron* 31, 557-568.
172. Stott F.J., Bates S., James M.C. et al. (1998): The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 17, 5001-5014.
173. Sun F., Fu H., Liu Q. et al. (2008): Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett* 582, 1564-1568.
174. Swartling F.J., Grimmer M.R., Hackett C.S. et al. (2010): Pleiotropic role for MYCN in medulloblastoma. *Genes Dev* 24, 1059-1072.
175. Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K. et al. (2004): Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64, 3753-3756.
176. Tarasov V., Jung P., Verdoodt B. et al. (2007): Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 6, 1586-1593.

177. Tavazoie S.F., Alarcon C., Oskarsson T. et al. (2008): Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451, 147-152.
178. Tazawa H., Tsuchiya N., Izumiya M. et al. (2007): Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15472-15477.
179. Thompson M.C., Fuller C., Hogg T.L. et al. (2006): Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* 24, 1924-1931.
180. Tolcher A.W., Chi K., Kuhn J. et al. (2005): A phase II, pharmacokinetic, and biological correlative study of oblimersen sodium and docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11, 3854-3861.
181. Trang P., Wiggins J.F., Daige C.L. et al. (2011): Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther* 19, 1116-1122.
182. Tsai W.C., Hsu P.W., Lai T.C. et al. (2009): MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49, 1571-1582.
183. Vajkoczy P., Knyazev P., Kunkel A. et al. (2006): Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5799-5804.
184. Ventura A., Young A.G., Winslow M.M. et al. (2008): Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132, 875-886.
185. Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. (2000): Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
186. Volinia S., Calin G.A., Liu C.G. et al. (2006): A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2257-2261.
187. Vousden K.H., Lane D.P. (2007): p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 275-283.
188. Wang P.Y., Li Y.J., Zhang S. et al. (2010): Regulating A549 cells growth by ASO inhibiting miRNA expression. *Mol Cell Biochem* 339, 163-171.
189. Wechsler-Reya R., Scott M.P. (2001): The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 24, 385-428.
190. Wei J.S., Song Y.K., Durinck S. et al. (2008): The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene* 27, 5204-5213.
191. Weiler J., Hunziker J., Hall J. (2006): Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther* 13, 496-502.
192. Weiner H.L., Bakst R., Hurlbert M.S. et al. (2002): Induction of medulloblastomas in mice by sonic hedgehog, independent of Gli1. *Cancer Res* 62, 6385-6389.
193. Weiss W.A., Aldape K., Mohapatra G. et al. (1997): Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* 16, 2985-2995.

194. Welch C., Chen Y., Stallings R.L. (2007): MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 26, 5017-5022.
195. Wetmore C., Eberhart D.E., Curran T. (2000): The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched. *Cancer Res* 60, 2239-2246.
196. Wiggins J.F., Ruffino L., Kelnar K. et al. (2010): Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 70, 5923-5930.
197. Wightman B., Ha I., Ruvkun G. (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
198. Wood L.D., Parsons D.W., Jones S. et al. (2007): The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318, 1108-1113.
199. Xu S., Witmer P.D., Lumayag S. et al. (2007): MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem* 282, 25053-25066.
200. Xue W., Zender L., Miething C. et al. (2007): Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.
201. Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C.J. (2008): miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13421-13426.
202. Yamanaka Y., Tagawa H., Takahashi N. et al. (2009): Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood* 114, 3265-3275.
203. Yanaihara N., Caplen N., Bowman E. et al. (2006): Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9, 189-198.
204. Zhang Y.X., Knyazev P.G., Cheburkin Y.V. et al. (2008): AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res* 68, 1905-1915.
205. Zhao H., Ayrault O., Zindy F. et al. (2008): Post-transcriptional down-regulation of *Atoh1/Math1* by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development. *Genes Dev* 22, 722-727.
206. Zhao T., Li J., Chen A.F. (2010): MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E110-116.
207. Zhu S., Wu H., Wu F. et al. (2008): MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 18, 350-359.
208. Zindy F., Uziel T., Ayrault O. et al. (2007): Genetic alterations in mouse medulloblastomas and generation of tumors de novo from primary cerebellar granule neuron precursors. *Cancer Res* 67, 2676-2684.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad in Celsius
Abb.	Abbildung
AML	akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua deion.	Deionisiertes Wasser
Atoh	<i>Atonal homolog</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> (Knochenmorphogenetisches Protein)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum - Albumin
ca.	circa
cDNA	<i>copy deoxyribonucleic acid</i>
CDC42	<i>cell division control protein 42</i>
CDK4	Cyclin- abhängige Kinase 4
CDK6	Cyclin- abhängige Kinase 6
c/EBP β	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein β</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
c- Myc	zelluläres Myc
CMV	Cytomegalo- Virus
CO ₂	Kohlendioxid
CreER TM	Tamoxifen induzierbare Cre- Rekombinase
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2' - Desoxyribonukleotid-5' - Triphosphat
eGFP	enhanced Green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
E2F3	<i>E2F transcription factor 3</i>
ES- Zellen	embryonale Stammzellen
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fetales Rinderserum)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FOXO1	Forkhead box Protein
fwd	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
Gli	<i>glioma-associated oncogene homolog</i>
GSK-3 β	Glycogen Synthase- Kinase 3 β
h	<i>hour</i> (Stunde)
Hcl	Salzsäure
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
kDa	Kilo- Dalton
KO	<i>Knockout</i>
LB- Medium	Lysogeny Broth- Medium
LEF1/ TCF-1- α	<i>lymphoid enhancer- binding factor</i>
mA	Milli- Ampere
MDM2	<i>mouse double minutes 2</i>
ml	Milliliter
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

pH	<i>potentium hydrogenium</i>
Rb	Retinoblastom
rev	<i>reverse</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT- PCR	Reverse Transkriptions- PCR
S1	Sicherheitsbereich 1
SA-β-Gal	Seneszenz- assoziierte saure β- Galaktosidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>Silencer RNA</i>
SIRT1	<i>silent mating type information regulation 2 homolog</i>
ssDNA	<i>single- stranded DNA</i>
ssRNA	<i>single- stranded RNA</i>
TAE	Tris- Acetat- EDTA- Puffer
Taq	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris- buffered Saline</i>
TE	Tris- EDTA- Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIEG-1	<i>TGFbeta Inducible Early Gene-1</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	ultraviolett
UTR	<i>untranslated region</i> (nicht- translatierter Bereich)
V	Volt
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

Die gängigen SI-Einheiten sind im Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt und werden als bekannt vorausgesetzt.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die mikroRNA Biogenese.	3
Abb. 2: Vergleich der Mitglieder der miR-34- Familie, miR-34a, miR-34b und miR-34c	10
Abb. 3: Die miR-34-Familie als Mediator der Tumorsuppression durch p53.	11
Abb. 4: Schematisches Modell der Regulation durch miR-34a.	12
Abb. 5: Der p53/miR-34a Signalweg reguliert die Apoptose.	13
Abb. 6: Klassifizierung der humanen Medulloblastome.....	20
Abb. 7: Vektorkarte von pEZX-MR04.	31
Abb. 8: Targetingvektor zur Deletion des miR-34a Gens.....	50
Abb. 9: Strategie zur Inaktivierung des MiR-34a Gens.	54
Abb. 10: Southern-Blot der ES-Zellklone auf 5`- und 3`-homologe Rekombination und Einzelintegration	56
Abb. 11: PCR-Ergebnis zur Genotypisierung der miR-34a <i>knockout</i> Mäuse.....	57
Abb. 12: Nachweis der miR-34a-Defizienz auf RNA Ebene in verschiedenen Organen.....	58
Abb. 13: HE-Färbung der verschiedenen Organen.	63
Abb. 14: miR-34a Expressionshöhe im Kleinhirn und Medulloblastom.....	65
Abb. 15: miR-34a Expression in humanen Medulloblastomzelllinien	65
Abb. 16: Wachstumsverhalten der Zelllinien HD-MB3, ONS-76, Daoy und UW-228 nach Behandlung mit miR-34a gemessen im MTT- Zellviabilitätstest.....	66
Abb. 17: Darstellung der Viabilität von HD-MB3, ONS-76, Daoy und UW-228 120h nach Transfektion mit miR-34a.	67
Abb. 18: Darstellung des relativen Proliferationsvermögen von mit miR-34a transfizierten HD-MB3, ONS-76, Daoy und UW-228 nach 120h, gemessen mittels „Cell Proliferation ELISA“	68
Abb. 19: Anteil der apoptischen Zellen der untersuchten Medulloblastomzellen 120h nach Behandlung mit miR-34a gemessen mittels „Cell Death Detection Kit“.	69
Abb. 20: Zellzyklusverteilung von HD-MB3-, Daoy-, UW-228- und ONS-76- Zellen 120h nach Transfektion mit miR-34a.....	70
Abb. 21: Darstellung der relativen Fluoreszenz als Maß der Seneszenz von mit miR-34a transfizierten HD-MB3, ONS-76, Daoy und UW-228 nach 120h.	72
Abb. 22: Proteinexpression der Zielgene MYCN und SIRT1 nach Reexpression der miR-34a in Daoy, HD-MB3, ONS-76 und UW-228 Medulloblastomzellen mittels Western Blot- Analysen.....	73

Abb. 23: miR-34a Expression in SmoA1 transgenen Mäusen.....	74
Abb. 24: miR-34a Expression in ptch transgenen Mäusen.....	74
Abb. 25: Kaplan- Meier Überlebenskurve der SmoA1- Mäuse.....	75
Abb. 26: Kaplan-Meier Überlebenskurve der ptch ^{+/-} - Mäuse.....	76
Abb. 27: Proteinexpression der Zielgene MYCN und SIRT1 in SmoA1 Mäusen.	77
Abb. 28: miR-34a als Regulator der positiven Rückkopplungschleife zwischen SIRT1 und MYCN.....	88

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die in humanen Tumoren überexprimierten miRNAs.....	6
Tabelle 2: Die in humanen Tumoren am stärksten herunterregulierten miRNAs.....	9
Tabelle 3: erwartete Fragmentgrößen der Southern-Blot Analyse.....	55
Tabelle 4: Auflistung der Beobachtungskohorte.....	59
Tabelle 5: Chi-Square-Unabhängigkeitstest.....	60
Tabelle 6: zusammenfassende Auflistung der verschiedenen Tests in der ersten Pipeline	60
Tabelle 7: zusammenfassende Auflistung der verschiedenen Tests in der zweiten Pipeline...	61
Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Primär-Screens der initialen Testreihe.....	62

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Johannes H. Schulte für das interessante Thema, die sehr gute Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung dieser Arbeit trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung danken. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die Einführung in die interessante Welt der Mausgenetik und die Einarbeitung in das tierexperimentelle Arbeiten.

Mein besonderer Dank geht an PD. Alexander Schramm für die konstruktiven und hilfreichen Ratschläge und die Unterstützung während der Entstehung und Durchführung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Prof. Angelika Eggert für die herzliche Aufnahme und Atmosphäre bedanken und, dass sie mir ermöglicht hat, im Onkolabor der Kinderklinik 3 meine Arbeit anzufangen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen ‚Hämatologische und onkologische Forschung I und II der Kinderklinik 3‘ möchte ich für die Unterstützung danken. Insbesondere möchte ich mich für die liebevolle Aufnahme, die freundschaftliche Atmosphäre auch außerhalb des Labors, die Unterstützung im Laboralltag und die zahlreichen lustigen Kaffee- und Mittagspausen bei Annette, Gabriele, Ines, Katharina, Harald, Christina, Andrea O., Kristian, Sabine, Simon, Annika, Anja, Sven, Kristina, Sebastian, Natalie und Kathrin M., bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden für das Verständnis, den Zuspruch und die unendliche Unterstützung in allen Lebensbereichen!

Vom ganzen Herzen möchte ich meinen Eltern und Schwestern für die immerwährende und bedingungslose Unterstützung und Liebe danken!

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Charakterisierung der funktionellen Bedeutung der mikroRNA-34a während der Entwicklung und der Tumorgenese mittels eines Mausmodells*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Theresa Thor befürworte.

Essen, den 5. Juni 2012 _____

Prof. Dr. med. J.H. Schulte

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 5. Juni 2012 _____

Theresa Thor

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den 5. Juni 2012 _____

Theresa Thor