

Technische Universität München



Fakultät für Medizin

**Interaktion zwischen miR-221-Überexpression und Bestrahlung in
den Brustkrebszelllinien SKBR3 und MDA-MB-231**

Elisabeth Monika Katharina Maria Hirmer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. med. Bernhard Haslinger

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Thomas Schmid

2. Priv.-Doz. Dr. Nataša Anastasov

Die Dissertation wurde am 21.10.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 12.04.2022 angenommen.

Meinen Eltern

INHALT

ABSTRACT	I
ZUSAMMENFASSUNG	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Mammakarzinom und Strahlentherapie	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Prognostische Parameter	2
1.1.3 Tripel-negatives Mammakarzinom	3
1.1.4 Therapien des Mammakarzinoms	5
1.1.5 Herausforderungen an die Strahlentherapie	6
1.2 Rolle der miRNAs in der Tumorgenese	8
1.2.1 miRNAs	8
1.2.2 miR-221 bei Brustkrebs	12
1.2.3 uPAR-Signalweg	16
1.3 Ziel der Dissertation	17
2 MATERIAL	19
2.1 Chemikalien	19
2.2 Messinstrumente und Verbrauchsmaterial	20
2.3 Puffer und Lösungen	23
2.4 Kommerzielle Kits	25
2.5 Software	25
3 METHODEN	26
3.1 Zellkultur, Transduktion und Bestrahlung	26
3.1.1 Charakterisierung der Zelllinien	26
3.1.2 Lentivirale Transduktion	27
3.1.3 Auftauen und Passagieren	29
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat	30
3.1.5 Bestrahlung der Zellen	33
3.1.6 Ernten der Zellen	33
3.2 Quantifizierung der miR-221-Expression	34
3.2.1 RNA-Isolation	34

3.2.2	Reverse Transkription	34
3.2.3	Quantitative RT-PCR	35
3.3	Klonogener Überlebenstest	36
3.4	Zellzahlbestimmung	39
3.5	Migrationsassay	39
3.6	Quantifizierung des uPAR mittels Western Blot	43
3.7	Statistische Tests	47
3.7.1	Lineare Regressionsanalyse und F-Test	47
3.7.2	Mehrfaktorielle Varianzanalyse	48
3.7.3	T-Test	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Konstante miR-221-Expressionslevel in SKBR3 bei Bestrahlung	50
4.2	Erhöhtes klonogenes Überleben durch miR-221-Überexpression in SKBR3	54
4.2.1	Erhöhtes klonogenes Überleben durch miR-221-Überexpression in SKBR3	55
4.2.2	Unverändertes klonogenes Überleben durch miR-221-Überexpression in MDA-MB-231	57
4.3	Vermehrtes Zellwachstum bei hoher miR-221-Expression	59
4.3.1	Vermehrtes Zellwachstum durch miR-221-Überexpression in SKBR3	59
4.3.2	Verringertes Zellwachstum durch miR-221-Knock-down in MDA-MB-231	63
4.4	Erhöhte Migration bei miR-221-Überexpression und Bestrahlung	67
4.4.1	Erhöhte Migration bei miR-221-Überexpression und Bestrahlung in SKBR3	67
4.4.2	Niedrigere Migration bei miR-221-Knock-down in MDA-MB-231	73
4.5	Vergleich des Effekts von miR-221-Überexpression auf die Proliferation und Migration	81
4.5.1	Konstanter Effekt von miR-221-Überexpression auf die Migration bei Bestrahlung bei abnehmendem Effekt auf das Zellwachstum in SKBR3	81
4.5.2	Konstanter Effekt von miR-221-Knock-down auf die Migration bei Bestrahlung bei abnehmendem Effekt auf das Zellwachstum von MDA-MB-231	84
4.6	Konstante Proteinexpression des uPAR bei miR-221-Überexpression und Bestrahlung in SKBR3	85
5	DISKUSSION	89
5.1	Effekt von Bestrahlung auf miR-221-Expression	89
5.2	Effekt von miR-221-Überexpression auf Radiosensibilität	90
5.3	Effekt von miR-221-Überexpression und Bestrahlung auf die Zellzahl	91
5.4	Effekt von miR-221-Überexpression und Bestrahlung auf die Migration	92
5.5	Effekt von miR-221-Überexpression und Bestrahlung auf die uPAR-Expression	95

6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	ANHANG	99
7.1	Erklärung der PCR Methode	99
7.2	Methode zur Auswertung des Migrationsassays für MDA-MB-231 mittels Python	99
	LITERATURVERZEICHNIS	101
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
	TABELLENVERZEICHNIS	122
	DANKSAGUNG	123

ABSTRACT

Despite the steady improvement of breast cancer therapy, the prognosis for triple negative breast cancer (TNBC) remains poor. TNBC shows significant overexpression of miR-221, which is also associated with poor prognosis. By regulating cellular processes, miR-221 is heavily involved in tumor pathogenesis. The interaction of miR-221 overexpression with radiation and its influence on migration, proliferation and colony formation were investigated in this thesis.

The mammary carcinoma cell lines SKBR3 and MDA-MB-231 were transduced with lentiviral vectors to ensure miR-221 overexpression in SKBR3 cells or miR-221 knock-down in MDA-MB-231 naturally overexpressing miR-221. They were compared to empty vector controls whose miR-221 expression levels equal the non-transduced cells. The cells were irradiated at doses of 0 to 8 Gray (Gy) using a ¹³⁷Cs γ -irradiation source. Effects of miR-221 combined with irradiation on clonogenic survival, proliferation and migration were investigated. qRT-PCR was performed to determine miR-221 expression changes upon irradiation. miR-221 overexpressing cells showed significantly higher migration capacity in both cell lines. The migration capacity remained constant up to 8 Gy irradiation treatment. In parallel, miR-221 overexpressing cells showed elevated proliferation in both cell lines. miR-221 overexpressing SKBR3 cells showed higher clonogenic survival when compared to the control. In MDA-MB-231, no significant effect of miR-221 knock-down on clonogenic survival was observed. Additionally, irradiation did not change the miR-221 expression levels significantly in SKBR3.

The results reproducibly show increased migration and proliferation of both cell lines upon miR-221 overexpression. The effect of miR-221 on migration remains constant upon irradiation, whereas the effect on proliferation decreases after radiation treatment. Additionally, the proliferation assays show a drastic reduction of viable cells upon irradiation, whereas no strong reduction of migration upon radiation was observed. Regarding the consequences for a personalized radiotherapy in the future, miR-221 overexpression in TNBC patients indicates a higher risk of migration, which cannot be decreased by radiation alone. Therefore, new therapies besides radiation are required in patients with miR-221 overexpression.

ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der ständigen Verbesserung der Brustkrebstherapie bleibt die Prognose für TNBC schlecht. TNBC zeigt signifikante Überexpression von miR-221, was ebenfalls mit schlechter Prognose assoziiert wird. miR-221 spielt eine wesentliche Rolle in der Tumorphathogenese durch die Regulation zellbiologischer Prozesse. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion von miR-221-Überexpression und Bestrahlung und deren Einfluss auf Migration, Proliferation und klonogenes Überleben untersucht.

Die Brustkrebszelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 wurden mit lentiviralen Vektoren transduziert, um miR-221-Überexpression in SKBR3 und miR-221-Knock-down in MDA-MB-231, welche miR-221 bereits überexprimieren, sicherzustellen. Diese wurden mit Leervektorkontrollen verglichen, deren miR-221-Expressionslevel nicht transduzierten Zellen entsprachen. Die Zellen wurden mit Dosen von 0 bis 8 Gy einer ¹³⁷Cs γ -Quelle bestrahlt. Kombinierte Auswirkungen von miR-221-Überexpression und Bestrahlung auf klonogenes Überleben, Proliferation und Migration wurden untersucht. Um Veränderungen der miR-221-Expressionslevel durch Bestrahlung festzustellen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. In beiden Zelllinien wurde signifikant höheres Migrationspotenzial bei miR-221-überexprimierenden Zellen beobachtet, welche bis zu Strahlendosen von 8 Gy erhalten blieb. miR-221-Überexpression führte in beiden Zelllinien zu erhöhtem Zellwachstum, welches nach Bestrahlung abnahm. Während miR-221 überexprimierende SKBR3 höheres klonogenes Überleben zeigten, konnte bei MDA-MB-231 kein Effekt festgestellt werden. Bestrahlung führte zu keinen signifikanten Veränderungen der miR-221-Expression in den SKBR3.

Die Ergebnisse zeigen reproduzierbar höhere Migration und Proliferation bei miR-221-Überexpression in beiden Zelllinien. Während der Migration verstärkende Effekt von miR-221 bei Bestrahlung bestehen bleibt, nimmt der das Zellwachstum verstärkende Effekt von miR-221 bei Bestrahlung ab. Trotz starker Abnahme der Zellzahl nach Bestrahlung bleibt das Migrationspotenzial erhalten. Im Hinblick auf eine individualisierte, zukünftige Strahlentherapie kann miR-221 bei Patienten mit TNBC als Biomarker für höhere Migration verwendet werden. Da die Migration durch Bestrahlung nicht ausreichend gesenkt wird, werden bei diesen Patienten zusätzliche Therapieansätze neben der Strahlentherapie benötigt.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
ADIPOR1	Adiponectin-Rezeptor
APS	Ammoniumpersulphat
ATCC	American Type Culture Collection
BMF	Bcl-2 Modifying Factor
BRCA₁	breast cancer 1
BRCA₂	breast cancer 2
CIS	Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco Modified Eagles Medium
DNA	desoxyribonucleinacid (Desoxyribonucleinsäure)
ECM	extracellular matrix (Extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epitheliale mesotheliale Transition
ER	Östrogenrezeptor
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
g	Gramm
GlutaMAX	hoher Glucosegehalt
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
Gy	Gray
h	hour (Stunde)
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
min	Minute
miRNA	micro RNA
miRNP	miRNA-Ribonucleoprotein
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA (Botschafter-RNA)

NEAA	non essential amino acids (nicht essenzielle Aminosäuren)
NST	no special type (nicht-spezzieller Typ)
PAI1/2	Plasminogen Aktivator Inhibitoren 1 und 2
PBS	Phosphate Buffered Saline
pCR	pathological complete response (pathologische Komplettremission)
PE	Plate efficiancy (Plattierungseffizienz)
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
pTNM	pathologisch gesichert, Tumorgröße, Nodus, Metastasen
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion)
R0	Residual 0 (tumorfreie Resektionsränder)
RISC	(mi)RNA-induced silencing complex
SF	Survival Fraction (Überlebensfraktion)
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNBC	triple negative breast cancer (tripel-negativer Brustkrebs)
T-PER	Tissue Protein in Extract Reagent
TRPS1	Protein Trichorhinophalangeal Syndrome I
UTR	untranslated region (nicht translaterter Abschnitt)
VEGF	Vasular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
ZEB1/2	Zink finger E Box-binding homeobox 1 und 2

1 EINLEITUNG

1.1 Mammakarzinom und Strahlentherapie

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Mammakarzinom ist der am häufigsten diagnostizierte, bösartige Tumor und die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen weltweit. Im Jahr 2012 betrug die Prävalenz etwa 1,7 Millionen und die Inzidenz 0,5 Millionen Frauen (Torre et al., 2015). Bei Frauen in Deutschland trug Brustkrebs im Jahr 2012 mit 30,8 % (69.550 Fälle) den höchsten prozentualen Anteil an neudiagnostizierten Tumoren, wobei die meisten Diagnosen bereits in frühen T-Stadien gestellt wurden (53 % in T1 und 36 % in T2). Trotz zumeist frühzeitiger Diagnose und einem 10-Jahres-Überleben von 82 % können dem Mammakarzinom mit 17,5 % (17.748 Fällen) die meisten Krebstodesfälle im Jahr 2012 zugeschrieben werden (Kaatsch et al., 2015).

Die Entstehung des Mammakarzinoms wird als ein mehrschrittiger Prozess angesehen, an dem zahlreiche Faktoren beteiligt sind. Ein erhöhtes Risiko bei familiärer Häufung lässt eine Beteiligung genetischer Faktoren vermuten. Dies wurde dadurch bestätigt, dass etwa 50 % der Patienten mit positiver Familienanamnese Mutationen der Desoxyribonuclease (DNA) - Reparatur vermittelnden Gene breast cancer 1 (BRCA₁) und breast cancer 2 (BRCA₂) aufweisen (Kaatsch et al., 2015; Kast et al., 2016). Neben einer genetischen Disposition können hormonelle und reproduktive Faktoren, wie eine frühe Menarche oder späte Menopause, eine späte erste Geburt, eine menopausale Hormonersatztherapie aus Gestagen- und Östrogenpräparaten und in geringem Maße die Einnahme von Kontrazeptiva das Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms erhöhen, während Gebären und Stillen einen protektiven Einfluss haben (Kaatsch et al., 2015; Schottenfeld & Fraumeni Jr, 2006; Torre et al., 2015). Des Weiteren erhöhen auch Adipositas, körperliche Inaktivität sowie Alkoholkonsum das Risiko für ein Mammakarzinom (Schottenfeld & Fraumeni Jr, 2006; Torre et al., 2015) .

Zur Senkung der Mortalität wurden Maßnahmen zur risikoadaptierten Früherkennung des Mammakarzinoms ergriffen (Myers et al., 2015). Da in den S3-Leitlinien zum Mammakarzinom ein fortgeschrittenes Lebensalter als wichtigster Risikofaktor angesehen wird, wurde ein altersadaptiertes Früherkennungsprogramm entworfen (Onkologie, 2017). In diesem Rahmen wird Frauen ab 30 Jahren eine jährliche

Einleitung

Tastuntersuchung der Brustdrüse empfohlen. Seit der Einführung des Mammografie-Screening-Programms können Frauen zwischen 50 und 69 Jahren zusätzlich alle zwei Jahre eine Mammografie durchführen lassen (Onkologie, 2017). Frauen mit familiärer Belastung kann zudem ein Test auf risikoassoziierte Gene angeboten werden (Onkologie, 2017).

1.1.2 Prognostische Parameter

Die Diagnose eines Mammakarzinoms kann mithilfe von klinischer Untersuchung, Mammografie, Sonografie und in Ausnahmefällen Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie gestellt sowie durch anschließende Biopsie eines verdächtigen Befundes gesichert werden (Onkologie, 2017).

Die pathomorphologische Untersuchung des Tumorgewebes ermöglicht die Ermittlung von für Prognose und Therapie wichtigen Parametern. Histologisch lässt sich das invasive Mammakarzinom gemäß der World Health Organization (WHO) - Klassifikation in eine Vielzahl von Subtypen unterteilen, wobei der nicht-spezelle Typ (NST) mit 50-80 % und der lobuläre Typ mit 5-15 % die größten Subgruppen ausmachen (Lakhani, Ellis, Schnitt, Tan & Van de Vijer, 2012). Durch histologisches Grading lässt sich der Differenzierungsgrad der Tumorzellen bestimmen (Lakhani et al., 2012). Neben einer für Tumoren standardmäßig durchgeführten histologischen Einteilung und einer Klassifikation nach pathologisch gesicherter Tumorgöße, Lymphknoten- und Metastasenanzahl (pTMN) wird spezifisch für Brustkrebs auch eine Bestimmung des instrinsischen Subtyps und des damit verbundenen Rezeptorstatus empfohlen (Onkologie, 2017).

Diese Einteilung geht auf eine von Perou et al. entwickelte Gruppierung der Brustkrebszellen nach Keratin- und Rezeptorexpressionsprofilen zurück (Perou et al., 2000). Dabei wurden in Epithelzellen der Brustdrüse luminale Zellen mit Keratin 8/18 und basale Zellen mit Keratin 5/6 gegeneinander abgegrenzt. Bei luminalen Zellen wurde dabei vermehrte Expression des Östrogenrezeptors (ER) und Progesteronrezeptors (PR) sowie keine bzw. niedrige Expression des Wachstumsrezeptors human epidermal growth factor receptor (HER2) beobachtet, wobei ein Subtyp "Luminal A" mit hoher ER-Expression und ein Subtyp "Luminal B" mit mäßiger ER-Expression unterschieden wurden (Perou et al., 2000; Sørlie et al.,

2001). Beim basalen Subtyp exprimierten 68-77 % der Zellen keinen der Marker ER, PR und HER2, weswegen sie als tripel-negativ bezeichnet wurden (Bertucci et al., 2008; Prat et al., 2013). Umgekehrt konnten bei TNBC 50-90 % dem basalen Subtyp zugeordnet werden (Lehmann et al., 2011; Rakha et al., 2009). Somit besteht eine Korrelation zwischen basalem Subtyp und TNBC, jedoch sind sie nicht als äquivalent zu betrachten (Rakha et al., 2009). Zuletzt wurde ein Subtyp abgegrenzt, der das HER2-Genprodukt überexprimiert und gleichzeitig niedrige ER- und PR-Expression zeigt (Perou et al., 2000).

Statistische Analysen zum Gesamtüberleben belegten mehrfach höheres Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben der luminalen Subtypen im Vergleich zum HER2-Typ und basalen Typ (Sørlie et al., 2001; Sørlie et al., 2003; Van't Veer et al., 2002). Zwischen Luminal A und B konnte bei A ein signifikant höheres rezidivfreies Überleben festgestellt werden (Sørlie et al., 2001). Die luminalen Subtypen können aufgrund ihres ER-positiven Rezeptorprofils mit endokriner Therapie durch Östrogenantagonisten spezifisch behandelt werden, was zu höherem Gesamtüberleben und damit besserer Prognose beiträgt (Criscitello, Fumagalli, Saini, & Loi, 2010; Dunnwald, Rossing, & Li, 2007). Auch die Prognose des HER2-Typs konnte durch spezifische Antikörpertherapie mittels Trastuzumab signifikant verbessert werden (Romond et al., 2005). Für TNBC fehlen jedoch aufgrund des tripel-negativen Rezeptorprofils therapeutische Targets, sodass derzeit die Chemotherapie die einzige Option für eine systemische Therapie darstellt (Foulkes, Smith, & Reis-Filho, 2010; Liedtke et al., 2008; Tan et al., 2008). Somit ist eine weitere Charakterisierung des TNBC zur Identifikation therapeutischer Targets und Verbesserung der Prognose notwendig.

1.1.3 Tripel-negatives Mammakarzinom

TNBC macht etwa 10-24 % aller Mammakarzinome aus und tritt vermehrt bei Frauen jungen Alters und afroamerikanischer Herkunft auf. TNBC ist im Allgemeinen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Bauer, Brown, Cress, Parise, & Caggiano, 2007; L. Carey, Winer, Viale, Cameron, & Gianni, 2010; Kyndi et al., 2008; Millikan et al., 2008; Morris et al., 2007). Bei Diagnose weißt TNBC aufgrund seines aggressiven Wachstums meist einen invasiv-duktales Typ in bereits fortgeschrittenem Stadium (Tumorgöße >2 cm, Grad 3) auf (Colleoni et al., 2010; Dent et al., 2007; Rakha et al.,

Einleitung

2007). Trotz höherer pathologischer Komplettremissionsraten (pCR-Raten) nach Chemotherapie im Vergleich zu anderen Subtypen war TNBC besonders in den ersten 3-5 Jahren nach Diagnosestellung mit höheren lokalen Rezidiven und geringerem Gesamtüberleben verbunden. Dies wird dem besonders ungünstigen Verlauf der Fälle zugeschrieben, die keine pCR erreichen konnten (L.A. Carey et al., 2007; Colleoni et al., 2010; Liedtke et al., 2008). Eine Assoziation des TNBC mit häufigeren und verfrühten Fernmetastasen, welche nach ihrem Auftreten rapide zum Tod führen können, verstärkt dessen schlechte Prognose sowie die Notwendigkeit, neue Therapieansätze zu entwickeln (Dent et al., 2007; Rakha et al., 2007; Tan et al., 2008).

Um spezifische Therapietargets identifizieren zu können, ist zunächst eine genauere Charakterisierung tripel-negativer Tumoren zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden biologischen Prozesse erforderlich.

Es wird vermutet, dass bei der Entstehung invasiv wachsender und Metastasen bildender Tumoren die epitheliale-mesotheliale Transition (EMT) eine zentrale Rolle spielt. Dieser Prozess wurde 1982 erstmals definiert als eine Umwandlung von Epithel- in Mesothelzellen. Dabei verlieren die Epithelzellen ihre charakteristischen Eigenschaften wie den Zusammenhalt in Zellverbänden und zeigen stattdessen mesotheliale Eigenschaften wie erhöhte Migration, Invasion und Bildung von extrazellulärer Matrix an (Greenburg & Hay, 1982). Findet dieser Prozess bei Tumorzellen statt, können sich diese durch erhöhtes Invasionspotenzial aus dem Zellverband lösen, die Basalmembran überschreiten und somit zur Entstehung eines invasiven Karzinoms aus einem Carcinoma in situ (CIS) beitragen. Das erhöhte Migrationspotenzial mesothelialer Zellen ermöglicht eine Ausbreitung der Tumorzellen in umliegendes Gewebe und körpereigene Transportsysteme wie Blut oder Lymphe, was eine Voraussetzung für die Entstehung von Fernmetastasen darstellt (Thiery, 2002).

Bei Patienten mit Brustkrebs vom basalem Typ, der häufig auch tripel negativ ist (Bertucci et al., 2008; Prat et al., 2013), konnte eine Erhöhung mesothelialer Marker (z.B. Vimentin, N-Cadherin) bei gleichzeitig niedrigen epithelialen Markern (z.B. E-Cadherin) im Vergleich zu den übrigen Subtypen festgestellt werden (Rakha et al., 2007; Sarrió et al., 2008). Auch im Zellkulturmodell konnte für basale und tripel-

Einleitung

negative Brustkrebszelllinien (z.B. MDA-MB-231) eine erhöhte Expression mesothelialer Marker sowie das Auftreten spontaner EMT gezeigt werden (Gordon et al., 2003; Sarrió et al., 2008). Dies stützt die Vermutung, dass bei TNBC vermehrt EMT stattfindet, was zu dessen frequenter Bildung von Fernmetastasen beitragen kann (Rakha et al., 2007). Es gilt zu analysieren, welche molekularen Mechanismen zu EMT führen können, um diesen Prozess therapeutisch unterbinden zu können.

1.1.4 Therapien des Mammakarzinoms

Die aktuelle Therapie des Mammakarzinoms setzt sich aus Operation, Strahlentherapie sowie systemischer Therapie zusammen und ist in Deutschland an der S3-Leitlinie zur Therapie des invasiven Mammakarzinoms orientiert. Ein Überblick über die zitierten Quellen findet sich in (Onkologie, 2017).

Die Operation ist zentraler Bestandteil einer kurativen Therapie des Mammakarzinoms mit dem Ziel, eine Komplettresektion (R0) zu erreichen, welche gleichzeitig das Lokalrezidivrisiko senkt und die Wirksamkeit adjuvanter Therapien erhöht (Houssami, Macaskill, Marinovich, & Morrow, 2014; Jones et al., 2009; Moran et al., 2014).

Als adjuvante Therapien stehen diverse Systemtherapien und Strahlentherapie zur Verfügung. Wie bei in 1.1.2 bereits erläutert wurde, können subtypabhängige Systemtherapien wie eine endokrine Therapie bei luminalen und eine anti-HER2-Therapie bei HER2-positiven Tumoren erfolgen (Goldhirsch et al., 2011). Eine adjuvante Chemotherapie soll bei HER2-positiven, tripel-negativen und Luminal B - Tumoren mit hohem Rezidivrisiko erfolgen (Goldhirsch et al., 2011).

Eine adjuvante Strahlentherapie hat sich nach brusterhaltender Therapie für frühe Tumorstadien (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2011) und für den Fall eines fortgeschrittenen und/oder nodal positiven Mammakarzinoms auch nach Mastektomie als rezidivsenkende Strategie erwiesen (McGale et al., 2014).

Bei inflammatorischem (Scotti et al., 2013) oder inoperablem Tumor (Bartelink, Rubens, Van der Schueren, & Sylvester, 1997) kann entweder eine Chemotherapie mit anschließender Operation und Bestrahlung oder bei bestehender Inoperabilität alleiniger oder präoperativer Strahlentherapie erfolgen.

Einleitung

Bei einem Auftreten von Fernmetastasen sind systemische Therapien indiziert. Dabei wird eine endokrine Therapie bei ER-positiven Tumoren zur Erstlinientherapie empfohlen (Hope et al., 2016). Bei Hormonrezeptor-negativen Tumoren ist unter Abwägung von Toxizität und Nutzen meist eine Monochemotherapie einer Polychemotherapie vorzuziehen (Dear et al., 2013; Fossati et al., 1998; Stockler, Wilcken, Ghersi, & Simes, 2000). Auch Bevacizumab, der Inhibitor des Vasuclar Endothelial Growth Factor (VEGF), konnte aufgrund besserer Wirksamkeit im Vergleich zu Monotherapie mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel in die Erstlinientherapie aufgenommen werden (Miller et al., 2007). Allerdings bleibt der Therapieansatz trotz verbesserter Therapien häufig palliativ. In einer epidemiologischen Studie in den USA über den Verlauf nach diagnostizierten Metastasen überlebten 40 % weniger als zwei Jahre, das 10-Jahres-Überleben lag bei lediglich 17 % (Mariotto, Etzioni, Hurlbert, Penberthy, & Mayer, 2017; Maxwell, 2018).

1.1.5 Herausforderungen an die Strahlentherapie

Strahlentherapie ist als fester Bestandteil sowohl eines kurativen als auch eines palliativen Therapieregimes beim Mammakarzinom etabliert, da durch Strahlentherapie eine Verbesserung des lokoregionären Überlebens sowie des Gesamtüberlebens bei einer Vielzahl maligner Tumoren nachgewiesen werden konnte (Bartelink et al., 1997; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2011; Fisher et al., 2002; McGale et al., 2014; Ragaz et al., 2005).

Hauptziel einer effektiven Strahlentherapie ist eine Maximierung der Strahlendosis bei gleichzeitiger Minimierung der frühen und späten Nebenwirkungen (Barnett et al., 2009). Frühe Nebenwirkungen sind hauptsächlich lokale Haut- und Schleimhautreaktionen, während späte Nebenwirkungen nicht nur lokal in Form einer Fibrosierung und Funktionsschädigung des bestrahlten Organs, sondern auch systemisch in Form von Zweittumoren auftreten können (Allan & Travis, 2005; Bentzen, 2006). Weiterhin kann die Effektivität der Strahlentherapie durch radioresistente Tumorzellen eingeschränkt sein (Peters, Withers, Thames Jr, & Fletcher, 1982). Gerade um späte Nebenwirkungen zu minimieren, ist es notwendig, die zugrunde liegenden molekularen Pathomechanismen zu erforschen (Bentzen, 2006).

Einleitung

Als Folge von ionisierender Strahlung konnte in vitro und ex vivo bereits mehrfach erhöhte Migration sowie Metastasenentwicklung festgestellt werden (Moncharmont et al., 2014). In vitro wurde beispielsweise für Glioblastomzellen höheres Migrationspotenzial unter Bestrahlung gezeigt (Wild-Bode, Weller, Rimner, Dichgans, & Wick, 2001). Auch in den Brustkrebszellen MDA-MB-231 wurde unter Bestrahlung mit 10 Gray signifikant erhöhte Migration im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle gemessen (De Bacco et al., 2011). Für das hepatozelluläre Karzinom wurde im Mausmodell bestrahlungsinduzierte EMT und vermehrte Entwicklung von Metastasen 30 Tage nach Bestrahlung nachgewiesen (T. Li et al., 2011).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass radioresistente Tumorzellen durch Bestrahlung befähigt werden, vermehrt zu migrieren. Mögliche Signaltransduktionswege, über die Bestrahlung zu erhöhter EMT und Invasion führen kann, sind in Abbildung 1, welche aus dem Review von Moncharmont et al. übernommen wurde, dargestellt (Moncharmont et al., 2014).

Eine Minimierung der strahleninduzierten Migration und Invasion spielt besonders bei Tumoren mit ohnehin erhöhtem Metastasenrisiko eine bedeutsame Rolle. Im Hinblick auf eine optimierte Therapie des Mammakarzinoms gilt es, biologische Marker (Biomarker) für Migration zu identifizieren, um bei Patienten mit erhöhtem Migrationsrisiko die Strahlentherapie entsprechend anpassen zu können. Dies soll zu fortschrittlicher und individualisierter Strahlentherapie beitragen.

Einleitung

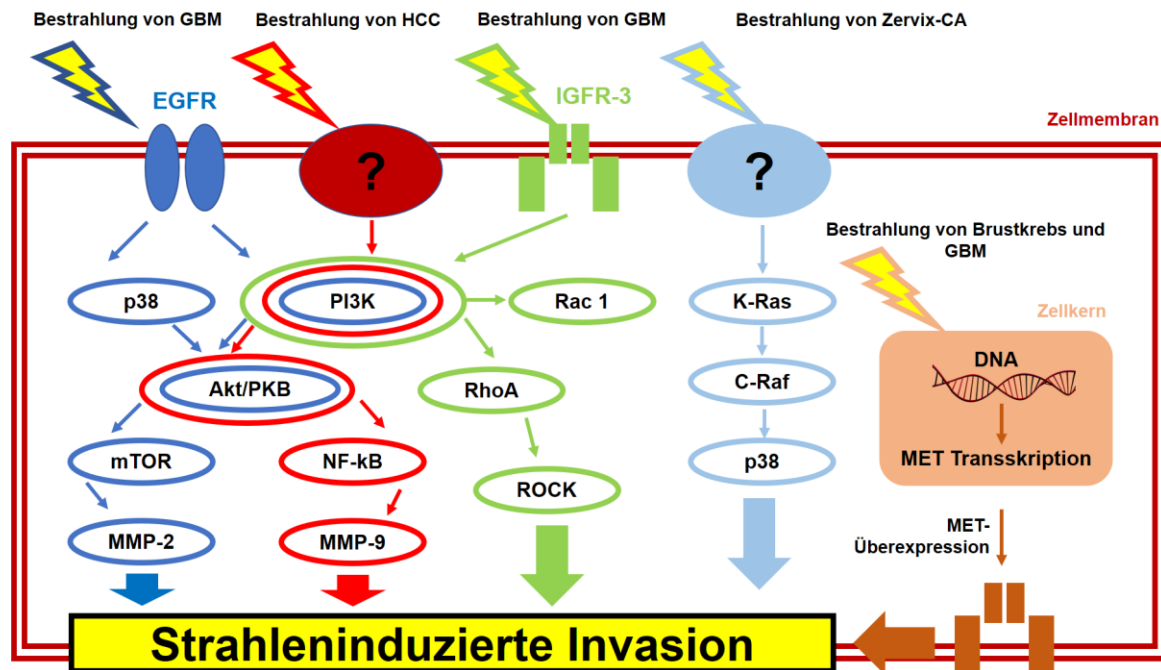


Abbildung 1. Signalwege strahlungsinduzierter Invasion, Abbildung übernommen von Moncharmont et al. (Moncharmont et al., 2014). Die Abbildung zeigt intrazelluläre Signalkaskaden, über die Bestrahlung Invasion vermitteln kann. Jede zusammengehörige Signalkaskade stammt aus einem eigenen Paper und wird durch eine eigene Farbe charakterisiert. Park et al. (C.-M. Park et al., 2006) wird blau, Cheng et al. (Cheng, Chou, Kuo, & Hsieh, 2006) wird rot, Zhai et al. (Zhai et al., 2006) wird grün, Su et al. (Su, Chuang, Huang, & Yang, 2012) wird hellblau und DeBacco et al. (De Bacco et al., 2011) wird braun dargestellt. Blitze zeigen Bestrahlung an, Pfeile signalisieren eine aktivierende Interaktion. GBM: Glioblastoma multiforme; HCC: Hepatozelluläres Karzinom; CA: Karzinom.

1.2 Rolle der miRNAs in der Tumorgenese

1.2.1 miRNAs

Um individuelle Tumorthérapien ermöglichen zu können, sind detaillierte Genanalysen unabdingbar, da deregulierte Gene die Ursache jeder Tumorentstehung darstellen (Vogelstein & Kinzler, 2004). Bei der Genexpression werden Gene auf der DNA in messenger RNA (mRNA) umgeschrieben (Transkription) und mithilfe des genetischen Codes in Aminosäuresequenzen, die Grundbausteine für Proteine, übersetzt (Translation). Die Frequenz der Genexpression eines Gens wird durch zahlreiche Faktoren auf posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene reguliert. Lee et al. entdeckten 1993 ein regulatorisches Modul der Genexpression, welches als microRNA (miRNA) bekannt wurde (Bartel, 2004; Lee & Ambros, 2001; Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Unter miRNA versteht man endogene, kurze (21-25 Nukleotide), nicht kodierende RNA-Moleküle, die durch komplementäre Basenpaarung der Nukleotide 2-8 an 3' untranslated region (3'UTR) der mRNA binden

Einleitung

und einen Abbau der mRNA herbeiführen, wodurch die Genexpression posttranskriptional blockiert wird (Bartel, 2004; Filipowicz, Bhattacharyya, & Sonenberg, 2008).

Einleitung

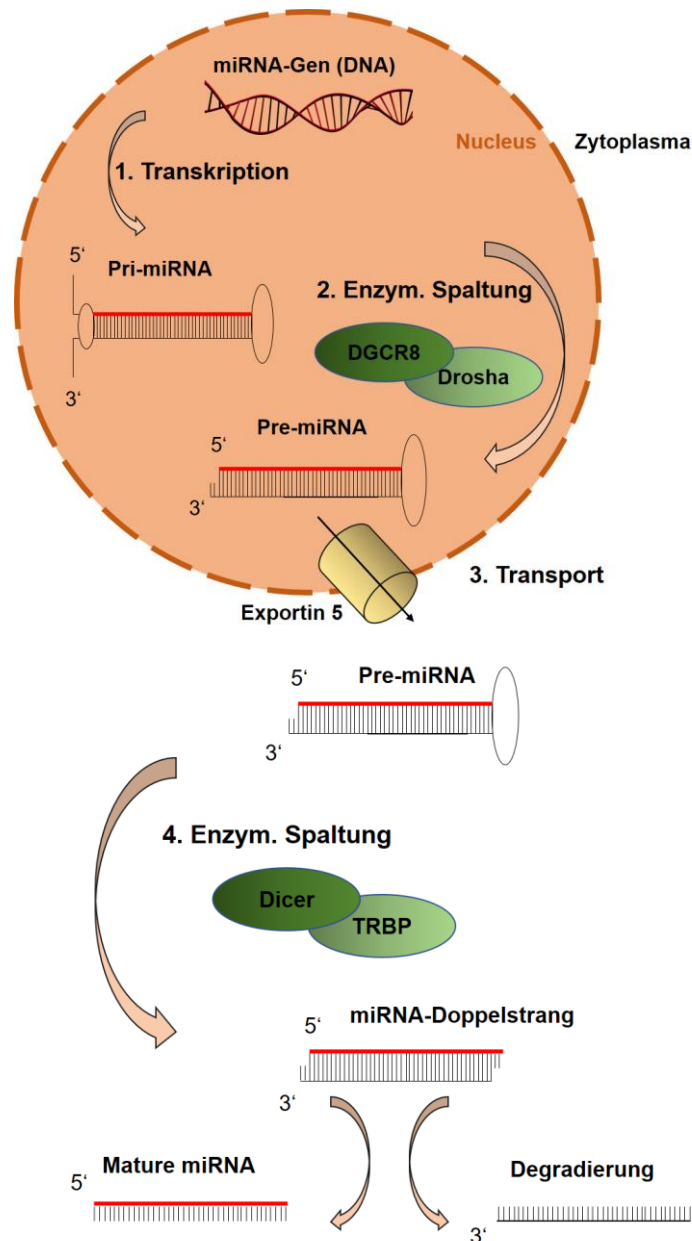


Abbildung 2. Biosynthese der miRNA, inspiriert von Filipowicz et al., Huang et al. (Filipowicz et al., 2008; Huang et al., 2011)

1. Transkription des miRNA-Gens auf der DNA mittels RNA-Polymerase II/III in pri-miRNA.
2. Enzymatische Spaltung der pri-miRNA mittels DGCR8 und Drosha zu pre-miRNA.
3. Transport aus dem Nucleus mittels Exportin 5 /Ran-GTP.
4. Enzymatische Spaltung mittels Dicer und TRBP zum miRNA-Doppelstrang. Der 5'-Einzelstrang stellt die mature miRNA dar, der 3'-Einzelstrang degradiert.

Die Biosynthese der miRNA ist ein mehrstufiger Reifungsprozess (Abbildung 2). Zunächst wird vom miRNA-Genabschnitt auf der DNA durch die RNA-Polymerase II oder III ein Transkript erstellt, die pri-miRNA. Die pri-miRNA wird mithilfe eines Komplexes aus dem Protein DGCR8, welches eine Bindedomäne für RNA enthält,

Einleitung

und dem Enzym Drosha, einer RNAse III Typ Endonuklease, zu pre-miRNA (70 Nukleotide) gespalten. Die pre-miRNA wird durch einen Komplex aus Exportin 5 und Ran-GTP aktiv aus dem Zellkern transportiert. Im Zytoplasma bindet die pre-miRNA an die RNA-Bindedomäne des Proteins TRBP und wird von Dicer, einer weiteren RNAse III Typ Endonuklease, in eine noch doppelsträngige miRNA (20 nt) gespalten. Von diesen Strängen stellt einer die mature miRNA dar, während der andere wieder abgebaut wird (Bartel, 2004).

Um mit der mRNA interagieren zu können, bilden reife miRNAs Komplexe mit Ribonukleoproteinen (RNPs), sogenannte microRNPs (miRNPs) oder miRNA-induced-silencing-complexes (RISC). Die miRNPs binden an das 3'UTR der mRNA und können über mehrere Mechanismen die Genexpression blockieren. Durch Deadenylierung können miRNPs direkt einen Zerfall der mRNA bewirken. miRNPs können jedoch auch noch auf der Ebene der Translation eingreifen. Bei der Initiationsphase der Translation wird die Wiedererkennung des Cap-Endes der mRNA oder der Anschluss an die 60S-Untereinheit blockiert. Bei der Elongationsphase der Translation wird der Verlängerungsprozess des Proteins verlangsamt oder ein Ablösen der mRNA vom Ribosom provoziert. Sogar auf Proteinebene können miRNPs eine proteolytische Spaltung des entstehenden Polypeptids vermitteln (Filipowicz et al., 2008).

Über die beschriebenen Mechanismen wird durch miRNAs eine Inhibierung der Expression des Targetgens vermittelt (Filipowicz et al., 2008). In einigen Fällen wurde jedoch auch eine miRNA-induzierte Aktivierung der Expression des Targetgens beobachtet (Falkenberg et al., 2015; Vasudevan, 2012). Dies ist auf eine Stabilisierung der mRNA und eine Aktivierung der Translation durch miRNA zurückzuführen (Valinezhad Orang, Safaralizadeh, & Kazemzadeh-Bavili, 2014).

miRNAs sind evolutionsbiologisch alt, da sie bereits in einzelligen Algen zu finden sind, hoch konserviert und lassen daher eine zentrale Bedeutung in der Genregulation vermuten (Molnár, Schwach, Studholme, Thuenemann, & Baulcombe, 2007). Es wird vermutet, dass miRNAs 30-60 % aller Gene regulieren und demzufolge an beinahe jedem zellulären Prozess beteiligt sind (Filipowicz et al., 2008; Friedman, Farh, Burge, & Bartel, 2009). Simulationen zeigten, dass eine miRNA hundert verschiedene

Einleitung

mRNAs und folglich hundert verschiedene Gene regulieren kann (Bushati & Cohen, 2007).

Da jeder Tumorphathogenese eine Deregulation von Genen zugrunde liegt (Vogelstein & Kinzler, 2004), sollte untersucht werden, ob miRNAs als zentrale Genregulatoren bei der Tumorphathogenese eine Rolle spielen. Eine von Calin et al. durchgeführte, genomische Kartierung von 186 miRNAs zeigte, dass über 50 % der miRNAs in tumorassoziierten Genomregionen lokalisiert waren (Calin et al., 2004). Es zeigte sich, dass einige miRNAs als Tumorsuppressoren wirken (oncosuppressor-miRs) und im Tumorgewebe selten exprimiert werden, einige miRNAs onkogen wirken (onco-miRs) und im Tumorgewebe vermehrt exprimiert werden (Iorio & Croce, 2009). miR-15 und miR-16 (oncosuppressor-miRs) waren verglichen zum Normalgewebe in der Mehrheit der Fälle mit chronisch lymphatischer Leukämie selten exprimiert (Calin et al., 2002). Dadurch konnte das Targetgen BCL-2 (Onkogen), das antiapoptotisch wirkt, vermehrt exprimiert werden (Cimmino et al., 2005). miR-21 (onco-miR) war bei Speicheldrüsentumoren überexprimiert und vermittelte den Abbau des Tumorsuppressors PDCD4 (Jiang et al., 2015). Für miR-221 (onco-miR) wurde eine Überexpression bei Tumoren beobachtet, was zu verstärktem Abbau des Tumorsuppressors p27 führte (Le Sage et al., 2007). Aufgrund der zentralen Bedeutung der miRNAs in der Tumorphathogenese werden diese als diagnostische und prädiktive Marker für zellbiologische Prozesse und damit verbundene Prognosen in Betracht gezogen. Zudem stellen sie ein potenzielles Target für eine zielgerichtete Tumorthherapie dar (Iorio & Croce, 2009).

1.2.2 miR-221 bei Brustkrebs

Eine Analyse der miRNA-Expression in Brustkrebsgeweben im Vergleich zu normalem Brustgewebe von Iorio et al. (Iorio et al., 2005) ergab, dass miR-10b, miR-125b und miR-145 in Brustkrebs herunterreguliert waren (oncosuppressor-miRs), während miR-21 und miR-155 vermehrt exprimiert wurden (Iorio et al., 2005).

Wie in Kapitel 1.1.2 bereits ausgeführt, exprimiert TNBC keinen der Biomarker ER, PR und HER2, die als Targets für zielgerichtete Therapien dienen, und ist daher mit schlechter Prognose assoziiert. Daher ist gerade für TNBC eine Analyse potenzieller Biomarker von Interesse (Foulkes et al., 2010; Liedtke et al., 2008; Tan et al., 2008).

Einleitung

Radojicic et al. verglichen die miRNA-Level von TNBC mit normalem Brustgewebe und zeigten, dass miR-221 bei TNBC überexprimiert wurde (Radojicic et al., 2011).

miR-221 liegt auf dem X-Chromosom, wird in diversen Tumoren überexprimiert und daher als onco-miR betrachtet (Howe, Cochrane, & Richer, 2012). Ein Überexpressionsmuster konnte für Brust- (Hui et al., 2009), Prostata- (Zheng, Yinghao, & Li, 2012), Magen- (X. Li et al., 2011), Blasen- (Gottardo et al., 2007), Schilddrüsen- (Chou et al., 2010), kolorektales Karzinom (Sun et al., 2011) sowie für Melanom (Felicetti et al., 2008) und akute myeloische Leukämie (Cammarata et al., 2010) gezeigt werden. Hohe miR-221-Expression wird im Allgemeinen mit hohem Tumorgrad und schlechter Prognose assoziiert (X. Lu et al., 2009; Veerla et al., 2009). Krebspatienten mit hoher miR-221-Expression zeigten geringeres Gesamtüberleben bei hepatozellulärem Karzinom (Karakatsanis et al., 2013) und kolorektalem Karzinom (Pu et al., 2010). Beim Glioblastom (X. Lu et al., 2009), Prostatakarzinom (Agaoglu et al., 2011) und Urothelkarzinom (Veerla et al., 2009) korrelierte miR-221-Überexpression positiv mit aggressiveren, fortgeschritteneren Tumoren. Auch beim Mammakarzinom war miR-221-Überexpression bei fortgeschrittenen Tumoren, die bereits Lymphknotenmetastasen und HER2-Überexpression aufwiesen, mit geringerem metastasefreiem Überleben vergesellschaftet (Falkenberg, Anastasov, Rappl, et al., 2013).

Aufgrund der mit miR-221-Überexpression verbundenen schlechten Prognose ist eine Betrachtung der zellulären Signalwege und zellbiologischen Prozesse, die miR-221 beeinflusst, bedeutsam, um Targets für zielgerichtete Therapien zu identifizieren. Als onco-miR hat miR-221 häufig Tumorsuppressoren als Targets, die bei miR-221-Überexpression vermehrt abgebaut werden (Abbildung 3).

Direkte Targets von miR-221 sind beispielsweise die Tumorsuppressoren p27^{kip1} (Fornari et al., 2008; Le Sage et al., 2007; Sarkar et al., 2013) und p57^{kip2} (Sarkar et al., 2013), die den Zellzyklus regulieren. Durch den miR-221-vermittelten Abbau fällt die regulierende Funktion auf den Zellzyklus weg, sodass unkontrollierte Zellteilung erfolgen kann. So kann miR-221-Überexpression in Tumoren zu verstärkter Proliferation führen.

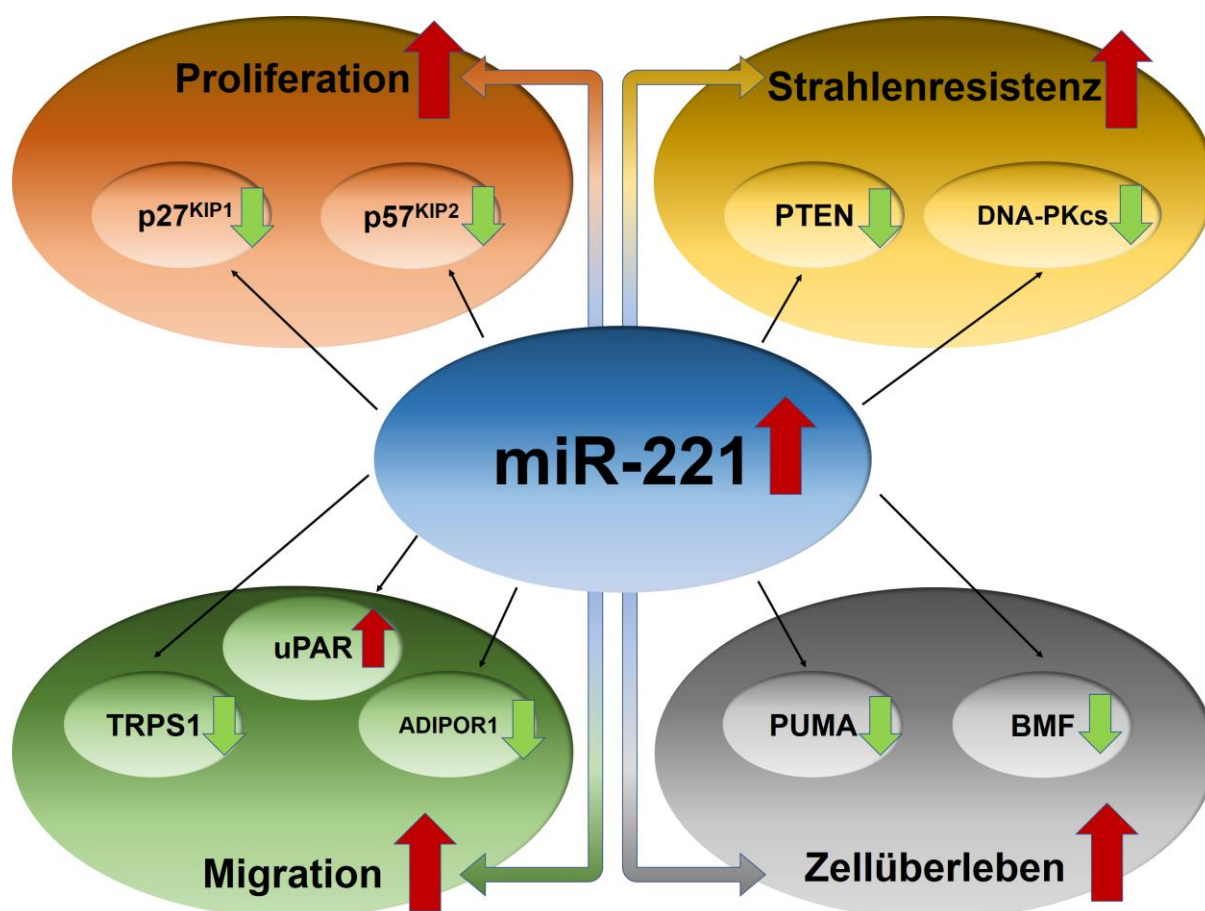


Abbildung 3. Direkte Targets und beeinflusste zellbiologische Prozesse von miR-221. Schwarze Pfeile verbinden miR-221 mit seinen direkten Targets. Rote Pfeile signalisieren hohe Expression bzw. ein verstärktes Ablufen des jeweiligen zellbiologischen Prozesses, grüne Pfeile signalisieren niedrige Expression. Bis auf uPAR resultiert hohe miR-221-Expression in niedriger Expression der Targets (Tumorsuppressoren). Durch den Wegfall der Tumorsuppressoren laufen tumorfördernde Prozesse wie Proliferation, Strahlenresistenz, Migration und Zellüberleben vermehrt ab. Die zellbiologischen Prozesse Proliferation, Strahlenresistenz, Migration und Zellüberleben werden somit durch miR-221-Überexpression verstärkt.

Weitere Targets von miR-221 sind die Apoptose einleitenden Gene p53 Upregulated Modulator of Apoptosis (PUMA) (Sarkar et al., 2013; Chun-zhi et al., 2010) und Bcl-2 Modifying Factor (BMF) (Gramantieri et al., 2009). Durch deren Abbau fördert miR-221 das Zellüberleben und Resistenz gegen apoptotische Stimuli, die durch endokrine, Chemo- oder Strahlentherapie gesetzt werden (Howe et al., 2012).

Resistenz gegen Bestrahlung kann von miR-221 auch direkt vermittelt werden über den Abbau seines Targets Phosphatase and tensin homolog (PTEN) (Chun-zhi et al., 2010). Der Ras-Signalweg, der Strahlenresistenz fördert, wird durch PTEN inhibiert (Gupta et al., 2001). Bei miR-221-Überexpression wird PTEN herunterreguliert, was

Einleitung

zu vermehrter Aktivierung des Ras-Signalwegs und damit zu vermehrter Radioresistenz führt. Dies konnte bereits in Magen- und Darmkrebszellen gezeigt werden (Chun-zhi et al., 2010). In Glioblastomzellen konnte außerdem eine miR-221-getriggerte Reparatur des strahleninduzierten DNA-Schadens beobachtet werden (W. Li, Guo, Wang, Hong, & Zhang, 2014).

Eine Verstärkung von Migrationsprozessen unter erhöhter miR-221-Expression konnte bereits mehrfach in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen werden. miR-221/222 konnte eine positive Regulation des Transkriptionsfaktors Zink finger E Box-binding homeobox 1 und 2 (ZEB1/2) über direkte Interaktion mit dem Protein Trichorhinophalangeal Syndrome I (TRPS1) und dadurch erhöhte EMT u.a. in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 nachgewiesen werden (Stinson et al., 2011). Dies lässt sich mit den im Experiment gemessenen höheren Migrationsraten der MDA-MB-231 im Vergleich zur MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down vereinbaren.

Mit dem Nachweis einer positiven Regulation des Adiponectin-Rezeptors 1 (ADIPOR1) durch miR-221/222 konnte ein weiterer miR-221-vermittelter Signalweg für EMT gezeigt werden (Hwang et al., 2013). ADIPOR1-Überexpression führt zu erhöhter Invasion und Migration (Taliaferro-Smith et al., 2009).

Auch die Migrationsprozesse auslösende lösliche Isoform des Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptors (uPAR) konnte als positiv reguliertes Target der miR-221 identifiziert werden, was im Kapitel 5.5 ausführlicher diskutiert wird (Falkenberg et al., 2015). Für miR-221 überexprimierende Brustkrebszellen (MDA-MB-231) konnten infolgedessen vermehrte uPAR-Expression beobachtet werden. Zudem wurden bei lentiviral transduzierter miR-221-Überexpression in SKBR3 erhöhte uPAR-Expression sowie erhöhte Invasionsraten observiert (Falkenberg, Anastasov, Braselmann, et al., 2013). Dies passt zu den im Migrationsversuch gemessenen erhöhten Migrationsraten bei SKBR3 und MDA-MB-231 mit miR-221-Überexpression.

Eine unter hohen miR-221-Expressionsleveln beobachtete Migration konnte bereits in Prostatazellen (Yang et al., 2014), Glioblastomzellen (Quintavalle et al., 2012), Lungenkrebszellen (Acunzo et al., 2012), Nierenzellen (G.-J. Lu et al., 2015) und auch

Einleitung

in Brustkrebszellen (B. Li et al., 2016; Y. Li et al., 2014; Stinson et al., 2011) nachgewiesen werden.

1.2.3 uPAR-Signalweg

Falkenberg et al (Falkenberg et al., 2015) zeigten, dass der lösliche uPAR (Isoform 2/b) ein direktes Target von miR-221 ist. Dabei führt miR-221-Überexpression zu einer Überexpression des uPAR (Isoform 2/b) (Falkenberg et al., 2015). Obwohl miRNA zunächst für eine Herunterregulierung ihres Targetgens bekannt waren, wurden zunehmend Fälle beschrieben, bei denen miRNA die Expression ihres Targetgens hochregulierte (Vasudevan, 2012).

Die über den uPAR vermittelte Signalkaskade steuert Wundheilungsprozesse sowie die Neuorganisation von Gewebe, indem das invasive und migrative Potenzial der Zellen erhöht wird. Diese Signalkaskade ist auch bei Tumoren vermehrt aktiviert und ist mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für Fernmetastasen und damit schlechter Prognose verbunden (Andreasen, Kjøller, Christensen, & Duffy, 1997; Chapman, 1997; Conese & Blasi, 1995; Foekens et al., 2000; Smith & Marshall, 2010).

Der im Folgenden beschriebene uPAR-Signalweg ist in Abbildung 4 dargestellt und ist an Abbildungen aus Smith et al und Falkenberg et al angelehnt (Falkenberg et al., 2015; Smith & Marshall, 2010). uPAR ist mithilfe eines Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI-) Ankers an die Zellmembran gebunden (Ploug et al., 1991). Es existiert allerdings auch eine lösliche, nicht über den GPI-Anker an die Membran gebundene Isoform des uPAR, auch als Isoform 2 oder Isoform b bekannt (Pyke et al., 1993; Stewart & Sayers, 2009). Diese Isoform wird durch miR-221-positiv reguliert (Falkenberg et al., 2015).

Der uPAR kann sowohl aktives uPA als auch seine Vorstufe pro-uPA binden (Ploug et al., 1991). uPA kann durch Plasminogen Aktivator Inhibitoren 1 und 2 (PAI1, PAI2) gehemmt werden (Ye & Goldsmith, 2001). Aktives uPA spaltet die Vorstufe Plasminogen zur aktiven Serinprotease Plasmin (Nielsen et al., 1982). Plasmin kann über einen positiven Rückkopplungsmechanismus wiederum pro-uPA zu aktivem uPA aktivieren, was wiederum Plasmin aktiviert. Plasmin verstärkt somit seine eigene Aktivierung (Ploug et al., 1991; Roldan et al., 1990). Plasmin kann jedoch durch α 2-Antiplasmin gehemmt werden (Ye & Goldsmith, 2001). Aktives Plasmin spaltet einige

Einleitung

Komponenten der ECM und aktiviert Matrix-Metalloproteinasen (MMP-3, -9, -12, -13), welche wiederum zur Degradierung der ECM beitragen (Carmeliet et al., 1997). Die uPAR-vermittelte Degradierung der ECM trägt zu verstärkter Migration und Invasion und somit zur Bildung von Tumormetastasen bei (Conese & Blasi, 1995). Der uPAR-Signalweg, den miR-221 über die vermehrte Expression des löslichen uPAR hochreguliert, zeigt neben den in 1.2.2 ausgeführten Signalwegen ebenfalls einen Mechanismus, über den miR-221-Überexpression in Tumoren zellbiologisch zu verstärkter Invasion und Migration führen kann (Falkenberg et al., 2015).

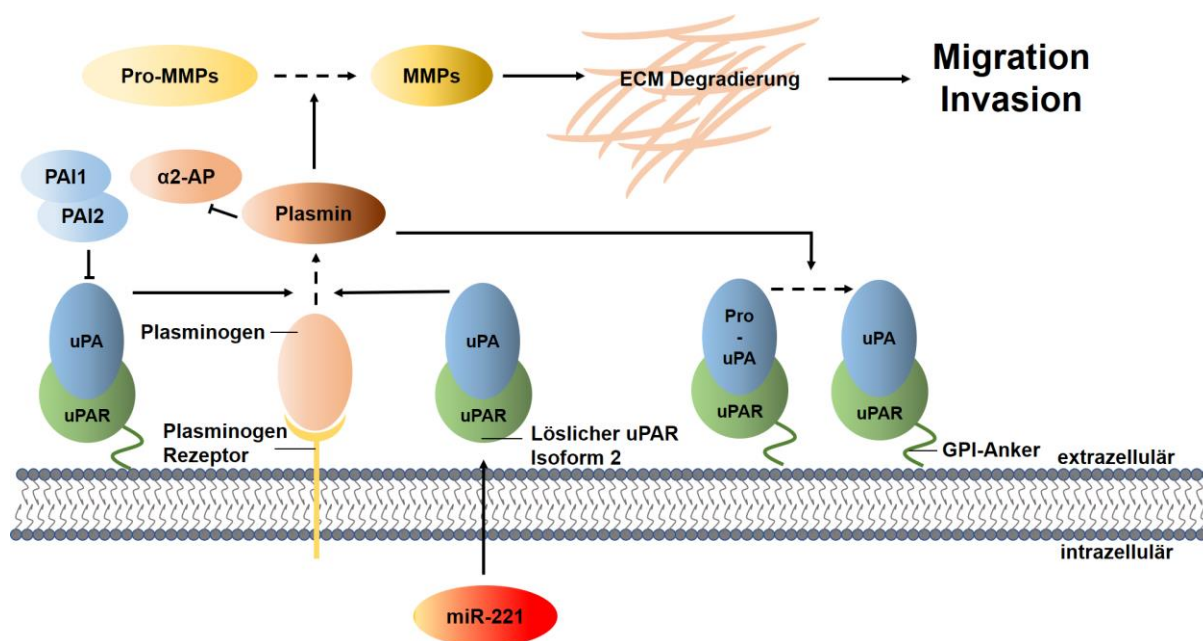


Abbildung 4. uPAR-Signalweg, angelehnt an Smith et al und Falkenberg et al (Falkenberg et al., 2015; Smith & Marshall, 2010). miR-221 verstärkt die Expression des löslichen uPAR Isoform 2. Sowohl der uPAR mit GPI-Anker als auch der lösliche uPAR binden uPA und aktivieren Plasmin aus der rezeptorgebundenen Vorstufe Plasminogen. Plasmin aktiviert MMPs aus Pro-MMPs. MMPs degradieren ECM und verstärken das Migrations- und Invasionspotenzial. Die Signalkaskade wird negativ durch PAI1 und PAI2, die uPA inhibieren, und durch α2-Antiplasmin, das Plasmin inhibiert, reguliert. Plasmin aktiviert Pro-uPA zu uPA und vermittelt somit eine positive Rückkopplung des Systems.

1.3 Ziel der Dissertation

Eine Strahlentherapie ist ineffizient, wenn die Tumorzellen strahlenresistent sind, oder sogar kontraproduktiv, wenn sie Migration und Metastasen induziert (1.1.5). miR-221-Überexpression wird ein strahlenresistentes und migratives Potenzial zugeschrieben (1.2.2).

Einleitung

Daher ist für eine effektive Tumorthherapie von zentraler Bedeutung, wie miR-221-Überexpression und Bestrahlung in Brustkrebszellen interagieren. In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen miR-221 und Bestrahlung in den Brustkrebszelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 untersucht. Dabei wurden die Interaktionen von miR-221 und Bestrahlung auf Radiosensitivität, Proliferation und Migration analysiert.

In Zukunft könnte die miR-221 als potenzieller Biomarker für Strahlenresistenz und Migration im Hinblick auf eine zielgerichtete, individualisierte Strahlentherapie in Betracht gezogen werden.

Material

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

2-mercaptoethanol, Sigmal-Aldrich, Steinheim, Deutschland

APS (Ammoniumpersulphat), Merck, Darmstadt, Deutschland

Bromphenolblau, Roche, Mannheim, Deutschland

BSA (Bovines Serum Albumin), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

DMEM GlutaMAX (Dulbecco Modified Eagles Medium), Gibco, Karlsruhe, Deutschland

DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, München, Deutschland

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Essigsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland

FCS (Fetal Calf Serum), Thermo scientific, Rockford, USA

Giemsa, Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycin, EMD Millipore, Darmstadt, Deutschland

HCl (Salzsäure), Merck, Darmstadt, Deutschland

Isopropanol, Merck, Darmstadt, Deutschland

Methanol, Merck, Darmstadt, Deutschland

Milchpulver, Roth®, Karlsruhe, Deutschland

NEAA, Gibco, Karlsruhe, Deutschland

PBS (Phosphate Buffered Saline), Merck, Darmstadt, Deutschland

PhosSTOP (Phosphatase-Inhibitor), Roche, Mannheim, Deutschland

Material

Ponceau-S-Rot, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, BioRad, Hercules, USA

Protease inhibitor, Roche, Mannheim, Deutschland

Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, Thermo scientific, Rockford, USA

Roti®block, Roth®, Karlsruhe, Deutschland

SDS (Sodium dodecyl sulfate), Serva, Heidelberg, Deutschland

TEMED (Tetramethylethylenediamine), Roth®, Karlsruhe, Deutschland

T-PER (Tissue Protein in Extract Reagent), Thermo scientific, Rockford, USA

Tris, Merck, Darmstadt, Deutschland

Trypsin-EDTA 1x 0,05%, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Tween 20, Roth®, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Messinstrumente und Verbrauchsmaterial

12-Well-Kammer, ibidi® GmbH, Gräfeling, Deutschland

¹³⁷Cs γ-Quelle, HWM-D 2000, Wälischmiller Engineering, Markdorf, Deutschland

2-Well-Kammer, ibidi® GmbH, Gräfeling, Deutschland

96-Wellplatten, Nunclon® Delta surface, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

96-Wellplatten, White opaque Tissue Culture Plate, Corning Incorporated,
Wiesbaden, Deutschland

Bioreader® 3000, BioSys, Karben, Deutschland

Bead Bath, Memmert, Schwalbach, Deutschland

Becherglas, Duran, Garching, Deutschland

Centrifuge 5424R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Centrifuge Biofuge pico, Heraeus, Osterode, Deutschland

Material

Centrifuge Rotina 420, Hettich Zentrifugen, Hanau, Deutschland

Criterion™ blotter filter paper, BioRad, Hercules, USA

Criterion™ blotter foam pads, BioRad, Hercules, USA

Cyclonegradient (Thermocycler), Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland

Deckgläser, VWR, Darmstadt, Deutschland

Dispenser Multipette plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Dual Gel Caster, Hoefer, Holliston, USA

Elektrophoresekammer Western Blot, Hoefer, Holliston, USA

Eppendorf tubes (1,5 ml, 2 ml), Greiner one, Frickenhausen, Deutschland

Falcon tubes (15ml, 50ml), Greiner one, Frickenhausen, Deutschland

Gefriertruhe -20°C, Liebherr, Ehingen, Deutschland

Gefriertruhe -80°C, New Brunswick, Nürtingen, Deutschland

Heizblock, Thermomixer comfort 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Heizblock, Thermomixer comfort 2 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Inkubator, Heraeus, Hanau, Deutschland

Keyence® BZ 9000 Microscope, Keyence, Frankfurt, Deutschland

Ladequelle für Western Blot und DNA Gelelektrophorese, BioRad, Hercules, USA

Magnetplatte, NeoLab, Heidelberg, Deutschland

Magnetrührer, NeoLab, Heidelberg, Deutschland

Maxwell® RSC Instrument, Promega, Fitchburg, USA

Microbiological safety cabinet (MSC), Heraeus, Hanau, Deutschland

Microscope Axiovert 25, Zeiss, Jena, Deutschland

Material

Microtiter-Plattenleser Infinite 200 Pro, TECAN, Crailsheim, Deutschland

Mikroskopierplatten, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Multistep Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl), Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Multistep Pipettenaufsätze (10, 20, 100, 200, 1000 µl), Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Nalgene Cyro Gefriercontainer, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

NanoDrop™, Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland

Nitrozellulosemembran, Amersham™ Protran™ 2µm, GE Healthcare, München, Deutschland

Petrischalen, Greiner one, Frickenhausen, Deutschland

Schott-Flaschen, Duran, Garching, Deutschland

Shaker IKA KS 260 basic, IKA LABORTECHNIK, Staufen, Deutschland

Shaker KS 250 basic, IKA LABORTECHNIK, Staufen, Deutschland

Step One Plus™, Applied Biosystems, San Francisco, USA

Sterile laminar flow work bench, BDK Luft und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland

Sub-Cell GT, BioRad, Hercules, USA

Trans-Blot Cell, BioRad, Hercules, USA

UV Transilluminator und Gel-Dokumentationssystem, AlphaInnotech®, Kasendorf, Deutschland

Well-Platten (6, 12), Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

X-cell Sure Lock, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter, Fullerton, USA

Material

Zellkulturflaschen (T25, T75, T175), Cellstar/Greiner one, Frickenhausen, Deutschland

2.3 Puffer und Lösungen

Blocklösung	Volumen (1 L)
PBS	1 L
1 % BSA	1,5 g
0,15 % Glycin	10 g
1M Tris pH 8,8/6,8	Volumen (1 L)
Destilliertes Wasser	800 ml
HCl	Volumen zur pH-Anpassung
Tris	121,1 g
10 % SDS	Volumen (100 ml)
Destilliertes Wasser	bis 100 ml auffüllen
SDS	10 g
10 % APS	Volumen (100 ml)
Destilliertes Wasser	bis 100 ml auffüllen
APS	10 g
4xLaemmli	Volumen (50 ml)
240mM Tris-HCl pH6,8	20 ml
8 % SDS	4 g
40 % Glycin	20 ml
0,08 % Bromphenolblau	0,04 g
20 % Mercaptoethanol	10 ml
1x Towbin Puffer	Volumen (1 L)
Destilliertes Wasser	800 ml
Glycin	14,4 g

Material

Methanol 200 ml

Tris 3,03 g

10 x TBS-T Volumen (1 L)

(Tris Buffered Saline, 0,1 % Tween 20)

Tris 4,24 g

Tris-HCl 80 g

Destilliertes Wasser 900 ml

nach Auflösung:

Tween 20 10 ml

10x Running Buffer Volumen (4 L)

20 % SDS 200 ml

Destilliertes Wasser 3800 ml

Glycin 576 g

Tris 121,1 g

1x Giemsa Volumen (1 L)

10 % Giemsa Lösung 100 ml

PBS 900 ml

Ponceau-Rot Volumen (525 ml)

0,2 % Ponceau-S 1 g

5 % Essigsäure 25 ml

Destilliertes Wasser 500 ml

5 % Milch Volumen (200 ml)

Milchpulver 10 g

1x TBST 200 ml

Material

2.4 Kommerzielle Kits

Maxwell® 16 miRNA Tissue Kit, Promega®, Fitchburg, USA

TaqMan® Universal PCR Mastermix 4304437, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

TaqMan®-Reverse Transcription Kit No. 436696, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Lipofectamine® 2000, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Pierce™ BCA™ Protein-Assay, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

PowerPlex® 16 System, Eurofins/MWG Operon, Deutschland

2.5 Software

Adobe® Photoshop® CS5, Adobe® Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland

Bioreader® DE Software, BioSys, Karben, Deutschland

Graphpad® Prism 6.05, San Diego, USA

Image J, <https://imagej.net/>

Python, <https://www.python.org/psf/>

3 METHODEN

3.1 Zellkultur, Transduktion und Bestrahlung

3.1.1 Charakterisierung der Zelllinien

Die Interaktion zwischen miR-221 und Bestrahlung wurde am Beispiel der Brustkrebszelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 untersucht. Die Zelllinien SKBR3 (HTB-30) und MDA-MB-231 stammen von der American Type Culture Collection (ATCC). Bei beiden Zelllinien wurde 2018 die genetische Identität durch die Erstellung eines genetischen Profils mittels PowerPlex® 16 System (Eurofins/MWG Operon, Deutschland) bestätigt.

Die Brustkrebszelllinie SKBR3 entstammt dem Adenokarzinom einer 43-jährigen Kaukasierin und wurde 1970 aus dem Gewebe einer Lungenmetastase aquiriert (Fogh & Trempe, 1975). Da sie keine Expression des ER und PR, aber eine Überexpression des HER2-Rezeptors zeigt, klassifiziert man sie als HER2-Subtyp. Aufgrund ihres Ki-67-Anteils von 20 % zählen SKBR3 zu relativ langsam proliferierenden Brustkrebszellen (Subik et al., 2010).

MDA-MB-231 ist eine Adenokarzinomzelllinie, die 1973 von einer 51-jährigen kaukasischen Frau mit Mammakarzinom aus einer Lungenmetastase gewonnen wurde (Cailleau, Olive, & Cruciger, 1978; Cailleau, Young, Olive, & Reeves Jr, 1974). Mit ihrem triple-negativen Rezeptorprofil (ER- PR- Her2-) und einer hohen Proliferationsrate durch einen Ki-67-Anteil von nahezu 100 % lässt sie sich dem basalen Subtyp des Mammakarzinoms zuordnen (Subik et al., 2010).

Beide Zelllinien repräsentieren somit Subtypen mit schlechter Prognose, welche sich in kurzem Langzeitüberleben und geringem Metastasen-freiem Überleben äußert (Sørlie et al., 2001).

Da TNBC, hier beispielhaft repräsentiert durch MDA-MB-231, miR-221 gehäuft überexprimiert, wird vermutet, dass miR-221 für die schlechte Prognose des TNBC eine bedeutsame Rolle spielt (Radojicic et al., 2011).

3.1.2 Lentivirale Transduktion

Um die zellbiologischen Mechanismen, über die eine Überexpression von miR-221 zu einer schlechten Prognose führen kann, genauer zu analysieren, wurden die verwendeten Zelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 mit lentiviralen Genvektoren transduziert.

Die Methode der lentiviralen Transduktion wird in der Abbildung 5 illustriert. Dabei war das in die Zielzellen zu transferierende Gen auf einem Plasmid kodiert, welches zusammen mit den für die Bildung eines Lentivirus erforderlichen Hüllen- und Packungsplasmiden mithilfe von Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) zunächst in HEK293T-Zellen eingeschleust wurde (Anastasov et al., 2012). Die verwendeten Plasmide sind mit ihren jeweiligen Genprodukten in Tabelle 1 aufgeführt. Mithilfe der genetischen Information der Plasmide produzierten die HEK293T-Zellen replikationsdefiziente lentivirale Partikel, die das Transfergen enthielten. Diese Partikel stellten geeignete lentivirale Vektoren da, um die genetische Information des Transferplasmids in die DNA der Targetzellen, in diesem Fall SKBR3 oder MDA-MB-231, zu integrieren.

Um die Auswahl der verwendeten Transfergene nachzuvollziehen, welche analog zu den Hüllen- und Packungsplasmiden in Tabelle 1 für alle durchgeführten Transduktionen aufgeführt sind, muss die miR-221-Expression in den Targetzellen SKBR3 und MDA-MB-231 betrachtet werden. In den SKBR3-Zellen findet im Vergleich zu den MDA-MB-231 eine wesentlich schwächere Expression miR-221 statt (Falkenberg et al., 2015). Um den Effekt einer miR-221-Überexpression bei den SKBR3 messen zu können, wurde diese Zelllinie mit einem miR-221 überexprimierenden lentiviralen Vektor (pMIRNA-221, Cat. No. MIRH221-PA-1-GVO-SBI; Biocat, Heidelberg, Deutschland) transduziert und im Folgenden als SKBR3 +miR-221 bezeichnet (siehe Tabelle 1).

Die Zelllinie MDA-MB-231, die das Genprodukt miR-221 bereits stark überexprimiert, erfährt durch Lentiviren ein Knock-down der miR-221 (pmiRZIP-221, Cat. No. MZIP221-PA-1-GVO-SBI; Biocat; Heidelberg, Deutschland) und wird als MDA-MB-231 +anti-miR-221 bezeichnet (Falkenberg et al., 2015).

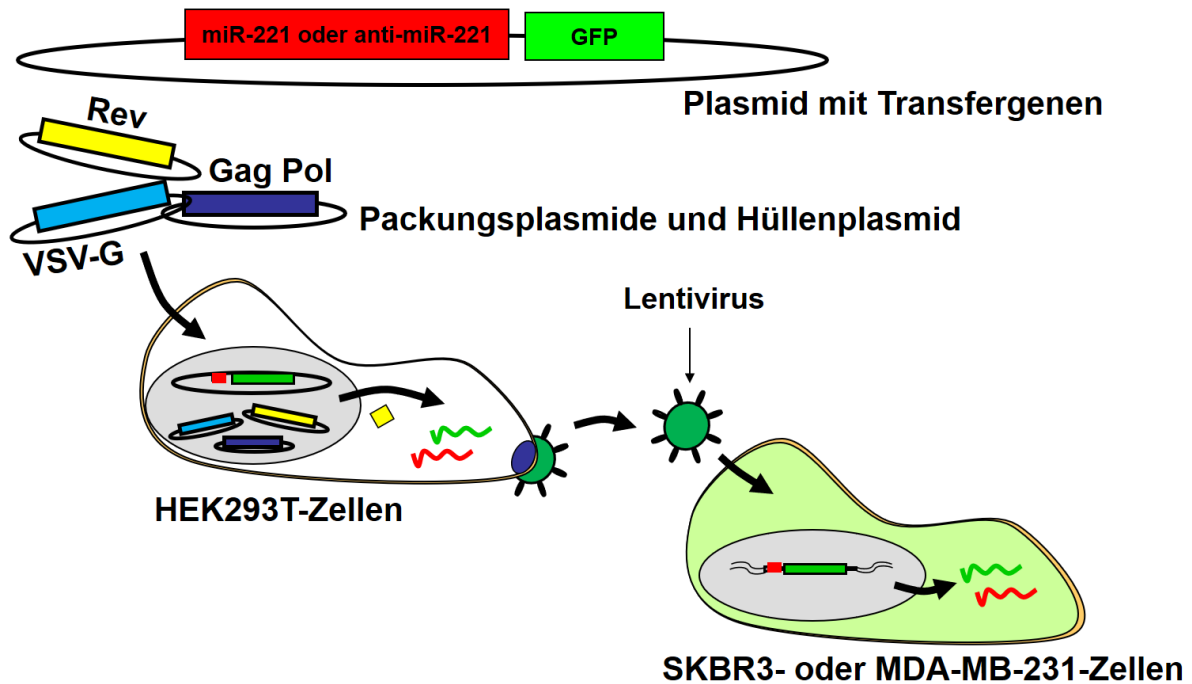


Abbildung 5. Methode der lentiviralen Transduktion. Hüllenplasmid (hellblau), Packungsplasmide (gelb, dunkelblau) und das Plasmid mit den Transfergenen für Überexpression oder Knock-down von miR-221 (rot) und für GFP-Produktion (hellgrün) wurden in HEK293T-Zellen übertragen. Diese produzierten replikationsdefiziente Lentiviren (dunkelgrün), welche die Transfergene in die Targetzellen SKBR3 oder MDA-MB-231 transduzierten. SKBR3 produziert nun vermehrt miR-221 (rot) und GFP (hellgrün), MDA-MB-231 produziert vermindert miR-221 (rot) und GFP (hellgrün).

Als Kontrolle für die lentivirale Transduktion und eine miR-221-Expression, die mit der untransfizierten Zelllinie vergleichbar ist, wurden SKBR3 und MDA-MB-231 mit dem Transferplasmid „pGreenPuro“ transduziert, im Folgenden bezeichnet als SKBR3 +EV bzw. MDA-MB-231 +EV. EV steht für „Empty Virus“, das leere Transferplasmid ohne eine miR-221 beeinflussende genetische Information. „pGreenPuro“ kodiert für das „green fluorescent protein“ (GFP), das in Zellen grüne Fluoreszenz hervorruft (Ikawa, Yamada, & Nakanishi, 1998).

Da bei allen vier transduzierten Zelllinien „pGreenPuro“ die Grundlage des Transferplasmids darstellte, wiesen sie die für Migrationsversuche (3.5) notwendige Eigenschaft der Fluoreszenz auf.

Methoden

Tabelle 1. Übersicht für durchgeführte lentivirale Transduktionen. Auflistung der verwendeten Plasmide mit jeweiligen Genprodukten in Klammern.

Zelllinie	SKBR3		MDA-MB-231	
Hüllenplasmid	pMD2.G (VSV-G)			
Packungsplasmide	pMDLg/pRRE (Gag, Pol), pRSV.Rev (Rev)			
Transferplasmid	pMIRH221-PA-1 (GFP, miR-221)	pGreenPuro (GFP)	MZIP221-PA-1 (GFP, anti-miR-221)	pGreenPuro (GFP)
Transduzierte Zelllinien	SKBR3 +miR-221	SKBR3 +EV	MDA-MB-231 +anti-miR-221	MDA-MB-231 +EV

3.1.3 Auftauen und Passagieren

Für SKBR3 und MDA-MB-231 wurde in allen Versuchen in Zellkultur Dulbecco Modified Eagles Medium mit hohem Glucosegehalt (DMEM mit GlutaMAX), das mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde, für die Anzucht verwendet. Das Medium für MDA-MB-231 enthielt zusätzlich 5 % nicht essenzielle Aminosäuren (NEAA).

Von jeder Zelllinie wurden Aliquots von jeweils 3 Millionen Zellen in Flüssigstickstofftanks (- 180°C) aufbewahrt. Zur Vermeidung eines Frostschadens waren die Zellen in 1 ml-Lösungen aus 10 % Dimethylsulfoxid und 90 % Medium eingefroren worden. Zur Verwendung in Zellkultur wurden die Zellen im 42°C-Wärmebad aufgetaut, in 15 ml-Falcons überführt und rasch mit auf 37°C vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde 5 min bei 300-facher Erdbeschleunigung (300 g) zentrifugiert und das nach Verwerfen des Überstandes verbliebene Zellpellet mit 13 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen überführt und in einer 37°C warmen, humiden, 5 % CO₂ enthaltenden Atmosphäre inkubiert.

Methoden

Nach 3-5 Tagen, sobald der Zellrasen zu 70-90 % konfluent war, wurden die Zellen entweder in eine nächstgrößere Flasche überführt oder in einem festen Verhältnis - 1:2 für SKBR3, 1:4 für MDA-MB-231 - in Flaschen gleicher Größe subkultiviert.

Für die folgenden Passageschritte notwendige Mengenangaben sind in Abhängigkeit von der Flaschengröße in Tabelle 2 aufgeführt. Zunächst wurde Medium abgenommen und der verbliebene Zellrasen mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen, um letzte Mediumreste zu entfernen. Nach Absaugen des PBS wurde der Zellrasen mit Trypsin- Ethylendiamintetraacetat (Trypsin-EDTA) versetzt und 3-5 min inkubiert, um die Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen. Sobald alle Zellen gelöst waren, wurde die Zellsuspension mit Medium₁ resuspendiert und in ein 15 ml-Falcon überführt. Im Falcon wurde bei 300 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Medium₂ resuspendiert, bis es visuell nicht mehr sichtbar war. Die entstandene Zellsuspension wurde nun in eine neue Zellkulturflasche überführt oder für Experimente weiterverwendet.

Tabelle 2. Kultivierung in Zellkulturflaschen verschiedener Größe.

Zellkulturflasche	PBS (ml)	Trypsin-EDTA (ml)	Medium₁ (ml)	Medium₂ (ml)
T25	5	2	3-5	10
T75	10	3	7-10	15
T175	20	5	15-20	25

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat

Für alle Zellkulturversuche war eine vorherige Zellzählung essentiell. Hierzu wurden die Zellen, wie in 3.1.3 beschrieben, aufbereitet. Die Zellsuspension im Falcon wurde sorgfältig resuspendiert, um eine gleichmäßige Zellverteilung zu gewährleisten, und 0,5 ml davon in einer 0,9 %-Natriumchlorid-Lösung im Verhältnis 1:40 gelöst. Mithilfe

Methoden

eines Z1-Coulter-Counter (Beckman Coulter, Fullerton, USA) konnten alle Zellen eines Durchmessers von 7.000-20.000 μm bestimmt werden.

Da für die Migrationsversuche mit SKBR3 (3.5) eine Zellzählung von hoher Präzision erforderlich war, wurde speziell für diesen Versuch eine manuelle Zählmethode mit der Neubauer-Zählkammer verwendet. Dabei wurde eine 1:1-Lösung von 40 μl aus Zellsuspension und Trypanblau hergestellt, welche sodann in die Zählkammer zwischen Deckglas und Kammer pipettiert wurde (Schrödel, 2010). Das Auszählen von vier in der Graphik grau dargestellten Zählquadraten unter dem Mikroskop wurde insgesamt mit vier verschiedenen Aliquots an Zellsuspension durchgeführt, um einen realistischen Mittelwert zu erhalten.

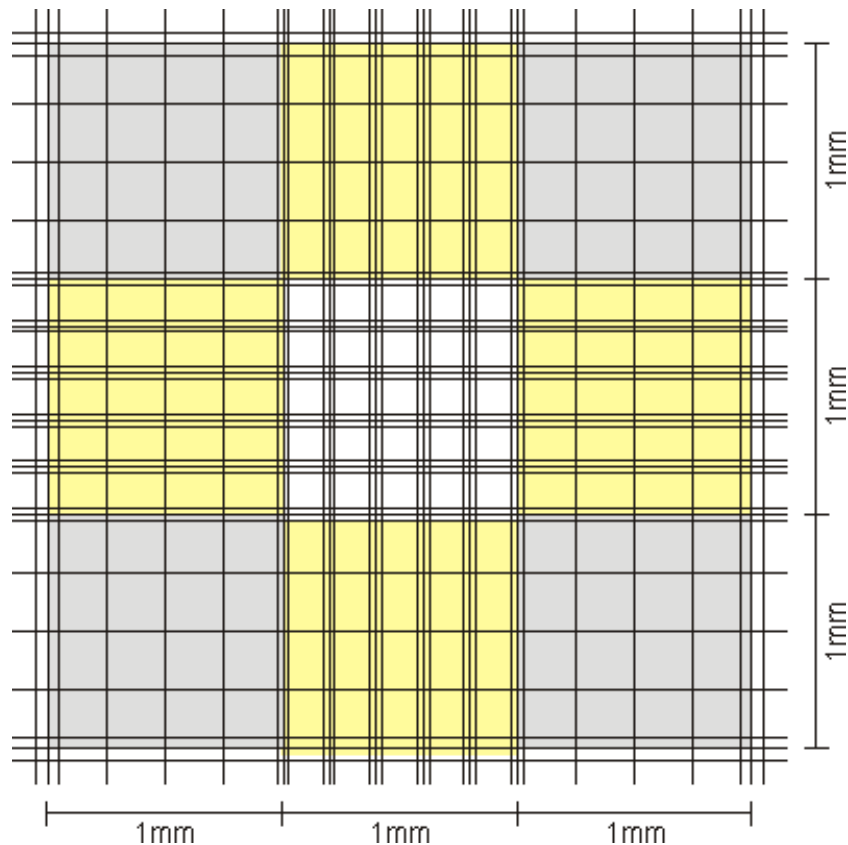


Abbildung 6. Schema der Zählquadrate einer Neubauer-Zählkammer (File:Neubauer improved schema.gif, 2021, August 8).

Die Berechnung der Zellzahl pro ml erfolgte aus der Berechnung des Mittelwerts der insgesamt 16 gezählten 1 mm^2 -Quadrate und folgender Formel:

Methoden

Zellkonzentration [1/ml]

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{ausgezählte Zellen} \times 10^3 [\text{Umrechnung in ml}]}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2] \times \text{Kammertiefe [mm]} \times \text{Verdünnung}} \\ &= \frac{\text{ausgezählte Zellen} \times 10^3}{1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} \times 0,5} \end{aligned}$$

Formel 1. Berechnung der Zellkonzentration.

Die Bestimmung der Zellzahl der Zellsuspension ermöglichte die Herstellung von Suspensionen beliebiger Konzentrationen, die für das Aussäen einer bestimmten Zellzahl notwendig waren. Das Aussäen erfolgte in Wellplatten verschiedener Größe. Jedes Well erhielt in Abhängigkeit von der Wellgröße ein bestimmtes Volumen an Zellsuspension (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3. Benötigtes Mediumvolumen bei verschiedenen Wellgrößen.

Wellgröße	Volumen/Well
6- Well	2 ml
12-Well	1 ml

Bei den in Kapitel 3.2, 3.4 und 3.6 beschriebenen Versuchen wurden jeweils 100.000 Zellen/Well für die in der Tabelle 4 dargestellten Zelllinien, Bestrahlungsdosen und Erntezeitpunkte ausgesät. Dabei wurden in 3.2 und 3.6 nur SKBR3 ausgesät. Bei 3.2 und 3.6 wurde jede Probe der gleichen Zelllinie, Bestrahlungsdosis und Erntezeit in drei verschiedene Wells ausgesät (technische Replikate). Jeder Versuch wurde insgesamt dreimal wiederholt (biologische Replikate).

Nach dem Aussäen wurden die Wellplatten bei 37°C inkubiert.

Methoden

Tabelle 4. Übersicht über ausgesäte Proben, Bestrahlung und Erntezeitpunkte in Versuchen 3.2, 3.4 und 3.6. Der Erntezeitpunkt 0 h fand direkt nach Bestrahlung der Zellen statt.

Zelllinien	SKBR3 +EV, SKBR3 +miR-221, (MDA-MB-231 +EV, MDA-MB-231 +anti-miR-221)
Bestrahlung	0, 2, 4, 8 Gy
Zeitpunkte	0, 24, 48, 72 h nach Bestrahlung

3.1.5 Bestrahlung der Zellen

24 h nach der Aussaat wurden die Zellen mit einer ^{137}Cs γ -Quelle (HWM-D 2000, Wälischmiller Engineering, Markdorf, Deutschland) bestrahlt. Die Bestrahlungszeiten für eine Strahlendosis von 1 Gy betragen analog zur aktuellen Aktivität der Bestrahlungsquelle von 0,444 Gy/min (Aug 2017) bis 0,439 Gy/min (Feb 2018) zwischen 2,25 min (Aug 2017) und 2,28 min (Feb 2018).

3.1.6 Ernten der Zellen

Für die Versuche 3.2, 3.4 und 3.6 wurden ausgesäte Zellen zu den in Tabelle 4 beschriebenen Zeitpunkten gerntet, d.h. von den Wellplatten durch Zugabe von Trypsin-EDTA gelöst, was der in 3.1.3 beschriebenen Methodik entspricht. Dabei wurden pro Well 200 μl Trypsin-EDTA zum Lösen und 800 μl Medium zur Resuspension verwendet. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt. Zellzahlen (3.4) wurden mithilfe des Z1-Coulter-Counters bestimmt. Für RNA- und Proteinanalysen (3.2, 3.6) wurden die Zellen 5 min bei 300 g zentrifugiert, nach Verwerfen des Überstands mit PBS resuspendiert und erneut 5 min bei 3000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der PBS-Überstand möglichst vollständig abgenommen und die verbliebenen Zellpellets bei -20°C eingefroren.

3.2 Quantifizierung der miR-221-Expression

Um die Veränderung der miR-221-Expression unter Bestrahlung zu analysieren und die miR-221-Überexpression bzw. den miR-221-Knock-down in den transfizierten Zellen zu überprüfen, wurde diese mithilfe der folgenden Schritte quantifiziert.

3.2.1 RNA-Isolation

RNA wurde aus Zellpellets, die bei -20°C gelagert wurden, mithilfe des Maxwell 16 miRNA Tissue Kit (Promega®, Fitchburg, USA) gemäß der Herstellerangaben isoliert. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2.2 Reverse Transkription

Um eine quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) durchführen zu können, musste die RNA über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde zunächst spektrometrisch die RNA-Konzentration der auf Eis gelagerten Proben mithilfe von NanoDrop™ (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Über das Absorptionsverhältnis von 260/280 nm (260 nm = Nucleinsäuren, 280 nm = Protein) wurde zudem die Reinheit der Proben ermittelt.

Die Proben wurden mit nucleasefreiem Wasser auf 20 ng/µl verdünnt und zur Herstellung eines Master-Mix für reverse Transkription verwendet. Der Master-Mix konnte mithilfe des TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) hergestellt werden und ist in Tabelle 5 genauer beschrieben.

Für jede zu analysierende Probe wurden getrennte reverse Transkriptionen mit Primern für miR-221 und RNU-44 durchgeführt. RNU44 ist eine in SKBR3 und MDA-MB-231 kontinuierlich exprimierte RNA und stellt daher eine geeignete Kontrolle für die Quantifizierung relativer miR-221-Expression dar.

Die cDNA wurde als Ergebnis der RT bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Methoden

Tabelle 5. Übersicht der pro Probe verwendeten Reagenzien zur Herstellung eines Master-Mix für reverse Transkription.

dNTP	0,15 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl
10x Puffer	1,5 µl
RNAse-Inhibitor	0,19 µl
Nucleasefreies Wasser	9,16 µl
5x Primer (miR-221 oder RNU44)	1,5 µl
Probe (20 ng/µl)	2 µl
Gesamt	15 µl

3.2.3 Quantitative RT-PCR

Um die miR-221-Expression zwischen SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 mit und ohne Bestrahlung zu vergleichen, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt (Falkenberg, Anastasov, Rappl, et al., 2013). Auf das Prinzip der PCR wird im Anhang genauer eingegangen (Gibson, Heid, & Williams, 1996).

Dabei wurden ein TaqMan®-MasterMix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) sowie zu den cDNA-Proben passende Primer für miR-221 und RNU44 in 20-facher Konzentration verwendet, um eine PCR zu generieren. Der Master Mix enthielt die zur PCR notwendigen dNTPs und DNA-Polymerase sowie für die Fluoreszenzreaktion notwendige Reagenzien. Die jeweiligen Mengenangaben pro Probe sind in Tabelle 6 aufgeführt. Um die Genauigkeit der PCR-Ergebnisse beurteilen zu können, wurde jeder Proben-Mix in Duplikaten hergestellt und analysiert.

Methoden

Tabelle 6. Übersicht der pro Probe verwendeten Reagenzien zum Ablauf der PCR.

TaqMan®-MasterMix	5 µl
H ₂ O (nucleasefrei)	2,5 µl
20x Primer (miR-221 oder RNU44)	0,5 µl
cDNA (miR-221 oder RNU44)	2 µl
Gesamt	10 µl

Die Proben wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und die PCR mithilfe von StepOnePlus™ (Applied Biosystems, San Francisco, USA) den Herstellerangaben entsprechend gestartet.

Die Auswertung der C_T -Werte erfolgte anhand der 2001 von Livak und Schmittgen entwickelten $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Dabei wurde zunächst zu jedem Probenduplikat ein Mittelwert gebildet, wobei bei stark divergierenden Duplikaten mit einer Differenz über eine C_T -Weite das bei Gesamtbetrachtung plausiblere gewählt wurde. Anschließend wurde eine Differenz des C_T -Mittelwerts des Zielgens (miR-221) und des C_T -Mittelwerts des Kalibratorgens (RNU44) einer Probe gebildet (ΔC_T). Die ΔC_T -Werte aller Proben wurden durch Subtraktion des ΔC_T -Werts einer Kontrolle (SKBR3 +miR-221 0 Gy) normalisiert, um relative Genexpression darstellen zu können. Um die log-skalierten $\Delta\Delta C_T$ -Werte in lineare Fold-Change in der Genexpression zu übersetzen, erfolgte eine Potenzierung mit $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Die so berechneten drei biologischen Replikate wurden mit Mittelwert und Standardabweichung graphisch dargestellt.

3.3 Klonogener Überlebenstest

Der klonogene Zellüberlebenstest ist eine 1956 entwickelte Methode, um *in vitro* Teilungsfähigkeit und Überleben von Zellen nach Einwirkung einer zellschädigenden Noxe wie beispielsweise Bestrahlung zu testen. Das klonogene Überleben einer Zelle

Methoden

wird durch ihre Fähigkeit, eine Kolonie von mind. 50 Zellen zu bilden, definiert (Puck, Morkovin, Marcus, & Cieciora, 1957).

Die Zellen wurden passagiert, trypsiniert und gezählt wie in 3.1.3 beschrieben. Anschließend wurden sie in 12-Well-Platten ausgesät, wobei mit steigender Strahlendosis, die die Zellen 24 h nach Aussaat erhalten sollten, höhere Zellzahlen pro Well ausgesät wurden, um dem erwarteten Zelltod entgegenzuwirken (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7. Ausgesäte Zellzahl pro Well in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis. Jede Behandlungseinheit wurde in 12 technischen Replikaten ausgesät.

Dosis [Gy]	0	1	2	4	6	8
Zellzahl/Well	200	200	400	800	1600	3200

Nach Bestrahlung mit den in Tabelle 7 aufgeführten Dosen wurden die Zellen bei 37°C inkubiert, bis sich Kolonien von über 50 Zellen gebildet hatten, d.h. nach etwa 6 Zellteilungen. Das dauerte aufgrund der unterschiedlichen Verdopplungszeiten 10 Tage bei MDA-MB-231 und 20 Tage bei SKBR3. Anschließend wurden die Wellplatten aus dem Inkubator entnommen, Medium abgesaugt und zwei Waschschrte mit PBS durchgeführt. Um die gewachsenen Kolonien zu fixieren, wurde 100 %-Ethanol in die Wells pipettiert, das dann vor dem Abpipettieren mindestens 30 min auf den Kolonien verblieb. Zur Färbung wurde 0,5 %-Kristallviolett mit ebenfalls mindestens 30 min Einwirkzeit verwendet. Nach Entfernung des Kristallvioletts von den Wellplatten wurden diese mit Leitungswasser gespült, wobei ein direkter Kontakt der Kolonien mit dem Wasserstrahl vermieden wurde. Die Wellplatten wurden nun über Nacht getrocknet und darauffolgend die Kolonien eines Wells unter dem Mikroskop ausgezählt, um eine Messmaske für den Bioreader® 3000 (BioSys, Karben, Deutschland) erstellen zu können. Mithilfe dieser Einstellungen konnte der Bioreader® die Kolonien der übrigen Wells auszählen, was eine Bestimmung der Plattierungseffizienz (PE) der und Überlebensfraktion (SF) für jede Strahlendosis ermöglichte (siehe Formel 2 und Formel 3).

Methoden

$$PE = \frac{\text{Kolonienanzahl}}{\text{ausgesäte Zellzahl}}$$

Formel 2. Berechnung der PE.

$$SF = \frac{\text{PE der bestrahlten Probe}}{\text{PE der unbestrahlten Probe}}$$

Formel 3. Berechnung der SF der einzelnen Strahlendosen.

Durch die Berechnung der Überlebensfraktionen konnten mithilfe eines linear-quadratischen Regressionsmodells (LQ) Überlebenskurven für jede Zelllinie angenähert werden. Dieses Modell bediente sich der aus mindestens drei biologischen Replikaten berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Überlebensfraktionen und bestimmte mit der aufgeführten Formel 4 die Parameter α und β (Franken, Rodermond, Stap, Haveman, & van Bree, 2006).

$$SF(D) = SF(0) \times \exp -(\alpha D + \beta D^2)$$

SF(D) = Überlebensfraktion nach Bestrahlung

SF(0) = Überlebensfraktion ohne Bestrahlung

D = Dosis

Formel 4. Linear-quadratische Annäherung der dosisabhängigen Überlebensfraktionen SF(D).

Das LQ-Modell beruht auf der Hypothese, dass reproduktiver Zelltod entweder durch ein einzelnes letales Ereignis, repräsentiert durch die lineare Komponente α [Gy^{-1}], oder durch die Akkumulation mehrerer subletaler Ereignisse, repräsentiert durch die quadratische Komponente β [Gy^{-2}], verursacht wird (Chadwick & Leenhouts, 1973). α und β können als Indikatoren für die Radiosensitivität der jeweiligen Zelllinie verwendet werden und zeigen mit größeren Werten ein größeres Ansprechen auf Bestrahlung an.

Das aus den beiden Parametern gebildete Verhältnis α/β [Gy] gibt die Strahlendosis an, bei der α und β einen äquivalenten Effekt auf die Radiosensitivität haben. Bei niedrigeren Dosen überwiegt α , bei höheren β . Die Überlebenskurven von Zellen mit hoher α/β -Ratio verlaufen eher linear, während sie mit niedriger Ratio eher quadratisch verlaufen. Zudem profitieren Gewebe mit hoher α/β -Ratio in geringerem

Maße von einer Fraktionierung in kleinere Dosen als Gewebe mit niedrigerem α/β (Franken et al., 2013).

3.4 Zellzahlbestimmung

Zellzahlbestimmungen wurden zu bestimmten Zeitpunkten durchgeführt, um die einzelnen Zelllinien hinsichtlich ihrer Proliferation vergleichen zu können und einen Einfluss von miR-221 und Bestrahlung auf das Zellwachstum zu analysieren. Dabei wurden die Zellen wie in 3.1.4 beschrieben ausgesät, geerntet und mit dem Z1-Coulter-Counter gezählt.

Zum Aufstellen einer Wachstumskurve wurden zunächst innerhalb eines biologischen Replikats die 24, 48, und 72 h-Werte auf den 0 h-Wert normalisiert. Anschließend wurden Mittelwert und Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten gebildet.

Für die Bestimmung der Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie wurden die zu den Zeitpunkten 24 h (Zeitpunkt A) und 72 h (Zeitpunkt B) nach Bestrahlung ermittelten Zellzahlen der unbestrahlten Zellen in die beschriebene Formel 5 eingesetzt. Die Zeitpunkte wurden in zeitlichem Abstand vom 0 h-Wert und größtmöglichen Zeitintervall zwischen A und B gewählt, um das Zellwachstum in seiner exponentiellen Phase festzuhalten, welches eine Voraussetzung für die Verwendung der Formel zur Verdopplungszeit darstellt.

$$\text{Verdopplungszeit} = \frac{(\text{Zeitpunkt B} - \text{Zeitpunkt A}) \times \log(2)}{\log(\text{Zellzahl B}) - \log(\text{Zellzahl A})}$$

Formel 5. Berechnung der Verdopplungszeit mittels zu zwei verschiedenen Zeitpunkten A und B gemessener Zellzahlen A und B.

3.5 Migrationsassay

Migrationsversuche wurden zur Evaluierung des Effekts von miR-221 und Bestrahlung auf die Zellmigration verwendet.

Die Migration wurde mithilfe eines Wundheilungstests analysiert. Der durchgeführte Test ähnelt dem in-vitro-Scratch-Assay, bei dem die Zeit, den Zellen bis zur Schließung des Spaltes (Scratch) benötigen, als Maß für die Migration verwendet wird. Die Migrationsrate wird dabei durch die Fläche des Spalts bestimmt, die die Zellen zu

Methoden

bestimmten Zeitpunkten geschlossen haben (Liang, Park, & Guan, 2007). Der Unterschied zum Scratch-Assay bestand beim verwendeten Test darin, dass der Spalt nicht durch den Kratzer (Scratch) zustande kam, sondern mithilfe von Silicon-Einsätzen (ibidi®, ibidi GmbH, Gräfeling, Deutschland) einer bestimmten Spaltbreite (500 µm bei SKBR3, 2 cm bei MDA-MB-231 aufgrund des unterschiedlichen Migrationsverhaltens). Die Einsätze ermöglichten im Gegensatz zum Scratch-Assay eine feste Spaltbreite und damit eine feste Migrationsfläche, was die Reproduzierbarkeit des Assays erleichterte.

Den Herstellerangaben folgend wurden 2-Well-Einsätze mit einem 500 µm-Spalt in 12-Well-Platten (für SKBR3) eingesetzt, 12-Well-Einsätze mit einem 2 mm-Spalt in Petrischalen (für MDA-MB-231). Dies erfolgte mit einer in Ethanol desinfizierten Pinzette. Da die Einsätze zuvor ebenfalls in Ethanol desinfiziert worden waren, trug dessen Verdunstung zur Bodenhaftung bei. Anschließend erfolgte die Aussaat in die Wells, wobei bei SKBR3 60.000 Zellen pro Well, bei MDA-MB-231 40.000 Zellen pro Wells ausgesät wurden. Bei diesen experimentell ermittelten Werten entstand ein dicht bewachsener und einheitlicher Zellrasen, der einen geeigneten Startpunkt für das Migrations-Assay darstellte. Jede der vier Zelllinien wurde dabei in 5 (für SKBR3) bzw. 3 (für MDA-MB-231) technischen Replikaten für jede Bestrahlungsdosis (0, 2, 4, 8 Gy) ausgesät. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen bestrahlt (3.1.5) und im unmittelbaren Anschluss die Einsätze entfernt. Der damit sichtbare zellfreie Spalt wurde mithilfe einer sterilen Nadel am Rand markiert, um bessere Vergleichbarkeit der aufzunehmenden Bilder zu gewährleisten. Diese wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Keyence® BZ 9000 Microscope, Frankfurt, Deutschland) aufgenommen, wobei die Messzeitpunkte bei SKBR3 0, 24, 48 und 72 h nach Entfernung der Grids betragen und bei MDA-MB-231 0, 16, 24, 40 und 48 h. Die zelllinienspezifischen Messzeitpunkte wurden aufgrund des unterschiedlichen Proliferationsverhaltens der Zellen gewählt (Mutschelknaus et al., 2017).

Zur Auswertung des Bildmaterials wurden aufgrund von Schwankungen der Hintergrundhelligkeit wegen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität für SKBR3 und MDA-MB-231 unterschiedliche Methoden verwendet.

Methoden

Bei den Bildern von SKBR3 erfolgte zunächst mithilfe von Adobe® Photoshop® CS5 (Adobe Systems) eine Markierung der mit grün fluoreszierenden Zellen bedeckten Fläche im 0 h-Bild. Diese Fläche wurde von den Bildern späterer Zeitpunkte subtrahiert, worauf das Migrationspotenzial der bearbeiteten Bilder über das Programm Image Colour Analyser (entwickelt von Markus Vetter) quantifiziert werden konnte. Durch dieses Programm konnte jedem Pixel im Bild ein Grün-Wert einer Intensität zwischen 0 und 255 im RGB-Farbraum zugeordnet werden. Die mit Zellen bedeckte Fläche wurde sodann durch die Anzahl der Pixel angenähert, deren Grün-Wert den Schwellenwert einer Intensität von 50 überschritt (Mutschelknaus et al., 2017).

Das bestehende Auswertungstool bestimmt Zellen aus den aufgenommenen Bildern anhand eines Grenzwerts, ab dem grünes Pixel als Zelle zählt. Bei den Migrationsexperimenten mit der Zelllinie MDA-MB-231 konnte diese Auswertungsmethode jedoch nicht verwendet werden, da die Fluoreszenzhelligkeit besonders bei den anti-miR-221 weniger stark war, sodass im Vergleich dazu die Hintergrundhelligkeit der Fluoreszenzkamera bereits ähnlich hohe Helligkeitswerte wie die Zellen aufwies. Demnach war ein einfacher Helligkeitsgrenzwert nicht geeignet, um Zellen und Hintergrund zuverlässig zu unterscheiden.

Durch die Hilfe von Christoph Herb konnte ich ein Python-basiertes Skript benutzen (Programmcode auf Nachfrage erhältlich), welches Pixel nicht mehr anhand ihres absoluten Helligkeitswertes als Zelle oder Hintergrund klassifiziert, sondern mittels eines Verfahrens, das die Zellen in Relation zu ihrer Umgebung setzt. Die Methode ist genauer im Anhang beschrieben (7.2). Mithilfe dieser Methode wurden die grünen Zellen erkannt und als Pixel gezählt. In Abbildung 7 ist ein Auswertungsbeispiel (MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 0 Gy 0 und 48 h nach Bestrahlung) zur Veranschaulichung dargestellt.

Dabei wurden zunächst bei jedem 0 h-Bild des jeweiligen technischen Replikats mithilfe des Programms die grünen Zellen als Zellrasen erkannt (in Abbildung 7 in der rechten Spalte gelb gefärbt). Alle in der Abbildung gelb gefärbten Pixel wurden gezählt. Bei jedem weiteren Zeitschritt (16, 24, 40 und 48 h) wurden zunächst analog zum 0 h-Bild alle vom Programm erkannten Zellen als Pixel gezählt. Um auf den

Methoden

jeweiligen 0 h-Wert zu normalisieren, wurde anschließend der Zellrasen, der beim zugehörigen 0 h-Bild erkannt wurde (in Abbildung 7 in der jeweils rechten oberen Spalte bei 0 h), wieder subtrahiert (in Abbildung 7 in der jeweils rechten unteren Spalte bei 48 h). Auf diese Weise wurden zu späteren Zeitpunkten nur die Zellen gezählt, die seit dem 0 h-Messpunkt migriert waren.

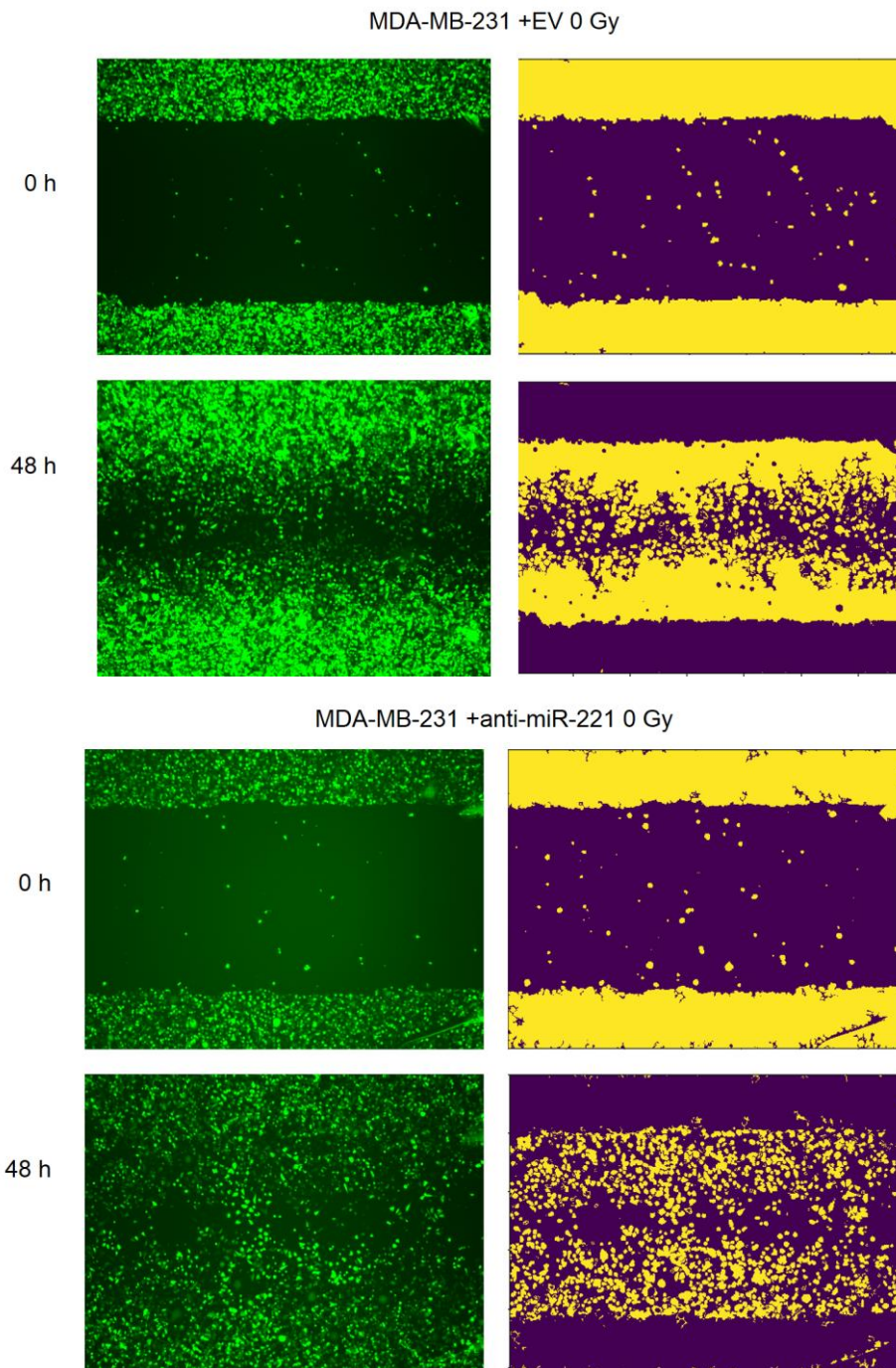


Abbildung 7. Demonstration der Auswertungsmethode. In der linken Spalte befinden sich die Originalbilder, in der rechten Spalte sind die Pixel, die von dem Programm als Zellen erkannt und gezählt wurden, gelb markiert. Die zum Zeitpunkt 0 h gemessenen Pixel wurden in den danach

Methoden

folgenden Zeitpunkten - im Bildbeispiel 48 h - automatisch abgezogen (daher ist der bei 0 h gelb markierte Zellrasen bei 48 h schwarz). So konnten auf den jeweiligen 0 h-Wert normalisiert für 16, 24, 40 und 48 h die Zunahme der Pixelzahl und somit die Zunahme der Migration über Zeit verfolgt werden.

3.6 Quantifizierung des uPAR mittels Western Blot

Um einen möglichen molekularen Erklärungsansatz zur Migration unter miR-221 zu verfolgen, wurde die Expression des Proteins uPAR verglichen. Dieser Versuchsansatz wurde lediglich an der Zelllinie SKBR3 durchgeführt.

Zur Proteinquantifizierung wurde die Western-Blot-Technik verwendet, bei der spezifische Antikörper an ein membranfixiertes Protein binden. Dieser Antikörper-Protein-Komplex kann mithilfe einer Chemilumineszenz-Lösung visualisiert werden. Anhand der Intensität des Lumineszenz-Signals kann das gesuchte Protein quantifiziert werden.

Als erster Schritt erfolgte eine Proteingewinnung aus den in 3.1.6 eingefrorenen SKBR3-Zellpellets. Dabei wurden die Pellets zunächst mit Tissue Protein in Extract Reagent (T-PER)-Lysepuffer lysiert, wobei in 10 ml Lysepuffer je ein Protease- und Phosphatase-Inhibitor in Tablettenform gelöst war. Pro Zellpellet wurde abhängig von der Pelletgröße etwa 30-80 µl Lysepuffer benötigt. Im Anschluss wurden die Zellen eine Stunde auf Eis gelagert, bevor die nun lysierten Zellen 20 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert wurden. Der die zu quantifizierenden Proteine enthaltende Überstand wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt, welche bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren wurden.

Um die auf die Membran aufzutragende Proteine relativ quantifizieren und vergleichen zu können, wurde die Konzentration des Gesamtproteins der einzelnen Proben anhand eines BCA-Assays (Pierce™ BCA™ Protein-Assay, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) bestimmt. Dieser Assay ermöglicht eine spektrometrische Bestimmung der Proteinkonzentration wobei durch die BCA-Reagenz jeder Proteinkonzentration eine bestimmte Absorptionsintensität zugeordnet werden kann. Dabei wurden Aliquots der Proben, die 1:25 mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt waren, sowie in Tabelle 8 aufgeführte BCA-Standard-Lösungen mit bekannter Proteinkonzentration in Duplikaten in eine Nunclon® 96-Well-Platte pipettiert. Diese wurden jeweils mit der gleichen Menge an BCA-Reagenz versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Methoden

Tabelle 8. Konzentrationen der für die Standardkurve verwendeten BCA-Standards.

BCA-Standard	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	350	250	175	100	75	50	25	5	0

Anschließend wurde spektrometisch die Absorption gemessen. Um mithilfe dieses Assays die unbekannte Proteinkonzentration der Proben zu ermitteln, wurde eine Standardkurve geplottet, welche die bekannten BCA-Konzentrationen gegen die Mittelwerte ihrer jeweiligen Absorptionswerte auftrug und aus der eine lineare Gleichung abgeleitet wurde. Über die gemessene Absorption der Proben konnte nun unter Verwendung dieser Gleichung ihre Konzentration berechnet werden.

Der nächste Schritt beinhaltete eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine der jeweiligen Proben hinsichtlich ihrer Größe und Ladung, um sie im Anschluss spezifisch detektieren zu können. Zu diesem Zweck wurde ein 12 %-Polyacrylamid-Trenngel gegossen, dessen Zusammensetzung in Tabelle 9 genauer beschrieben ist. Sobald Ammoniumpersulphat (APS) und Tetramethylethylenediamine (TEMED) hinzugefügt worden waren, welche eine Polymerisation des Gels auslösten, wurden 4 ml des Gels in eine vorbereitete Kammer pipettiert und aufgefüllt mit Isopropanol mindestens eine Stunde gelagert. Nach vollständiger Polymerisation wurde Isopropanol mit H_2O ausgewaschen und ein in Tabelle 9 beschriebenes Sammelgel bis an den Kammerrand pipettiert. Um Geltaschen für die aufzutragenden Proben zu schaffen, wurde ein 10-zähliger-Kamm auf die Kammer gesetzt.

Während des Polymerisierungsprozesses des Sammelgels wurden die Proben für die Elektrophorese vorbereitet. Hierzu wurden jeweils 20 μl -Lösungen aus Probenvolumina, die 10 μg Protein enthielten, 5 μl 4xLaemmli-Puffer und H_2O zum Auffüllen auf das gewünschte Endvolumen hergestellt. Diese Lösungen wurden nach Vortexen und kurzem Zentrifugieren 5 min in einem 95°C-Heizblock erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und in die Geltaschen des polymerisierten Sammelgels pipettiert, wobei in die erste Geltasche der Marker Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (BioRad,

Methoden

Hercules, USA) pipettiert wurde, um später entstehende Banden identifizieren zu können. Nicht mit Proben oder Marker besetzte Geltaschen wurden mit 1xLaemmli aufgefüllt, um eine gleichmäßige Elektrophorese zu gewährleisten. Die Reihenfolge der auf ein Gel aufgetragenen Proben ist durch Tabelle 10 wiedergegeben. Dabei erfolgte die Platzierung der unbestrahlten Kontrolle EV in die weniger komplikationsanfälligen Mitteltaschen.

Tabelle 9. Chemische Zusammensetzung der für die Gelelektrophorese verwendeten Trenn- und Sammelgele.

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	2 ml	0,6 ml
H ₂ O	1,05 ml	1,4 ml
Tris-Puffer pH 8,8	1,9 ml	
Tris-Puffer pH 6,8		0,25 ml
SDS	0,05 ml	0,02 ml
APS	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,005 ml	0,002 ml

Tabelle 10. Darstellung der Reihenfolge der Proben in den Geltaschen einer Laufkammer. Dieser Durchlauf erfolgte für die 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung geernteten Proben.

Marker	SKBR3 +miR- 221 2 Gy	SKBR3 +EV 2 Gy	SKBR3 +miR- 221 0 Gy	SKBR3 +EV 0 Gy	SKBR3 +EV 4 Gy	SKBR3 +miR- 221 4 Gy	SKBR3 +EV 8 Gy	SKBR3 +miR- 221 8 Gy	1xLaemmli

Methoden

Durch das Anlegen einer Spannung von 180 V über 1,5 h wurden die Proteine über das Gel anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Nach der Gel-Elektrophorese wurde ein Tank-Blot durchgeführt, wobei die auf dem Trenngel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen wurden. Dazu wurde eine Kassette, die in feststehender Reihenfolge aus Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrocellulosemembran, Filterpapier und Schwamm aufgebaut war, in eine mit Towbin-Puffer gefüllte Laufkammer eingesetzt. Alle Bestandteile waren zuvor bereits in Towbin-Puffer equilibriert worden. Für den Elektroblot von Gel auf Membran wurde wiederum Spannung (100 Volt bei 4°C für 2 h oder 18 Volt bei 4°C über Nacht) an die Laufkammer angelegt. Um den Erfolg des Blots zu testen, wurden die Membranen mit Ponceaurot gefärbt, was eine Visualisierung der Banden ermöglichte.

Um nicht-spezifischen Membranbindungen vorzubeugen, wurde die Membran bei 4°C über Nacht mit Block-Lösung (5 % Milch oder Roti®-Block) geblockt. Anschließend wurde der Antikörper gegen das zu detektierende Protein (uPAR oder Actin) in Block-Lösung gelöst und mit der Membran bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 3 Mal für je 10 min in 1xTBST gewaschen, bevor sie für 1 h bei Raumtemperatur mit einem zweiten, in 5 % Milch gelöstem Antikörper inkubiert wurde. Dieser konnte an den ersten Antikörper spezifisch binden und besaß gleichzeitig eine Bindungsstelle für die zur Detektion notwendige Chemilumineszenz-Lösung. Die verwendeten Antikörper und Block-Lösungen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Nach der Inkubation wurde die Membran erneut 3 Mal für 10 min in 1xTBST gewaschen und in der Chemilumineszenz generierenden Lösung ECL™ Prime Western Blotting System Detection Reagent (GE Healthcare, München, Deutschland) für 1-5 min inkubiert, bevor das Lumineszenz-Signal mithilfe des AlphaInnotech® (UV Transilluminator und Gel-Dokumentationssystem, AlphaInnotech®, Kasendorf, Deutschland) als Bildinformation aufgenommen wurde.

Methoden

Tabelle 11. Verwendete Antikörper und zugehörige Block-Lösungen.

	Antikörper (AK)	Ursprung	Block-Lösung (BL)	AK/BL
Erster Antikörper	anti-uPAR	mouse	5 % Milch	1:500
	anti-actin	goat	Roti®-Block	1:1000
Zweiter Antikörper	anti-mouse	goat	5 % Milch	1:2000
	anti-goat	donkey	5 % Milch	1:40.000

Zur Detektion weiterer Proteine auf der Membran konnten die gebundenen Antikörper durch einen für 10 min aufgetragenen Stripping-Puffer entfernt werden. Nach anschließenden Waschschritten mit 1xTBST konnten die zuvor beschriebenen Schritte (Blocken, Antikörperbindung sowie Bandendetektion) mit einem anderen Antikörper durchgeführt werden.

Die Auswertung des Bildmaterials erfolgte durch die Messung der Bandenintensität mit Image J. Nach Subtraktion der Hintergrundintensität wurde zunächst auf die Intensität der internen Kontrolle Actin und anschließend auf die unbestrahlte Kontrolle des EV normalisiert, um die uPAR-Expression der auf einer Membran aufgetragenen Proben relativ vergleichen zu können. Statistische Tests wurden allerdings zu den lediglich auf Actin normalisierten Proben durchgeführt, um die als Voraussetzung notwendige Varianzhomogenität (vgl. 3.7) zu gewährleisten.

3.7 Statistische Tests

3.7.1 Lineare Regressionsanalyse und F-Test

Um die klonogenen Zellüberlebenskurven zweier verschiedener Zelllinien (4.2) statistisch zu vergleichen, wurde ein ANOVA F-Test in Graph Pad Prism® 6.05 durchgeführt. Dieser erstellte für die Beschreibung des Zellüberlebens einen einzigen Fit für beide Zelllinien (Nullhypothese) und verglich diesen mit zwei verschiedenen auf die jeweilige Zelllinie passenden Fits (Alternativhypothese). Die Überlebenskurven der

Methoden

beiden Zelllinien wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass die Restdatenstreuung zwischen den beiden Hypothesen zufällig entstanden war, (p-Wert) unter 0,05 lag. Zum Vergleich der Zelllinienunterschiede für einzelne Strahlendosen wurde ein Post-Hoc-Test mit Dunnett-Korrektur durchgeführt mithilfe von Graph Pad Prism® 6.05.

3.7.2 Mehrfaktorielle Varianzanalyse

Statistische Tests wurden jeweils getrennt für 24, 48, und 72 h-Werte mithilfe von Graph Pad Prism® 6.05 durchgeführt. Bei allen Tests war ein 95 %-Konfidenzintervall mit einem Signifikanzniveau von 5 % vorausgesetzt. Zur Testung wurden für die Versuche zur qRT-PCR (4.1), zum klonogenen Überleben (4.2), zur Zellzahlbestimmung (4.3), zur Migration (4.4) und zum Western Blot (4.6) die Mittelwerte der drei biologischen Replikate verwendet.

Alle grafischen Darstellungen im Ergebnisteil enthalten Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten (n=3) sowie der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). Dieser wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{SEM} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Formel 6. Berechnung der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

Die Standardabweichung S wurde wie folgt berechnet:

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

y_i = Messwert

\bar{y} = Mittelwert aller Messwerte y_i

n = Anzahl der Messwerte

Formel 7. Berechnung der Standardabweichung S.

Durch eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurde ermittelt, ob die Faktoren miR-221-Expression und Bestrahlung (unabhängige Variablen) einen signifikanten Einfluss auf die Messgröße (abhängige Variable) hatten und ob eine signifikante

Methoden

Interaktion der Faktoren zu beobachten war. Die Messgröße war abhängig vom jeweiligen Versuch die miR-221-Expression (4.1), Überlebensfraktion (4.2), Zellzahl (4.3), Migration (4.4) oder uPAR-Expression (4.6).

Um einzelne Behandlungsgruppen zu vergleichen, wurden Post-Hoc-Tests, welche im Gegensatz zum t-Test eine Kumulation des α -Fehlers vermeiden, durchgeführt.

Dabei wurde mithilfe der Šidák-Korrektur die miR-221 überexprimierende (SKBR3) bzw. niederregulierte (MDA-MB-231) Gruppe mit der Kontrollgruppe EV (SKBR3 und MDA-MB-231) für jede einzelne Bestrahlungsdosis auf signifikante Unterschiede getestet.

Um den Einfluss der Bestrahlungsdosis genauer zu evaluieren, wurden innerhalb jeder Gruppe (miR-221-Expression hoch, miR-221-Expression niedrig) Unterschiede zwischen der mit einer bestimmten Dosis bestrahlten Gruppe (2, 4, 8 Gy) und der unbestrahlten Kontrolle (0 Gy) ermittelt. Dafür wurde die Dunnett-Korrektur verwendet.

3.7.3 T-Test

Für die Auswertung der quantitativen RT-PCR (4.1) bei den nicht bestrahlten SKBR3 (SKBR3 +miR-221 und SKBR3 +EV) und MDA-MB-231 (MDA-MB-231 +anti-miR-221 und MDA-MB-231 +EV) wurde ein zweiseitiger T-Test durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Konstante miR-221-Expressionslevel in SKBR3 bei Bestrahlung

Um zu überprüfen, ob SKBR3 +miR-221 im Vergleich zu SKBR3 +EV tatsächlich miR-221 überexprimieren und ob MDA-MB-231 +anti-miR-221 im Vergleich zu MDA-MB-231 +EV weniger miR-221 exprimieren, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurde bei den SKBR3 überprüft, ob Bestrahlung die miR-221-Expression beeinflusst.

Dabei wurde bei den SKBR3 +miR-221 signifikant höhere miR-221-Expression im Vergleich zu den SKBR3 +EV, bei den MDA-MB-231 +anti-miR-221 signifikant niedrigere miR-221-Expression im Vergleich zu den MDA-MB-231 +EV gezeigt. Bei den SKBR3 zeigte Bestrahlung weder bei den SKBR3 +miR-221 noch bei den SKBR3 +EV einen signifikanten Effekt auf die miR-221-Expression.

Bei den SKBR3 wurde hierzu die miR-221-Expression der SKBR3 +miR-221 relativ zur miR-221-Expression der Leervektorkontrolle SKBR3 +EV analysiert. Die Proben entstammen den wie in 3.1.6 beschrieben gewonnenen Zellpellets des Zeitpunkts 72 h nach Bestrahlung (SKBR3). Die miR-221-Expression wurde zunächst bei 0 Gy Strahlendosis verglichen (Abbildung 8).

Abbildung 8 zeigt eine im Mittel $171,1 \pm 20,3$ erhöhte miR-221-Expression der SKBR3 +miR-221 im Vergleich zur Kontrolle SKBR3 +EV 72 h nach Bestrahlung mit 0 Gy. Im beidseitigen T-Test ist die relative miR-221-Expression bei SKBR3 +miR-221 signifikant höher als bei den SKBR3 +EV ($p=0.01388817$).

Somit ist bei SKBR3 eine statistisch signifikant höhere miR-221-Expression bei den mit einem lentiviralen Vektor für miR-221-Überexpression transduzierten SKBR3 +miR-221 im Vergleich zu den mit einem Leervektor transduzierten SKBR3 +EV zu beobachten.

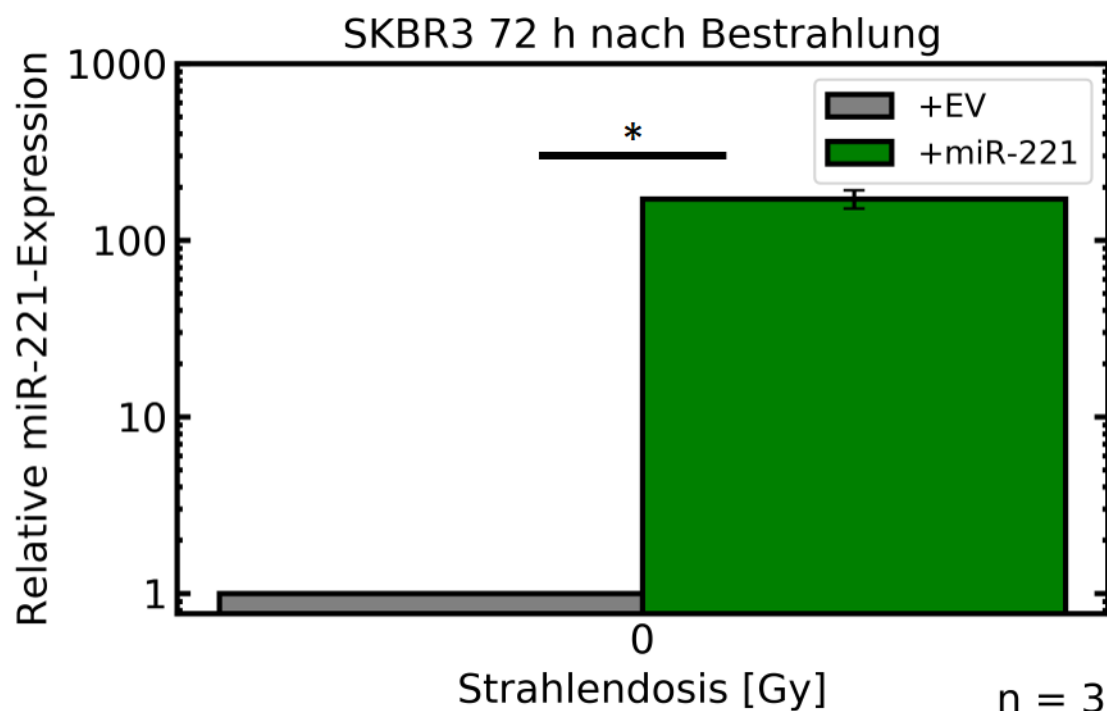


Abbildung 8. Relative miR-221-Expression der SKBR3 +miR-221 im Vergleich zur Leervektorkontrolle SKBR3 +EV 72 h nach Bestrahlung mit 0 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM (n=3) der jeweiligen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte mit RNU44 als Kalibrator und SKBR3 +EV 0 Gy als Normalisierungskontrolle.

Bei den MDA-MB-231 wurde die miR-221-Expression der MDA-MB-231 +anti-miR-221 relativ zur miR-221-Expression der Leervektorkontrolle MDA-MB-231 +EV bestimmt. Die Proben entstammen den wie in 3.1.6 beschrieben gewonnenen Zellpellets des Zeitpunktes 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy (MDA-MB-231).

Die Abbildung 9 zeigt bei miR-221-Knock-down eine von $100,0 \pm 0,0$ % bei MDA-MB-231 +EV auf $65,7 \pm 0,6$ % bei MDA-MB-231 +anti-miR-221 reduzierte relative miR-221-Expression. Im beidseitigen T-Test ist die relative miR-221-Expression bei MDA-MB-231 +anti-miR-221 im Vergleich zu MDA-MB-231 +EV ($p = 0.0003$) statistisch signifikant niedriger.

Bei MDA-MB-231 ist bei den mit einem lentiviralen Vektor für miR-221-Knock-down transduzierten MDA-MB-231 +anti-miR-221 im Vergleich zu den mit einem Leervektor transduzierten MDA-MB-231 +EV eine statistisch signifikante niedrigere miR-221-Expression zu beobachten.

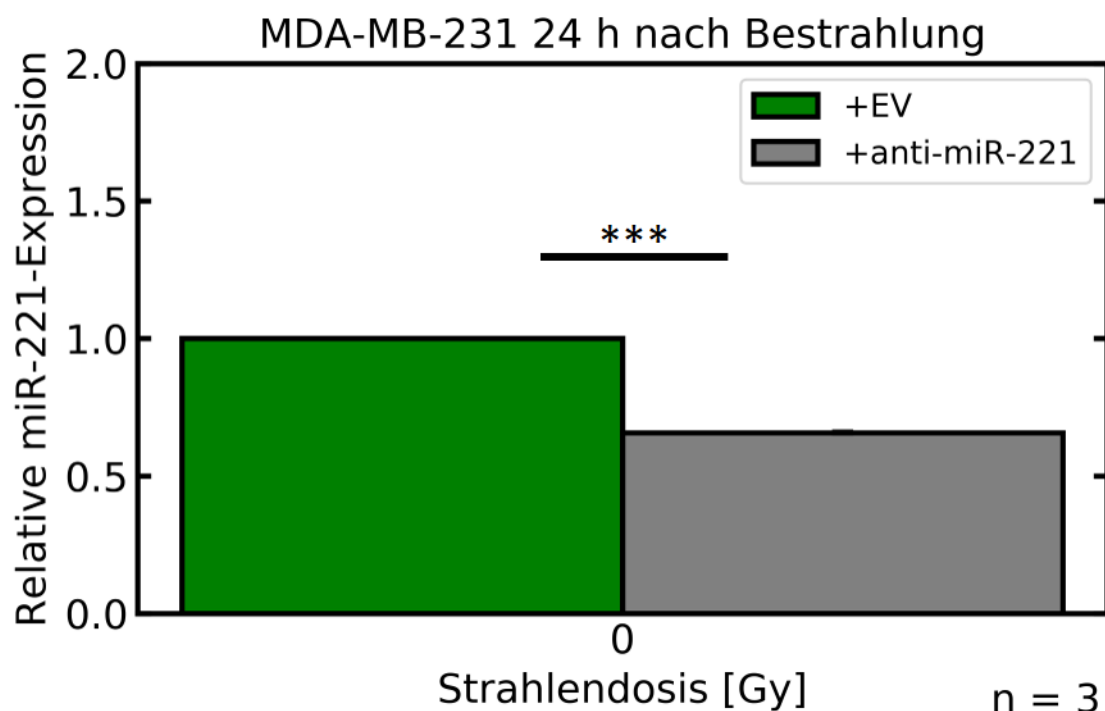


Abbildung 9. Relative miR-221-Expression der MDA-MB-231 +anti-miR-221 im Vergleich zur Leervektorkontrolle MDA-MB-231 +EV 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM (n=3) der jeweiligen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte mit RNU44 als Kalibrator und MDA-MB-231 +EV 0 Gy als Normalisierungskontrolle.

Zur Analyse eines potenziellen Effekts von Bestrahlung auf die miR-221-Expression wurde diese mithilfe einer qRT-PCR in SKBR3, die mit einem Leervektor transduziert waren, im Gegensatz zu SKBR3, die mit einem miR-221-Überexpression generierenden Vektor transduziert waren, in Abhängigkeit der Strahlendosis (0, 2, 4 und 8 Gy) quantifiziert. Dargestellt wurde die miR-221-Expression 24 h (A) und 72 h (B) nach Bestrahlung als $2^{-\Delta\Delta CT}$ jeder Probe, was die relative miR-221-Expression im Vergleich zu SKBR3 +miR-221 in unbestrahlter Form ausdrückt. (Abbildung 10)

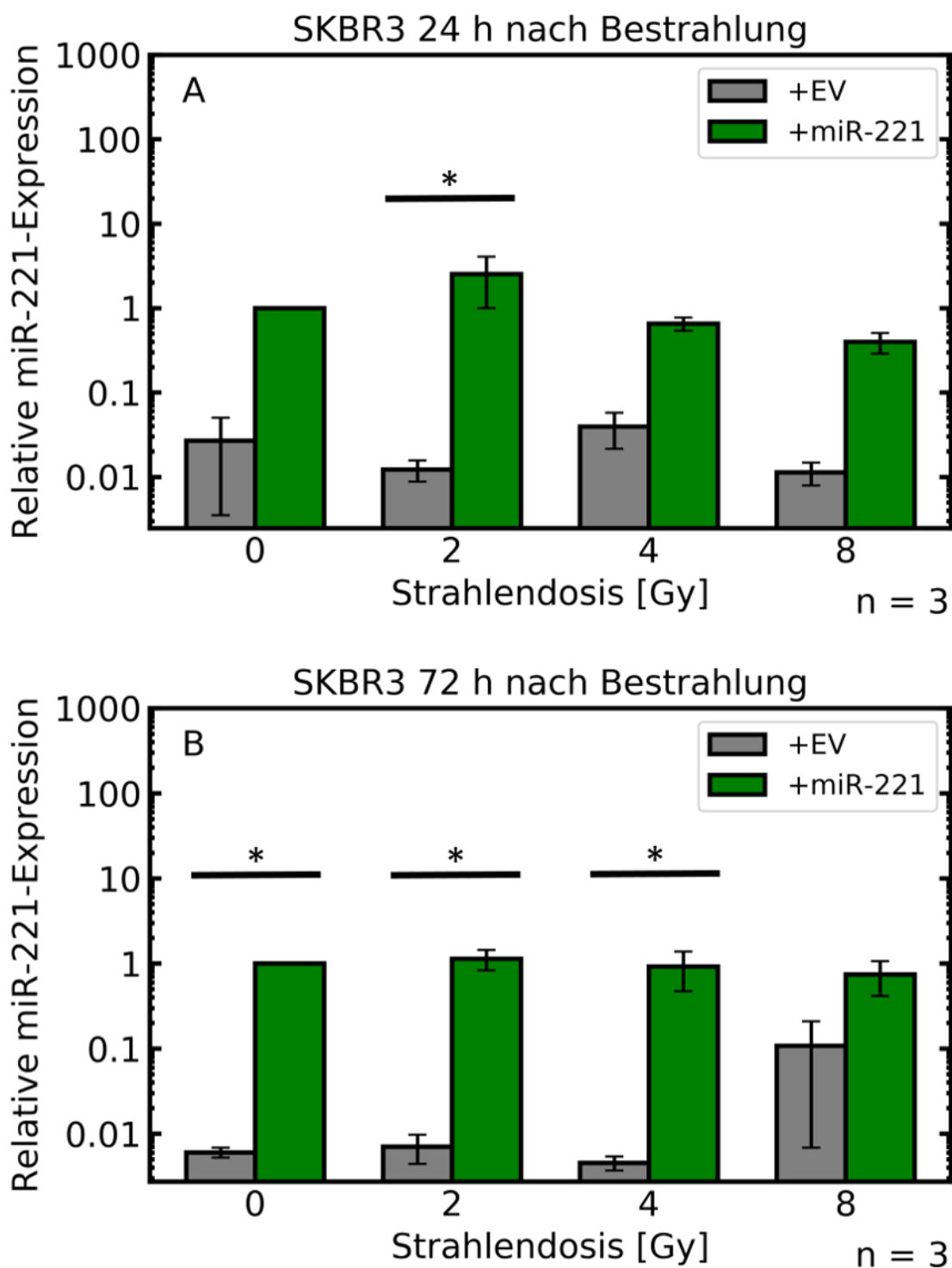


Abbildung 10. Relative miR-221-Expression von SKBR3 mit miR-221 überexprimierendem Vektor (grün schraffiert) und SKBR3 mit Leervektor (grau) 24 h (A) und 72 h (B) nach Bestrahlung (0, 2, 4, 8 Gy). Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM (n=3) der jeweiligen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte mit RNU44 als Kalibrator SKBR3 +miR-221 0 Gy als Normalisierungskontrolle.

Eine Betrachtung der miR-221-Expression der SKBR3 +miR-221 bei Bestrahlung mit 8 Gy zeigt einen relativen mittleren Abfall der Expression auf etwa $39,8 \pm 10,9 \%$ (24 h)

Ergebnisse

bzw. $74,0 \pm 32,4$ % (72 h) der unbestrahlten Probe SKBR3 +miR-221 mit $100,0 \pm 0,0$ %. Die relative miR-221-Expression SKBR3 +EV – normalisiert auf SKBR3 +miR-221 0 Gy – betrug 24 h nach Bestrahlung mit 8 Gy $1,1 \pm 0,3$ % im Vergleich zu $2,7 \pm 2,3$ % bei 0 Gy und 72 h nach Bestrahlung mit 8 Gy $10,8 \pm 10,1$ % im Vergleich zu $0,6 \pm 0,1$ % bei 0 Gy.

Somit sind nach Bestrahlung keine eindeutigen Veränderungen der miR-221-Expression weder bei den SKBR3 +miR-221 noch bei den SKBR3 +EV im Vergleich zu keiner Bestrahlung erkennbar. Es fällt auf, dass die relative miR-221-Expression bei den SKBR3 +EV zu jeder Bestrahlungsdosis im Vergleich zu den SKBR3 +miR-221 deutlich niedriger ist.

Eine statistische Analyse der miR-221-Expression mit einer Zwei-Faktor-ANOVA ergab für 24 h ($p=0.0100$) und 72 h ($p<0.0001$) einen signifikanten Gesamtunterschied zwischen SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221. Für den Faktor Bestrahlung konnte jedoch kein signifikanter Einfluss auf die miR-221-Expression bestimmt werden. Post-Hoc-Analysen mit Šidák-Korrektur konnten bei beiden Zeitpunkten für einzelne Strahlendosen signifikante Unterschiede in der miR-221-Expression zwischen SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 feststellen, wobei sich die Unterschiede bei 72 h ($p=0.0274$ für 0 Gy, $p=0.0114$ für 2 Gy, $p=0.0444$ für 4 Gy) deutlicher manifestierten als bei 24 h ($p=0.0191$ für 2 Gy). Dies bestätigte zum einen eine tatsächliche Überexpression in den SKBR3 +miR-221 sowie ein Bestehen dieser Überexpression bei Bestrahlung.

Da weder die ANOVA für Bestrahlung als gesamter Faktor noch Post-Hoc-Tests mit Dunnett-Korrektur einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Strahlendosen (2, 4, 8 Gy) und der unbestrahlten Kontrolle (0 Gy) evaluieren konnten, konnte kein signifikanter Effekt von Bestrahlung auf die miR-221-Expression beobachtet werden.

4.2 Erhöhtes klonogenes Überleben durch miR-221-Überexpression in SKBR3

Um einen möglichen Einfluss von miR-221 auf die Radiosensibilität der transduzierten Zelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 zu evaluieren, wurde ein klonogener Zellüberlebenstest durchgeführt.

Ergebnisse

Dabei wurde für SKBR3 sigifikant höheres klonogenes Überleben bei miR-221-Überexpression festgestellt. Bei MDA-MB-231 zeigte sich kein signifikanter Einfluss von miR-221 auf das klonogene Überleben.

4.2.1 Erhöhtes klonogenes Überleben durch miR-221-Überexpression in SKBR3

Um einen Einfluss von miR-221-Überexpression bei den SKBR3 auf die Radiosensibilität festzustellen, wurde ein klonogener Überlebenstest durchgeführt. In Abbildung 11 sind die klonogenen Überlebensfraktionen bei miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221) im Vergleich zur Kontrolle (SKBR3 +EV) illustriert. Die Überlebensfraktionen sind in Abhängigkeit der Strahlendosis aufgetragen.

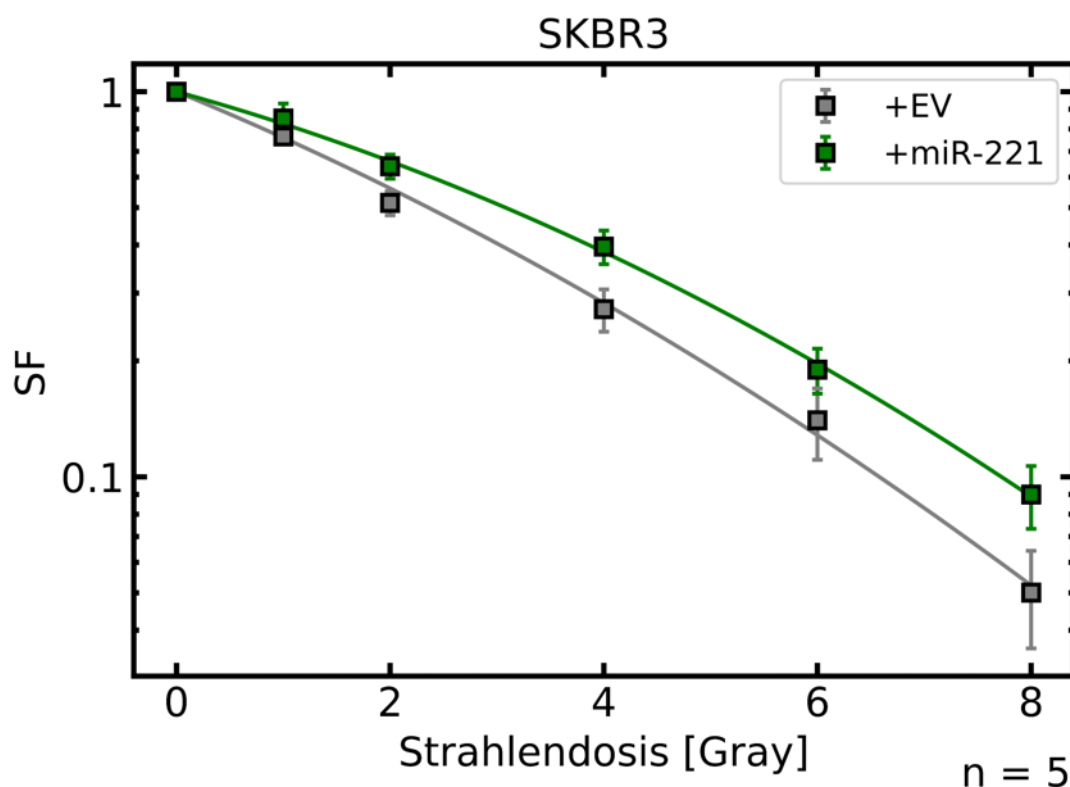


Abbildung 11. Klonogenes Überleben in Abhängigkeit von der Strahlendosis bei miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221, grün) im Vergleich zur Kontrolle (SKBR3 +EV, grau). Dargestellt sind die berechneten SF mit SEM aus fünf (SKBR3, n=5) biologischen Replikaten sowie die als kontinuierlicher Graph gezeichnete linear-quadratische Annäherung für jede Zelllinie.

Zudem ist in Abbildung 11 eine graphische Darstellung der linear-quadratischen-Modelle der verwendeten Zelllinien enthalten. Die Modell-spezifischen Parameter α und β sind für jede Zelllinie in Tabelle 12 dargestellt. In den SKBR3 mit miR-221-

Ergebnisse

Überexpression (SKBR3 +miR-221) ist der α -Wert mit 0.1766 ± 0.0379 kleiner als bei der Kontrolle (SKBR3 +EV) mit 0.2624 ± 0.05752 . Der β -Wert ist bei miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221) mit 0.01574 ± 0.005539 geringfügig größer als bei der Kontrolle (SKBR3 +EV) mit 0.01331 ± 0.00828 . Der Quotient α/β ist bei miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221) mit 11.22 ± 6.309 kleiner als bei der Kontrolle (SKBR3 +EV) mit 19.71 ± 16.49 .

Mithilfe dieses Modells konnten potentielle signifikante Unterschiede zwischen den Überlebenskurven für SKBR3 +EV und +miR-221 ermittelt werden.

Der zu diesem Zweck durchgeführte F-Test ergab für SKBR3 eine Effektstärke F von 7,266 (2,48) und einen p-Wert von 0.0018 für das Verwerfen der Nullhypothese, SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 mit einer einzigen Kurve zu beschreiben. Daher sind SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 in zwei unterschiedlichen Kurven in Abbildung 12 dargestellt.

Tabelle 12. α - und β -Parameter (Mittelwerte und SD) der linear-quadratischen Annäherungen für die Zelllinien SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221.

SKBR3	α	SD	β	SD	α/β	SD
+EV	0.2624	0.05752	0.01331	0.00828	19.71	16.49
+miR-221	0.1766	0.0379	0.01574	0.005539	11.22	6.309

Um statistisch zu überprüfen, ob miR-221-Überexpression einen signifikanten Einfluss auf das klonogene Zellüberleben hat, wurde eine ANOVA durchgeführt.

Für den Faktor miR-221-Überexpression wurde das klonogene Überleben von SKBR3 +EV mit dem von SKBR3 +miR-221 im Allgemeinen verglichen und ergab ein signifikant höheres Zellüberleben bei SKBR3 +miR-221 ($p=0,0030$). Signifikante Unterschiede im Zellüberleben zwischen SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 innerhalb einzelner Bestrahlungsdosen (0,1,2,4,6,8 Gy) konnten in der ANOVA mit Šidák-Korrektur nicht festgestellt werden.

4.2.2 Unverändertes klonogenes Überleben durch miR-221-Knock-down in MDA-MB-231

Um einen Einfluss von miR-221-Knock-down bei den MDA-MB-231 auf die Radiosensibilität festzustellen, wurde ein klonogener Überlebenstest durchgeführt. In Abbildung 12 sind die klonogenen Überlebensfraktionen bei miR-221-Knock-down (MDA-MB-231 +anti-miR-221) im Vergleich zur Kontrolle (MDA-MB-231 +EV) dargestellt. Die Überlebensfraktionen sind in Abhängigkeit der Strahlendosis aufgetragen.

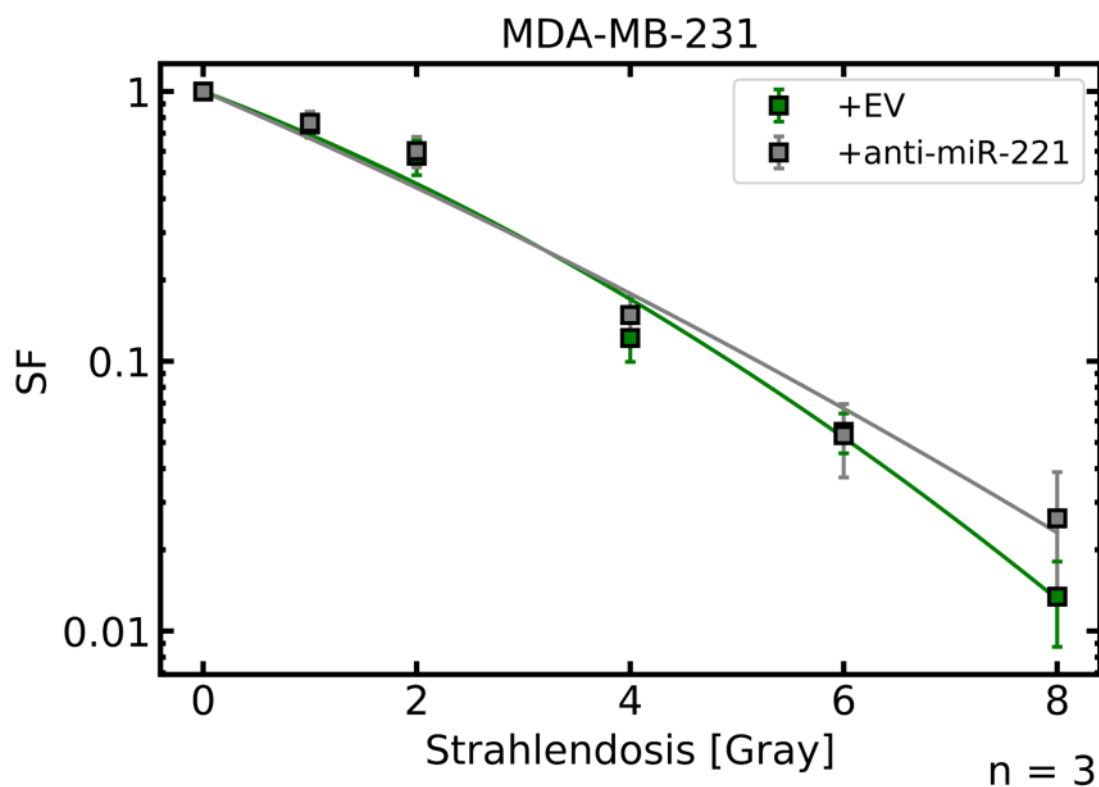


Abbildung 12. Klonogenes Überleben in Abhängigkeit von der Strahlendosis miR-221-Knock-down (MDA-MB-231, grau) im Vergleich zur Kontrolle EV (grün). Dargestellt sind die berechneten SF mit SEM aus drei (MDA-MB-231, n=3) biologischen Replikaten (Punkte mit Standardabweichungen) sowie die als kontinuierlicher Graph gezeichnete linear-quadratische Annäherung.

Zudem ist eine graphische Darstellung der linear-quadratischen-Modelle der verwendeten Zelllinien enthalten. Die Modell-spezifischen Parameter α und β sind für MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 in Tabelle 12 dargestellt. In den MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down (MDA-MB-231 +anti-miR-221) ist der α -Wert mit 0.3918 ± 0.0973 geringfügig größer als bei der Kontrolle (MDA-MB-231 +EV) mit

Ergebnisse

0.3448±0.07061. Der β -Wert ist bei miR-221-Knock-down (MDA-MB-231 +anti-miR-221) mit 0.00986±0.0142 kleiner als bei der Kontrolle (MDA-MB-231 +EV) mit 0.0246±0.01032. Der Quotient α/β ist bei miR-221-Knock-down (MDA-MB-231 +anti-miR-221) mit 39.74±66.85 größer als bei der Kontrolle (MDA-MB-231 +EV) mit 14.01±8.685.

Mithilfe dieser Modelle konnten Unterschiede zwischen den Überlebenskurven für MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 ermittelt werden.

Die Nullhypothese, MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 mit einer Kurve darzustellen, konnte im F-Test mit einer Effektstärke von 4,569 (2,31) und einem p-Wert von 0,0182 widerlegt werden. Daher sind MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 in zwei unterschiedlichen Kurven in Abbildung 12 dargestellt.

Tabelle 13. α - und β -Parameter (Mittelwerte und SD) der linear-quadratischen Annäherungen für die Zelllinien MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221.

MDA-MB-231	α	SD	β	SD	α/β	SD
+EV	0.3448	0.07061	0.0246	0.01032	14.01	8.685
+anti-miR-221	0.3918	0.0973	0.00986	0.0142	39.74	66.85

Um statistisch zu überprüfen, ob miR-221-Überexpression einen signifikanten Einfluss auf das klonogene Zellüberleben hat, wurde eine ANOVA durchgeführt.

Für den Faktor miR-221-Überexpression wurde das klonogene Überleben von MDA-MB-231 +EV mit dem von MDA-MB-231 +anti-miR-221 im Allgemeinen verglichen und ergab kein signifikant unterschiedliches Zellüberleben zwischen MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221. Signifikante Unterschiede im Zellüberleben zwischen MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 innerhalb einzelner Bestrahlungsdosen (0, 1, 2, 4, 6, 8 Gy) konnten in der ANOVA mit Šidák-Korrektur ebenfalls nicht festgestellt werden.

4.3 Vermehrtes Zellwachstum bei hoher miR-221-Expression

In den Zellzahlbestimmungen konnte für SKBR3 signifikant höheres Zellwachstum bei miR-221-Überexpression und für MDA-MB-231 signifikant niedrigeres Zellwachstum bei miR-221-Knock-down gezeigt werden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass der signifikante Proliferationsunterschied zwischen miR-221-überexprimierenden und nicht-überexprimierenden Zellen durch Bestrahlung verringert wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass Bestrahlung die proliferationsverstärkenden Eigenschaften von miR-221 abschwächt.

4.3.1 Vermehrtes Zellwachstum durch miR-221-Überexpression in SKBR3

Um einen Effekt von miR-221-Überexpression und Bestrahlung auf die Proliferation der SKBR3 zu untersuchen, wurde das Zellwachstum von SKBR3 mit miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221) im Vergleich zur Kontrolle (SKBR3 +EV) zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy anhand von Zellzahlbestimmungen ermittelt.

Zunächst wurde von den nicht bestrahlten Zellen Wachstumskurven über Zeit aufgestellt, um das Zellwachstum von SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 direkt vergleichen zu können (Abbildung 13).

Bei der Kontrolle SKBR3 +EV ließ sich ein Zellzahlanstieg um das 2,5-fache ($2,7 \pm 0,1$), bei den miR-221-überexprimierenden SKBR3 +miR-221 ein Anstieg um das 3,5-fache ($3,4 \pm 0,1$) innerhalb eines Zeitraums von 72 h feststellen. Die angenäherten Verdopplungszeiten betragen für SKBR3 +EV 41 h und für SKBR3 +miR-221 35 h. Somit lässt sich bei miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221) höhere mittlere Proliferation mit kürzerer Verdopplungszeit beobachten als bei der Kontrolle (SKBR3 +EV).

Eine Zwei-Faktoren-ANOVA mit miR-221-Expression (Kontrolle SKBR3 +EV oder miR-221-Überexpression SKBR3 +miR-221) und Zeit als unabhängigen Variablen und dem Proliferationsindex als abhängige Variable lieferte einen höchst signifikanten Einfluss der Faktors Zeit auf die Proliferation ($p < 0.0001$). Zusätzlich konnte bei SKBR3 +miR-221 im Vergleich zu SKBR3 +EV signifikant höhere Proliferation bei Betrachtung des gesamten Zeitraums ermittelt werden ($p = 0.0114$). Zudem bestätigt ANOVA eine

Ergebnisse

signifikante Interaktion der Faktoren Zeit und miR-221-Expression ($p=0.0064$), welche eine zeitabhängige Verstärkung des positiven Effekts von miR-221 auf die Proliferation vermuten lassen könnte.

Diese Vermutung wird gestützt durch die Ergebnisse der Post-Hoc-Tests mit Šidák-Korrektur, welche eine signifikant stärkere Proliferation bei SKBR3 +miR-221 im Vergleich zu SKBR3 +EV erst ab einem Zeitpunkt von 72 h nach Bestrahlung bestimmen konnten ($p<0.0001$ für SKBR3).

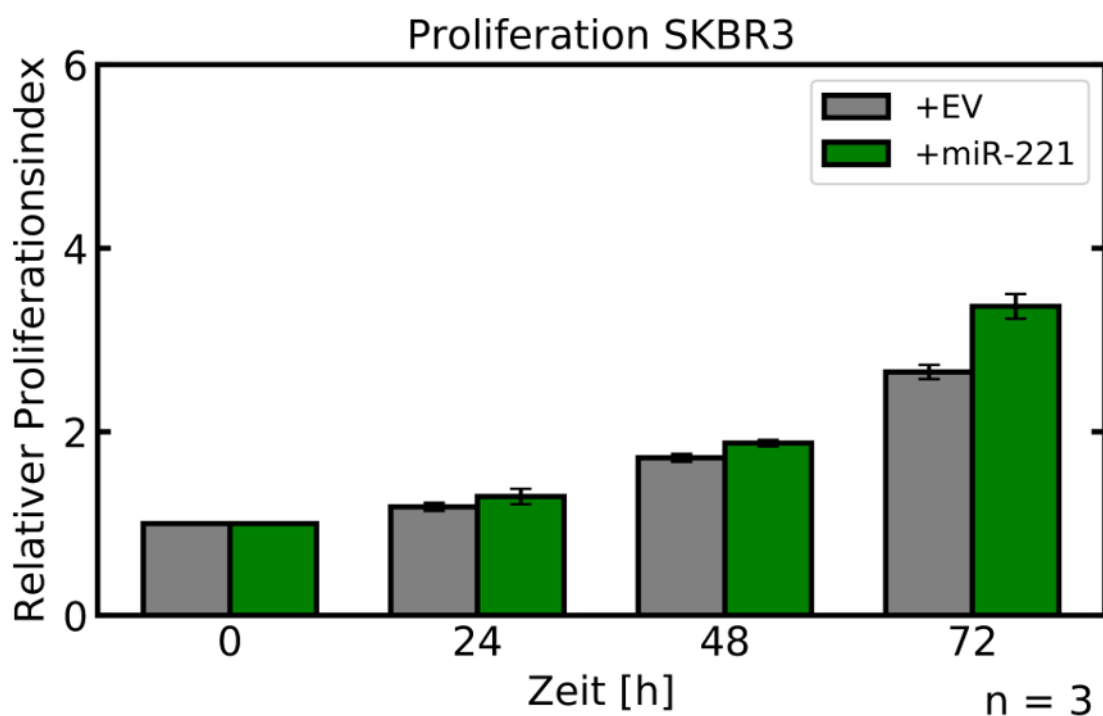


Abbildung 13. Relativer Proliferationsindex der unbestrahlten SKBR3 mit miR-221-Überexpression (grün) und im Vergleich zur EV-Kontrolle (grau) in Abhängigkeit von der Zeit. Der Proliferationsindex wurde berechnet aus dem Quotienten der Proliferation zum gegebenen Zeitpunkt und der Proliferation 0 h nach Bestrahlung. Aufgeführt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.

Um Proliferationsunterschiede durch miR-221-Überexpression und Bestrahlung in den SKBR3 zu einzelnen Zeitpunkten festzustellen, wurden Zellzahlen der SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 bei verschiedenen Bestrahlungsdosen bestimmt. SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 sind mit ihren jeweiligen Proliferationsindices in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) für die Zeitpunkte 24 h (A), 48 h (B) und 72 h (C) nach Bestrahlung in Abbildung 14 dargestellt.

Ergebnisse

Mehrfaktorielle Varianzanalysen ergaben für SKBR3 24 h nach Bestrahlung keinen signifikanten Effekt von miR-221 und Bestrahlung auf die Proliferation. Bei den 48 und 72 h-Werten konnten jedoch signifikante Unterschiede sowohl durch Bestrahlung ($p=0.0003$ für 48 h, $p<0.0001$ für 72 h) als auch durch miR-221 ($p=0.0036$ für 48 h, $p=0.0037$ für 72 h) erkannt werden.

Post-Hoc-Tests mit Šidák-Korrektur konnten für 24 und 48 h keine signifikanten Unterschiede zwischen SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 innerhalb einzelner Strahlendosen detektieren, jedoch für 72 h zwischen den unbestrahlten SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 (0 Gy) eine Signifikanz von $p=0.0046$. Mithilfe der Dunnett-Korrektur konnte 48 h nach Bestrahlung für SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 jeweils ein signifikanter Abfall der Proliferation unter 8 Gy im Vergleich zur Proliferation ohne Bestrahlung ($p=0.0227$ für +EV, $p=0.0195$ für +miR-221) berechnet werden. 72 h nach Bestrahlung waren für SKBR3 +miR-221 signifikante Unterschiede zur unbestrahlten Probe bereits ab einer Strahlendosis von 2 Gy signifikant ($p=0.0172$), wobei sich die Signifikanz mit höheren Strahlendosen verstärkte ($p=0.0025$ für 4 Gy, $p<0.0001$ für 8 Gy), während für SKBR3 +EV ein signifikanter Abfall der Proliferation erst ab 8 Gy ($p=0.0014$) beobachtet werden konnte.

Die signifikant stärkere Proliferation bei miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221 im Vergleich zu SKBR3 +EV), welche bei zum Zeitpunkt 72 h ohne Bestrahlung beobachtet werden konnte, sinkt bei Bestrahlung, sodass nach Bestrahlung keine signifikant stärkere Proliferation von SKBR3 +miR-221 im Vergleich zu SKBR3 +EV in den Post-hoc-Tests mehr nachgewiesen werden konnte. Dies legt die Vermutung nahe, dass Bestrahlung die proliferationsverstärkenden Eigenschaften von miR-221 abschwächt. Zudem lässt sich nach Bestrahlung ein vergleichsweise höherer Proliferationsabfall in den miR-221-überexprimierenden Zellen (SKBR3 +miR-221) im Vergleich zu Kontrolle (SKBR3 +EV) bestimmen.

Ergebnisse

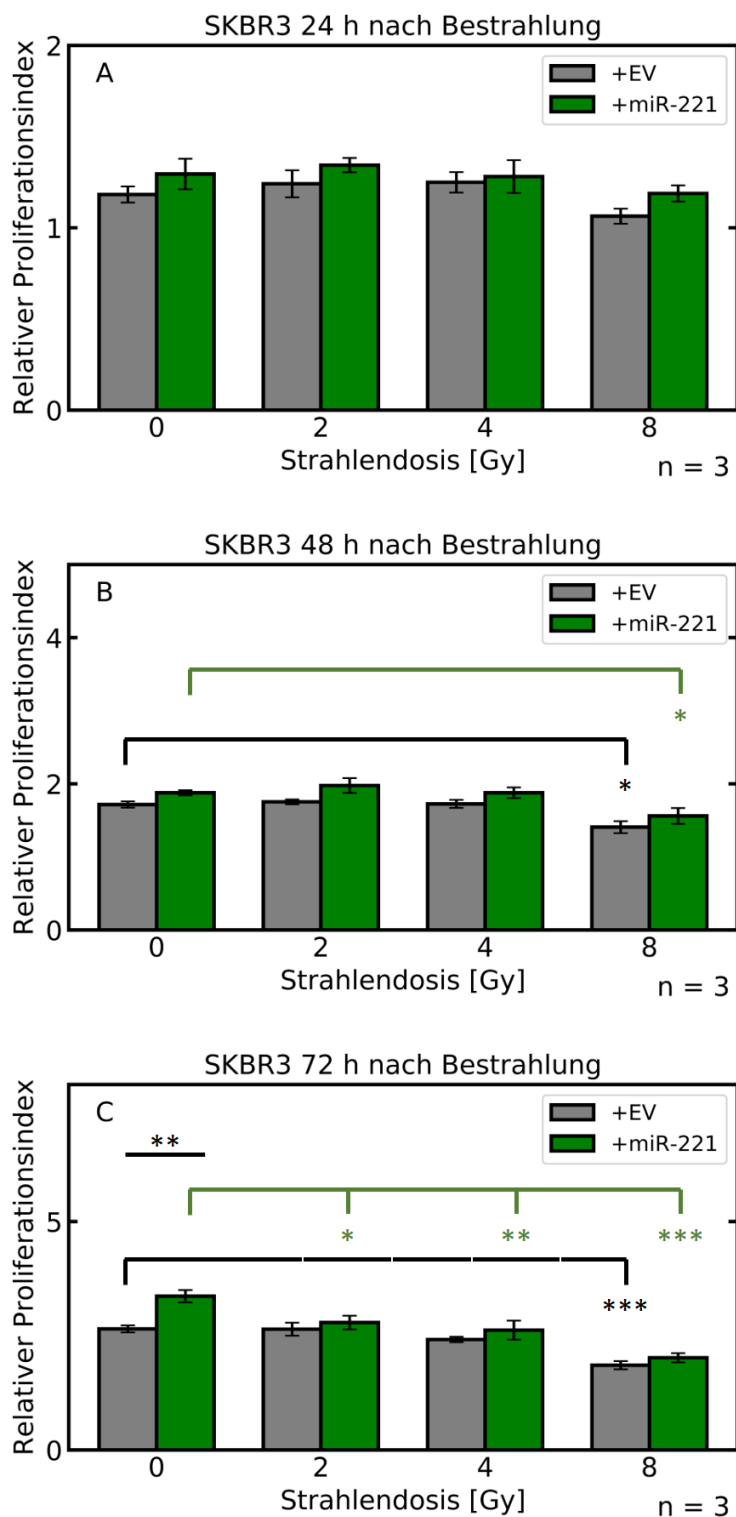


Abbildung 14. Proliferation der Zelllinie SKBR3 mit miR-221-Überexpression (grün) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grau) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung. Die relative Proliferation wurde durch Normalisierung auf die Proliferation 0 h nach Bestrahlung ermittelt (Relativer Proliferationsindex) und in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.

4.3.2 Verringertes Zellwachstum durch miR-221-Knock-down in MDA-MB-231

Um einen Effekt von miR-221-Knock-down und Bestrahlung auf die Proliferation der MDA-MB-231 zu untersuchen, wurde das Zellwachstum von MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down (MDA-MB-231 +anti-miR-221) im Vergleich zur Kontrolle (MDA-MB-231 +EV) zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy anhand von Zellzahlbestimmungen ermittelt.

Zunächst wurde von den nicht bestrahlten Zellen Wachstumskurven über Zeit aufgestellt, um das Zellwachstum von MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 direkt vergleichen zu können (Abbildung 15).

In einem Zeitraum von 72 h zeigte sich ein Anstieg der Zellzahl um das 11-fache ($11,3 \pm 0,6$) bei MDA-MB-231 +EV und um das 9-fache ($9,2 \pm 0,3$) bei MDA-MB-231 +anti-miR-221. Die angenäherten Verdopplungszeiten betragen für MDA-MB-231 +EV 22 h und für MDA-MB-231 +anti-miR-221 24 h. Somit lässt sich bei miR-221-Knock-down (MDA-MB-231 +anti-miR-221) niedrigere mittlere Proliferation mit längerer Verdopplungszeit beobachten als bei der Kontrolle (MDA-MB-231 +EV).

Eine Zwei-Faktoren-ANOVA mit miR-221-Expression (Kontrolle MDA-MB-231 +EV oder Knock-down MDA-MB-231 +anti-miR-221) und Zeit als unabhängigen Variablen und dem Proliferationsindex als abhängige Variable lieferte einen höchst signifikanten Einfluss der Faktors Zeit auf die Proliferation ($p < 0.0001$). Zudem bestätigt ANOVA eine signifikante Interaktion von Zeit und miR-221 ($p = 0.0064$ für MDA-MB-231), welche eine zeitabhängige Verstärkung des abschwächenden Effekts von miR-221-Knock-down auf die Proliferation vermuten lassen könnte.

Diese Vermutung wird gestützt durch die Ergebnisse der Post-Hoc-Tests mit Šidák-Korrektur, welche signifikant niedrigere Proliferation bei MDA-MB-231 +anti-miR-221 im Vergleich zu MDA-MB-231 +EV erst ab einem Zeitpunkt von 72 h nach Bestrahlung bestimmen konnten ($p = 0.0079$).

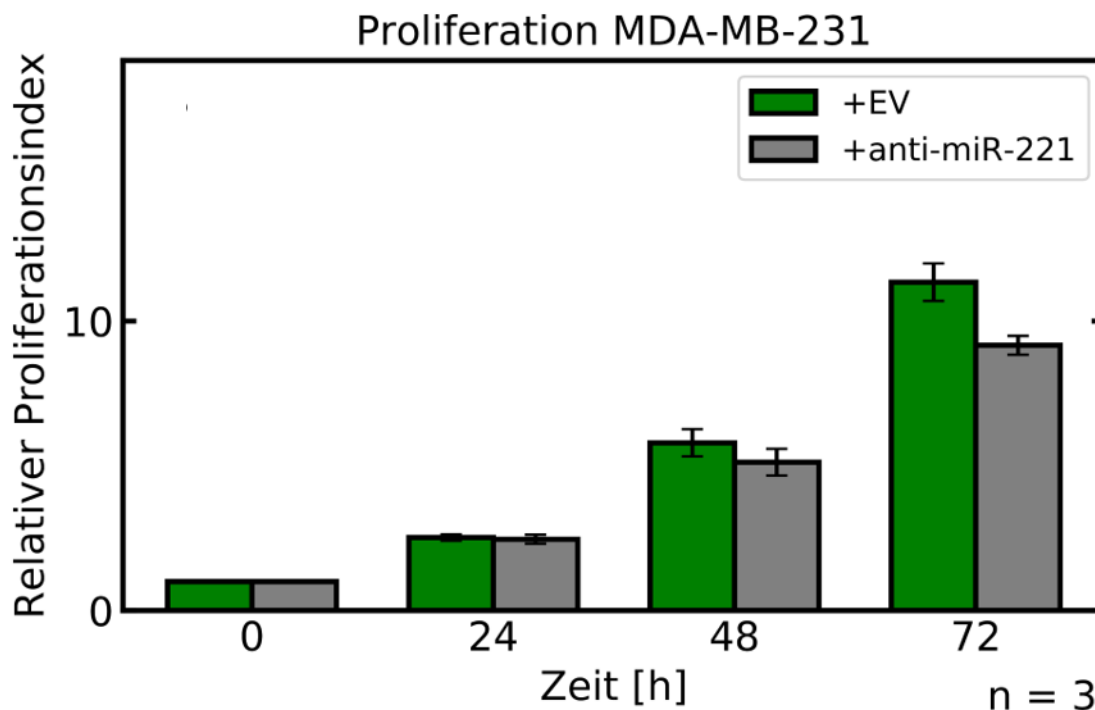


Abbildung 15. Relativer Proliferationsindex der unbestrahlten Zelllinien MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down (grau) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grün) in Abhängigkeit von der Zeit. Der Proliferationsindex wurde berechnet aus dem Quotienten der Proliferation zum gegebenen Zeitpunkt und der Proliferation 0 h nach Bestrahlung. Aufgeführt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.

Um Proliferationsunterschiede zu einzelnen Zeitpunkten sowie den Einfluss von Bestrahlung und miR-221-Knock-down auf die Zellzahl durch gegenüberzustellen, sind, wurden Zellzahlbestimmungen von MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy durchgeführt. Die MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 sind mit ihren jeweiligen Proliferationsindices in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) in Abbildung 16 für die Zeitpunkte 24 h (A), 48 h (B) und 72 h (C) nach Bestrahlung dargestellt.

Mithilfe einer Zwei-Faktor-ANOVA konnte bei MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 bereits ab 24 h ein signifikanter Effekt von Bestrahlung auf die Proliferation berechnet werden, welcher bei allen drei Zeitpunkten erhalten blieb ($p < 0.001$ für 24, 48 und 72 h). Ein signifikant höheres Zellwachstum der MDA-MB-231 +EV im Vergleich zu MDA-MB-231 +anti-miR-221 konnte ähnlich wie bei SKBR3 erst

Ergebnisse

zu den Zeitpunkten 48 und 72 h festgestellt werden ($p=0.0026$ für 48 h, $p=0.0030$ für 72 h).

Die Dunnett-Korrektur ergab sowohl für MDA-MB-231 +EV als auch für MDA-MB-231 +anti-miR-221 für alle Zeitpunkte bereits ab 2 Gy stark signifikante Abnahmen der Proliferation im Vergleich zur unbestrahlten Probe ($p<0.0001$ für alle Proben außer $p=0.0003$ für MDA-MB-231 +EV 24 h bei 2 Gy, $p=0.0006$ für MDA-MB-231 +anti-miR-221 24 h bei 2 Gy und $p=0.0033$ für MDA-MB-231 +EV 48 h bei 2 Gy). Unter Verwendung der Šidák-Korrektur wurden signifikante Abfälle der Zellzahlen bei miR-221-Knock-down bei einer Strahlendosis von 2 Gy 48 h nach Bestrahlung ($p=0.0011$) und von 0 Gy 72 h nach Bestrahlung (0.0194) erkannt.

Der Verlust der signifikant höheren Proliferation der MDA-MB-231 +EV im Vergleich zu den MDA-MB-231 +anti-miR-221 bei Bestrahlung, welcher bei 72 h beobachtet werden konnte, legt die Vermutung nahe, dass Bestrahlung die proliferationsverstärkenden Eigenschaften von miR-221 abschwächt.

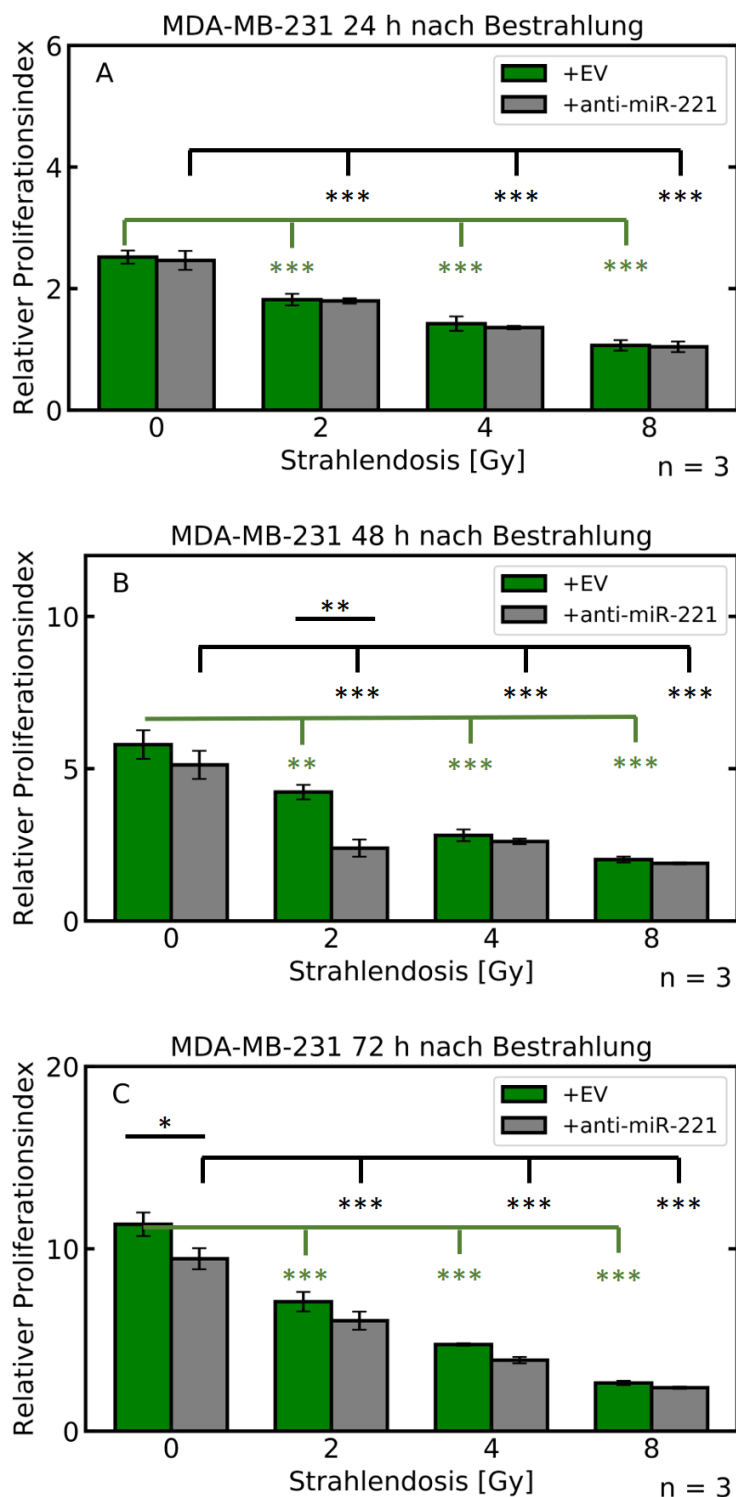


Abbildung 16. Proliferation der Zelllinie MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down (grau) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grün) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung. Die relative Proliferation wurde durch Normalisierung auf die Proliferation 0 h nach Bestrahlung ermittelt (Relativer Proliferationsindex) und in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.

4.4 Erhöhte Migration bei miR-221-Überexpression und Bestrahlung

Um einen Einfluss von Bestrahlung und miR-221-Überexpression in den SKBR3 oder von miR-221-Knock-down in den MDA-MB-231 auf die Migration feststellen zu können, wurde ein Wound Scratch Assay durchgeführt.

Dieses ergab signifikant höhere Migration bei miR-221-Überexpression in SKBR3 (SKBR3 +miR-221) im Vergleich zur Kontrolle (SKBR3 +EV) und signifikant niedrigere Migration bei miR-221-Knock-down in MDA-MB-231 (MDA-MB-231 +anti-miR-221) im Vergleich zur Kontrolle (MDA-MB-231 +EV). Dieser verstärkende Effekt von miR-221 auf die Migration blieb in beiden Zelllinien bei Bestrahlung bis 8 Gy bestehen.

4.4.1 Erhöhte Migration bei miR-221-Überexpression und Bestrahlung in SKBR3

Die Migration von SKBR3 mit miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221) im Vergleich zur Kontrolle (SKBR3 +EV) wurde zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy mithilfe des Wound Scratch Assays ermittelt.

Die Abbildung 17 bis Abbildung 19 zeigen die mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder, die zur Quantifizierung der Migration verwendet wurden. Dabei wurden die Bilder mit miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221) der Kontrolle (SKBR3 +EV) für jeden Zeitpunkt und jede Bestrahlungsdosis direkt gegenübergestellt.

Ergebnisse

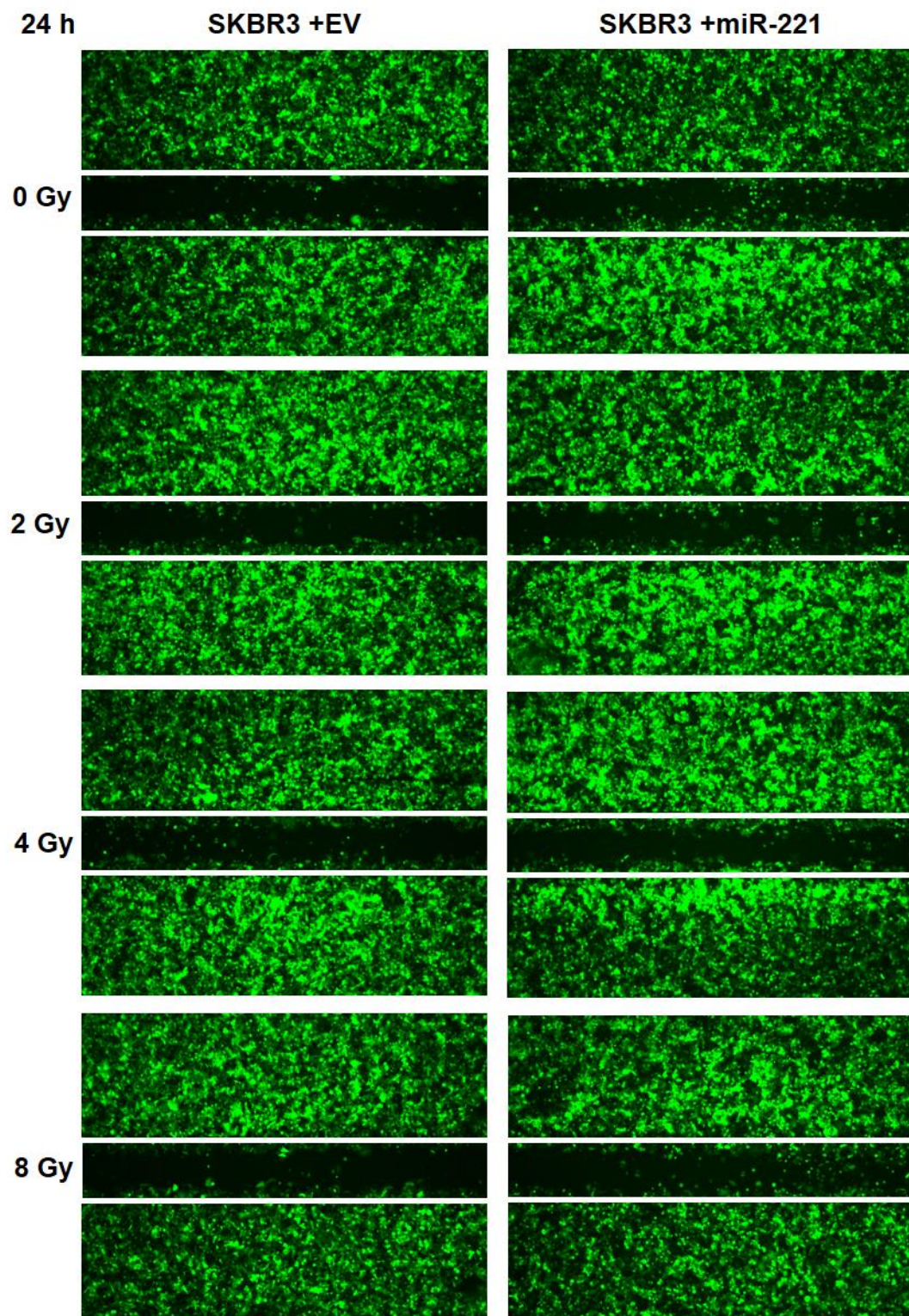


Abbildung 17. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von SKBR3 +EV und +miR-221 24 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).

Ergebnisse

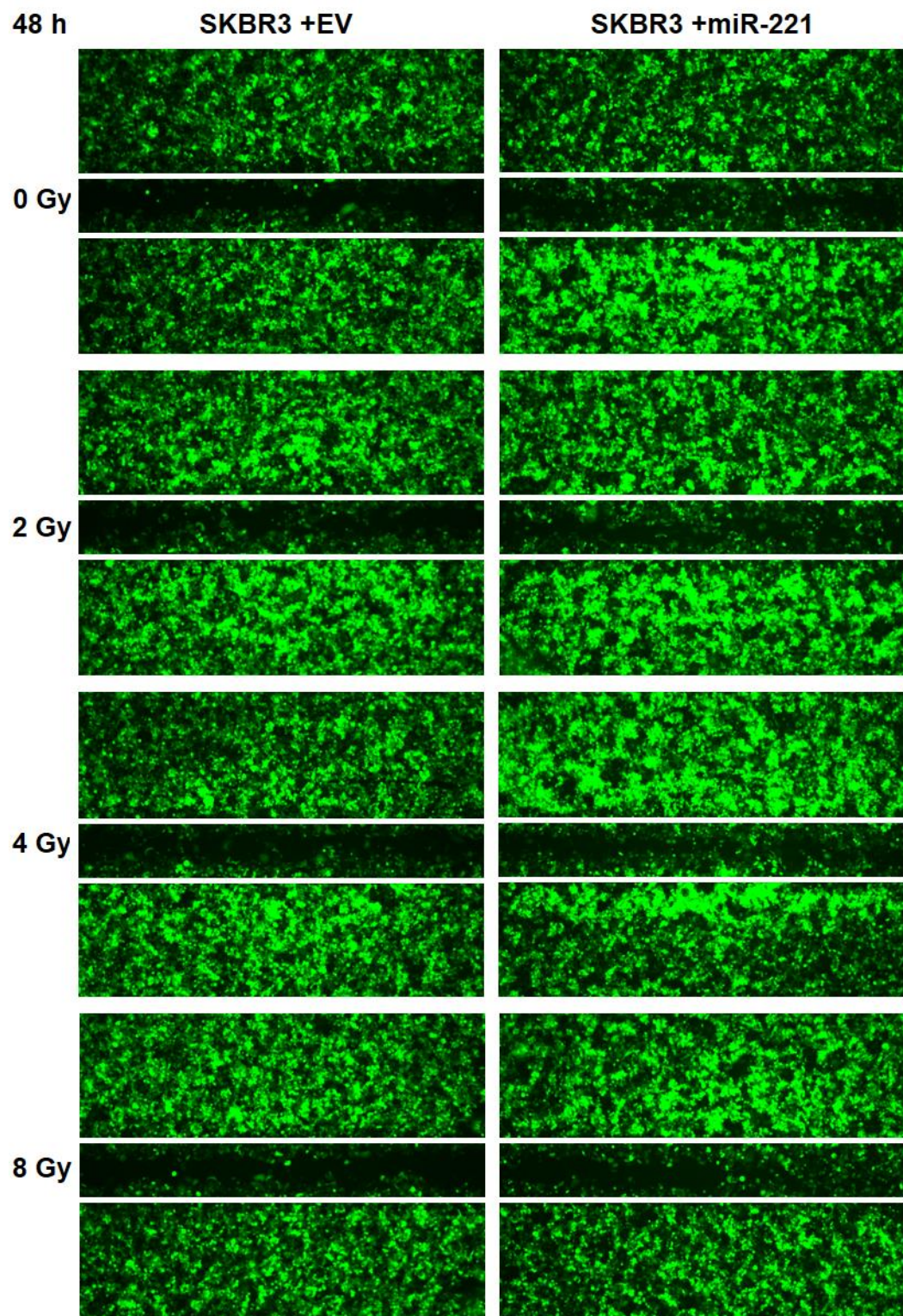


Abbildung 18. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von SKBR3 +EV und +miR-221 48 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).

Ergebnisse

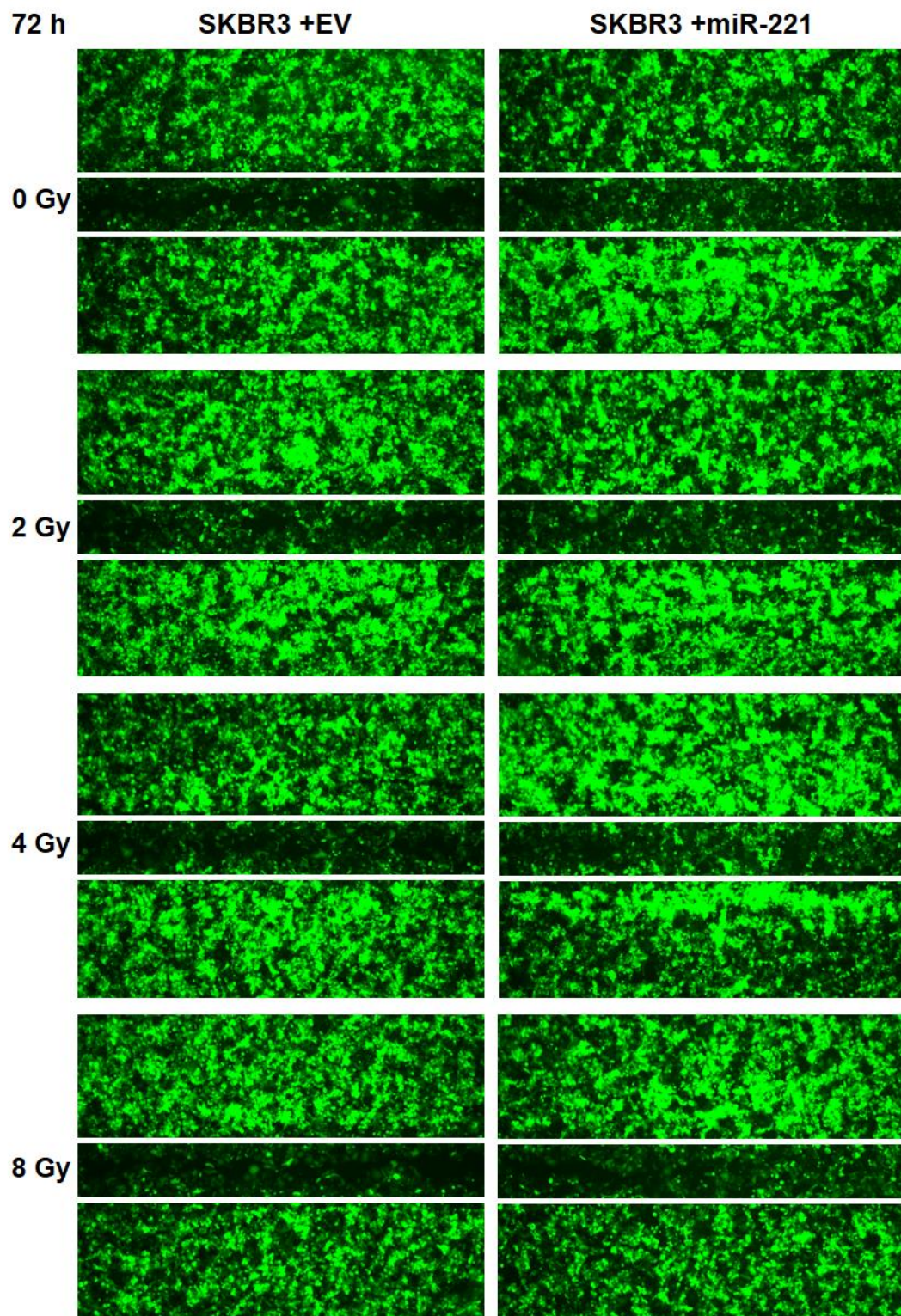


Abbildung 19. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von SKBR3 +EV und +miR-221 72 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).

Ergebnisse

Um die Migration zwischen miR-221 überexprimierenden Zellen (SKBR3 +miR-221) und der Kontrolle (SKBR3 +EV) vergleichen zu können, wurde in den fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Bildern die Anzahl der grünen Pixel ermittelt.

Die Anzahl der grünen Pixel ist für SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 in Abbildung 20 für die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy dargestellt. Unter allen Strahlendosen ließ sich zu allen drei Zeitpunkten eine im Mittel höhere Pixelanzahl und somit Migration für SKBR3 +miR-221 als für SKBR3 +EV ermitteln. Eine mehrfaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt des Faktors einer miR-221-Überexpression auf die Anzahl der grünen Pixel für 24 h ($p=0,0106$), 48 h ($p=0,0006$) und 72 h ($p=0,0003$). Post-Hoc-Analysen mit Šidák-Korrektur konnten beim Vergleich von SKBR3 +miR-221 und SKBR3 +EV für einzelne Strahlendosen (0, 2, 4, 8 Gy) zu keinem der drei Messzeitpunkte signifikante Unterschiede feststellen.

Für den Faktor Bestrahlung ergab sich kein signifikanter Effekt auf die Anzahl der grünen Pixel zwischen SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221 zu keinem der drei gemessenen Zeitpunkte. Die Post-Hoc-Analysen mit Dunnett-Korrektur lieferten demnach auch keine signifikanten Ergebnisse beim Vergleich einzelner Bestrahlungsdosen (2, 4, 8 Gy) mit der unbestrahlten Kontrolle (0 Gy) jeweils für SKBR3 +miR-221 und für SKBR3 +EV.

Ergebnisse

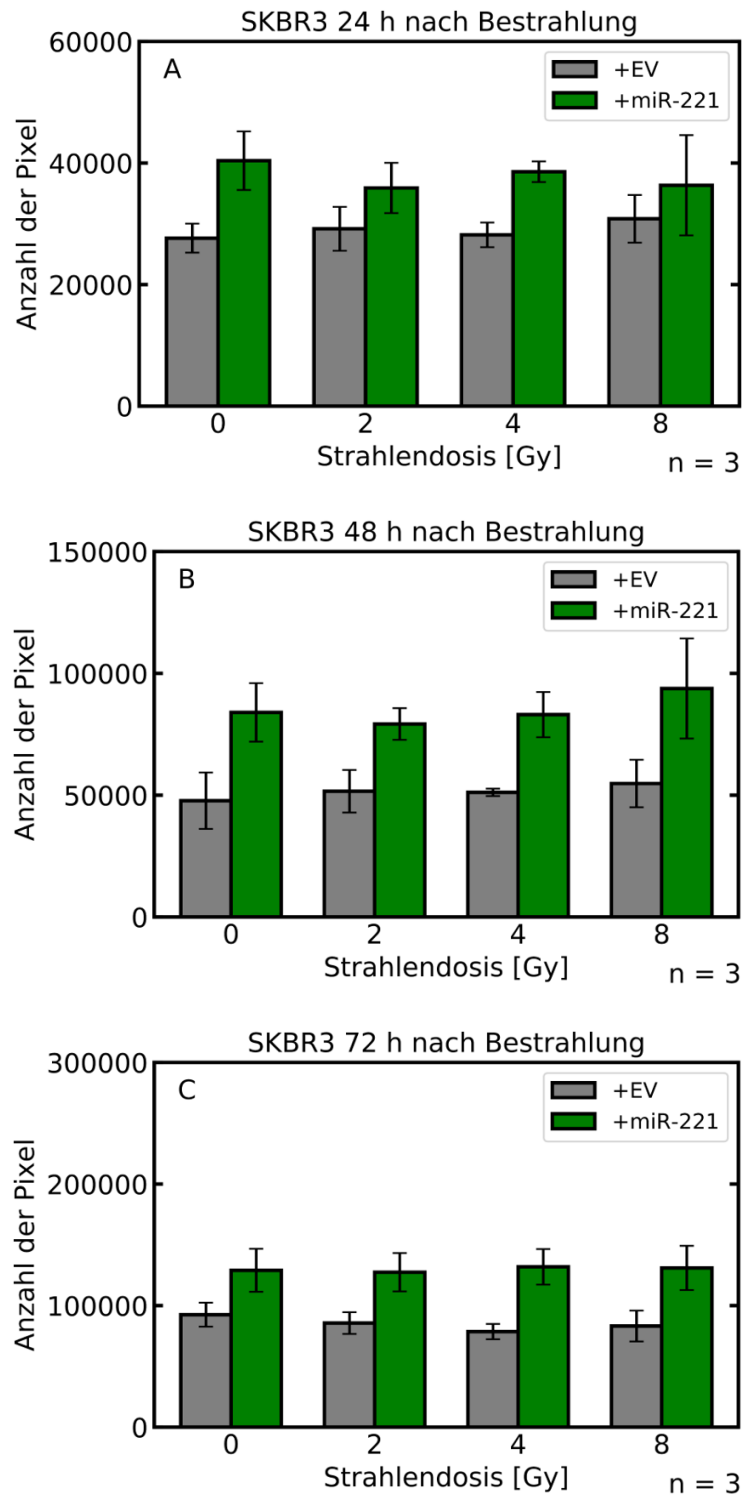


Abbildung 20. Anzahl der Pixel der Zelllinie SKBR3 mit miR-221-Überexpression (grün) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grau) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung. Die gemessene Pixelanzahl dient als Maß für die Migration und ist in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.

4.4.2 Niedrigere Migration bei miR-221-Knock-down in MDA-MB-231

Die Migration von MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down (MDA-MB-231 +anti-miR-221) im Vergleich zur Kontrolle (MDA-MB-231 +EV) wurde zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy mithilfe des Wound Scratch Assays ermittelt.

Die Abbildung 21 bis Abbildung 24 zeigen die mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder, die zur Quantifizierung der Migration verwendet wurden. Dabei wurden die Bilder mit miR-221-Knock-down (MDA-MB-231 +anti-miR-221) der Kontrolle (MDA-MB-231 +EV) für jeden Zeitpunkt und jede Bestrahlungsdosis direkt gegenübergestellt.

Ergebnisse

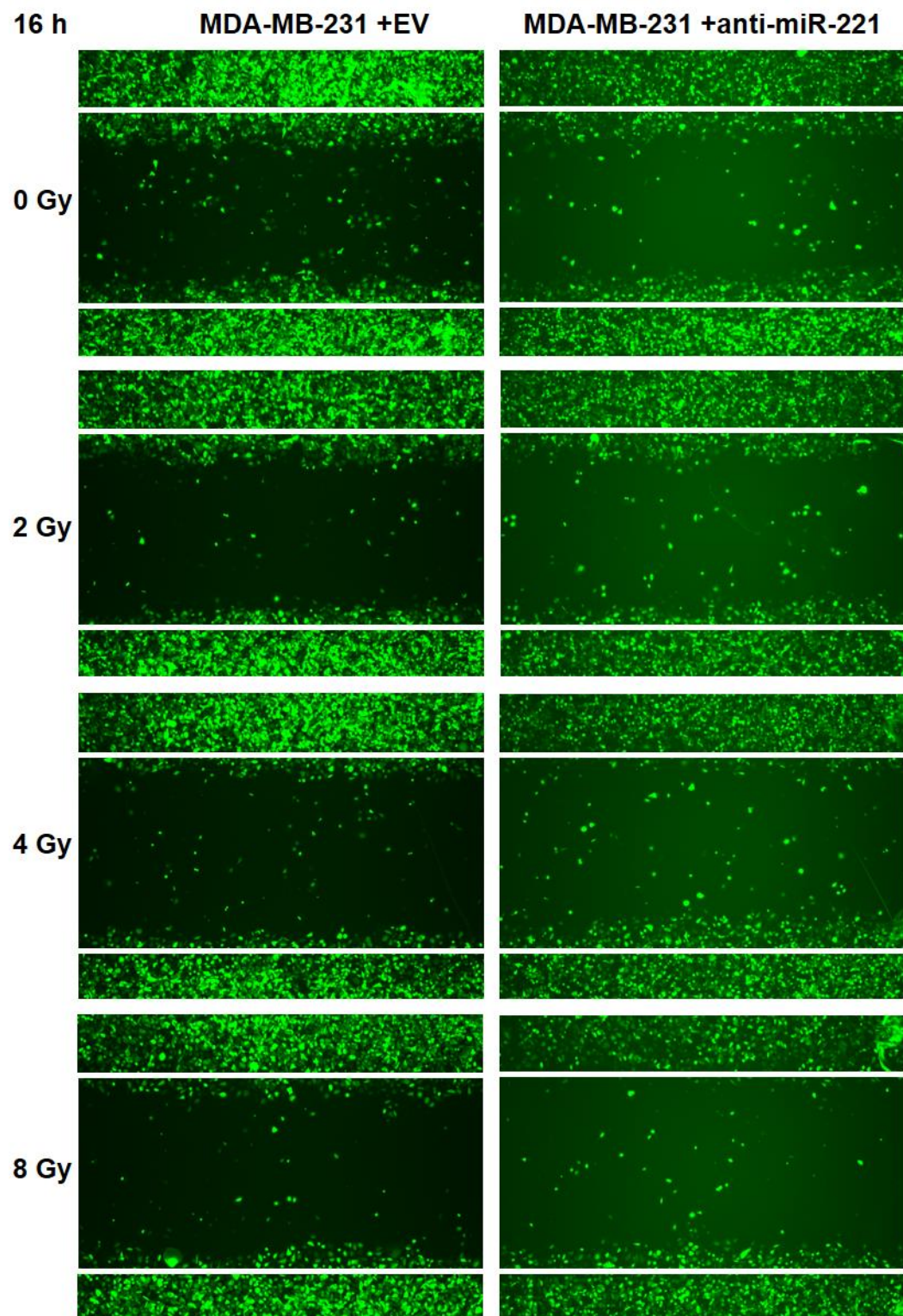


Abbildung 21. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 16 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).

Ergebnisse

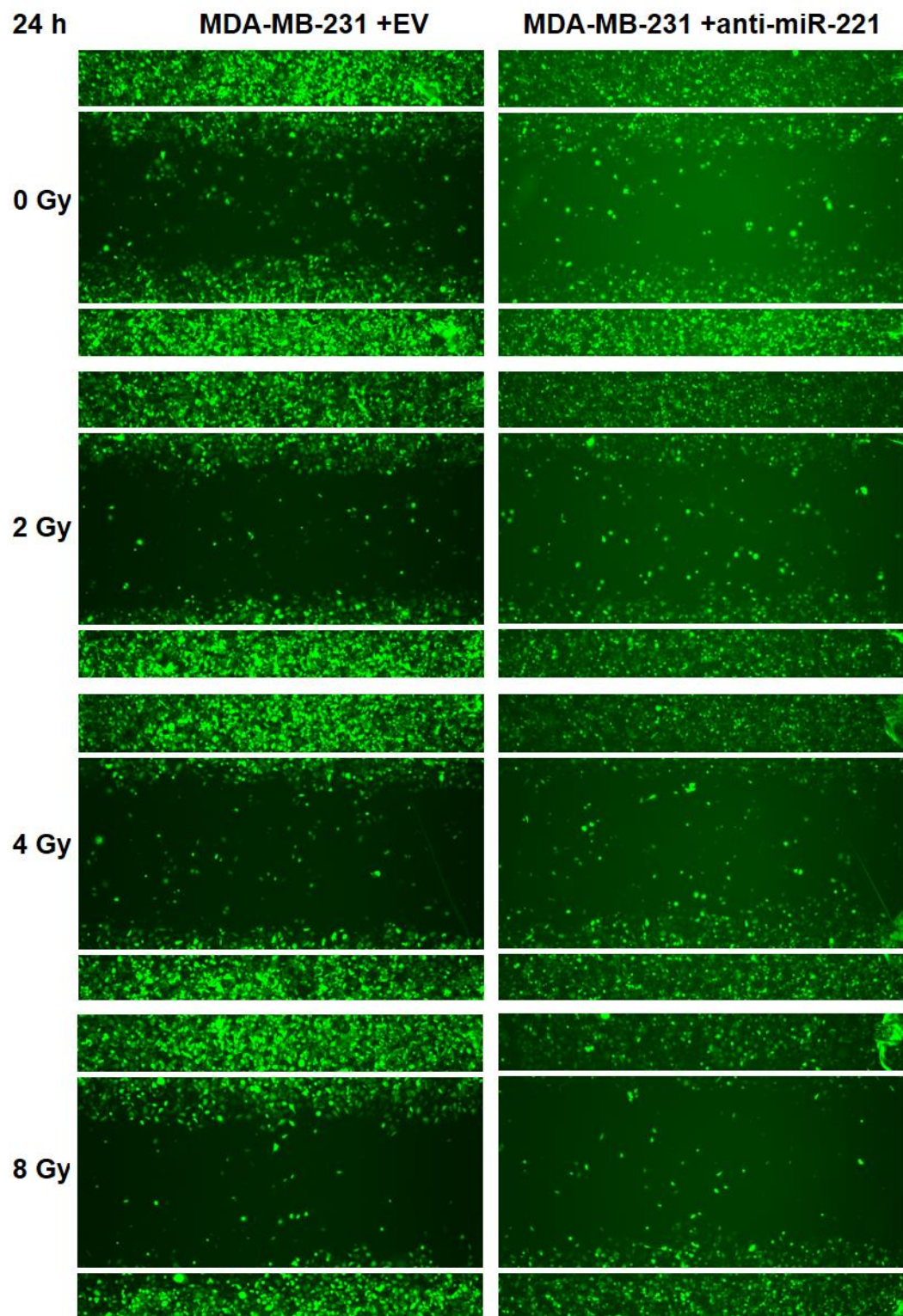


Abbildung 22. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 24 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).

Ergebnisse

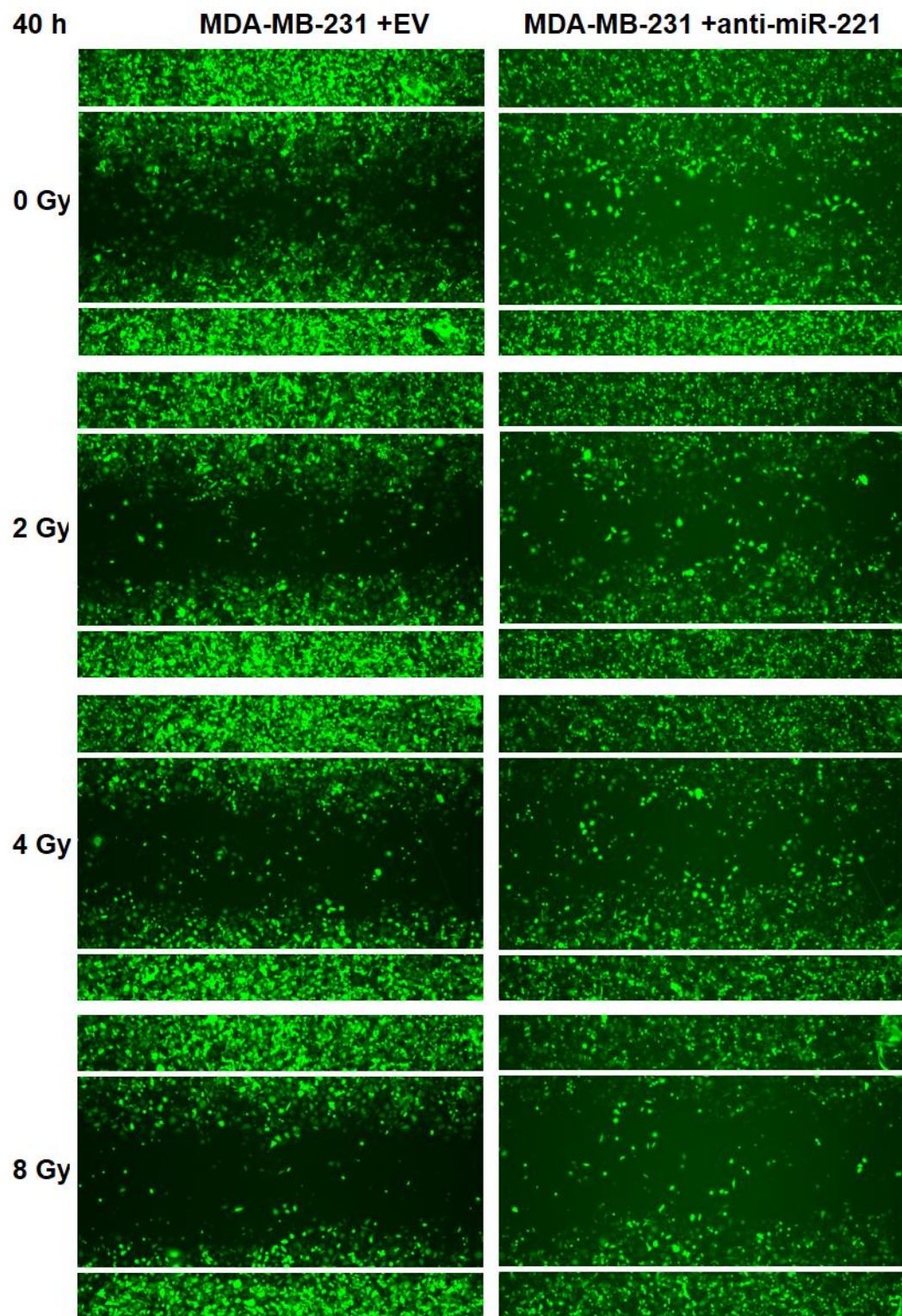


Abbildung 23. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 40 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).

Ergebnisse

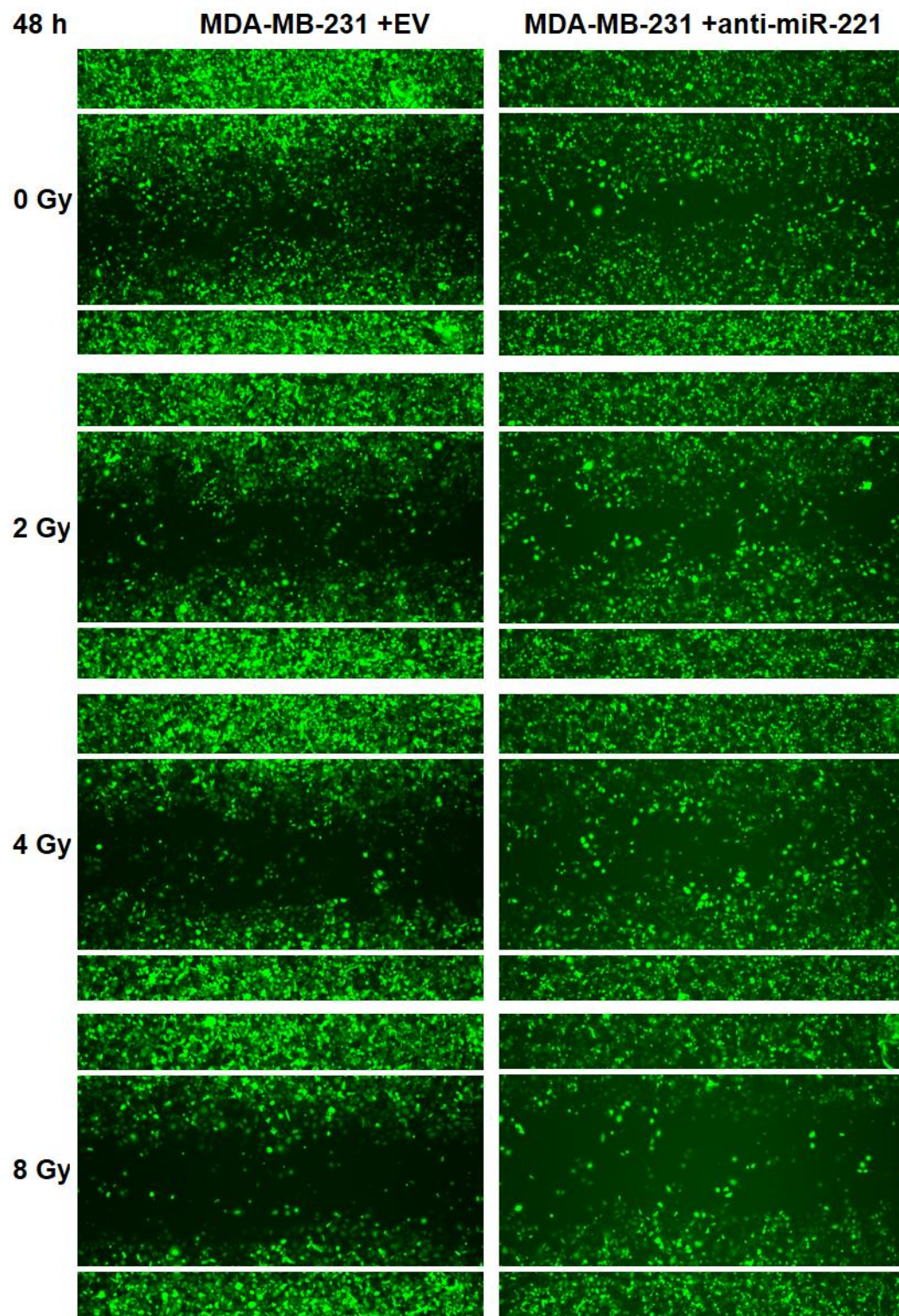


Abbildung 24. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 48 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).

Ergebnisse

Für MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 ist eine Darstellung der Anzahl der grünen Pixel für die Zeitpunkte 16, 24, 40 und 48 Stunden nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy in Abbildung 25 erfolgt. Zu allen vier Zeitpunkten ließ sich für jede Strahlendosis eine im Mittel höhere Pixelzahl und somit Migration für miR-221 überexprimierende MDA-MB-231 +EV ermitteln als für MDA-MB-231 +anti-miR-221.

Eine mehrfaktorielle Varianzanalyse zeigte, dass miR-221 überexprimierende Zellen (MDA-MB-231 +EV) im Vergleich zu Zellen mit miR-221-Knock-down (MDA-MB-231 +anti-miR-221) signifikant höhere Anzahlen grüner Pixel und somit höhere Migration zu den Zeitpunkten 16 h ($p < 0,0001$), 24 h ($p < 0,0001$), 48 h ($p < 0,0001$) und 72 h ($p < 0,0001$) aufwiesen.

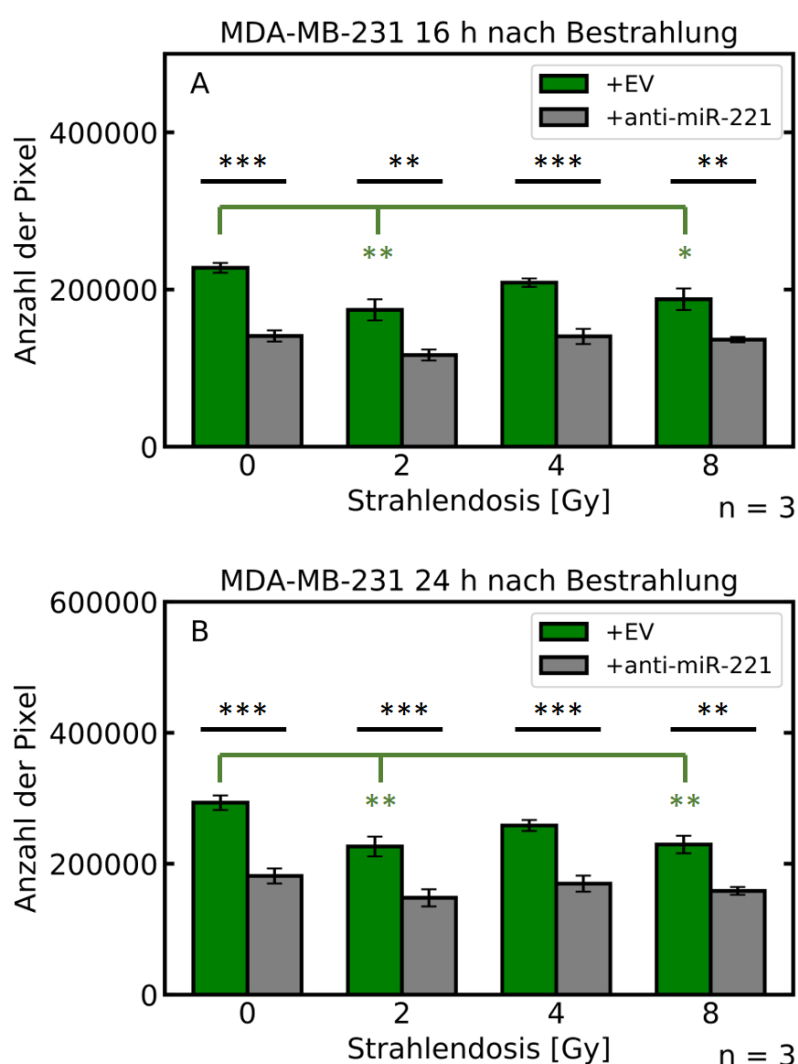
Post-Hoc-Analysen mit Šidák-Korrektur ergaben beim Vergleich von MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 signifikant höhere grüne Pixelzahlen für die miR-221-überexprimierende Leervektorkontrolle +EV für jede einzelne Strahlendosis zu den Zeitpunkten 16 h ($p < 0,0001$ bei 0 Gy, $p = 0,0014$ bei 2 Gy, $p = 0,0002$ bei 4 Gy, $p = 0,0037$ bei 8 Gy), 24 h ($p < 0,0001$ bei 0 Gy, $p = 0,0009$ bei 2 Gy, $p = 0,0003$ bei 4 Gy, $p = 0,0023$ bei 8 Gy), 40 h ($p < 0,0001$ bei 0, 2, 4 und 8 Gy) und 48 h ($p < 0,0001$ bei 0, 2, 4 und 8 Gy).

Eine mehrfaktorielle Varianzanalyse des Faktors Bestrahlung ergab einen signifikanten Effekt von Bestrahlung auf die Anzahl der grünen Pixel für die einzelnen Zeitpunkte 16 h ($p = 0,0032$), 24 h ($p = 0,0025$), 40 h ($p < 0,0001$) und 48 h ($p = 0,0004$).

Post-Hoc-Analysen mit Dunnett-Korrektur verglichen für die einzelnen Zeitpunkte jeweils die einzelnen Strahlendosen (2,4,8 Gy) mit der nicht bestrahlten Kontrolle (0 Gy) für jede einzelne Zelllinie. Zum Messzeitpunkt 16 h ergaben sich für MDA-MB-231 +EV signifikant niedrigere Pixelzahlen bei 2 Gy ($p = 0,0018$) und 8 Gy ($p = 0,0162$) im Vergleich zu 0 Gy, für MDA-MB-231 +anti-miR-221 keine signifikante Abnahme der Pixelanzahl nach Bestrahlung mit 2, 4 oder 8 Gy. Zum Messzeitpunkt 24 h zeigten sich bei MDA-MB-231 +EV ebenfalls bei 2 Gy ($p = 0,0026$) und 8 Gy ($p = 0,0038$) signifikant höhere Pixelzahlen im Vergleich zu 0 Gy, bei MDA-MB-231 +anti-miR-221

Ergebnisse

konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen bestrahlten (2,4,8 Gy) und nicht bestrahlten Zellen (0 Gy) gefunden werden. Zum Messzeitpunkt 40 h zeigten sich bei MDA-MB-231 +EV im Vergleich zu 0 Gy bei 2 Gy ($p=0,0017$), 4 Gy ($p=0,0393$) und 8 Gy ($p<0,0001$) signifikant niedrigere Pixelzahlen, bei MDA-MB-231 +anti-miR-221 ergaben sich keine signifikant unterschiedlichen Pixelwerte bei Bestrahlung. Zum Messzeitpunkt 48 h zeigten sich bei MDA-MB-231 +EV für 2 Gy ($p=0,0058$) und 8 Gy ($p=0,0002$) signifikant niedrigere Pixelwerte als bei 0 Gy, wobei bei MDA-MB-231 +anti-miR-221 zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen keine signifikant unterschiedlichen Pixelwerte detektiert werden konnten.



Ergebnisse

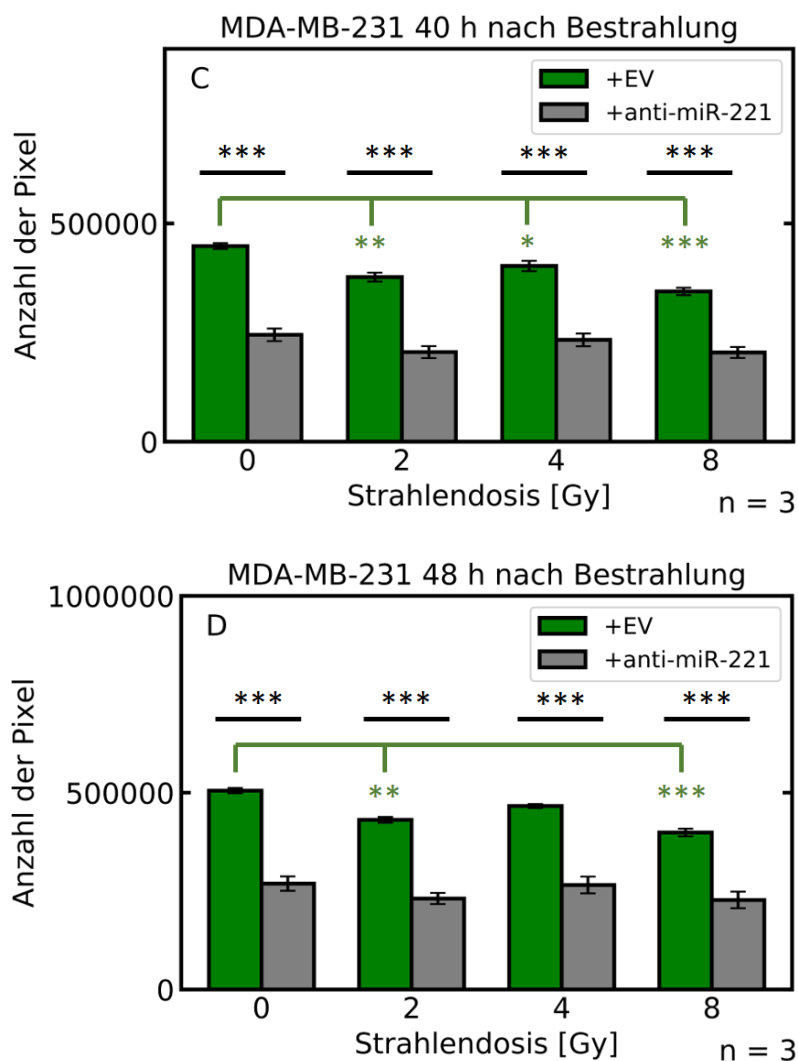


Abbildung 25. Anzahl der Pixel der Zelllinie MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down (grau) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grün) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung. Die gemessene Pixelanzahl dient als Maß für die Migration und ist in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.

Zusammenfassend konnte in beiden Zelllinien unter miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221, MDA-MB-231 +EV) signifikant höhere Migration beobachtet werden als unter niedriger miR-221-Expression (SKBR3 +EV, MDA-MB-231 +anti-miR-221). Dieser Effekt einer höheren Migration bei miR-221-Überexpression blieb in beiden Zelllinien bei Bestrahlung bestehen.

Unter Bestrahlung blieb die Migration bei SKBR3 sowohl bei miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221) als auch ohne (SKBR3 +EV) konstant. Bei MDA-MB-231 führte

Ergebnisse

Bestrahlung allgemein zu einem signifikanten Abfall der Migration. Zur Prüfung der Plausibilität der beobachteten Signifikanzen dient das folgende Kapitel.

4.5 Vergleich des Effekts von miR-221-Überexpression auf die Proliferation und Migration

Um die statistischen Ergebnisse für der Zellwachstums- und Migrationsversuche sinngemäß interpretieren zu können, wurden die Messergebnisse nochmals gegenübergestellt. Die bei den Migrationsassays gemessene Fläche an grünen Zellen hängt zwangsläufig von der Zellzahl ab. Demnach müssen die in 4.3 gemessenen Zellzahlen mit der in 4.4 gemessenen Fläche des Zellrasens verglichen werden.

Um die Proliferation und Migration zwischen einzelnen Strahlendosen und zwischen den miR-221 überexprimierenden Zellen und der Kontrolle besser vergleichen zu können, wurden die Rohwerte jeder in Kapitel 4.3 und 4.4 gezeigten Grafik auf die nicht bestrahlte, mit dem Leervektor transduzierte Kontrolle (SKBR3 +EV 0 Gy oder MDA-MB-231 +EV 0 Gy) normiert. Als Resultat wurde ein relativer Proliferations- bzw. Migrationsindex abgebildet.

4.5.1 Konstanter Effekt von miR-221-Überexpression auf die Migration bei Bestrahlung bei abnehmendem Effekt auf das Zellwachstum in SKBR3

In Abbildung 26 sind die relative Proliferation und Migration für SKBR3 +miR-221 und SKBR3 +EV für die Strahlendosen 0, 2, 4 und 8 Gy normiert auf die nicht bestrahlten SKBR3 +EV zu den Zeitpunkten 24 h (A,B), 48 h (C,D) und 72 h (E,F) gegenübergestellt.

Bei den Zellwachstumsversuchen waren 48 h und 72 h nach Bestrahlung statistisch signifikante Abnahmen der mittleren Zellzahl in der mehrfaktoriellen Varianzanalyse ermittelt worden. 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy war jeweils ein Abfall der mittleren Zellzahl um ein Fünftel der nicht bestrahlten Kontrolle sowohl bei SKBR3 + miR-221 (von $110,0 \pm 4,2$ % bei 0 Gy auf $91,3 \pm 8,2$ % bei 8 Gy) als auch bei SKBR3 +EV (von $100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $82,1 \pm 5,5$ % bei 8 Gy) zu beobachten. 72 h nach Bestrahlung mit 8 Gy war sogar ein Abfall um etwa ein Drittel der nicht bestrahlten Kontrolle bei SKBR3 +miR-221 (von $126,9 \pm 2,8$ bei 0 Gy auf $76,1 \pm 1,9$ % bei 8 Gy) und bei SKBR3 +EV ($100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $70,0 \pm 2,4$ % bei 8 Gy) zu verzeichnen. 24 h nach Bestrahlung mit 8 Gy war eine nicht signifikante Abnahme der mittleren Zellzahl um

Ergebnisse

etwa ein Zehntel der nicht bestrahlten Kontrolle bei SKBR3 +miR-221 (von $110,2 \pm 10,3$ % bei 0 Gy auf $100,9 \pm 5,8$ %) und bei SKBR3 +EV (von $100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $89,9 \pm 0,8$ % bei 8 Gy) zu beobachten.

Im Migrationsassay hingegen waren zu keinem der drei Zeitpunkte statistisch signifikante Veränderungen der Migration bei Bestrahlung zu berechnen. 24 h nach Bestrahlung mit 8 Gy war der mittlere Migrationsindex bei SKBR3 +EV geringfügig höher (von $100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $112,0 \pm 13,2$ % bei 8 Gy) und bei SKBR3 +miR-221 geringfügig niedriger (von $145,4 \pm 4,7$ % bei 0 Gy auf $133,0 \pm 33,2$ % bei 8 Gy) als ohne Bestrahlung. 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy war der mittlere Migrationsindex sowohl bei SKBR3 +miR-221 (von $185,1 \pm 25,3$ % bei 0 Gy auf $220,0 \pm 72,1$ % bei 8 Gy) als auch bei SKBR3 + EV (von $100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $120,7 \pm 23,0$ % bei 8 Gy) sogar höher als ohne Bestrahlung. 72 h nach Bestrahlung mit 8 Gy war der mittlere Migrationsindex bei SKBR3 +EV geringfügig niedriger (von $100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $89,4 \pm 7,4$ % bei 8 Gy) und bei SKBR3 +miR-221 geringfügig höher (von $138,7 \pm 4,7$ % bei 0 Gy auf $141,3 \pm 11,7$ % bei 8 Gy).

Während die Zellzahl bei Bestrahlung zunehmend sinkt, scheint das migrative Potenzial der SKBR3 bei Bestrahlung verhältnismäßig konstant zu bleiben. Zieht man noch die Überlegung hinzu, dass die beim Migrationsassay gemessene Fläche an grünen Zellen automatisch durch eine abnehmende Zellzahl sinkt, deutet die Beobachtung, dass die Migration bei Bestrahlung trotz der dezimierten Zellzahl konstant bleibt, auf eine mögliche mögliche Verstärkung des Migrationspotenzials durch Bestrahlung hin.

Ergebnisse

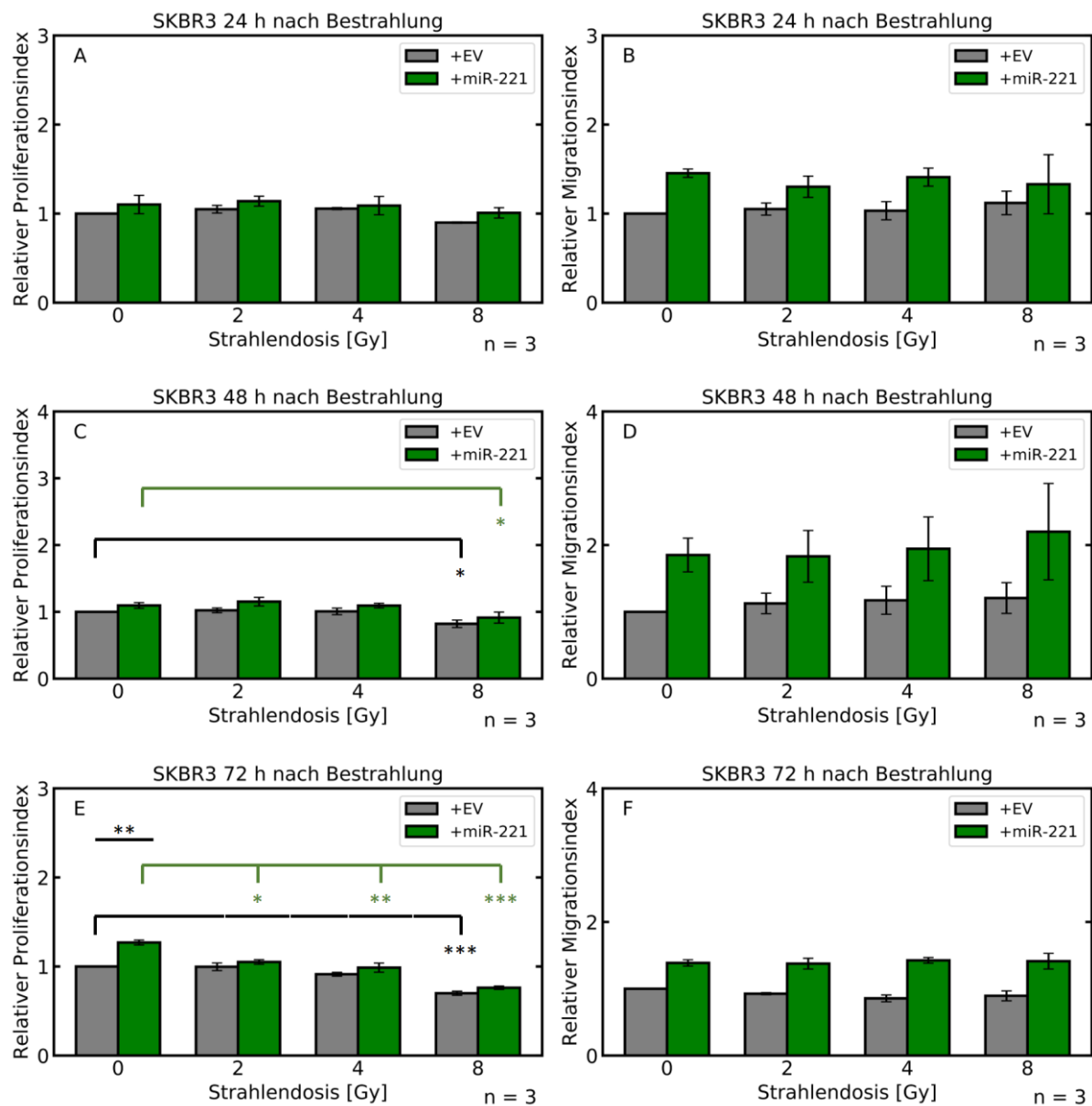


Abbildung 26. Relative Proliferation (A,C,E) und Migration (B,D,F) von SKBR3 +EV (grau) und SKBR3 +miR-221 (grün) 24 (A,B), 48 (C,D) und 72 (E,F) h nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy (horizontal). Normalisiert wurde auf SKBR3 +EV 0 Gy des jeweiligen Zeitpunktes. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.

4.5.2 Konstanter Effekt von miR-221-Knock-down auf die Migration bei Bestrahlung bei abnehmendem Effekt auf das Zellwachstum von MDA-MB-231

In Abbildung 27 sind die relative Proliferation und Migration für MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221 für die Strahlendosen 0, 2, 4 und 8 Gy normiert auf die nicht bestrahlten MDA-MB-231 +EV zu den Zeitpunkten 24 h (A,B) und 48 h (C,D) gegenübergestellt.

Für beide Zeitpunkte waren bei Bestrahlung in der mehrfaktoriellen Varianzanalyse statistisch signifikante Abnahmen sowohl bezüglich der relativen Proliferation (A,C) als auch der relativen Migration (B,D) zu beobachten. Die Zellzahlen im Proliferationsassay fielen 24 h nach Bestrahlung mit 8 Gy um über die Hälfte im Vergleich zu den nicht bestrahlten Zellen (bei MDA-MB-231 +EV von $100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $42,1 \pm 1,7$ % bei 8 Gy; bei MDA-MB-231 +anti-miR-221 von $98,0 \pm 6,0$ % bei 0 Gy auf $41,7 \pm 4,6$ % bei 8 Gy). 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy fielen die Zellzahlen sogar um zwei Drittel im Vergleich zu den nicht bestrahlten Zellen (bei MDA-MB-231 +EV von $100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $35,0 \pm 1,5$ % bei 8 Gy; bei MDA-MB-231 +anti-miR-221 von $89,0 \pm 33,1$ % bei 0 Gy auf $33,1 \pm 2,6$ % bei 8 Gy). Im Migrationsassay hingegen nahm die relative Migration 24 h nach Bestrahlung mit 8 Gy im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle um etwa ein Fünftel bei MDA-MB-231 +EV (von $100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $78,6 \pm 6,6$ % bei 8 Gy) und ein Zehntel bei MDA-MB-231 +anti-miR-221 (von $61,9 \pm 3,7$ % bei 0 Gy auf $54,2 \pm 3,1$ % bei 8 Gy) ab. 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy nahm die relative Migration im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle um etwa ein Fünftel sowohl bei MDA-MB-231 +EV (von $100,0 \pm 0,0$ % bei 0 Gy auf $78,9 \pm 1,7$ % bei 8 Gy) als auch bei MDA-MB-231 +anti-miR-221 (von $53,2 \pm 3,2$ % bei 0 Gy auf $44,9 \pm 3,5$ % bei 8 Gy) ab.

Ergebnisse

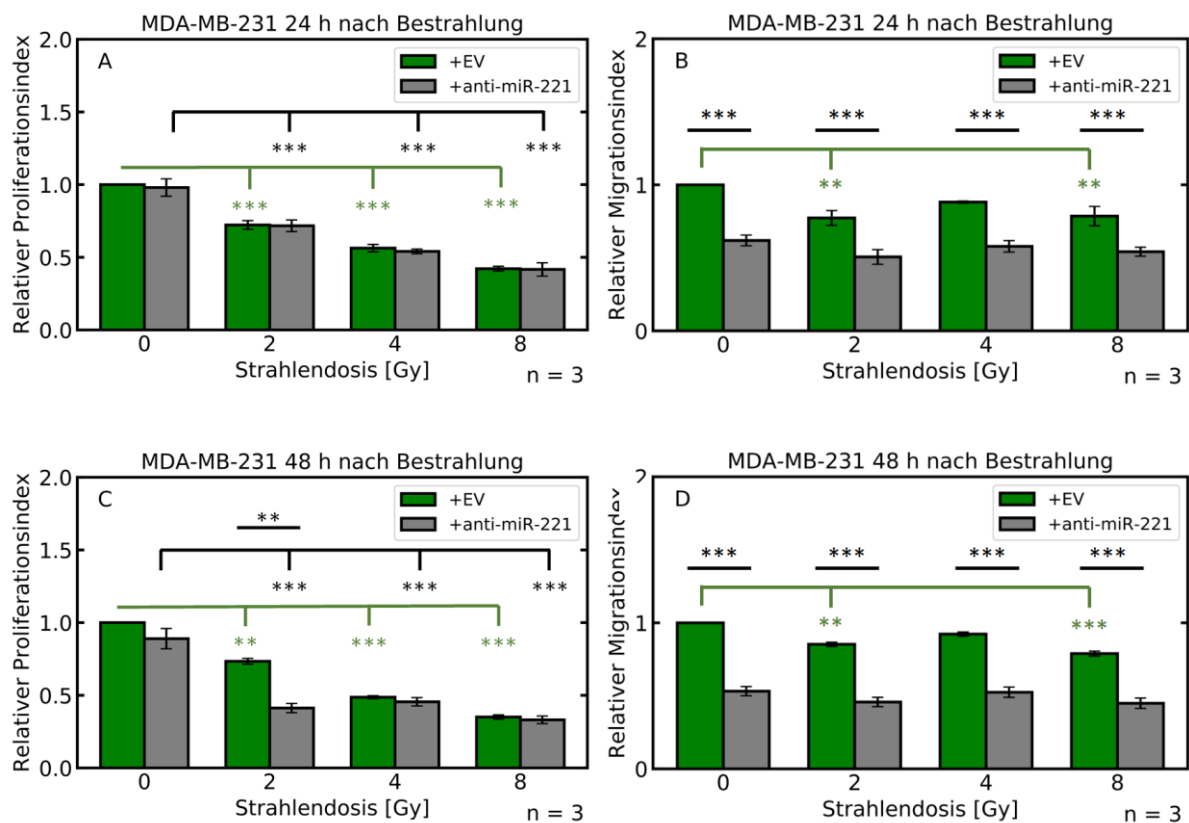


Abbildung 27. Relative Proliferation (A,C) und Migration (B,D) von MDA-MB-231 +EV (grün) und MDA-MB-231 +anti-miR-221 (grau) 24 (A,B) und 48 (C,D) nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy (horizontal). Normalisiert wurde auf MDA-MB-231 +EV 0 Gy des jeweiligen Zeitpunktes. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.

Somit sinkt bei Bestrahlung die relative Proliferation wesentlich drastischer als die relative Migration. Zieht man noch die Überlegung hinzu, dass die beim Migrationsassay gemessene Fläche an grünen Zellen automatisch durch eine abnehmende Zellzahl sinkt, deutet die Beobachtung, dass die Migration bei Bestrahlung trotz der dezimierten Zellzahl verhältnismäßig konstant bleibt, auf eine mögliche Verstärkung des Migrationspotenzials durch Bestrahlung hin.

4.6 Konstante Proteinexpression des uPAR bei miR-221-Überexpression und Bestrahlung in SKBR3

Um zu analysieren, ob miR-221-Überexpression und Bestrahlung die Proteinexpression des uPAR in SKBR3 beeinflussen, wurden Western Blots durchgeführt. Statistische Analysen ergaben jedoch keine signifikanten Veränderungen der uPAR-Expression zwischen SKBR3 +miR-221 und SKBR3 +EV.

Ergebnisse

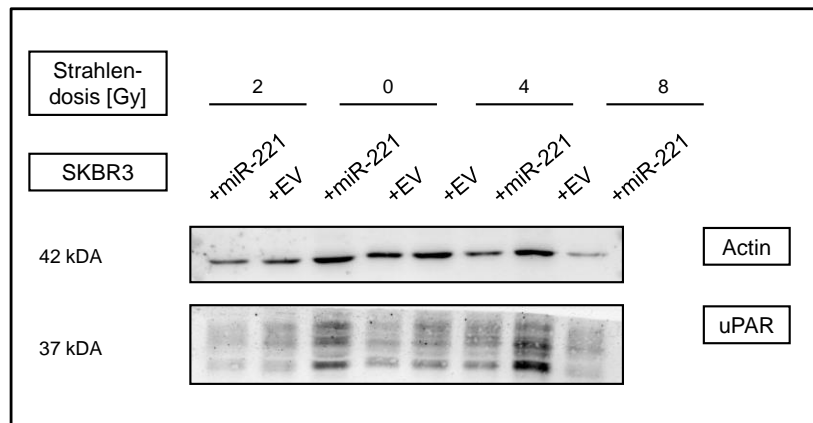
Auch für verschiedene Bestrahlungsdosen konnten keine signifikanten Veränderungen der uPAR-Expression detektiert werden.

Die Western Blots sind für die Zeitpunkte 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h in Abhängigkeit von der Bestrahlung (0, 2, 4 und 8 Gy) in Abbildung 28 dargestellt.

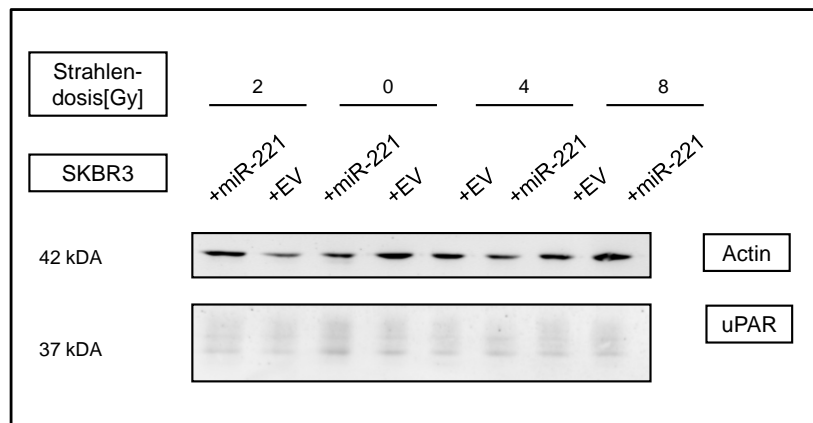
In Abbildung 29 sind die Mittelwerte der uPAR-Expression bis auf eine Ausnahme (SKBR3 +EV 4 Gy 48 h nach Bestrahlung in B) bei bestrahlten und/ oder miR-221 überexprimierenden SKBR3 höher als die der unbestrahlten Kontrolle EV. Die Mittelwerte \pm SEM bewegen sich dabei in einem Rahmen zwischen 0.9749543 ± 0.02724846 (SKBR3 +EV 4 Gy 48 h nach Bestrahlung in B) und 2.615 ± 1.295 (SKBR3 +miR-221 8 Gy 48 h nach Bestrahlung in B) im Vergleich zur Kontrolle SKBR3 +EV 0 Gy mit $1,0 \pm 0,0$.

Die statistische Auswertung mit mehrfaktorieller ANOVA ergab keinen signifikanten Einfluss der Faktoren miR-221 und Bestrahlung für die einzelnen Zeitpunkte. Auch die Post-Hoc-Tests mit Sidak- oder Dunnett-Korrektur zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgrößen.

A uPAR Expression 24 h nach Bestrahlung



B uPAR Expression 48 h nach Bestrahlung



C uPAR Expression 72 h nach Bestrahlung

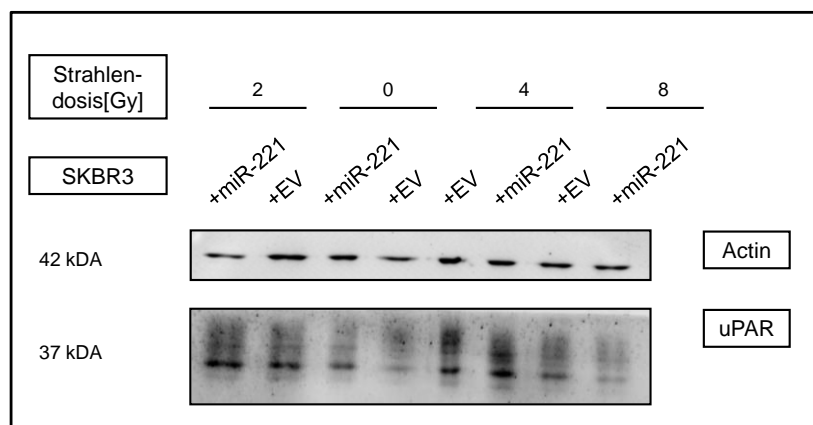


Abbildung 28. Western Blot von uPAR und Actin (Housekeeper) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung (0, 2, 4 und 8 Gy) in SKBR3 +miR-221 und SKBR3 +EV. Gezeigt ist jeweils ein biologisches Replikat zur Veranschaulichung. Alle Proben weisen uPAR-Expression auf. Es ist eine Tendenz erkennbar, dass SKBR3 +miR-221 höhere Expression als die Kontrolle EV bei 0 Gy zeigen.

Ergebnisse

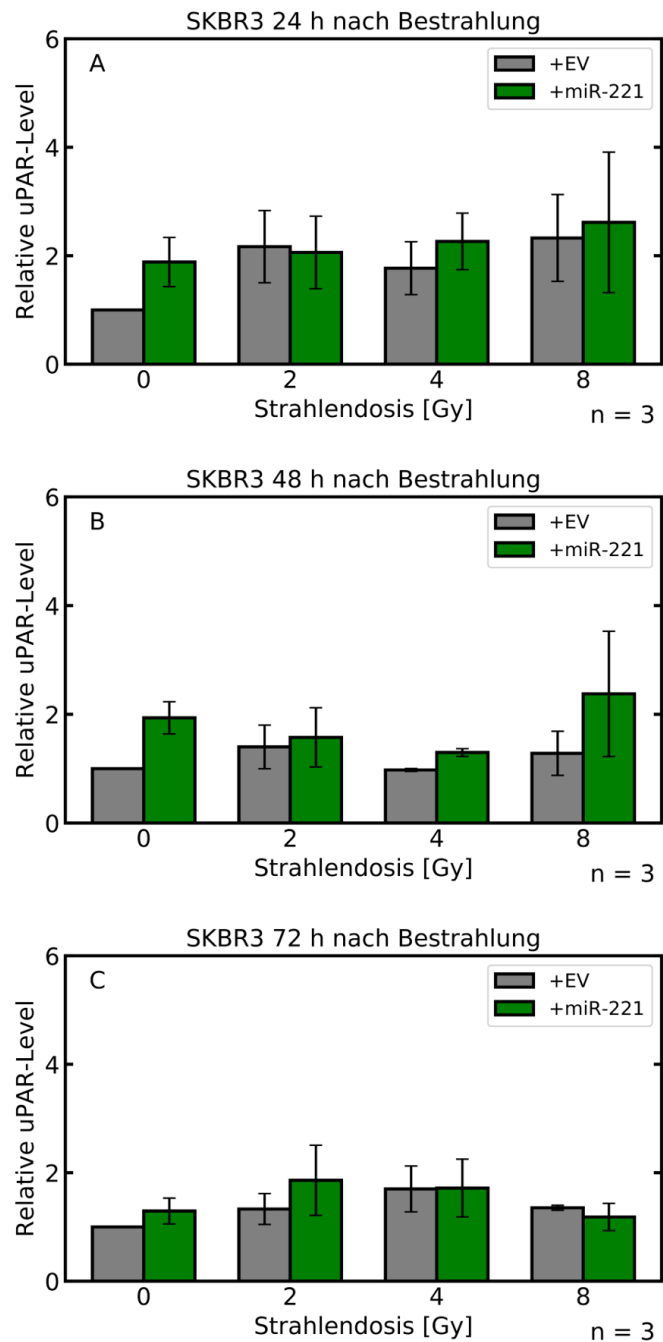


Abbildung 29. Relative uPAR-Expression normalisiert auf Actin und die unbestrahlte Kontrolle SKBR3 +EV zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) nach Bestrahlung (0, 2, 4 und 8 Gy) in SKBR3 +miR-221 und SKBR3 +EV. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten. Für eine statistische Beurteilung wurden zunächst mehrfaktorielle ANOVA zu den drei Zeitpunkten durchgeführt. Diese ergaben keinen signifikanten Gesamteinfluss der Faktoren miR-221 und Bestrahlung auf die uPAR-Expression.

5 DISKUSSION

5.1 Effekt von Bestrahlung auf miR-221-Expression

Neben der Kontrolle der tatsächlichen miR-221-Überexpression in den SKBR3 +miR-221 im Gegensatz zu den SKBR3 + EV und neben der Kontrolle des miR-221-Knock-downs in den MDA-MB-231 +anti-miR-221 im Gegensatz zu den MDA-MB-231 +EV wurde in den SKBR3 zusätzlich die Auswirkung von Bestrahlung auf die miR-221-Expression untersucht. In den statistischen Analysen konnte nach Bestrahlung insgesamt keine signifikante Veränderung der miR-221-Expression festgestellt werden. Dies erhöht die Aussagekraft der Proliferations- und Migrationsexperimente, da die miR-221-Überexpression in den SKBR3 +miR-221 im Vergleich zu den SKBR3 +EV auch bei Bestrahlung weiterhin bestehen bleibt.

Vergleicht man diese Beobachtungen mit Veränderungen der miR-221-Expression durch Bestrahlung in der Literatur, so wurde ein Einfluss von Bestrahlung auf die miR-221-Expression in Brustkrebszellen noch nicht untersucht. Allerdings wurden bei Zellen aus anderen Geweben sowohl Fälle, bei denen die miR-221-Expression durch Bestrahlung erhöht wurde (Girardi et al., 2012; Metheetrairut & Slack, 2013; Templin et al., 2011; Vincenti et al., 2011), als auch Fälle, bei denen die miR-221-Expression durch Bestrahlung gesenkt wurde (Girardi et al., 2012; Leung et al., 2014), beschrieben.

In Endothelzellen der Nabelvene konnte bereits eine Stunde nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlung signifikant höhere miR-221-Expression gemessen werden (Vincenti et al., 2011). In Lymphozyten, die aus peripherem Blut von Patienten gewonnen wurden, konnte vier Stunden nach Bestrahlung mit 0,2 Gy γ -Strahlen eine höhere miR-221-Expression als ohne Bestrahlung gezeigt werden. Jedoch war 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy eine niedrigere miR-221-Expression als ohne Bestrahlung gemessen worden, sodass bereits innerhalb dieses Experiment sowohl Hoch- als auch Niederregulation von miR-221 durch Bestrahlung zu beobachten war (Girardi et al., 2012). Bei Patienten, die in Vorbereitung für eine Stammzelltransplantation einer Ganzkörperbestrahlung von 1,25 Gy Röntgenstrahlung ausgesetzt waren, wurde vor und vier Stunden nach Bestrahlung die quantitative miR-221-Expression des peripheren Blutes untersucht. Dabei war

Diskussion

eine höhere miR-221-Expression nach Bestrahlung beobachtet worden (Templin et al., 2011).

In einer Zelllinie von Prostatakrebszellen konnte fünf bis 40 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy eine niedrigere miR-221-Expression als ohne Bestrahlung gemessen werden (Leung et al., 2014). Dieses Experiment ähnelt sowohl von den Messzeitpunkten als auch von den Bestrahlungsdosen dem in dieser Dissertation durchgeführten am meisten. Zudem wurde hier auch eine Tumorzelllinie verwendet, während bei den Experimenten, bei denen eine Hochregulation von miR-221 durch Bestrahlung gezeigt wurde, häufig gesunde Zellen extrahiert wurden.

Dennoch kann weder aus der Literatur noch aus den eigens durchgeführten Experimenten eine definitive Aussage getroffen werden, ob Bestrahlung die miR-221-Expression in Brustkrebszellen verändert. Möglicherweise kann über eine leichte Niederregulation bei hohen Bestrahlungsdosen und längeren Zeiträumen diskutiert werden.

5.2 Effekt von miR-221-Überexpression auf Radiosensibilität

In den klonogenen Überlebenstests wurde die Radiosensibilität der Zelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 zunächst nur mit Leervektor transduziert analysiert. Dabei betrug das Zellüberleben der SKBR3 bei Bestrahlung mit 8 Gy nur noch $5,0 \pm 1,4\%$ der nicht bestrahlten Zellen, was mit der Literatur nachgewiesen übereinstimmt (Cai et al., 2011; Mihatsch et al., 2011; No, Choi, & Kim, 2009). Bei den MDA-MB-231 fiel das klonogene Überleben nach Bestrahlung mit 8 Gy sogar auf $1,3 \pm 0,5\%$ der unbestrahlten Kontrolle, was ebenfalls bereits in Form von ähnlichen Überlebensanteilen um 1 % (Phillips, McBride, & Pajonk, 2006; C. Wang, Jiang, Li, & Hu, 2015) gezeigt worden war.

Hauptsächlich sollte mithilfe der klonogenen Überlebenstests ein Einfluss von miR-221 auf die Radiosensibilität untersucht werden. Der ANOVA F-Test ergab eine signifikante Erhöhung der durch lineare Regression angenäherten Überlebenskurve der SKBR3 mit miR-221-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle. Dies kann als Hinweis auf eine miR-221-vermittelte Radioresistenz verstanden werden. Jedoch ist dieses Ergebnis kritisch zu hinterfragen, da der F-Test für MDA-MB-231 keine signifikanten Unterschiede durch miR-221 feststellen konnte und der Vergleich des

Überlebens bei einzelnen Bestrahlungsdosen weder bei MDA-MB-231 noch bei SKBR3 eine signifikante Erhöhung der Radioresistenz durch hohe miR-221-Level zeigte.

In der Literatur konnte eine Erhöhung der Radioresistenz durch miRNA in Mammakarzinomzellen bereits mehrfach bestätigt werden. So konnten miR-34 in MDA-MB-231 eine Erhöhung der Radioresistenz, welche über DNA-Reparaturmechanismen vermittelt wurde, auslösen (Kato et al., 2009). Weiterhin war miR-144 in MDA-MB-231 und SKBR3 an Prozessen wie Radioresistenz, Proliferation und Migration über eine Interaktion mit dem die Ras-Kaskade inhibierenden PTEN beteiligt (Yu et al., 2015).

PTEN inhibiert die Ras-Kaskade auf der Stufe der durch Ras aktivierten PI3-Kinase und kann somit Radiosensibilität erhöhen (Gupta et al., 2001). miR-221, welche einen direkten Abbau von PTEN vermittelt, konnte bei Magen- und Colonkarzinomzellen zu Radioresistenz führen (Xue et al., 2013; C. Zhang, Wang, Kang, Du, & Pu, 2009). Auch bei Glioblastomzellen konnte eine Radioresistenz mit miR-221 in Verbindung gebracht werden (C. Zhang et al., 2009). Sogar unabhängig von PTEN konnte eine miR-221-getriggerte Reparatur des strahleninduzierten DNA-Schadens in Glioblastomzellen beobachtet werden (W. Li et al., 2014). Somit ist die Vorstellung einer miR-221-vermittelten Radioresistenz sowohl mit Teilen der eigenen experimentellen Ergebnisse, bereits veröffentlichten Beobachtungen und potenziellen molekularen Mechanismen vereinbar.

5.3 Effekt von miR-221-Überexpression und Bestrahlung auf die Zellzahl

Sowohl in SKBR3 als auch in MDA-MB-231 konnte 48 h und 72 h nach Bestrahlung eine signifikante Erhöhung der Zellzahl unter miR-221-Überexpression ermittelt werden. Durch negative Regulation des Tumorsuppressors p27^{kip1} waren bei miR-221-Überexpression bereits höhere Proliferationsraten und höheres Zellüberleben bei Leberkarzinom-, Mammakarzinom- und Glioblastomzellen beobachtet worden (Fornari et al., 2008; Le Sage et al., 2007; Sarkar et al., 2013). In Pancreaszellen konnten neben p27^{kip1} auch bei p57^{kip2}, PUMA und PTEN, welche als Tumorsuppressoren unkontrollierte Proliferation und Zellüberleben verhindern, niedrigere Expression unter miR-221 gezeigt werden (Sarkar et al. 2013). Eine

Diskussion

verringerte Apoptose unter miR-221, welche insbesondere durch miR-221-vermittelten PUMA-Abbau zu erklären war, wurde in Epithelzellen und Glioblastomzellen bewiesen (Chun-zhi et al., 2010). Ein durch miR-221 erhöhtes Zellwachstum konnte somit mehrfach bestätigt und durch den gezielten Abbau von Tumorsuppressoren erklärt werden.

In den SKBR3 und MDA-MB-231 72 h nach Bestrahlung mit 2, 4 und 8 Gy konnte ein Verlust der signifikant höheren Zellzahlen durch miR-221, die ohne Bestrahlung gemessen wurden, beobachtet werden. Dies widerspricht der in gastritischen Zellen und Glioblastomzellen beobachteten Radioresistenz durch miR-221, welche u.a. durch DNA-Reparaturmechanismen zustande kommt und bereits in Kapitel 5.2 ausführlich diskutiert wurde (Chun-zhi et al., 2010; C. Zhang et al., 2009).

Zum näheren Verständnis, wie miR-221 die Zellteilung und damit das Zellwachstum beeinflussen kann, wurden Studien durchgeführt, die den Zusammenhang von miR-221 und Zellzyklusphasen analysierten. Unter anti-miR-221 konnte mehrfach ein Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase beobachtet werden (Chun-zhi et al., 2010; Y. Li et al., 2014; C. Zhang et al., 2009) sowie ein S-Phase-Eintritt unter miR-221 (Y. Li et al., 2014). Somit bestätigen auch Studien auf Zellzyklusebene vermehrte Zellteilung unter verstärkter miR-221-Expression.

5.4 Effekt von miR-221-Überexpression und Bestrahlung auf die Migration

Im Wundheilungstest konnte sowohl in SKBR3 als auch in MDA-MB-231 hohe miR-221-Expression signifikant höhere Migration in drei unabhängigen Experimenten beobachtet werden. Dabei wurde ein signifikanter Einfluss des Faktors miR-221-Überexpression auf die Migration mittels mehrfaktorieller ANOVA bereits nach 16 h (MDA-MB-231) bzw. 24 h (SKBR3) ermittelt, während ein signifikanter Einfluss von miR-221 auf die Proliferation mittels ANOVA erst ab 48 h nach Bestrahlung für beide Zelllinien erkennbar war.

Eine unter hohen miR-221-Expressionsleveln beobachtete Migration konnte bereits in Prostatazellen (Yang et al., 2014), Glioblastomzellen (Quintavalle et al., 2012), Lungenkrebszellen (Acunzo et al., 2012), Nierenzellen (G.-J. Lu et al., 2015) und auch in Brustkrebszellen (B. Li et al., 2016; Y. Li et al., 2014; Stinson et al., 2011) nachgewiesen werden.

Diskussion

Für diese miR-221-vermittelte Migration wurden dabei zahlreiche Erklärungsansätze in Form von möglichen Signalwegen, in die miR-221 regulierend eingreift, veröffentlicht, wobei die in Brustkrebszellen nachgewiesenen Mechanismen genauerer Betrachtung unterzogen wurden.

Ein zentraler Ansatzpunkt, über den zahlreiche miRNAs regulierend EMT beeinflussen, ist die ZEB1/2, welche das EMT unterdrückende E-Cadherin inhibiert und somit erhöhte Migration und Invasion induziert (L. Wang & Wang, 2012). So kann eine bei Tumoren häufig vorkommende Niederregulation der miR-200-Familie, welche ZEB1/2 direkt inhibiert, eine EMT begünstigen (Korpál, Lee, Hu, & Kang, 2008; S.-M. Park, Gaur, Lengyel, & Peter, 2008). Auch bei miR-221/222 konnte eine positive Regulation des ZEB1/2 über direkte Interaktion mit TRPS1 und dadurch erhöhte EMT u.a. in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 nachgewiesen werden (Stinson et al., 2011). Dies lässt sich mit den im Experiment gemessenen höheren Migrationsraten der MDA-MB-231 im Vergleich zur MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down vereinbaren.

Mit dem Nachweis einer positiven Regulation des ADIPOR1 durch miR-221/222 konnte ein weiterer miR-221-vermittelter Signalweg für EMT gezeigt werden (Hwang et al., 2013). ADIPOR1-Überexpression führt zu erhöhter Invasion und Migration (Taliaferro-Smith et al., 2009).

Auch der Migrationsprozesse auslösende lösliche uPAR (Isoform 2) konnte als positiv reguliertes Target der miR-221 identifiziert werden, was im Kapitel 5.5 ausführlicher diskutiert wird (Falkenberg et al., 2015). Für miR-221 überexprimierende Brustkrebszellen (MDA-MB-231) konnten infolgedessen vermehrte uPAR-Expression beobachtet werden. Zudem wurden bei miR-221-Überexpression erhöhte uPAR-Expression sowie erhöhte Invasionsraten in SKBR3 observiert (Falkenberg, Anastasov, Braselmann, et al., 2013). Dies passt zu den im Migrationsversuch gemessenen erhöhten Migrationsraten bei SKBR3 und MDA-MB-231 mit miR-221-Überexpression.

Zusätzlich zu miR-221 wurde Bestrahlung als weiterer Faktor eines potenziellen Einflusses auf die Migration von SKBR3 und MDA-MB-231 getestet.

Diskussion

In den SKBR3 +EV und +miR-221 konnte keine signifikante Änderung der Migration durch Bestrahlung nachgewiesen werden. Die bei miR-221-Überexpression gemessene starke Migration blieb demnach auch nach Bestrahlung mit bis zu 8 Gy bestehen. Angesichts der bei hohen Bestrahlungsdosen signifikant stark abnehmenden Zellzahlen in 4.3 lässt sich jedoch die Vermutung anstellen, dass die bei hoher Dosis verbliebenen Zellen in einem Migrationsexperiment, in dem für alle Bestrahlungsdosen dieselbe Zellzahl ausgesät wurde, ein höheres Migrationspotenzial aufweisen müssen, um im Vergleich zur unbestrahlten Dosis einen Zellrasen von gleichbleibender Migrationsfläche zu bilden. Demzufolge könnte zusätzlich zur miR-221-Überexpression auch Bestrahlung zur Verstärkung der Migration beitragen.

In den MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 konnte eine zwar signifikante, aber prozentual gesehen geringfügige Abnahme der Migration durch Bestrahlung nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.5). Hier wird vermutet, dass die Abnahme der Migration nach Bestrahlung damit zusammenhängt, dass nach Bestrahlung – wie die Proliferationsassays zeigten – die Zellzahl auf weniger als die Hälfte im Vergleich zu den nicht bestrahlten Zellen abnahm und somit ein stark gelichteter Zellrasen zur Bestimmung der Migration diene. Betrachtet man nun die Tatsache, dass trotz der bei 8 Gy stark minimierten Zellzahl nahezu konstante Migration im Vergleich zu den nicht bestrahlten Zellen gemessen werden konnte, erscheint es durchaus möglich, dass auch hier Bestrahlung Migrationsprozesse geringfügig verstärken könnte.

Ein durch Bestrahlung hervorgerufenes Migrationspotenzial wurde bereits mehrfach sowohl in Zellkulturversuchen als auch in Patientengewebe nachgewiesen (Moncharmont et al., 2014). Migrationsexperimente mit MDA-MB-231 mit Bestrahlung mit 10 Gy wurden bereits durchgeführt und zeigten 24 Stunden nach Bestrahlung verstärkte Migration im Vergleich zu nicht bestrahlten Zellen (De Bacco et al., 2011).

Da laut diskutierter Ergebnisse sowohl miR-221 als auch Bestrahlung die Migration und folglich potenziell auch das Metastasenrisiko beim Mammakarzinom erhöhen könnte, kann miR-221 als Biomarker für Migration in Betracht gezogen werden. Im Hinblick auf eine personalisierte Strahlentherapie gewinnen bei Patienten mit miR-221-Überexpression, bei denen nachweislich Strahlentherapie zu keiner relevanten

Senkung der Migration führt, Alternativtherapien zur Senkung der Migration an Bedeutung. Eine genauere Erforschung der Wirkmechanismen von miR-221 könnte neue Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapien solcher Patienten ermöglichen, weswegen der uPAR in seinem Ansprechen auf Bestrahlung im Rahmen des Forschungsprojekts weiter untersucht wurde.

5.5 Effekt von miR-221-Überexpression und Bestrahlung auf die uPAR-Expression

Die uPAR-Expression wurde in SKBR3 mit miR-221-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle mittels Leervektor nach Einwirkung verschiedener Strahlendosen analysiert. Die ANOVA ergab weder für den Faktoren Bestrahlung noch für den Faktor miR-221 signifikante Veränderungen der uPAR-Expression.

Über den Zusammenhang von miR-221-Überexpression und uPAR-Expression konnte in der Literatur von Falkenberg et al. eine direkte Interaktion der miR-221 mit der löslichen Isoform des uPAR festgestellt werden, welche zu einer Erhöhung desselbigen u.a. in der verwendeten Brustkrebszelllinie SKBR3 führte (Falkenberg, Anastasov, Braselmann, et al., 2013; Falkenberg et al., 2015). Da mittels Western Blot lediglich der gesamte uPAR unabhängig von seinen Isoformen detektiert werden konnte, trug dies möglicherweise zur wenig deutlichen Ausprägung der uPAR-Erhöhung bei miR-221-Überexpression im Experiment bei. Weiterhin diesen Zusammenhang zwischen miR-221- und uPAR-Expression verstärkend kommt hinzu, dass in miR-221-überexprimierenden Zelllinien wie MDA-MB-231 und BT549 auch uPAR-Überexpression beobachtet werden konnte (Falkenberg et al., 2015). Diese Erhöhung des uPAR in MDA-MB-231 stellt einen potenziellen Erklärungsansatz dessen in den Migrationsversuchen beobachteten hohen Migrationspotenzials dar. Eine durch dysregulierte miRNA hervorgerufene Erhöhung von uPA und eine damit verbundene Erhöhung migrativer und invasiver Prozesse konnten in MDA-MB-231 bereits für die miR-193b festgestellt werden (X. Li, Yan, & Shao, 2009).

Betrachtet man den Einfluss von Bestrahlung auf die uPAR-Expression, waren mittels ANOVA keine signifikanten Veränderungen erkennbar. Vergleicht man die Ergebnisse mit der Literatur, so konnte eine unter Bestrahlung observierte Erhöhung des uPAR bereits bei Melanomzellen (Rofstad, Mathiesen, & Galappathi, 2004),

Diskussion

Meningeomzellen (Kargiotis et al., 2008; Rao Gogineni et al., 2010) und Medulloblastomzellen (Nalla et al., 2010) gezeigt werden. Der Mechanismus, über den Bestrahlung möglicherweise zu einer vermehrten Expression des uPAR führen kann, ist noch weitgehend unklar. Es existiert jedoch die Theorie, dass die durch Bestrahlung verursachte Hypoxie eine zentrale Rolle bei der uPAR-Expression innehat (Rofstad et al., 2004).

Es ist anzumerken, dass die Ergebnisse in 4.6 eine sehr große Streuung mit folglich großen Standardabweichungen aufwiesen und man für erhöhte Ergebnisgenauigkeit gegebenenfalls die Versuchsbedingungen verändern sollte. So könnte beispielsweise ein Auftragen aller biologischen Replikate auf eine große Gelplatte bessere Vergleichbarkeit erzielen. Demnach ist in diesem Fall der Literatur zu miR-221-Expression und uPAR mehr Plausibilität zuzuschreiben als den gemessenen Ergebnissen. Zusätzlich zu dem uPAR-Signalweg gibt es eine Vielzahl weiterer Signalwege, über die miR-221-Überexpression zu verstärkter Migration führen kann (siehe 5.4), deren genauere Charakterisierung zu neuen therapeutischen Targets führen könnte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Dissertation war, die miR-221 als potenziellen Biomarker für die Strahlentherapie von Brustkrebs zu untersuchen. In *in vitro* Experimenten wurde untersucht, wie Bestrahlung und miR-221 in den Brustkrebszelllinien SKBR3 und MDA-MB-231 interagieren und sich auf Proliferation und Migration auswirken.

In die SKBR3 wurde mittels lentiviraler Transduktion ein Vektor, der Überexpression von miR-221 gewährleistet, eingebracht und mit den weniger miR-221 exprimierenden, mit einem Leervektor transduzierten SKBR3, verglichen. Bei den MDA-MB-231, welche bereits miR-221 überexprimieren, wurde mittels lentiviraler Transduktion ein Knock-down der miR-221 vorgenommen, um dann einen Vergleich mit den MDA-MB-231, die lediglich mit einem Leervektor transduziert waren, anzustellen.

Die Bestrahlung beeinflusste die miR-221-Expression in den SKBR3 nicht signifikant.

Im klonogenen Zellüberlebenstest erhöhte miR-221-Überexpression in den SKBR3 geringfügig die Strahlenresistenz, in den MDA-MB-231 jedoch nicht.

Die miR-221-Überexpression führte sowohl in den SKBR3 als auch in den MDA-MB-231 zu signifikant höherem Zellwachstum. Eine Bestrahlung führte sowohl in miR-221 überexprimierenden als auch den nicht miR-221 überexprimierenden Zellen zu einem signifikanten Abfall der Zellzahl, der bei den MDA-MB-231 stärker ausgeprägt war.

Die miR-221-Überexpression führte sowohl in den SKBR3 als auch in den MDA-MB-231 zu signifikant verstärkter Migration. Zum ersten Mal wurde untersucht, wie sich die Kombination von Bestrahlung und miR-221-Überexpression auf die Migration auswirkt. Die signifikant stärkere Migration der miR-221 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den nicht miR-221 überexprimierenden blieb bis zu Strahlendosen von 8 Gy bestehen.

Somit kann miR-221 als Biomarker für eine erhöhte Migration in Betracht gezogen werden. Im Hinblick auf eine personalisierte Strahlentherapie bedeutet dies, dass bei Patienten mit miR-221-Überexpression zusätzlich zur Bestrahlung weitere Therapiemöglichkeiten in Betracht gezogen werden sollten, da Bestrahlung alleine nicht ausreicht, um die Migration zu senken.

Zusammenfassung

Im nächsten Schritt müssen die Ergebnisse in einem Mausmodell verifiziert werden. Von besonderem Interesse wäre hier, ob miR-221-Überexpression nicht nur zu verstärkter Migration in vitro, sondern auch zu vermehrter Metastasenbildung in vivo führt. Anschließend sind klinische Studien mit Patienten unerlässlich, zum einen, um die Interaktion von miR-221 und Bestrahlung auch beim Menschen zu untersuchen, zum anderen, um die Umsetzbarkeit von miR-221 als Biomarker zu testen.

Zudem ist miR-221 als Target für eine Gentherapie in Betracht zu ziehen. In vitro führte der Knock-down von miR-221 in den MDA-MB-231 bereits zu verringerter Migration. Ein Knock-down der miR-221 mittels Lentiviren muss ebenfalls zunächst im Mausmodell und anschließend am Patienten getestet werden. Würde dieser zu seltenerem Auftreten von Metastasen führen, stünde gerade Patienten mit schlechter Prognose eine wirksame, zielgerichtete Tumorthherapie zur Verfügung.

7 ANHANG

7.1 Erklärung der PCR Methode

Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer mengenabhängigen Amplifikation der gewonnenen cDNA durch ein Durchlaufen mehrerer Verdopplungszyklen und einer Kopplung der Reaktion an eine Fluoreszenzemission, welche mithilfe eines Detektors erkannt wird. Dabei wird zu jeder gemessenen Probe ein C_T -Wert ermittelt, welcher definiert wird als der Verdopplungszyklus, bei dem ein Anstieg der Fluoreszenzemission über einen arbiträr gesetzten Grenzwert zu beobachten ist. Jeder niedriger der C_T -Wert, desto höher ist die Menge des gesuchten Gens in der cDNA anzunehmen. Somit ermöglicht der C_T -Wert einen relativen Vergleich der Genexpression zwischen den Proben (Gibson et al., 1996).

7.2 Methode zur Auswertung des Migrationsassays für MDA-MB-231 mittels Python

Zunächst wurde eine Glättung des Bildes mittels einer Faltung mit einem Gaußschen Faltungskernels vorgenommen (Standardverfahren in der Bildbearbeitung), um einzelne zu helle Pixel zu an ihren Umgebungswert anzupassen.

Im Folgenden fand eine Faltung des geglätteten Bildes mit einem Scharr-Kanten-Detektions-Faltungskern statt, der im Folgenden dargestellt ist:

[[-3-3j, 0-10j, +3 -3j]

[-10+0j, 0+ 0j, +10 +0j]

[-3+3j, 0+10j, +3 +3j]]

Dabei handelt es sich um eine Überlagerung zweier Kernels, die jeweils vertikale und horizontale Kanten eines Bildes bestimmen können. Somit sind die vertikalen Kanten im Realteil der resultierenden Matrix und die horizontalen Kanten im Imaginärteil eingeschrieben.

Im Betrag der Matrix finden sich nun sowohl Informationen über vertikale als auch horizontale Kanten.

Im nächsten Schritt wird der Mittelwert des Betragsbildes bestimmt und daraus ein binäres Bild bestimmt, bei welchem nur Pixel als Kante gewertet werden, deren Wert den vorher bestimmten Produkt aus Mittelwert und einem kritischen Wert überschreitet. Nun entsteht ein Bild, bei dem sämtliche erkannte Zellränder markiert

Anhang

sind. Anschließend können die leeren Zellen noch mittels einer Python-Bibliotheksfunktion aufgefüllt werden.

Auf dem resultierenden binären Bild ist nun eine Fläche aus Pixeln zu erkennen, die dem Zellrasen entsprechen. Die Anzahl der als Zelle erkannten Pixel kann dann für jedes individuelle Bild ausgelesen werden.

Diese Normierung berücksichtigte auch die Markierungen und etwaige Kratzer auf dem Bild zuverlässig.

LITERATURVERZEICHNIS

- Acunzo, M., Visone, R., Romano, G., Veronese, A., Lovat, F., Palmieri, D., Bottoni, A., Garofalo, M., Gasparini, P., Condorelli, G., Chiariello, M., & Croce, C. M. (2012). miR-130a targets MET and induces TRAIL-sensitivity in NSCLC by downregulating miR-221 and 222. *Oncogene*, *31*(5), 634-642. doi:10.1038/onc.2011.260
- Agaoglu, F. Y., Kovancilar, M., Dizdar, Y., Darendeliler, E., Holdenrieder, S., Dalay, N., & Gezer, U. (2011). Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumor Biology*, *32*(3), 583-588.
- Allan, J. M., & Travis, L. B. (2005). Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, *5*(12), 943-955.
- Anastasov, N., Hofig, I., Vasconcellos, I. G., Rappl, K., Braselmann, H., Ludyga, N., Auer, G., Aubele, M., & Atkinson, M. J. (2012). Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. *Radiation oncology*, *7*(1), 1-12. doi:Artn 20610.1186/1748-717x-7-206
- Andreasen, P. A., Kjøller, L., Christensen, L., & Duffy, M. J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *International journal of cancer*, *72*(1), 1-22.
- Barnett, G. C., West, C. M., Dunning, A. M., Elliott, R. M., Coles, C. E., Pharoah, P. D., & Burnet, N. G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nature Reviews Cancer*, *9*(2), 134-142.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, *116*(2), 281-297.
- Bartelink, H., Rubens, R., Van der Schueren, E., & Sylvester, R. (1997). Hormonal therapy prolongs survival in irradiated locally advanced breast cancer: a European Organization for Research and Treatment of Cancer Randomized Phase III Trial. *Journal of clinical oncology*, *15*(1), 207-215.
- Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*, *109*(9), 1721-1728.
- Bentzen, S. M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nature Reviews Cancer*, *6*(9), 702-713.

Literaturverzeichnis

- Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Esterni, B., Hermitte, F., Viens, P., & Birnbaum, D. (2008). How basal are triple-negative breast cancers? *International journal of cancer*, *123*(1), 236-240.
- Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *23*, 175-205.
- Cai, Z. L., Chattopadhyay, N., Liu, W. J., Chan, C., Pignol, J. P., & Reilly, R. M. (2011). Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: Comparison with manual counting. *International Journal of Radiation Biology*, *87*(11), 1135-1146.
doi:10.3109/09553002.2011.622033
- Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, *14*(11), 911-915.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., & Reeves Jr, W. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*, *53*(3), 661-674.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the national academy of sciences*, *99*(24), 15524-15529.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 2999-3004.
doi:10.1073/pnas.0307323101
- Cammarata, G., Augugliaro, L., Salemi, D., Agueli, C., Rosa, M. L., Dagnino, L., Civiletto, G., Messina, F., Marfia, A., Bica, M. G., Cascio, L., Florida, P. M., Mineo, A. M., Russo, M., Fabbiano, F., Santoro, A. (2010). Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *American journal of hematology*, *85*(5), 331-339.
- Carey, L., Winer, E., Viale, G., Cameron, D., & Gianni, L. (2010). Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nature reviews Clinical oncology*, *7*(12), 683-692.
- Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., Ollila, D. W., Sartor, C. I., Graham, M. L., & Perou, C. M. (2007). The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical cancer research*, *13*(8), 2329-2334.

Literaturverzeichnis

- Carmeliet, P., Moons, L., Lijnen, R., Baes, M., Lemaître, V., Tipping, P., Drew, A., Eeckhout, Y., Shapiro, S., Lupu, F., & Collen, D. (1997). Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nature genetics*, *17*(4), 439-444.
- Chadwick, K. H., & Leenhouts, H. P. (1973). Evidence for a dose-rate effect in type B spermatogonia of the mouse at high dose-rates. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, *23*(6), 627-629.
- Chapman, H. A. (1997). Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Current opinion in cell biology*, *9*(5), 714-724.
- Cheng, J. C., Chou, C.-H., Kuo, M., & Hsieh, C. (2006). Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF- κ B signal transduction pathway. *Oncogene*, *25*(53), 7009-7018.
- Chou, C.-K., Chen, R.-F., Chou, F.-F., Chang, H.-W., Chen, Y.-J., Lee, Y.-F., Yang, K. D., Cheng, J.-T., Huang, C.-C., & Liu, R.-T. (2010). miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAFV600E mutation. *Thyroid*, *20*(5), 489-494.
- Chun-zhi, Z., Lei, H., An-ling, Z., Yan-chao, F., Xiao, Y., Guang-xiu, W., Zhi-fan, J., Pei-yu, P., Qing-yu, Z., & Chun-sheng, K. (2010). MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. *BMC cancer*, *10*(1), 1-10.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.-g., Kipps, T. J., Negrini, M., Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the national academy of sciences*, *102*(39), 13944-13949.
- Colleoni, M., Cole, B.F., Viale, G., Regan, M. M., Price, K. N., Maiorano, E., Mastropasqua, M. G., Crivellari, D., Gelber, R. D., Goldhirsch, A., Coates, A. S., Gusterson, B. A. (2010). Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology*, *28*(18), 2966.
- Conese, M., & Blasi, F. (1995). The urokinase/urokinase-receptor system and cancer invasion. *Baillière's clinical haematology*, *8*(2), 365-389.
- Criscitello, C., Fumagalli, D., Saini, K. S., & Loi, S. (2010). Tamoxifen in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer: overview of clinical use and

- molecular biomarkers for patient selection. *Onco Targets Ther*, 4, 1-11.
doi:10.2147/OTT.S10155
- De Bacco, F., Luraghi, P., Medico, E., Reato, G., Girolami, F., Perera, T., Gabriele, P., Comoglio, P. M., & Boccaccio, C. (2011). Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 103(8), 645-661.
- Dear, R. F., McGeechan, K., Jenkins, M. C., Barratt, A., Tattersall, M., & Wilcken, N. (2013). Combination versus sequential single agent chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 12.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research*, 13(15), 4429-4434.
- Dunnwald, L. K., Rossing, M. A., & Li, C. I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast cancer research*, 9(1), 1-10.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *The Lancet*, 378(9804), 1707-1716.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61629-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61629-2)
- Falkenberg, N., Anastasov, N., Braselmann, H., Auer, G., Huber, M., Schmitt, M., Hofler, H., & Aubele, M. (2013). MiR-221 and-222 expression elevates cell invasion and allows distinction between different prognostic groups in advanced breast cancers. *Molecular cancer research*, 11. doi:10.1158/1557-3125.ADVBC-A046
- Falkenberg, N., Anastasov, N., Rappl, K., Braselmann, H., Auer, G., Walch, A., Huber, M., Hofig, I., Schmitt, M., Hofler, H., Atkinson, M. J., & Aubele, M. (2013). MiR-221/-222 differentiate prognostic groups in advanced breast cancers and influence cell invasion. *British journal of cancer*, 109(10), 2714-2723. doi:10.1038/bjc.2013.625
- Falkenberg, N., Anastasov, N., Schaub, A., Radulovic, V., Schmitt, M., Magdolen, V., & Aubele, M. (2015). Secreted uPAR isoform 2 (uPAR7b) is a novel direct target of miR-221. *Oncotarget*, 6(10), 8103-8114.
doi:10.18632/oncotarget.3516
- Felicetti, F., Errico, M. C., Bottero, L., Segnalini, P., Stoppacciaro, A., Biffoni, M., Felli, N., Mattia, G., Petrini, M., Colombo, M. P., Peschle, C., & Carè, A. (2008). The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer research*, 68(8), 2745-2754.

- File:Neubauer improved schema.gif. (2021, August 8). *Wikimedia Commons, the free media repository*. Retrieved 12:20, May 25, 2022 from https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Neubauer_improved_schema.gif&oldid=579025271.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight, *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 102-114. doi:10.1038/nrg2290
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R. G., Deutsch, M., Fisher, E. R., Jeong, J.-H., & Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *New England journal of medicine*, 347(16), 1233-1241.
- Foekens, J. A., Peters, H. A., Look, M. P., Portengen, H., Schmitt, M., Kramer, M. D., Br nner, N., J nicke, F., Meijer-van Gelder, M. E., Henzen-Logmans, S. C., van Putten, W. L. J., Klijn, J. G. M. (2000). The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer research*, 60(3), 636-643.
- Fogh, J., & Trempe, G. (1975). New human tumor cell lines. In J. Fogh (Ed.), *Human tumor cells in vitro* (pp. 115-159). Springer, Boston, MA.
- Fornari, E., Gramantieri, L., Ferracin, M., Sabbioni, S., Veronese, A., Giovannini, C., Galassi, M., Grazi, G. L., Negrini, M., & Bolondi, L. (2008). Micro-RNA-221 regulates p27/kip1 in hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 40(5), A11.
- Fossati, R., Confalonieri, C., Torri, V., Ghislandi, E., Penna, A., Pistotti, V., Tinazzi, A., & Liberati, A. (1998). Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women. *Journal of clinical oncology*, 16(10), 3439-3460.
- Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *New England journal of medicine*, 363(20), 1938-1948.
- Franken, N. A. P., Oei, A. L., Kok, H. P., Rodermond, H. M., Sminia, P., Crezee, J., Stalpers, L. J. A., & Barendsen, G. W. (2013). Cell survival and radiosensitisation: Modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (Review). *International journal of oncology*, 42(5), 1501-1515. doi:10.3892/ijo.2013.1857
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315-2319.
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19(1), 92-105.

Literaturverzeichnis

- Gibson, U., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research*, 6(10), 995-1001.
- Girardi, C., De Pittà, C., Casara, S., Sales, G., Lanfranchi, G., Celotti, L., & Mognato, M. (2012). Analysis of miRNA and mRNA expression profiles highlights alterations in ionizing radiation response of human lymphocytes under modeled microgravity. *PloS one*, 7(2), e31293.
- Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2011). Strategies for subtypes - dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology*, 22(8), 1736-1747.
- Gordon, L. A., Mulligan, K. T., Maxwell-Jones, H., Adams, M., Walker, R. A., & Jones, J. L. (2003). Breast cell invasive potential relates to the myoepithelial phenotype. *International journal of cancer*, 106(1), 8-16.
- Gottardo, F., Liu, C. G., Ferracin, M., Calin, G. A., Fassan, M., Bassi, P., Sevignani, C., Byrne, D., Negrini, M., Pagano, F., Gomella, L. G., Croce, C. M., & Baffa, R. (2007, September). *Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers*. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. (Vol. 25, No. 5, pp. 387-392). Elsevier.
- Gramantieri, L., Fornari, F., Ferracin, M., Veronese, A., Sabbioni, S., Calin, G. A., Grazi, G. L., Croce, C. M., Bolondi, L., & Negrini, M. (2009). MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clinical cancer research*, 15(16), 5073-5081.
- Greenburg, G., & Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *The Journal of cell biology*, 95(1), 333-339.
- Gupta, A. K., Bakanauskas, V. J., Cerniglia, G. J., Cheng, Y., Bernhard, E. J., Muschel, R. J., & McKenna, W. G. (2001). The Ras radiation resistance pathway. *Cancer research*, 61(10), 4278-4282.
- Hope, S., Rugo, R., Rumble, R. B., Macrae, E., Barton, D. L., Connolly, H. K., Dickler, M. N., Fallowfield, L., Fowble, B., Ingle, J. N., Jahanzeb, M., Johnston, S. R. D., Korde, L. A., Khatcheressian, J. I., Mehta, R. S., Muss, H. B., & Burstein, H. J. (2016). Endocrine therapy for hormone receptor-positive metastatic breast cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline. *Journal of clinical oncology*, 34(25), 3069-3103.
- Houssami, N., Macaskill, P., Marinovich, M. L., & Morrow, M. (2014). The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: a meta-analysis. *Annals of surgical oncology*, 21(3), 717-730.

Literaturverzeichnis

- Howe, E. N., Cochrane, D. R., & Richer, J. K. (2012). The miR-200 and miR-221/222 microRNA families: opposing effects on epithelial identity. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 17(1), 65-77.
- Huang, Y., Shen, X. J., Zou, Q., Wang, S. P., Tang, S. M., & Zhang, G. Z. (2011). Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of physiology and biochemistry*, 67(1), 129-139.
- Hui, A. B. Y., Shi, W., Boutros, P. C., Miller, N., Pintilie, M., Fyles, T., McCready, D., Wong, D., Gerster, K., Jurisica, I., Penn, L. Z., & Liu, F. F. (2009). Robust global micro-RNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Laboratory investigation*, 89(5), 597-606.
doi:10.1038/labinvest.2009.12
- Hwang, M. S., Yu, N., Stinson, S. Y., Yue, P., Newman, R. J., Allan, B. B., & Dornan, D. (2013). miR-221/222 targets adiponectin receptor 1 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *PloS one*, 8(6), e66502.
- Ikawa, M., Yamada, S., & Nakanishi, T. (1998). Green Fluorescent Protein (GFP). *Current topics in developmental biology*, 44, 1.
- Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *Journal of clinical oncology*, 27(34), 5848.
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C.-G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*, 65(16), 7065-7070.
- Jiang, L.-H., Ge, M.-H., Hou, X.-X., Cao, J., Hu, S.-S., Lu, X.-X., Han, J., Wu, J.-C., Liu, X., Zhu, X., Hong, L.-L., Li, P., & Ling, Z.-Q. (2015). miR-21 regulates tumor progression through the miR-21-PDCD4-Stat3 pathway in human salivary adenoid cystic carcinoma. *Laboratory investigation*, 95(12), 1398-1408.
- Jones, H. A., Antonini, N., Hart, A., Peterse, J. L., Horiot, J.-C., Poortmans, F. C. P. M., Oei, S.B., Collette, L., Struikmans, H., Van den Bogaert, W. F., Fourquet, A., Jager, J. J., Schinagl, D. A. X., Wárlám-Rodenhuis, C. C., & Bartelink, H. (2009). Impact of pathological characteristics on local relapse after breast-conserving therapy: a subgroup analysis of the EORTC boost versus no boost trial. *J Clin Oncol*, 27(30), 4939-4947.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., & Klein, S. (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012.
- Karakatsanis, A., Papaconstantinou, I., Gazouli, M., Lyberopoulou, A., Polymeneas, G., & Voros, D. (2013). Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients

with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Molecular Carcinogenesis*, 52(4), 297-303.
doi:10.1002/mc.21864

- Kargiotis, O., Chetty, C., Gogineni, V., Gondi, C. S., Pulukuri, S. M., Kyritsis, A. P., Gujrati, M., Klopfenstein, J. D., Dinh, D. H., & Rao, J. S. (2008). uPA/uPAR downregulation inhibits radiation-induced migration, invasion and angiogenesis in IOMM-Lee meningioma cells and decreases tumor growth in vivo. *International Journal of Oncology*, 33(5), 937-947.
- Kast, K., Rhiem, K., Wappenschmidt, B., Hahnen, E., Hauke, J., Bluemcke, B., Zarghooni, V., Herold, N., Ditsch, N., Kiechle, M., Braun, M., Fischer, C., Dikow, N., Schott, S., Rahner, N., Niederacher, D., Fehm, T., Gehrig, A., Mueller-Reible, C., Arnold, N., Maass, N., Borck, G., de Gregorio, N., Scholz, C., Auber, B., Varon-Manteeva, R., Speister, D., Horvath, J., Lichey, N., Wimberger, P., Stark, S., Faust, U., Weber, B. H. F., Emons, G., Zachariae, S., Meindl, A., Schmutzler, R. K., & Engel, C. (2016). Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *Journal of medical genetics*, 53(7), 465-471.
- Kato, M., Paranjape, T., Ullrich, R., Nallur, S., Gillespie, E., Keane, K., Esquela-Kerscher, A., Weidhaas, J. B., & Slack, F. J. (2009). The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in *C. elegans* and in vitro in human breast cancer cells. *Oncogene*, 28(25), 2419-2424.
- Korpál, M., Lee, E. S., Hu, G., & Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 14910-14914.
- Kyndi, M., Sørensen, F. B., Knudsen, H., Overgaard, M., Nielsen, H. M., & Overgaard, J. (2008). Estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and response to postmastectomy radiotherapy in high-risk breast cancer: the Danish Breast Cancer Cooperative Group. *Journal of clinical oncology*, 26(9), 1419-1426.
- Lakhani, S. R., Ellis, I., Schnitt, S., Tan, P. H., & Van de Vijver, M. J. (2012). WHO classification of tumours of the breast: international agency for research on cancer. *Breast Care*, 8, 149-154.
- Le Sage, C., Nagel, R., Egan, D. A., Schrier, M., Mesman, E., Mangiola, A., Anile, C., Maira, G., Mercatelli, N., Ciafrè, S. A., Farace, M. G., & Agami, R. (2007). Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *The EMBO journal*, 26(15), 3699-3708.
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *science*, 294(5543), 862-864.

- 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(5), 843-854.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2750-2767.
- Leung, C. M., Li, S. C., Chen, T. W., Ho, M. R., Hu, L. Y., Liu, W. S., Wu, T. T., Hsu, P.-C., Chang, H.-T., & Tsai, K.-W. (2014). Comprehensive microRNA profiling of prostate cancer cells after ionizing radiation treatment. *Oncology reports*, 31(3), 1067-1078. doi:10.3892/or.2014.2988
- Li, B., Lu, Y., Wang, H., Han, X., Mao, J., Li, J., Yu, L., Wang, B., Fan, S., Yu, X., & Song, B. (2016). miR-221/222 enhance the tumorigenicity of human breast cancer stem cells via modulation of PTEN/Akt pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 79, 93-101. doi:10.1016/j.biopha.2016.01.045
- Li, T., Zeng, Z., Wang, L., Qiu, S., Zhou, J., Zhi, X., Yu, H.-H. & Tang, Z.-Y. (2011). Radiation enhances long-term metastasis potential of residual hepatocellular carcinoma in nude mice through TMPRSS4-induced epithelial–mesenchymal transition. *Cancer gene therapy*, 18(9), 617-626.
- Li, W., Guo, F., Wang, P., Hong, S., & Zhang, C. (2014). miR-221/222 confers radioresistance in glioblastoma cells through activating Akt independent of PTEN status. *Current molecular medicine*, 14(1), 185-195.
- Li, X., Yan, P., & Shao, Z. (2009). Downregulation of miR-193b contributes to enhance urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression and tumor progression and invasion in human breast cancer. *Oncogene*, 28(44), 3937-3948.
- Li, X., Zhang, Y., Zhang, H., Liu, X., Gong, T., Li, M., Sun, L., Ji, G., Shi, Y., Han, Z., Han, S., Nie, Y., Chen, X., Zhao, Q., Ding, J., Wu, K., & Daiming, F. (2011). miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Molecular cancer research*, 9(7), 824-833.
- Li, Y., Liang, C., Ma, H., Zhao, Q., Lu, Y., Xiang, Z., Li, L., Qin, J., Chen, Y., Cho, W. C., Pestell, R.G., Liang, L., & Yu, Z. (2014). miR-221/222 promotes S-phase entry and cellular migration in control of basal-like breast cancer. *Molecules*, 19(6), 7122-7137. doi:10.3390/molecules19067122
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329-333.
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennesy, B., Green, M., Cristofanilli, M.,

Literaturverzeichnis

- Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 26(8), 1275-1281.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lu, G.-J., Dong, Y.-Q., Zhang, Q.-M., Di, W.-Y., Jiao, L.-Y., Gao, Q.-Z., & Zhang, C.-G. (2015). miRNA-221 promotes proliferation, migration and invasion by targeting TIMP2 in renal cell carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(5), 5224.
- Lu, X., Zhao, P., Zhang, C., Fu, Z., Chen, Y., Lu, A., Liu, N., You, Y., Pu, P., & Kang, C. (2009). Analysis of miR-221 and p27 expression in human gliomas. *Molecular medicine reports*, 2(4), 651-656.
- Mariotto, A. B., Etzioni, R., Hurlbert, M., Penberthy, L., & Mayer, M. (2017). Estimation of the number of women living with metastatic breast cancer in the United States. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 26(6), 809-815.
- Maxwell, J. (2018). Reconstruction in the setting of metastatic breast cancer: a challenging clinical question. *Annals of surgical oncology*, 25(11), 3107-3108.
- McGale, P., Taylor, C., Correa, C., Cutter, D., Duane, F., Ewertz, M., Gray, R., Mannu, G., Peto, R., Whelan, T., & Darby, S. (2014). Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *The Lancet*, 383(9935), 2127-2135.
- Metheetraitut, C., & Slack, F. J. (2013). MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy. *Current opinion in genetics & development*, 23(1), 12-19.
- Mihatsch, J., Toulany, M., Bareiss, P. M., Grimm, S., Lengerke, C., Kehlbach, R., & Rodemann, H. P. (2011). Selection of radioresistant tumor cells and presence of ALDH1 activity in vitro. *Radiotherapy and Oncology*, 99(3), 300-306.
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E. A., Shenkier, T., Cella, D., & Davidson, N. E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *New England journal of medicine*, 357(26), 2666-2676.
- Millikan, R. C., Newman, B., Tse, C.-K., Moorman, P. G., Conway, K., Smith, L. V., Labbok, M. H., Geradts, J., Bensen, J. T., Jackson, S., Nyante, S., Livasy, C., Carey, L., Earp, H. S., & Perou, C. M. (2008). Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 109(1), 123-139.

- Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D. J., Thuenemann, E. C., & Baulcombe, D. C. (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, 447(7148), 1126-1129.
- Moncharmont, C., Levy, A., Guy, J.-B., Falk, A. T., Guilbert, M., Trone, J.-C., Alphonse, G., Gilomini, M., Ardail, D., Toillon, R.-A., Rodriguez-Lafrasse, C., & Magné, N. (2014). Radiation-enhanced cell migration/invasion process: a review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 92(2), 133-142.
- Moran, M. S., Schnitt, S. J., Giuliano, A. E., Harris, J. R., Khan, S. A., Horton, J., Klimberg, S., Chavez-MacGregor, M., Freedman, G., Houssami, N., Johnson, P. L., & Morrow, M. (2014). Society of Surgical Oncology–American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 88(3), 553-564.
- Morris, G. J., Naidu, S., Topham, A. K., Guiles, F., Xu, Y., McCue, P., Schwartz, G. F., Park, P. K., Rosenberg, A. L., Brill, K., & Mitchell, E. P. (2007). Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African–American and Caucasian patients: A single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and end results database. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 110(4), 876-884.
- Mutschelknaus, L., Azimzadeh, O., Heider, T., Winkler, K., Vetter, M., Kell, R., Tapio, S., Merl-Pham, J., Huber, S. M., Edalat, L., Radulović, V., Anastasov, N., Atkinson, M. J., & Moertl, S. (2017). Radiation alters the cargo of exosomes released from squamous head and neck cancer cells to promote migration of recipient cells. *Scientific reports*, 7(1), 1-13. doi:10.1038/s41598-017-12403-6
- Myers, E. R., Moorman, P., Gierisch, J. M., Havrilesky, L. J., Grimm, L. J., Ghatge, S., Davidson, B., Mongtomery, R. C., Crowley, M. J., McCrory, D. C., Kendrick, A., & Sanders, G. D. (2015). Benefits and harms of breast cancer screening: a systematic review. *Jama*, 314(15), 1615-1634.
- Nalla, A. K., Asuthkar, S., Bhoopathi, P., Gujrati, M., Dinh, D. H., & Rao, J. S. (2010). Suppression of uPAR retards radiation-induced invasion and migration mediated by integrin β 1/FAK signaling in medulloblastoma. *PloS one*, 5(9), e13006.
- Nielsen, L. S., Hansen, J. G., Skriver, L., Wilson, E. L., Kalltoft, K., Zeuthen, J., & Danøe, K. (1982). Purification of zymogen to plasminogen activator from human glioblastoma cells by affinity chromatography with monoclonal antibody. *Biochemistry*, 21(25), 6410-6415.
- No, M., Choi, E. J., & Kim, I. A. (2009). Targeting HER2 signaling pathway for radiosensitization: alternative strategy for therapeutic resistance. *Cancer biology & therapy*, 8(24), 2351-2361.

- Onkologie, L. (2017). S3-Leitlinie Früherkennung. Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Version 4.0, Retrieved 12:21, May, 25, 2022, from <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
- Park, C.-M., Park, M.-J., Kwak, H.-J., Lee, H.-C., Kim, M.-S., Lee, S.-H., Park, I.-C., Rhee, C. H., & Hong, S.-I. (2006). Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor–mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer research*, *66*(17), 8511-8519.
- Park, S.-M., Gaur, A. B., Lengyel, E., & Peter, M. E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development*, *22*(7), 894-907.
- Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747-752. doi:10.1038/35021093
- Peters, L. J., Withers, H. R., Thames Jr, H. D., & Fletcher, G. H. (1982). Keynote address—The problem: Tumor radioresistance in clinical radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, *8*(1), 101-108.
- Phillips, T. M., McBride, W. H., & Pajonk, F. (2006). The response of CD24–/low/CD44+ breast cancer–initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute*, *98*(24), 1777-1785.
- Ploug, M., Rønne, E., Behrendt, N., Jensen, A. L., Blasi, F., & Danø, K. (1991). Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(3), 1926-1933.
- Prat, A., Adamo, B., Cheang, M. C., Anders, C. K., Carey, L. A., & Perou, C. M. (2013). Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *The oncologist*, *18*(2), 123-133.
- Pu, X. X., Huang, G. I., Guo, H. Q., Guo, C. C., Li, H., Ye, S., Ling, S., Jiang, L., Tian, Y., Lin, T.-Y. (2010). Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *25*(10), 1674-1680.
- Puck, T. T., Morkovin, D., Marcus, P. I., & Cieciora, S. J. (1957). Action of X-rays on mammalian cells: II. Survival curves of cells from normal human tissues. *The Journal of experimental medicine*, *106*(4), 485-500.

Literaturverzeichnis

- Pyke, C., Eriksen, J., Solberg, H., Nielsen, B. S., Kristensen, P., Lund, L., & Dano, K. (1993). An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator. *FEBS letters*, *326*(1-3), 69-74.
- Quintavalle, C., Garofalo, M., Zanca, C., Romano, G., Iaboni, M., De Caro, M. D., Martinez-Montero, J. C., Incoronato, M., Nuovo, G., Croce, C. M., & Condorelli, G. (2012). miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphatase PTP μ . *Oncogene*, *31*(7), 858-868. doi:10.1038/onc.2011.280
- Radojicic, J., Zaravinos, A., Vrekoussis, T., Kafousi, M., Spandidos, D. A., & Stathopoulos, E. N. (2011). MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. *Cell cycle*, *10*(3), 507-517. doi:10.4161/cc.10.3.14754
- Ragaz, J., Olivetto, I. A., Spinelli, J. J., Phillips, N., Jackson, S. M., Wilson, K. S., Knowling, M. A., Coppin, C. M. L., Weir, L., Gelmon, K., Le, N., Durand, R., Coldman, A. J., & Manji, M. (2005). Locoregional radiation therapy in patients with high-risk breast cancer receiving adjuvant chemotherapy: 20-year results of the British Columbia randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*, *97*(2), 116-126.
- Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Green, A. R., Lee, A. H., Robertson, J. F., & Ellis, I. O. (2007). Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*, *109*(1), 25-32.
- Rakha, E. A., Elsheikh, S. E., Aleskandarany, M. A., Habashi, H. O., Green, A. R., Powe, D. G., El-Sayed, M. E., Benhasouna, A., Brunet, J.-S., Akslen, L. A., Evans, A. J., Blamey, R., Reis-Filho, J. S., Foulkes, W. D., & Ellis, I. O. (2009). Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clinical cancer research*, *15*(7), 2302-2310.
- Rao Gogineni, V., Kumar Nalla, A., Gupta, R., Gorantla, B., Gujrati, M., Dinh, D. H., & Rao, J. S. (2010). Radiation-inducible silencing of uPA and uPAR in vitro and in vivo in meningioma. *International journal of oncology*, *36*(4), 809-816.
- Rofstad, E. K., Mathiesen, B., & Galappathi, K. (2004). Increased metastatic dissemination in human melanoma xenografts after subcurative radiation treatment: radiation-induced increase in fraction of hypoxic cells and hypoxia-induced up-regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Cancer research*, *64*(1), 13-18.
- Roldan, A. L., Cubellis, M. V., Masucci, M. T., Behrendt, N., Lund, L. R., Danø, K., Appella, E., & Blasi, F. (1990). Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *The EMBO journal*, *9*(2), 467-474.
- Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J., Suman, V. J., Geyer Jr, C. E., Davidson, N. E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P. A., Swain, S. M.,

- Pisansky, T. M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L. A., Vogel, V. G., Visscher, D. W., Yothers, G., Jenkins, R. B., Brown, A. M., Dakhil, S. R., Mamounas, E. P., Lingle, W. L., Klein, P. M., Ingle, J. N., & Wolmark, N. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *New England journal of medicine*, 353(16), 1673-1684.
- Sarkar, S., Dubaybo, H., Ali, S., Goncalves, P., Kollepara, S. L., Sethi, S., Philip, P. A., & Li, Y. (2013). Down-regulation of miR-221 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through up-regulation of PTEN, p27kip1, p57kip2, and PUMA. *American journal of cancer research*, 3(5), 465.
- Sarrió, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., & Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer research*, 68(4), 989-997.
- Schottenfeld, D., & Fraumeni Jr, J. F. (Eds.). (2006). *Cancer epidemiology and prevention*. Oxford University Press.
- Schrödel, A. (2010). Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer. *Biologie in unserer Zeit*, 40(5), 298-298. doi:10.1002/biuz.201090074
- Scotti, V., Desideri, I., Meattini, I., Di Cataldo, V., Cecchini, S., Petrucci, A., Franzese, C., Greto, D., Livi, L., Bonomo, P. & Biti, G. (2013). Management of inflammatory breast cancer: focus on radiotherapy with an evidence-based approach. *Cancer treatment reviews*, 39(2), 119-124.
- Smith, H. W., & Marshall, C. J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(1), 23-36.
- Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A.-L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the national academy of sciences*, 98(19), 10869-10874. doi:10.1073/pnas.191367098
- Sørlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A.-L., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(14), 8418-8423.
- Stewart, C. E., & Sayers, I. (2009). Characterisation of urokinase plasminogen activator receptor variants in human airway and peripheral cells. *BMC molecular biology*, 10(1), 1-19.
- Stinson, S., Lackner, M. R., Adai, A. T., Yu, N., Kim, H. J., O'Brien, C., Spoerke, J., Jhunjunwala, S., Boyd, Z., Januario, T., Newman, R. J., Yue, P., Bourgon, R., Modrusan, Z., Stern, H. M., Warming, S., De Sauvage, F. J., Amler, L.,

- Yeh, R.-F., & Dornan, D. (2011). TRPS1 Targeting by miR-221/222 Promotes the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Science signaling*, 4(177), ra41-ra41. doi: 10.1126/scisignal.2001538
- Stockler, M., Wilcken, N., Gherzi, D., & Simes, R. J. (2000). Systematic reviews of chemotherapy and endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer treatment reviews*, 26(3), 151-168.
- Su, W.-H., Chuang, P.-C., Huang, E.-Y., & Yang, K. D. (2012). Radiation-induced increase in cell migration and metastatic potential of cervical cancer cells operates via the K-Ras pathway. *The American journal of pathology*, 180(2), 862-871.
- Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.-C., Bonfiglio, T., Hicks, D. G., & Tang, P. (2010). The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast cancer: basic and clinical research*, 4, 117822341000400004.
- Sun, K., Wang, W., Zeng, J.-J., Wu, C.-T., Lei, S.-T., & Li, G.-X. (2011). MicroRNA-221 inhibits CDKN1C/p57 expression in human colorectal carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(3), 375-384.
- Taliaferro-Smith, L., Nagalingam, A., Zhong, D., Zhou, W., Saxena, N., & Sharma, D. (2009). LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK–S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*, 28(29), 2621-2633.
- Tan, D. S., Marchió, C., Jones, R. L., Savage, K., Smith, I. E., Dowsett, M., & Reis-Filho, J. S. (2008). Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast cancer research and treatment*, 111(1), 27-44.
- Templin, T., Paul, S., Amundson, S. A., Young, E. F., Barker, C. A., Wolden, S. L., & Smilenov, L. B. (2011). Radiation-induced micro-RNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 80(2), 549-557.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews cancer*, 2(6), 442-454.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R., & Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *International journal of genomics*, 2014.

Literaturverzeichnis

- Van't Veer, L. J., Dai, H., Van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A. M., Mao, M., Peterse, H. L., Van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., & Friend, S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, *415*(6871), 530-536. doi:10.1038/415530a
- Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *3*(3), 311-330.
- Veerla, S., Lindgren, D., Kvist, A., Frigyesi, A., Staaf, J., Persson, H., Liedberg, F., Chebil, G., Gudjonsson, S., Borg, Å., Månsson, W., Rovira, C., & Höglund, M. (2009). MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *International journal of cancer*, *124*(9), 2236-2242.
- Vincenti, S., Brillante, N., Lanza, V., Bozzoni, I., Presutti, C., Chiani, F., Etna, M. P., & Negri, R. (2011). HUVEC respond to radiation by inducing the expression of pro-angiogenic microRNAs. *Radiation research*, *175*(5), 535-546. doi:10.1667/RR2200.1
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, *10*(8), 789-799.
- Wang, C., Jiang, Y., Li, X., & Hu, L. (2015). Thioglucose-bound gold nanoparticles increase the radiosensitivity of a triple-negative breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Breast Cancer*, *22*(4), 413-420.
- Wang, L., & Wang, J. (2012). MicroRNA-mediated breast cancer metastasis: from primary site to distant organs. *Oncogene*, *31*(20), 2499-2511. doi:10.1038/onc.2011.444
- Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J., & Wick, W. (2001). Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer research*, *61*(6), 2744-2750.
- Xue, Q., Sun, K., Deng, H. J., Lei, S. T., Dong, J. Q., & Li, G. X. (2013). Anti-miRNA-221 sensitizes human colorectal carcinoma cells to radiation by upregulating PTEN. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(48), 9307-9317. doi:10.3748/wjg.v19.i48.9307
- Yang, X., Yang, Y., Gan, R., Zhao, L., Li, W., Zhou, H., Wang, X., Lu, J., & Meng, Q. H. (2014). Down-regulation of mir-221 and mir-222 restrain prostate cancer cell proliferation and migration that is partly mediated by activation of SIRT1. *PLoS one*, *9*(6), e98833.
- Ye, S., & Goldsmith, E. J. (2001). Serpins and other covalent protease inhibitors. *Current opinion in structural biology*, *11*(6), 740-745.

Literaturverzeichnis

- Yu, L., Yang, Y., Hou, J., Zhai, C., Song, Y., Zhang, Z., Qiu, L., & Jia, X. (2015). MicroRNA-144 affects radiotherapy sensitivity by promoting proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. *Oncology reports*, *34*(4), 1845-1852. doi:10.3892/or.2015.4173
- Zhai, G. G., Malhotra, R., Delaney, M., Latham, D., Nestler, U., Zhang, M., Mukherjee, N., Song, Q., Robe, P. & Chakravarti, A. (2006). Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *Journal of neuro-oncology*, *76*(3), 227-237.
- Zhang, C., Wang, G., Kang, C., Du, Y., & Pu, P. (2009). Up-regulation of p27(kip1) by miR-221/222 antisense oligonucleotides enhances the radiosensitivity of U251 glioblastoma. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi = Chinese journal of medical genetics*, *26*(6), 634-638. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2009.06.006
- Zhang, C., Zhang, J., Zhang, A., Wang, Y., Han, L., You, Y., Pu, P., & Kang, C. (2010). PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers. *International journal of oncology*, *37*(6), 1621-1626.
- Zheng, C., Yinghao, S., & Li, J. (2012). MiR-221 expression affects invasion potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting DVL2. *Medical oncology*, *29*(2), 815-822.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Signalwege strahlungsinduzierter Invasion, Abbildung übernommen von Moncharmont et al. (Moncharmont et al., 2014). Die Abbildung zeigt intrazelluläre Signalkaskaden, über die Bestrahlung Invasion vermitteln kann. Jede zusammengehörige Signalkaskade stammt aus einem eigenen Paper und wird durch eine eigene Farbe charakterisiert. Park et al. (C.-M. Park et al., 2006) wird blau, Cheng et al. (Cheng, Chou, Kuo, & Hsieh, 2006) wird rot, Zhai et al. (Zhai et al., 2006) wird grün, Su et al. (Su, Chuang, Huang, & Yang, 2012) wird hellblau und DeBacco et al. (De Bacco et al., 2011) wird braun dargestellt. Blitze zeigen Bestrahlung an, Pfeile signalisieren eine aktivierende Interaktion. GBM: Glioblastoma multiforme; HCC: Hepatozelluläres Karzinom; CA: Karzinom.	8
Abbildung 2. Biosynthese der miRNA, inspiriert von Filipowicz et al., Huang et al. (Filipowicz et al., 2008; Huang et al., 2011)	10
Abbildung 3. Direkte Targets und beeinflusste zellbiologische Prozesse von miR-221. Schwarze Pfeile verbinden miR-221 mit seinen direkten Targets. Rote Pfeile signalisieren hohe Expression bzw. ein verstärktes Ablaufen des jeweiligen zellbiologischen Prozesses, grüne Pfeile signalisieren niedrige Expression. Bis auf uPAR resultiert hohe miR-221-Expression in niedriger Expression der Targets (Tumorsuppressoren). Durch den Wegfall der Tumorsuppressoren laufen tumorfördernde Prozesse wie Proliferation, Strahlenresistenz, Migration und Zellüberleben vermehrt ab. Die zellbiologischen Prozesse Proliferation, Strahlenresistenz, Migration und Zellüberleben werden somit durch miR-221-Überexpression verstärkt.	14
Abbildung 4. uPAR-Signalweg, angelehnt an Smith et al und Falkenberg et al (Falkenberg et al., 2015; Smith & Marshall, 2010). miR-221 verstärkt die Expression des löslichen uPAR Isoform 2. Sowohl der uPAR mit GPI-Anker als auch der lösliche uPAR binden uPA und aktivieren Plasmin aus der rezeptorgebundenen Vorstufe Plasminogen. Plasmin aktiviert MMPs aus Pro-MMPs. MMPs degradieren ECM und verstärken das Migrations- und Invasionspotenzial. Die Signalkaskade wird negativ durch PAI1 und PAI2, die uPA inhibieren, und durch α 2-Antiplasmin, das Plasmin inhibiert, reguliert. Plasmin aktiviert Pro-uPA zu uPA und vermittelt somit eine positive Rückkopplung des Systems.....	17
Abbildung 5. Methode der lentiviralen Transduktion. Hüllenplasmid (hellblau), Packungsplasmide (gelb, dunkelblau) und das Plasmid mit den Transfergenen für Überexpression oder Knock-down von miR-221 (rot) und für GFP-Produktion (hellgrün) wurden in HEK293T-Zellen übertragen. Diese produzierten replikationsdefiziente Lentiviren (dunkelgrün), welche die Transfergene in die Targetzellen SKBR3 oder MDA-MB-231 transduzierten. SKBR3 produziert nun vermehrt miR-221 (rot) und GFP (hellgrün), MDA-MB-231 produziert vermindert miR-221 (rot) und GFP (hellgrün).....	28
Abbildung 6. Schema der Zählquadrate einer Neubauer-Zählkammer.	31

- Abbildung 7. Demonstration der Auswertungsmethode. In der linken Spalte befinden sich die Originalbilder, in der rechten Spalte sind die Pixel, die von dem Programm als Zellen erkannt und gezählt wurden, gelb markiert. Die zum Zeitpunkt 0 h gemessenen Pixel wurden in den danach folgenden Zeitpunkten - im Bildbeispiel 48 h - automatisch abgezogen (daher ist der bei 0 h gelb markierte Zellrasen bei 48 h schwarz). So konnten auf den jeweiligen 0 h-Wert normalisiert für 16, 24, 40 und 48 h die Zunahme der Pixelzahl und somit die Zunahme der Migration über Zeit verfolgt werden..... 42
- Abbildung 8. Relative miR-221-Expression der SKBR3 +miR-221 im Vergleich zur Leervektorkontrolle SKBR3 +EV 72 h nach Bestrahlung mit 0 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM (n=3) der jeweiligen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte mit RNU44 als Kalibrator und SKBR3 +EV 0 Gy als Normalisierungskontrolle..... 51
- Abbildung 9. Relative miR-221-Expression der MDA-MB-231 +anti-miR-221 im Vergleich zur Leervektorkontrolle MDA-MB-231 +EV 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM (n=3) der jeweiligen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte mit RNU44 als Kalibrator und MDA-MB-231 +EV 0 Gy als Normalisierungskontrolle..... 52
- Abbildung 10. Relative miR-221-Expression von SKBR3 mit miR-221 überexprimierendem Vektor (grün schraffiert) und SKBR3 mit Leervektor (grau) 24 h (A) und 72 h (B) nach Bestrahlung (0, 2, 4, 8 Gy). Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM (n=3) der jeweiligen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte mit RNU44 als Kalibrator SKBR3 +miR-221 0 Gy als Normalisierungskontrolle. 53
- Abbildung 11. Klonogenes Überleben in Abhängigkeit von der Strahlendosis bei miR-221-Überexpression (SKBR3 +miR-221, grün) im Vergleich zur Kontrolle (SKBR3 +EV, grau). Dargestellt sind die berechneten SF mit SEM aus fünf (SKBR3, n=5) biologischen Replikaten sowie die als kontinuierlicher Graph gezeichnete linear-quadratische Annäherung für jede Zelllinie. 55
- Abbildung 12. Klonogenes Überleben in Abhängigkeit von der Strahlendosis miR-221-Knock-down (MDA-MB-231, grau) im Vergleich zur Kontrolle EV (grün). Dargestellt sind die berechneten SF mit SEM aus drei (MDA-MB-231, n=3) biologischen Replikaten (Punkte mit Standardabweichungen) sowie die als kontinuierlicher Graph gezeichnete linear-quadratische Annäherung..... 57
- Abbildung 13. Relativer Proliferationsindex der unbestrahlten SKBR3 mit miR-221-Überexpression (grün) und im Vergleich zur EV-Kontrolle (grau) in Abhängigkeit von der Zeit. Der Proliferationsindex wurde berechnet aus dem Quotienten der Proliferation zum gegebenen Zeitpunkt und der Proliferation 0 h nach Bestrahlung. Aufgeführt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten. 60
- Abbildung 14. Proliferation der Zelllinie SKBR3 mit miR-221-Überexpression (grün) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grau) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung. Die relative Proliferation wurde durch Normalisierung auf die Proliferation 0 h nach Bestrahlung ermittelt (Relativer Proliferationsindex) und in Abhängigkeit von

der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.....	62
Abbildung 15. Relativer Proliferationsindex der unbestrahlten Zelllinien MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down (grau) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grün) in Abhängigkeit von der Zeit. Der Proliferationsindex wurde berechnet aus dem Quotienten der Proliferation zum gegebenen Zeitpunkt und der Proliferation 0 h nach Bestrahlung. Aufgeführt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.	64
Abbildung 16. Proliferation der Zelllinie MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down (grau) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grün) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung. Die relative Proliferation wurde durch Normalisierung auf die Proliferation 0 h nach Bestrahlung ermittelt (Relativer Proliferationsindex) und in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.....	66
Abbildung 17. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von SKBR3 +EV und +miR-221 24 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).	68
Abbildung 18. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von SKBR3 +EV und +miR-221 48 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).	69
Abbildung 19. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von SKBR3 +EV und +miR-221 72 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).	70
Abbildung 20. Anzahl der Pixel der Zelllinie SKBR3 mit miR-221-Überexpression (grün) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grau) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung. Die gemessene Pixelanzahl dient als Maß für die Migration und ist in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.....	72
Abbildung 21. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 16 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).....	74
Abbildung 22. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 24 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).....	75
Abbildung 23. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 40 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).....	76
Abbildung 24. Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von MDA-MB-231 +EV und +anti-miR-221 48 h nach Bestrahlung (0,2,4,8 Gy).....	77
Abbildung 25. Anzahl der Pixel der Zelllinie MDA-MB-231 mit miR-221-Knock-down (grau) im Vergleich zur EV-Kontrolle (grün) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung. Die gemessene Pixelanzahl dient als Maß für die Migration und ist in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2, 4, 8 Gy) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.....	80
Abbildung 26. Relative Proliferation (A,C,E) und Migration (B,D,F) von SKBR3 +EV (grau) und SKBR3 +miR-221 (grün) 24 (A,B), 48 (C,D) und 72 (E,F) h nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy (horizontal). Normalisiert wurde auf SKBR3 +EV 0 Gy des jeweiligen Zeitpunktes. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten.	83

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 27. Relative Proliferation (A,C) und Migration (B,D) von MDA-MB-231 +EV (grün) und MDA-MB-231 +anti-miR-221 (grau) 24 (A,B) und 48 (C,D) nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 8 Gy (horizontal). Normalisiert wurde auf MDA-MB-231 +EV 0 Gy des jeweiligen Zeitpunktes. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten..... 85
- Abbildung 28. Western Blot von uPAR und Actin (Housekeeper) 24 (A), 48 (B) und 72 (C) h nach Bestrahlung (0, 2, 4 und 8 Gy) in SKBR3 +miR-221 und SKBR3 +EV. Gezeigt ist jeweils ein biologisches Replikat zur Veranschaulichung. Alle Proben weisen uPAR-Expression auf. Es ist eine Tendenz erkennbar, dass SKBR3 +miR-221 höhere Expression als die Kontrolle EV bei 0 Gy zeigen. 87
- Abbildung 29. Relative uPAR-Expression normalisiert auf Actin und die unbestrahlte Kontrolle SKBR3 +EV zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) nach Bestrahlung (0, 2, 4 und 8 Gy) in SKBR3 +miR-221 und SKBR3 +EV. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus drei biologischen Replikaten. Für eine statistische Beurteilung wurden zunächst mehrfaktorielle ANOVA zu den drei Zeitpunkten durchgeführt. Diese ergaben keinen signifikanten Gesamteinfluss der Faktoren miR-221 und Bestrahlung auf die uPAR-Expression..... 88

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Übersicht für durchgeführte lentivirale Transduktionen. Auflistung der verwendeten Plasmide mit jeweiligen Genprodukten in Klammern.....	29
Tabelle 2. Kultivierung in Zellkulturflaschen verschiedener Größe.....	30
Tabelle 3. Benötigtes Mediumvolumen bei verschiedenen Wellgrößen.	32
Tabelle 4. Übersicht über ausgesäte Proben, Bestrahlung und Erntezeitpunkte in Versuchen 3.2, 3.4 und 3.6. Der Erntezeitpunkt 0 h fand direkt nach Bestrahlung der Zellen statt.	33
Tabelle 5. Übersicht der pro Probe verwendeten Reagenzien zur Herstellung eines Master-Mix für reverse Transkription.....	35
Tabelle 6. Übersicht der pro Probe verwendeten Reagenzien zum Ablauf der PCR.	36
Tabelle 7. Ausgesäte Zellzahl pro Well in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis. Jede Behandlungseinheit wurde in 12 technischen Replikaten ausgesät.....	37
Tabelle 8. Konzentrationen der für die Standardkurve verwendeten BCA-Standards.	44
Tabelle 9. Chemische Zusammensetzung der für die Gelelektrophorese verwendeten Trenn- und Sammelgele.....	45
Tabelle 10. Darstellung der Reihenfolge der Proben in den Geltaschen einer Laufkammer. Dieser Durchlauf erfolgte für die 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung geernteten Proben.	45
Tabelle 11. Verwendete Antikörper und zugehörige Block-Lösungen.....	47
Tabelle 12. α - und β -Parameter (Mittelwerte und SD) der linear-quadratischen Annäherungen für die Zelllinien SKBR3 +EV und SKBR3 +miR-221.....	56
Tabelle 13. α - und β -Parameter (Mittelwerte und SD) der linear-quadratischen Annäherungen für die Zelllinien MDA-MB-231 +EV und MDA-MB-231 +anti-miR-221.....	58

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Dr. Thomas Schmid danken, der mir die Mitarbeit an diesem Projekt meiner Doktorarbeit erst ermöglicht und der mich über die letzten Jahre kompetent und zuverlässig betreut hat. Besonders für die organisatorische Hilfe im Bezug auf die Graduate School und die Betreuung auf den Kongressen, auf denen ich meine Arbeit vorstellen durfte, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ganz besonders möchte ich auch meiner Mentorin Dr. Nataša Anastasov danken, die mein Projekt entworfen hat, meine primäre Ansprechpartnerin am Helmholtz Zentrum war und mich dort in ihre Arbeitsgruppe am ISB eingebunden hat. Sie stand mir für alle meine Fragen zur Planung, Organisation und Auswertung der Experimente immer zuverlässig im Nachbarbüro zur Seite und führte die Transduktion der Zellen durch, die ich für meine Versuche verwendet habe.

In dem Rahmen möchte ich auch dem Leiter des ISB Prof. Dr. Mike Atkinson für die Möglichkeit, in seiner Abteilung mitwirken zu können und für die konstruktive Kritik meiner Arbeit und Vorträge danken.

Vielen Dank an Jessica Ott, auf deren Doktorarbeit meine eigene aufgebaut hat und die mir bei der praktischen Durchführung der Migrationsexperimente geholfen hat. Einen herzlichen Dank auch an Dr. Lisa Mutschelknaus und an Dr. Simone Mörtl, die die Auswertung der Migrationsexperimente erst möglich gemacht haben.

Der Arbeitsgruppe am ISB gilt ein großes Dankeschön, ganz besonders Klaudia Winkler, Stefanie Winkler und Rosemarie Kell, mit denen ich mir ein Büro teilen durfte und die mir alle meine Fragen zu den Experimenten so geduldig beantwortet haben und mir die Laborarbeit und die Arbeit mit der Bestrahlungsmaschine Schritt für Schritt gezeigt haben. Vielen Dank auch an die Doktorandinnen Sabine Richter und Mona Wohlrab, die mir gerade bei der Auswertung meiner Experimente riesig geholfen haben.

Ich möchte meinen Eltern danken, Mechthilde Lagleder und Heinrich Hirmer, ohne die ich nicht hier wäre und die mich über all die Jahre begleitet und unterstützt haben. Ich bin sehr froh und stolz, euch meine Eltern nennen zu können.

Danksagung

Meinem Freund Christoph Herb möchte ich danken, nicht nur für den talentierten Einsatz seiner Programmierkünste zur Entwicklung einer Auswertungsmethode für meine Migrationsversuche, sondern vor allem für den seelischen Beistand, mit dem er mich durch alle Höhen und Tiefen meiner Arbeit begleitet hat, sodass ich nie besonders tief gefallen bin.