

# Solar simulierte Strahlung und Progression des Plattenepithelkarzinoms: Die Rolle von miRNAs und TGF- $\beta$ 1

*Solar simulated radiation and progression of cutaneous squamous  
cell carcinoma: the role of miRNAs and TGF- $\beta$ 1*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) an der Fakultät für  
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie, Universität Hamburg

Von  
Marc Bender  
aus Buxtehude

2023  
Juli

Tag der Disputation: 10.11.2023

1. Gutachter:in: Prof. Dr. Julia Kehr

2. Gutachter:in: Dr. Rüdiger Greinert

Diese Arbeit wurde betreut und erstellt im Labor für Molekulare Zellbiologie des Elbe  
Klinikums Buxtehude



---

# Inhaltsverzeichnis

---

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XV
Zusammenfassung	XVII
Summary	XIX
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau der Haut	2
1.1.1 Epidermis	3
1.1.2 Dermis	3
1.1.3 Subkutis	3
1.2 Solare Strahlung	4
1.2.1 Terrestrische Sonnenstrahlung	4
1.2.2 Physikalische Grundlagen der solaren Strahlung	6
1.2.3 Eindringtiefe in menschliche Haut	8
1.2.4 Biologische Prozesse	9
1.2.4.1 UVB	10
1.2.4.2 UVA	13
1.2.4.3 Sichtbares Licht und nahe Infrarotstrahlung	15
1.2.4.4 Synergistische und modulatorische Effekte kombinierter Strahlenexposition	16
1.3 miRNA	17
1.3.1 miRNA-Biosynthese	17
1.3.2 Funktion von miRNAs	20
1.3.3 miRNA-Regulierung durch solare Strahlung	22
1.4 Kutanes Plattenepithelkarzinom	26
<b>2 Ziel der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>3 Material</b>	<b>31</b>
3.1 Geräte	31
3.2 Chemikalien und Reagenzien	32
3.3 Antikörper	33
3.4 Kits	33
3.5 Zellkulturmedien	34
3.6 Puffer und Gebrauchslösungen	34
3.7 Verbrauchsmaterialien	36
3.8 Zelllinien	36
3.8.1 Met-Zelllinien	36

3.8.2	SCC-Zelllinien . . . . .	37
3.9	Oligonukleotide . . . . .	38
3.9.1	mRNA PCR-Primer . . . . .	38
3.9.2	miRNA PCR-Primer . . . . .	39
3.9.3	miRNA Inhibitoren . . . . .	39
3.10	Software . . . . .	40
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>41</b>
4.1	Zellbiologische Methoden . . . . .	41
4.1.1	Kultivierung humaner Hautkrebszelllinien . . . . .	41
4.1.2	Isolierung und Kultivierung primärer Fibroblasten . . . . .	41
4.1.3	Passagieren von Zellen . . . . .	41
4.1.4	Zellzahlbestimmung . . . . .	42
4.1.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen . . . . .	42
4.1.6	UV-Bestrahlung von Zellen . . . . .	42
4.1.6.1	KAUVIR-Strahlungsquelle . . . . .	42
4.1.6.2	Zellpräparation und Bestrahlung . . . . .	44
4.1.7	Transfektion . . . . .	45
4.1.8	Bestimmung des Zellwachstums . . . . .	45
4.1.9	Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 . . . . .	46
4.1.10	Durchflusszytometrie . . . . .	46
4.1.10.1	Zellzyklusanalyse . . . . .	47
4.1.10.2	Messung von Früh- und Spätapoptose mittels Annexin-V . . . . .	49
4.1.10.3	Doppelanfärbung der Oberflächenproteine E- und N-Cadherin . . . . .	50
4.1.11	Immunhistochemie . . . . .	51
4.1.12	Scratch-Assay . . . . .	51
4.1.13	Transwell-Assays mittels Boyden-Kammer . . . . .	52
4.1.13.1	Migration-Assay . . . . .	52
4.1.13.2	Invasion-Assay . . . . .	53
4.1.14	Gewebepräparation . . . . .	54
4.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	55
4.2.1	Isolation und Aufreinigung von Ribonukleinsäure (RNA) . . . . .	55
4.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration . . . . .	56
4.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	56
4.2.3.1	Reverse Transkription . . . . .	56
4.2.3.2	qPCR . . . . .	57
4.2.3.3	miRCURY LNA™ microRNA (miRNA) PCR Assay . . . . .	58
4.2.4	FirePlex® Assay . . . . .	59
4.2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) . . . . .	60
4.3	Bioinformatische Analyse und Statistik . . . . .	61
4.3.1	Statistische Auswertung . . . . .	61
4.3.2	PCA . . . . .	62
4.3.3	Clusteranalyse . . . . .	63
4.3.4	Pathway-Analyse . . . . .	63
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>65</b>
5.1	Analyse der Multiplex-Ergebnisse mittels PCA . . . . .	65

5.2	Analyse basaler miRNA-Level in cSCC-Zelllinien unterschiedlicher Differenzierungsgrade . . . . .	67
5.3	Analyse der miRNA-Expression in cSCC-Zelllinien nach Bestrahlung mit solar simulierter Strahlung . . . . .	70
5.4	Strahlungssensitivität in cSCC-Zelllinien . . . . .	75
5.5	Differentielle miRNA-Expression in Gewebe von SCC-Patienten . . . . .	77
5.6	Analyse der miR-205-5p Funktion im cSCC . . . . .	79
5.7	Expression von EMT-Markern in SCC-12 Zellen nach miR-205 Knock-down oder Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 . . . . .	87
5.8	Migrationspotential von SCC-12 Zellen nach TGF-beta Behandlung . . . . .	89
5.9	Invasionspotenzial von SCC-12 Zellen nach TGF-beta Behandlung . . . . .	93
5.10	Einfluss chronischer Bestrahlung von Fibroblasten und SCC-12 auf den TGF- $\beta$ -Pathway . . . . .	94
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
6.1	Die Tumorheterogenität ist assoziiert mit distinkten Veränderungen der miRNA-Expression und der Strahlungssensitivität . . . . .	98
6.2	Chronische cSS-Exposition führt zu universellen und spezifischen Alterationen der miRNA-Expression im cSCC . . . . .	101
6.2.1	Funktion der differentiell exprimierten miRNAs . . . . .	103
6.2.2	Komplementäre Analyse der miRNA-Expression im cSCC-Tumorgewebe . . . . .	105
6.3	Der Knockdown von miR-205-5p induziert keine phänotypischen Veränderungen im cSCC <i>in vitro</i> . . . . .	107
6.4	Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways fördert die EMT im cSCC <i>in vitro</i> . . . . .	110
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>117</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>
	<b>Anhang</b>	<b>149</b>
1	Ergänzende Abbildungen . . . . .	149
2	Ergänzende Tabellen . . . . .	153
3	Publikationen . . . . .	156
	<b>Danksagung</b>	<b>157</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>159</b>



---

# Abkürzungsverzeichnis

---

<b>6-4PP</b>	Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidonphotoprodukt
<b>8-OHdG</b>	8-Hydroxydesoxyguanosin
<b>a.u.</b>	<i>Arbitrary units</i>
<b>ACTB</b>	Aktin- $\beta$
<b>AKT</b>	Proteinkinase B
<b>ATAC-seq</b>	<i>Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing</i>
<b>ATF3</b>	Aktivierender Transkriptionsfaktor 3
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated
<b>ATR</b>	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein
<b>BCC</b>	Basalzellkarzinom
<b>BCL2</b>	B-cell Lymphoma 2
<b>BER</b>	Basenexzisionsreparatur
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>Cas</b>	CRISPR-associated
<b>CCNE1</b>	Cyclin D
<b>CCNE1</b>	Cyclin E
<b>CCR4</b>	Carbon Catabolite Repression
<b>CDH1</b>	E-Cadherin
<b>CDK</b>	Cyclin-abhängige Kinase
<b>CDKN1A</b>	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1A
<b>CDKN2A</b>	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A
<b>CDKN2B</b>	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2B
<b>cDNA</b>	<i>Copy DNA</i>
<b>CAF</b>	<i>Cancer associated fibroblast</i>
<b>CIE</b>	Internationale Beleuchtungskommission
<b>c-Jun</b>	Transcription Factor AP-1 Subunit Jun
<b>c-Myc</b>	Proto-Onkogen C-Myc



## *Inhaltsverzeichnis*

<b>CPD</b>	Cyclobutan-Pyrimidindimer
<b>CRISPR</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
<b>cSCC</b>	Kutanes Plattenepithelkarzinom
<b>cSS</b>	Gesamtes solar simuliertes Spektrum
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindol
<b>DCP</b>	mRNA-Decapping-Enzym
<b>DDR</b>	<i>Dna damage response</i>
<b>DGCR8</b>	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
<b>DMD</b>	Dystrophin
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNMT</b>	DNA-Methyltransferase
<b>DSB</b>	Doppelstrangbruch
<b>E2F2</b>	E2F Transkriptionsfaktor 2
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EK</b>	Endkonzentration
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>EMT</b>	Epithelial-mesenchymale Transition
<b>ERK</b>	Extracellular Signal-regulated Kinases
<b>ERBB2</b>	Erb-b2 Rezeptortyrosinkinase 2
<b>EV</b>	Extrazelluläre Vesikel
<b>FACS</b>	Flusszytometer
<b>FAD</b>	Zellkulturmedium, 3:1 Gemisch aus DMEM und Ham's F12 + Supplementen
<b>FANTOM5</b>	<i>Functional Annotation of Mammalian Genome</i>
<b>FICZ</b>	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FKS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FSC</b>	<i>Forward scatter</i>
<b>FDR</b>	<i>False discovery rate</i>

<b>FOXO3</b>	Forkhead-Box-Protein O3
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>geoMean</b>	Geometrisches Mittel
<b>geoSD</b>	Geometrische Standardabweichung
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
<b>GO</b>	<i>Gene Ontology</i>
<b>GRHL3</b>	Grainyhead-like 3
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HBSS</b>	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
<b>hccm</b>	<i>Heteroscedasticity corrected covariance matrices</i>
<b>h-EGF</b>	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor
<b>HNSCC</b>	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom
<b>HPRT1</b>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
<b>HR</b>	Homologe Rekombination
<b>hsa</b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INPPL1</b>	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2
<b>IRA</b>	Infrarotstrahlung A (780 nm - 1400 nm)
<b>IRB</b>	Infrarotstrahlung B (1400 nm - 3000 nm)
<b>IRC</b>	Infrarotstrahlung C (3000 nm - 1 mm)
<b>ITGA5</b>	Integrin Subunit Alpha 5
<b>JNK</b>	C-Jun-N-terminale Kinase
<b>KEGG</b>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<b>KSRP</b>	KH-Type Splicing Regulatory Protein
<b>LNA</b>	<i>Locked nucleid acid</i>
<b>LMNB1</b>	Lamin B1
<b>m<sup>7</sup>G</b>	7N-Methylguanin
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>MED</b>	Minimale Erythemdosis
<b>miRISC</b>	Minimaler miRNA <i>induced silencing complex</i>
<b>miRNA</b>	microRNA

## *Inhaltsverzeichnis*

<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>mRNA</b>	Messenger-RNA
<b>NGS</b>	Next-Generation-Sequencing
<b>NER</b>	Nukleotid-Exzisionsreparatur
<b>NHEJ</b>	<i>Non homologous end-joining</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>b</b>	Nuclear Factor ' $\kappa$ -light-chain-enhancer' of Activated B-cells
<b>NOT</b>	Negative On TATA-less
<b>NOTCH1</b>	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1
<b>NUFIP2</b>	Nuclear FMR1 Interacting Protein 2
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>onco-miR</b>	Onkogene microRNA
<b>ORA</b>	Overrepresentation-Analyse
<b>PAN2</b>	Poly(A) Specific Ribonuclease Subunit PAN2
<b>PAN3</b>	Poly(A) Specific Ribonuclease Subunit PAN3
<b>PABPC</b>	Poly(A)-binding protein C
<b>PCA</b>	<i>Principal component analysis</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative real-time PCR</i>
<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
<b>PJ</b>	Propidiumjodid
<b>pre-miRNA</b>	<i>Precursor microRNA</i>
<b>pri-miRNA</b>	Primäre microRNA
<b>PTCH</b>	Protein Patched Homolog
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin Homolog
<b>PUVA</b>	Psoralen/UVA
<b>RAS</b>	Rat Sarcoma

<b>RAN-GTPase</b>	RAS-related Nuclear Protein-guanosine-5'-triphosphate-ase
<b>RHOBTB1</b>	Rho Related BTB Domain Containing 1
<b>RISC</b>	<i>RNA-induced Silencing Complex</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNS</b>	Reaktive Stickstoffspezies
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RUNX1</b>	Runt-related Transcription Factor 1
<b>SCC</b>	Plattenepithelkarzinom
<b>scRNA-seq</b>	<i>Single cell RNA sequencing</i>
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SMAD</b>	Mothers Against Decapentaplegic Homolog
<b>SNAI1</b>	Zinkfingerprotein SNAI1
<b>SP1</b>	Sp1 Transkriptionsfaktor
<b>SSC</b>	<i>Side scatter</i>
<b>TBP</b>	TATA-binding protein
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline</i>
<b>TE</b>	Tris-EDTA-Puffer
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor $\beta$
<b>TGFBR</b>	TGF- $\beta$ -Rezeptor
<b>TP53</b>	Protein p53
<b>TRBP</b>	TAR RNA-binding protein
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UV</b>	Ultraviolette Strahlung (100 nm - 400 nm)
<b>UVA</b>	Ultraviolette Strahlung (315 nm - 400 nm)
<b>UVB</b>	Ultraviolette Strahlung (280 nm - 315 nm)
<b>UVC</b>	Ultraviolette Strahlung (100 nm - 280 nm)
<b>UTR</b>	<i>Untranslated region</i>
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>VEGFA</b>	Vascular Endothelial Growth Factor A

## *Inhaltsverzeichnis*

<b>VIS</b>	Sichtbares Licht (400 nm - 780 nm)
<b>WNT</b>	Wingless and Int-1
<b>XP</b>	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
<b>XPO5</b>	Exportin 5
<b>XRN1</b>	Exoribonuklease 1
<b>ZEB</b>	Zinc Finger E-box Binding Homeobox

---

# Abbildungsverzeichnis

---

1.1	Aufbau der menschlichen Haut. . . . .	2
1.2	Elektromagnetisches Spektrum. . . . .	4
1.3	Spektrales Sonnenspektrum . . . . .	6
1.4	Erythemgewichtete Effektivität. . . . .	8
1.5	Eindringtiefe von solarer Strahlung in menschliche Haut. . . . .	9
1.6	UV-induzierte Photoprodukte. . . . .	11
1.7	Desaminierung von Cytosin zu Uracil. . . . .	12
1.8	Oxidation von Desoxyguanosin zu 8-Hydroxydesoxyguanosin. . . . .	14
1.9	miRNA Biosynthese. . . . .	18
1.10	miRNA-vermittelte mRNA Degradation. . . . .	21
1.11	Schematische Darstellung der strahlungsinduzierten miRNA-Regulation. . . . .	25
4.1	KAUVIR-Lampe. . . . .	43
4.2	Setzen von Gates zur Zellzyklusanalyse. . . . .	47
4.3	Zellzyklusanalyse mit Mod Fit™. . . . .	48
4.4	Annexin-V-Apoptose-Assay. . . . .	50
4.5	Boyden-Kammer. . . . .	53
4.6	FirePlex® Assay. . . . .	60
5.1	Identifikation eines Zelllinien- und Bestrahlungseffekts im miRNA-Muster. . . . .	66
5.2	Hierarchische Clusteranalyse und <i>Gene Set Enrichment</i> einzelner Cluster in SCC-Zelllinien. . . . .	68
5.3	Untersuchung des Bestrahlungseffekts mittels PCA. . . . .	71
5.4	Zelllinienspezifische miRNA-Expression nach chronischer cSS-Bestrahlung. . . . .	72
5.5	Universelle miRNA-Expression nach chronischer cSS-Bestrahlung. . . . .	74
5.6	Netzwerkanalyse differentiell hochregulierter miRNAs nach cSS-Bestrahlung . . . . .	75
5.7	Differenzen in der Strahlungssensitivität unterschiedlicher cSCC-Zelllinien. . . . .	76
5.8	miRNA-Expression in cSCC-Gewebe verglichen mit sonnengeschützter und -exponierter Haut. . . . .	78
5.9	Die Behandlung mit einem miR-205-5p Inhibitor führt zum langanhaltenden miR-205-5p Knockdown und transienter Hochregulation von Zielgenen. . . . .	81
5.10	Analyse komplementärer miRNAs nach miR-205 Inhibition. . . . .	83

## Abbildungsverzeichnis

5.11	Die Zellzyklusverteilung und das Zellwachstum in SCC-12 werden durch eine miR-205 Inhibition nicht beeinflusst. . . . .	84
5.12	Ein miR-205-5p Knockdown hat keinen Einfluss auf die Apoptoseinduktion in SCC-12. . . . .	85
5.13	Die miR-205-5p Inhibition hat keine Auswirkungen auf das Migrationsverhalten von SCC-12. . . . .	86
5.14	TGF- $\beta$ induziert einen mesenchymalen Phänotyp auf Proteinebene <i>in vitro</i> . . . . .	88
5.15	TGF- $\beta$ fördert die Migration von SCC-12 im Zellverbund. . . . .	90
5.16	TGF- $\beta$ erhöht das Migrationspotenzial einzelner SCC-12 Zellen durch eine semipermeable Membran. . . . .	92
5.17	TGF- $\beta$ erhöht das Invasionspotenzial einzelner SCC-12 Zellen durch eine semipermeable Membran mit künstlicher Basalmembran. . . . .	94
5.18	Chronische cSS-Bestrahlung führt zur dynamischen Inhibition des TGF- $\beta$ -Pathways in Fibroblasten aber nicht in SCC-12. . . . .	96
6.1	Visuelle Repräsentation des Workflows. . . . .	98
6.2	Vergleich genetischer und phänotypischer Merkmale der fünf untersuchten Zelllinien. . . . .	99
6.3	Schematische Darstellung des miR-200/miR-205/ZEB1/ZEB2 Feedback-Loops. . . . .	108
6.4	Schematische Darstellung der kanonischen und non-kanonischen TGF- $\beta$ -Signaltransduktion. . . . .	111
6.5	Modell der autokrinen und parakrinen Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways durch oxidativen Stress und Bestrahlung im cSCC. . . . .	113
A.1	Pathway-Analyse differentiell exprimierter miRNAs zwischen den Clustern A (Met-1/Met-4), B (SCL-II) und C (SCC-12/SCC-13). . . . .	149
A.2	qPCR-Validierung der Fireplex <sup>®</sup> -Ergebnisse. . . . .	150
A.3	miR-205 Expression nach akuter und chronischer Bestrahlung. . . . .	151

---

# Tabellenverzeichnis

---

3.1	Geräte und Hersteller. . . . .	31
3.2	Chemikalien und Reagenzien. . . . .	32
3.3	Verwendete Antikörper. . . . .	33
3.4	Kits und Hersteller. . . . .	33
3.5	Zellkulturmedien. . . . .	34
3.6	Puffer und Gebrauchslösungen. . . . .	35
3.7	Verbrauchsmaterialien. . . . .	36
3.8	Merkmale von Met-Zelllinien. . . . .	37
3.9	Merkmale von SCC-Zelllinien. . . . .	37
3.10	mRNA-Primer. . . . .	38
3.11	miRNA-Primer. . . . .	39
3.12	miRNA-Inhibitoren. . . . .	39
3.13	Verwendete Software. . . . .	40
4.1	Daten zur Bestrahlung von humanen cSCC-Zelllinien und primären Fibroblasten. . . . .	45
4.2	Daten zu den Hautgewebeproben. . . . .	54
4.3	Daten zu den cSCC-Gewebeproben. . . . .	55
4.4	PCR-Programm. . . . .	58
4.5	miRCURY LNA™miRNA PCR-Programm. . . . .	58
4.6	FirePlex®-Panel. Die zwölf stabilsten miRNAs wurden zur Normalisie- rung genutzt und sind fettgedruckt. . . . .	59
5.1	Zielgene von miR-205-5p und deren Funktion im cSCC. . . . .	82
A.1	Gering exprimierte miRNAs im FirePlex®-Assay (< 2,5 a.u.). . . . .	153
A.2	KEGG-Pathway-Analyse (Top 10) der miRNAs aus Abbildung 5.7. Er- stellt mit miRTargetLink 2.0, Abrufdatum 06.12.2022 . . . . .	154
A.3	Signifikant veränderte GO-Terme des im Tumor herunterregulierten 13- miRNA Sets aus Abbildung 5.8. Ermittelt mit miEAA 2.0, Abrufdatum 13.12.2022. . . . .	155





---

# Zusammenfassung

---

Das kutane Plattenepithelkarzinom (cSCC) ist eine häufige Erkrankung in der hellhäutigen Bevölkerung. Der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines cSCCs ist die Sonnenexposition, insbesondere der Anteil ultravioletter Strahlung (UV). Obwohl eine frühzeitige Erkennung von cSCCs die Prognose durch Entfernung des Tumors signifikant verbessern kann, weisen lokal fortgeschrittene oder metastasierte cSCCs eine deutlich schlechtere Prognose aufgrund begrenzter Therapiemöglichkeiten auf. Die Mechanismen, die der Progression zum metastatischen cSCC zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt. Unsere Hypothese ist, dass die Exposition gegenüber solar simulierter Strahlung (cSS) zusätzliche Veränderungen in bereits transformierten epithelialen cSCC-Zellen auslösen kann, die zur Progression des cSCCs beitragen könnten. Darüber hinaus glauben wir, dass cSS-induzierbare microRNAs (miRNAs) eine bedeutende Rolle bei diesem Prozess spielen.

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass eine chronische cSS-Bestrahlung (UVB+UVA+VIS+IRA) komplexe Veränderungen im miRNA-Muster von fünf verschiedenen cSCC-Zelllinien (Met-1, Met-4, SCC-12, SCC-13, SCL-II) verursachte. Diese Veränderungen waren entweder zelltypspezifisch und deuteten eine spezifische Strahlenantwort an oder waren ubiquitär vorhanden und wiesen auf konservierte Elemente in der zellulären Strahlenantwort hin. Ein Teil dieser Unterschiede konnte der Tumorerheterogenität zugeschrieben werden, insbesondere Differenzen im p53-Mutationsstatus. p53-defiziente Zelllinien zeigten stärkere miRNA-Veränderungen, die wahrscheinlich auf eine erhöhte Strahlungssensitivität zurückzuführen sind. Eine ergänzende Untersuchung des miRNA-Musters im cSCC-Gewebe im Vergleich zu gesunden Probanden, zeigte eine Hochregulierung eines onkogenen 3-miRNA-Sets bei gleichzeitiger Herunterregulierung eines 13-miRNA-Sets, das mit Tumorsuppression und der UV-Strahlenantwort assoziiert ist. Eine übereinstimmende Herunterregulierung von miR-205-5p wurde sowohl nach Bestrahlung in Zelllinien als auch in Tumorgewebe beobachtet. Daher wurde die Funktion von miR-205-5p im cSCC *in vitro* durch den Knockdown von miR-205-5p in SCC-12 untersucht. Trotz einer effizienten und lang anhaltenden Herunterregulierung von miR-205-5p, wurde die Zielgenexpressionen nur transient 24 h nach der Transfektion verändert und die Expressionslevel normalisierten sich bereits nach 72 h. Diese Normalisierung der Genexpression ging mit einem Mangel an phänotypischen Veränderungen (Zellwachstum, Zellzyklus, Apoptose, Migration) in miR-205-5p Knockdown Zellen einher. Die Hochregulation von miR-200a-3p nach miR-205-5p-Knockdown lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass die Funktion von miR-205-5p durch intra-

zelluläre Feedback-Loops gehemmt werden könnte. Insbesondere der miR-200/miR-205/ZEB1/ZEB2 Feedback-Loop und der damit verbundene Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Signalweg rückten in den Fokus. Der Einfluss des TGF- $\beta$ -Signalwegs auf zelluläre Prozesse wurde durch die Behandlung von SCC-12 mit rekombinantem TGF- $\beta$ 1 getestet und die Expression von EMT-Markern sowie das Migrations- und Invasionspotential untersucht. Die mesenchymalen Marker N-Cadherin und Vimentin waren nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung signifikant hochreguliert, während der epitheliale Marker E-Cadherin eine reduzierte Expression aufwies. Auf zellulärer Ebene wurde dies von einer erhöhten Migration in einem Scratch-Assay sowie der erhöhten Migration und Invasion durch eine semipermeable Membran begleitet. Wir kamen daher zu dem Schluss, dass die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs die Tumorprogression und Metastasierung durch Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) in bereits transformierten cSCCs *in vitro* fördert. Eine vermutete autokrine oder parakrine Induktion des TGF- $\beta$ -Signalwegs durch chronische Bestrahlung von SCC-12 und Fibroblasten konnte nicht bestätigt werden. Zusammen mit Daten aus der Literatur scheint es, dass akute oder chronische Bestrahlung *in vitro* die TGF- $\beta$ -Signaltransduktionskaskade nicht verändert oder sogar blockiert. Während des Photoagings der Haut ist jedoch ein Switch zur Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways beschrieben. Zur Verifizierung eines Modells strahlungsinduzierter Veränderungen im Zuge der Hautalterung sollte dieser Switch im Mausmodell in zukünftigen Studien nachgewiesen werden.

Zusammenfassend liefern die gewonnenen Daten Einblicke in das komplexe Zusammenspiel von cSS-Strahlung, miRNAs und dazugehörigen Signalwegen sowie der Tumorprogression.

---

# Summary

---

Cutaneous squamous cell carcinoma is a common malignancy in the fair-skinned population. The primary risk factor for cSCC development is exposure to solar radiation, mainly ultraviolet radiation. Although early detection of cSCC can significantly improve the prognosis, locally advanced or metastatic cSCC has a markedly worse outcome. However, the mechanisms behind the progression to metastatic cSCC are not well understood. Our hypothesis is that solar simulated radiation exposure may trigger additional changes in already transformed epithelial cSCC cells that could contribute to the progression to metastatic cSCCs. Furthermore, we believe that cSS-inducible miRNAs may play a significant role in this process.

Here, we could show that chronic cSS irradiation (UVB+UVA+VIS+IRA) leads to complex changes in the miRNA pattern of five different cSCC cell lines (Met-1, Met-4, SCC-12, SCC-13, SCL-II). These changes were either cell type specific indicating a particular response to genotoxic insults, or ubiquitous suggesting conserved elements in the cellular radiation response. Moreover, it was evident that part of these differences could be attributed to tumor heterogeneity, especially disparities in the p53 mutational status. p53 deficient cell lines exhibited higher amplitudes in miRNA changes, likely caused due to an increased radiation sensitivity. A complementary examination of the miRNA pattern in cSCC tissue compared to healthy donors showed upregulation of an oncogenic 3-miRNA-set and simultaneous downregulation of a 13-miRNA-set associated with tumor suppression and response to UV radiation. Concordant downregulation of miR-205-5p was observed for irradiated cSCC *in vitro* and in tumor tissue *in vivo*. Thus, the function of miR-205-5p in cSCC was investigated *in vitro* by knockdown of miR-205-5p in SCC-12. Despite an efficient and prolonged downregulation of miR-205-5p, target gene expression was only transiently changed 24 h post-transfection and expression levels were normalized after 72 h. This quick recovery of initial gene expression was accompanied by a lack of phenotypic changes (cell growth, cell cycle, apoptosis, migration) in miR-205-5p knockdown experiments. Upregulation of miR-200a-3p after miR-205-5p knockdown provided a first hint that perhaps miR-205-5p function was nullified by intracellular feedback loops. Especially, the miR-200/miR-205/ZEB1/ZEB2 feedback loop and the associated transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pathway came to attention. The influence of the TGF- $\beta$  pathway on cellular processes was tested by treatment of SCC-12 with recombinant TGF- $\beta$ 1. To this end, we scrutinized expression levels of EMT markers as well as investigated the migratory and invasive potential. The mesenchymal markers N-Cadherin and Vimentin were significantly upregulated after

TGF- $\beta$ 1 treatment, whereas the epithelial marker E-Cadherin exhibited reduced expression, indicating an EMT on the protein level. On the cellular level this was supported by increased migration in a scratch assay and elevated migration as well as invasion through a semi-permeable membrane. We therefore concluded that activation of the TGF- $\beta$  pathway promotes tumor progression and metastasis by induction of EMT in already transformed cSCC *in vitro*. Yet, a putative autocrine or paracrine induction of the TGF- $\beta$  pathway by chronic irradiation of SCC-12 and fibroblasts could not be confirmed. Together with data from the literature it seems that acute or chronic irradiation *in vitro* does not activate or even blocks TGF- $\beta$  signaling. However, during the lengthy process of photoaging of the skin a switch towards activated TGF- $\beta$  signaling was reported previously. Verification of a TGF- $\beta$  switch catalysed by photoaging should be obtained from experiments in mice to simulate the radiation-induced aging process.

In conclusion, the obtained data provide insight into the complex interplay of cSS radiation, miRNAs with associated pathways and tumor progression.

---

# 1 Einleitung

---

Das kutane Plattenepithelkarzinom ist der zweithäufigste Hauttumor und zusammen mit dem Basalzellkarzinom (BCC) der häufigste Tumor in der hellhäutigen Bevölkerung [1, 2]. Im Frühstadium lässt sich ein SCC durch Exzision therapieren, verbunden mit sehr guter Prognose. Fortgeschrittene oder metastasierte SCCs sind hingegen schwer therapierbar und durch eine geringe 10-Jahres-Überlebensrate von 10-20% [3] gekennzeichnet. Über die gesamte Lebenszeit gilt akkumulierte UV-Strahlung als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines cSCCs. Weitere Risikofaktoren sind genotoxische Noxen (z.B. Herbizide, Pestizide) oder radioaktive Strahlung. Auch für den Einfluss von anderen Strahlenqualitäten des elektromagnetischen Spektrums (z.B. sichtbares Licht, Infrarotstrahlung) auf Prozesse, die mit der Tumorentstehung assoziiert sind, mehren sich Hinweise in aktuellen Studien (u.a. [4–6]). Insbesondere in Hinblick auf den demographischen Wandel lassen sich Zusammenhänge darstellen, da die *lifetime*-Dosis der UV-Strahlung und anderer Strahlenqualitäten des Sonnenlichts bei unverändertem Expositionsverhalten in Zukunft zunehmen wird. Folglich wird die Inzidenz initialer cSCCs in den nächsten Jahren voraussichtlich steigen, einhergehend mit einer erhöhten Rate metastasierter cSCCs [1, 7].

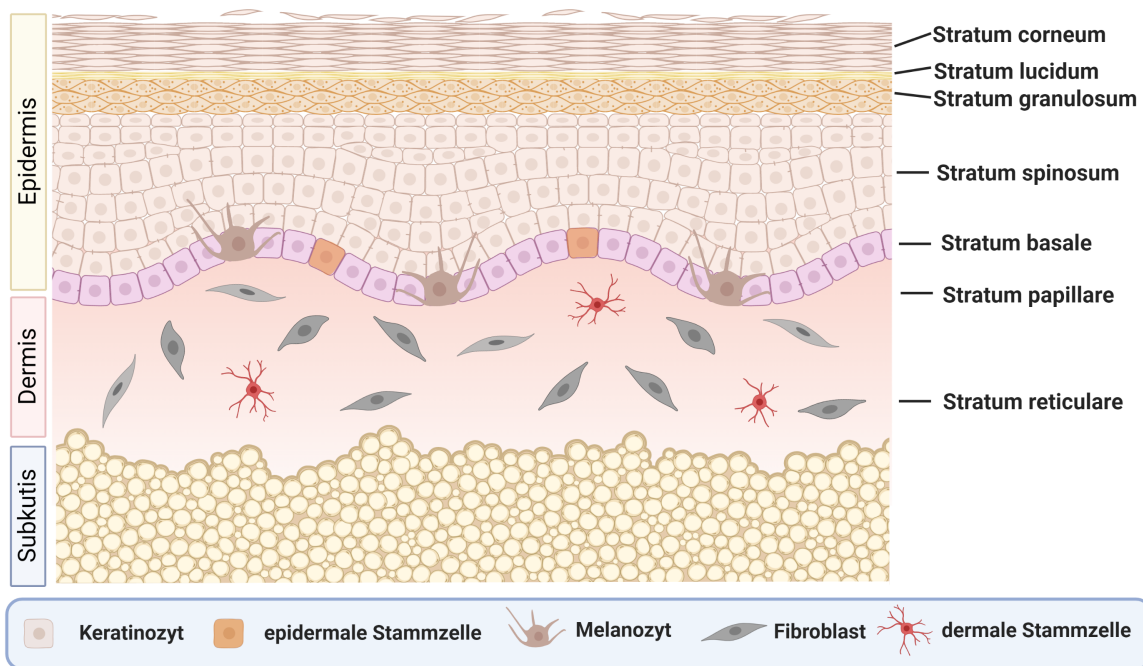
Die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung, -progression und Metastasierung des kutanen SCCs bedürfen jedoch noch weiterer Forschung, um die Erkrankung besser zu verstehen sowie effektive Therapien zu entwickeln. Aufgrund der o.g. Schlüsselrolle der UV-Strahlung in der cSCC-Karzinogenese ist auch ein Einfluss von UV-Strahlung (und anderer Strahlenqualitäten des Sonnenlichts) auf die Tumorprogression nach Ausbildung eines primären cSCCs wahrscheinlich.

Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit dem Einfluss von künstlich simulierter Sonnenstrahlung auf cSCC-Zellen *in vitro*, um einen möglichen Zusammenhang zur Tumorprogression mit einem Fokus auf epigenetischer Regulation durch miRNAs zu untersuchen. Dieser Endpunkt wurde gewählt, da miRNAs bei der Transformation von Keratinozyten zum primären cSCC eine wichtige Rolle spielen und ebenfalls in Metastasierungsprozesse involviert sind [8]. Ob miRNA-Expressionsmuster oder die Expression einzelner miRNAs (nach cSS-Exposition) *in vitro* und *in vivo* von Bedeutung sind, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Für das Verständnis dieser Zusammenhänge werden im Folgenden der Aufbau der Haut (Abschnitt 1.1), Grundlagen und biologische Effekte der solaren Strahlung (Abschnitt 1.2), miRNAs und deren Funktion (Abschnitt 1.3) sowie bekannte Mechanismen der cSCC-Entstehung (Abschnitt 1.4) näher erläutert.

## 1.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte menschliche Organ und übernimmt eine Vielzahl lebenswichtiger Funktionen. Zu ihren Aufgaben gehört die Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts, die Vitamin-D Synthese und die Thermoregulation durch Wärmeabgabe über die Oberfläche sowie Verdunstung von Wasser und Schweiß. Außerdem dient sie als mechanische Barriere dem Schutz vor chemischen, mikrobiellen und physikalischen (z.B. UV-Strahlung) Umwelteinflüssen. Darüber hinaus ist sie als peripheres Sinnesorgan durchsetzt von einer Vielzahl an Schmerz-, Wärme- und Tastrezeptoren. Sie ist aus drei Schichten aufgebaut - der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis) und der Unterhaut (Subkutis) -, die wiederum in weitere Schichten unterteilt sind (Abbildung 1.1). In den jeweiligen Hautschichten sind verschiedene Zelltypen lokalisiert, die spezifische Aufgaben übernehmen. Weitere essentielle Bestandteile der Haut sind Talg- und Schweißdrüsen sowie Haarfollikel [9, 10].



**Abbildung 1.1: Aufbau der menschlichen Haut.** Die Haut ist in drei Schichten gegliedert: die Epidermis, Dermis und Subkutis, die wiederum aus weiteren Schichten bestehen. In der Epidermis wandern Keratinozyten von der Basalzellschicht (*Stratum basale*) zur Hautoberfläche, wo sie zu Hornzellen differenzieren. Melanozyten schützen die Haut durch die Bildung von Melanin und die Abgabe an benachbarte Keratinozyten mittels mit Melanin gefüllten Vesikeln (Melanosomen). Die Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen und Sauerstoff erfolgt durch die Dermis und Subkutis, die außerdem für Elastizität und Festigkeit des Gewebes sorgen. Mit freundlicher Genehmigung von Christin Starzonek. Erstellt mit biorender.com.

### 1.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist die äußerste Hautschicht und charakterisiert durch ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel, das sich im Laufe von ca. vier Wochen einmal komplett erneuert. Die Epidermis besteht hauptsächlich aus Keratinozyten, die in der Basalzellschicht (*Stratum basale*) an der Grenze zur Dermis aus epidermalen Stammzellen entstehen. Anschließend wandern sie während des Differenzierungsprozesses zu Hornzellen (Korneozyten; bilden die Hornschicht) zur Hautoberfläche und durchqueren die verschiedenen epidermalen Schichten, die durch unterschiedliche Keratinproteine charakterisiert sind (von basal zu superfizial): Basalzellschicht, Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), Hornschicht (*Stratum corneum*). In der Leistenhaut (Handflächen, Fußsohlen) gibt es zusätzlich die Glanzschicht (*Stratum lucidum*), die in der Transitionszone zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* lokalisiert ist. In der Basalzellschicht befinden sich neben epidermalen Stammzellen die Langerhanszellen, Merkelzellen und Melanozyten. Diese dienen der Immunabwehr, dem Tastsinn beziehungsweise dem Schutz vor UV-Strahlung durch die Bildung und Abgabe von Melanin an umliegende Keratinozyten durch Melanosomen [9, 10].

### 1.1.2 Dermis

Die Dermis ist direkt unter der Epidermis lokalisiert und in zwei Schichten unterteilt: die *Stratum papillare* und *Stratum reticulare*. Die *Stratum papillare* ist durch zapfenförmige Verbindungen eng mit der Epidermis verzahnt, wohingegen die dickere *Stratum reticulare* einen fließenden Übergang zur tiefer liegenden Subkutis bildet. Die Dermis besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, die ein faseriges Netzwerk aus Proteinen (überwiegend Kollagenfasern) bilden, das für Halt und Elastizität sorgt. Weitere Zelltypen sind diverse Immunzellen (Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten, etc.) und dermale Stammzellen. Letztere sind der Neuralleiste entstammende Vorläuferzellen der Melanozyten, die als Ursprungszelle der Melanomgenese diskutiert werden [11]. Außerdem ist die Dermis von Blut-, Nerven- und Lymphbahnen durchzogen, die die Versorgung der Epidermis mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellen. Darüber hinaus sind in der unteren Dermis bis in die Subkutis die Hautanhangsgebilde (Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen) eingebettet [9, 10].

### 1.1.3 Subkutis

Unterhalb der Dermis liegt die Subkutis, eine stark dehnbare lockere Bindegewebsschicht mit umfangreichen Fetteinlagerungen. In der Subkutis sind hauptsächlich Fettzellen (Adipozyten) lokalisiert, die von Kollagenfasern umschlossen sind und eine schwammartige Struktur ausbilden. Ihre Aufgaben umfassen die Polsterung der Haut,

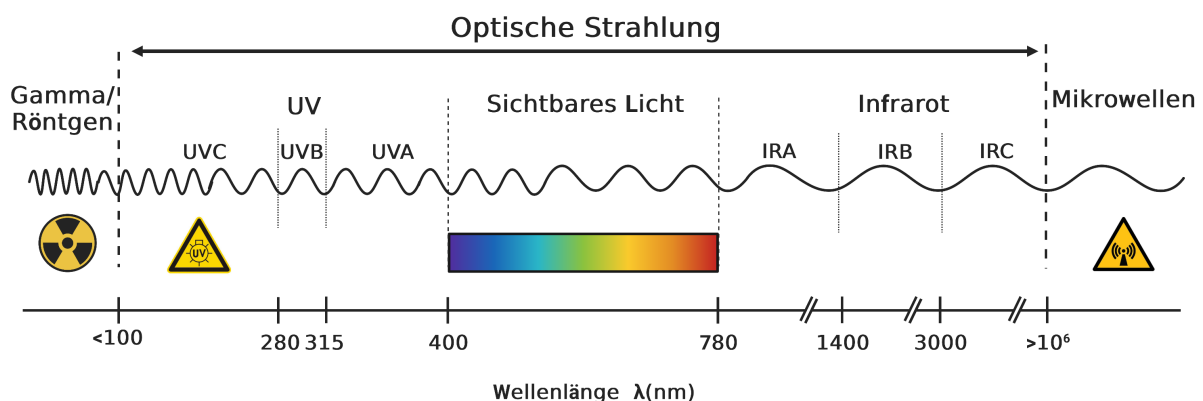


## 1 Einleitung

Energiespeicherung und Wärmeisolation. Die Subkutis schützt Knochen, Organe und Muskulatur gegen Wärmeverlust sowie mechanische Stöße und dient der Nährstoffversorgung der oberen Hautschichten. Um dies zu gewährleisten ist sie von größeren Blut- und Lymphgefäßen durchsetzt [9].

## 1.2 Solare Strahlung

Sonnenstrahlung ist die größte natürliche Quelle elektromagnetischer Strahlung auf der Erde und umfasst einen Großteil des elektromagnetischen Spektrums (Abbildung 1.2), hauptsächlich jedoch nicht-ionisierende optische Strahlung [12]. Diese beinhaltet Infrarotstrahlung (780 nm - 1 mm), sichtbares Licht (VIS, 400-780 nm) und UV-Strahlung (100-400 nm). Von besonderer biologischer Bedeutung ist die UV-Strahlung, da sie als Karzinogen eingestuft [13] und der Hauptrisikofaktor für die Bildung von Hauttumoren ist. Sie unterteilt sich in UVA- (315-400 nm), UVB- (280-315 nm) und UVC-Strahlung (100-280 nm), die jeweils spezifische biologische Effekte induzieren (s. Abschnitt 1.2.4). In letzter Zeit wurden VIS und nahe Infrarotstrahlung (IRA, 780-1400 nm) mit zellulären Schäden in Verbindung gebracht [5, 6] und sollen in dieser Arbeit ebenfalls berücksichtigt werden.



**Abbildung 1.2: Elektromagnetisches Spektrum.** Kurzwellige (<math><100</math> nm) Gamma- und Röntgenstrahlung ist die energiereichste elektromagnetische Strahlung und in der Lage Atome/Moleküle zu ionisieren, daher auch als ionisierende Strahlung bezeichnet. UV: Ultraviolette Strahlung, 100-400 nm. UVC: UV-Strahlung im Bereich 100-280 nm. UVB: UV-Strahlung im Bereich 280-315 nm. UVA: UV-Strahlung im Bereich 315-400 nm. Sichtbares Licht umfasst Wellenlängen von 400 nm bis 780 nm. IRA: Infrarotstrahlung im Bereich 780 nm bis 1400 nm. IRB: Infrarotstrahlung im Bereich 1400 nm bis 3000 nm. IRC: Infrarotstrahlung im Bereich 3000 nm bis 1 mm. Längerwellige, energiearme elektromagnetische Strahlung beinhaltet Mikrowellen und Radiowellen. Erstellt mit biorender.com (vgl. [12]).

### 1.2.1 Terrestrische Sonnenstrahlung

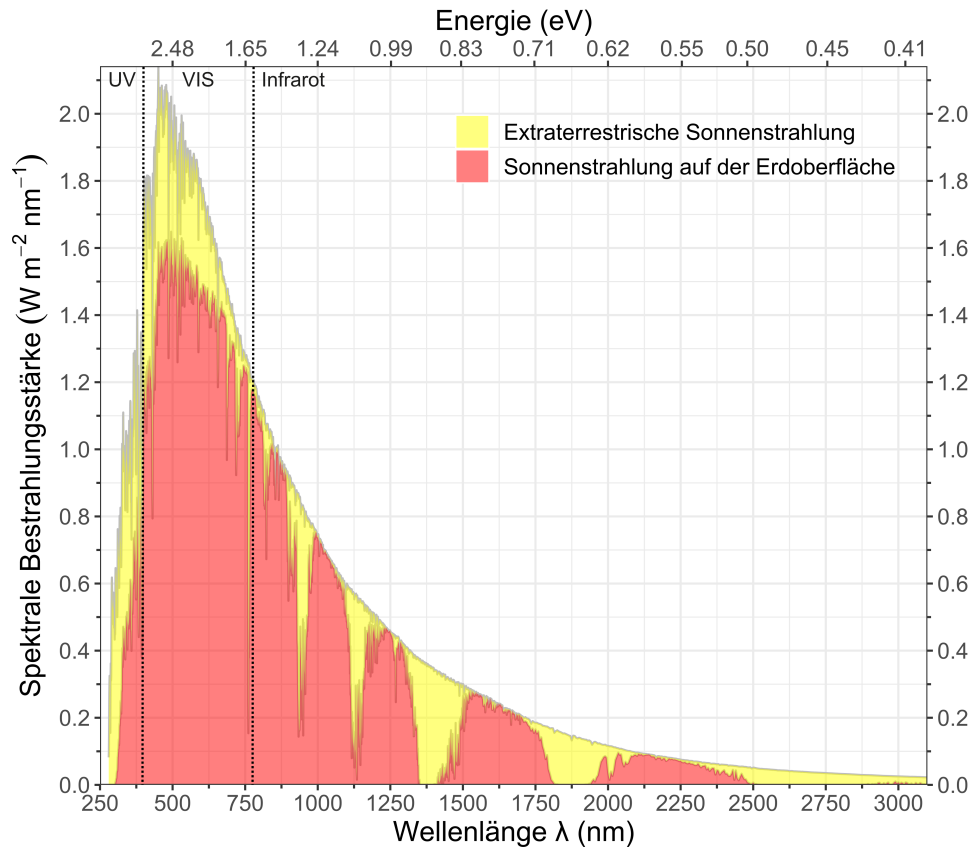
Die solare Strahlung unterscheidet sich in ihrer spektralen Zusammensetzung bei der Emission von der Sonne (extraterrestrische Strahlung) und dem Auftreffen auf der

Erdoberfläche (terrestrische Strahlung), grafisch dargestellt in Abbildung 1.3. Diese Differenzen sind durch eine Filterung des Sonnenlichts in der Atmosphäre, hauptsächlich durch atmosphärische Gase und Wasser, bedingt. Eine besondere Rolle spielt die Ozonschicht in der Stratosphäre, die einen Großteil schädlicher UV-Strahlung absorbiert, insbesondere im kurzwelligen Bereich (UVC). Infolgedessen erreicht nur ein geringer Anteil der UVB-Strahlung die Erde, UVC-Strahlung wird (bei intakter Ozonschicht) gänzlich absorbiert. Eine UVC-Exposition ist daher nur durch künstliche Quellen (Elektroschweißen, Entkeimungslampen) möglich [14] und wird wegen geringer Relevanz für die vorliegende Fragestellung nicht näher analysiert. Biologisch relevante, terrestrische UV-Strahlung setzt sich somit zu 90-95 % aus UVA- und zu 5-10 % aus UVB-Strahlung zusammen [15]. Unterschiede in der Strahlenqualität und -intensität ergeben sich hierbei abhängig von diversen Faktoren wie Ozongehalt der Atmosphäre, geografisch/tageszeitlich bedingter Sonnenstandshöhe, Bewölkung sowie Höhenlage und Luftverschmutzung [16].

Auch im Bereich des sichtbaren Lichts erfolgt eine Absorption durch die Atmosphäre, allerdings nicht in qualitativer Form, sondern lediglich durch quantitative Abschwächung der Strahlungsintensität. Im Bereich der längerwelligen Sonnenstrahlung sind hingegen distinkte Absorptionsbereiche bei 810 nm, 935 nm, 1130 nm, 1380 nm, 1880 nm und ab 2680 nm lokalisiert, die durch Absorption der Infrarotstrahlung an atmosphärischen Gasen (z.B. CO<sub>2</sub>) und Wasser entstehen [17]. Außerhalb dieser Bereiche ist keine generelle Abschwächung der Strahlung zu verzeichnen.

Insgesamt setzt sich die terrestrische solare Strahlung zu ungefähr 45 % aus Infrarotstrahlung, zu 50 % aus sichtbarem Licht und zu fünf Prozent aus UV-Strahlung zusammen [18].

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.3: Solares Spektrum im Weltall (gelb) und auf der Erdoberfläche (rot).** In der Ozonschicht werden große Teile des kurzwelligen UV-Anteils herausgefiltert und die Intensität des sichtbaren Lichts abgeschwächt. Atmosphärisches Wasser und Gase wie  $\text{CO}_2$  absorbieren Infrarotstrahlung in bestimmten eng definierten Bereichen. Zusätzlich zur Wellenlänge (nm) und spektralen Bestrahlungsstärke ( $\text{W m}^{-2} \text{nm}^{-1}$ ) ist die Energie einzelner Photonen in Elektronenvolt (eV) angegeben. Die Grafik wurde mit empirischen Daten des solaren ASTM G173-03 Referenzspektrums erstellt: Reference Solar Spectral Irradiance: Air Mass 1.5, <https://www.nrel.gov/grid/solar-resource/spectra-am1.5.html>, aufgerufen am 23. August 2022.

### 1.2.2 Physikalische Grundlagen der solaren Strahlung

Elektromagnetische Strahlung wird entsprechend des Welle-Teilchen-Dualismus anhand folgender Formeln [10] charakterisiert:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (1.1)$$

$$E = h * \nu = \frac{h * c}{\lambda} \quad (1.2)$$

mit

- $\nu$  = Frequenz (Hz) des Photons
- $c$  = Lichtgeschwindigkeit im Vakuum ( $\text{ms}^{-1}$ )
- $\lambda$  = Wellenlänge (nm)

- E = Energie (J) des Photons
- h = Plancksches Wirkungsquantum ( $6.63 \cdot 10^{-34}$  Js)

Die Lichtgeschwindigkeit und das Plancksche Wirkungsquantum sind konstante Größen, folglich hängt die Energie eines Photons von der Wellenlänge bzw. der invers zur Wellenlänge korrelierten Frequenz ab: je kleiner die Wellenlänge bzw. größer die Frequenz, desto größer die Energie und umgekehrt. Relevanter als die Energie einzelner Photonen ist die Leistung einhergehender elektromagnetischer Strahlung bezogen auf eine bestimmte Fläche, die als Bestrahlungsstärke bezeichnet wird ( $\text{Wm}^{-2}$ ):

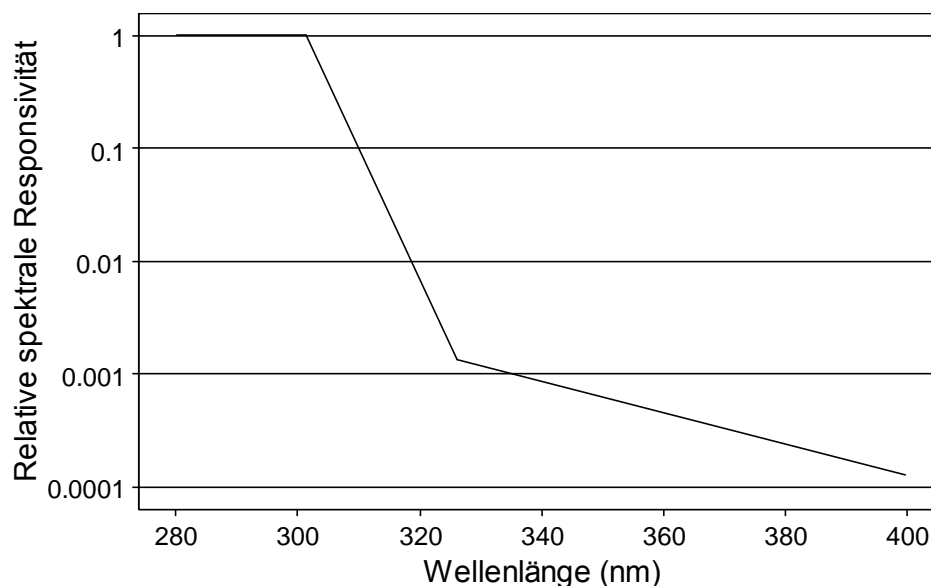
$$E = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} E_{\lambda}(\lambda) d\lambda \quad (1.3)$$

Das Zeitintegral der Bestrahlungsstärke ist die Bestrahlungsdosis H ( $\text{Jm}^{-2}$ ) und gibt die Energie an, die über den Zeitraum t auf einer definierten Fläche akkumuliert [19]:

$$H = \int_0^t E(t) dt \quad (1.4)$$

Die Induktion biologischer Effekte unterscheidet sich deutlich für verschiedene Strahlenqualitäten und ist nicht linear mit der physikalischen Bestrahlungsstärke (Gleichung 1.3) bzw -Dosis (Gleichung 1.4) korreliert. Daher ist eine biologische Gewichtung sinnvoll: bei der ionisierenden Strahlung werden Strahlenqualität und gewebsspezifische Effekte z.B. bei Angabe der biologischen Dosis (Einheit: Sievert) im Vergleich zur physikalischen Dosis (Einheit: Gray) berücksichtigt. Für UV-Strahlung hat sich die Erythemschwelldosis, die 24 Stunden nach UV-Exposition eine gerade noch wahrnehmbare Rötung (Erythem) verursacht, als Maß für die biologische Wirksamkeit etabliert. Diese ist bei zuvor unbestrahlter Haut am geringsten und wird als Minimale Erythemdosis (MED) bezeichnet [20]. Die MED ist abhängig vom Hauttyp und beträgt bei einem hellhäutigen Mitteleuropäer (Hauttyp II) durchschnittlich ungefähr  $250 \text{ Jm}^{-2}$ . Eine wellenlängenabhängige Normung wurde von der Internationalen Beleuchtungskommission CIE durchgeführt, die zur Berechnung erythemgewichteter Dosen genutzt werden kann [21]. Diese attestiert der UVB-Strahlung (280 nm-315 nm) die höchste biologische Wirksamkeit, welche sich anschließend beim Übergang zur UVA-Strahlung (315 nm-400 nm) um den Faktor 1.000-10.000 verringert (Abbildung 1.4). UVC-Strahlung ist aufgrund der geringen biologischen Relevanz aus natürlichen Quellen nicht berücksichtigt.

## 1 Einleitung

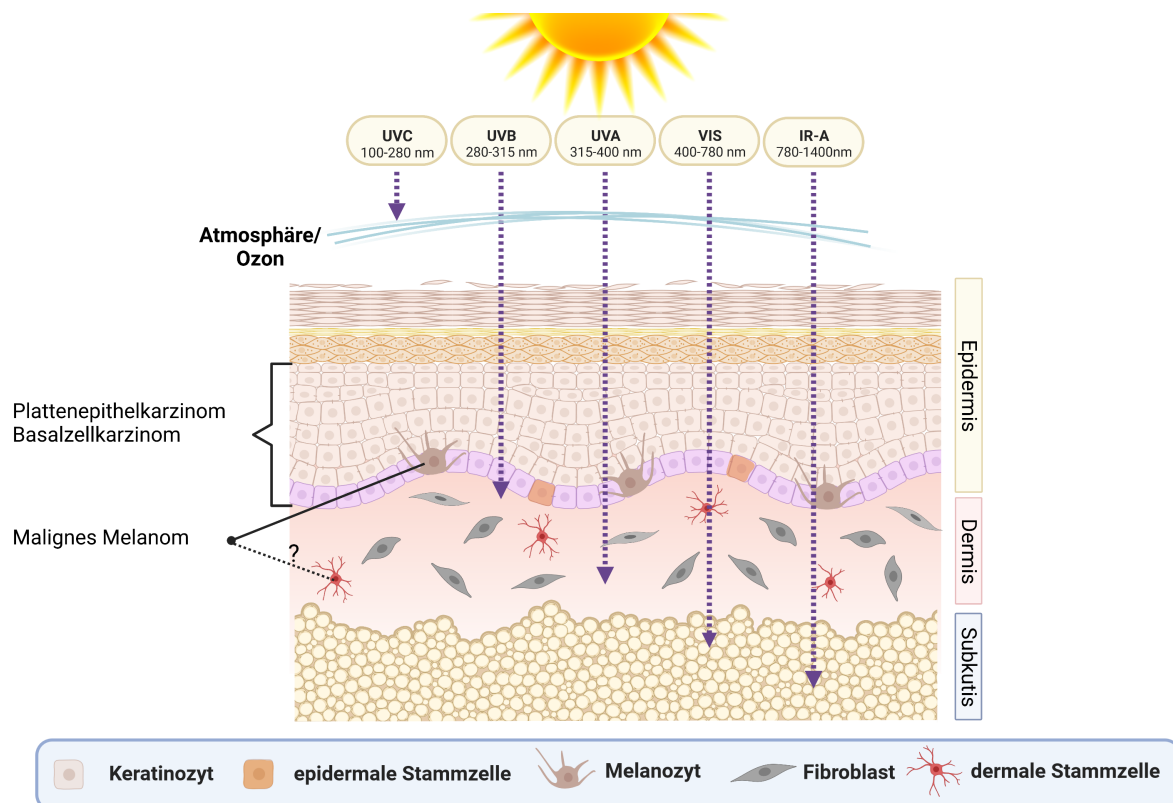


**Abbildung 1.4: Erythemgewichtete Effektivität.** UVB-Strahlung zeigt die höchste biologische Wirksamkeit, gefolgt von einer Abnahme der relativen Effektivität beim Übergang zur UVA-Strahlung mit einer 1.000-10.000 fachen Reduktion. UVC-Strahlung (aus natürlichen Quellen) ist aufgrund geringer biologischer Relevanz nicht dargestellt (vgl. CIE, 2006).

### 1.2.3 Eindringtiefe in menschliche Haut

Neben Unterschieden in der spektralen Responsivität solarer Strahlung zeigt sich eine wellenlängenabhängige Penetration der jeweiligen Gewebsschichten (Abbildung 1.5): je größer die Wellenlänge, desto tiefer dringt die Strahlung ein. Dies ist durch Streuung im Gewebe und die Absorption (insbesondere kurzwelliger Strahlung) an Chromophoren bedingt [22].

UVC-Strahlung wird bereits in der intakten Atmosphäre absorbiert (s. Abschnitt 1.2) und erreicht die Haut nicht. UVB-Strahlung wird durch Chromophore wie Urocaninsäure [22] oder tryptophanhaltige Moleküle [23] sowie das epidermale Keratin [24], speziell in der *Stratum corneum*, abgeschwächt, sodass nur ungefähr neun Prozent die Basalzellschicht erreichen. Dort sind epidermale Stammzellen sowie Melanozyten lokalisiert, deren Schädigung besonders schwerwiegend ist [25]. UVA-Strahlung wird durch Hyperkeratinisierung nicht wesentlich beeinflusst und hauptsächlich durch Melanin absorbiert [24]. Folglich erreichen noch 19 % der UVA-Strahlung die Basalzellschicht. Außerdem ist die Strahlung in der Lage bis in die tieferen Schichten der Dermis einzudringen [25]. Sichtbares Licht dringt auch in tiefere Hautschichten vor und erreicht zu 20 % subkutanes Gewebe, ebenso wie IRA Strahlung, die zu 65 % in die Dermis und zu 10 % bis in die Subkutis vordringt. Längerwellige IRB und IRC Strahlung werden größtenteils von der Epidermis absorbiert und als Wärmeenergie an umliegendes Gewebe abgegeben [26].



**Abbildung 1.5: Eindringtiefe von solarer Strahlung in menschliche Haut.**

Die Eindringtiefe ist abhängig von der Wellenlänge und nimmt mit steigender Wellenlänge zu. UVC wird bereits in der Ozonschicht absorbiert und erreicht die Haut nicht. UVB wird weitgehend von der Epidermis absorbiert, ist jedoch in der Lage zu einem kleinen Teil bis in die oberen Schichten der Dermis einzudringen. Dort können sowohl epidermale als auch dermale Stammzellen geschädigt werden. UVA-Strahlung reicht bis in die tieferen Schichten der Dermis und kann dort durch Schädigung des Kollagens zur Hautalterung beitragen. Sichtbares Licht und IRA (< 1400 nm) dringen bis in die Subkutis ein. Längere-wellige Infrarotstrahlung wird bereits in der Epidermis absorbiert. Die drei häufigsten Hautkrebsarten (BCC, cSCC, Malignes Melanom) und deren Lokalisation sind ebenfalls abgebildet. Mit freundlicher Genehmigung von Christin Starzonek. Erstellt mit biorender.com.

### 1.2.4 Biologische Prozesse

Solare Strahlung induziert biologische Effekte über zwei unterschiedliche Wirkmechanismen: photochemische und thermische Prozesse [18]. Photochemische Effekte werden durch Absorption von solarer Strahlung (hauptsächlich UV) an intrazellulären Chromophoren verursacht und führen zu direkten DNA-Schäden (UVB, UVA) oder indirekten, meist oxidativen Schäden (UVB, UVA, VIS, IRA). Insbesondere die Absorption von UV(B)-Strahlung durch DNA-Moleküle ist für den toxischen und karzinogenen Effekt der solaren Strahlung verantwortlich. Die Schädigung hängt dabei von der Gesamtdosis ab, die entweder durch starke Exposition über einen kurzen Zeitraum als auch schwächere Exposition über einen längeren Zeitraum akkumulieren kann und vergleichbare Effekte hervorruft [18]. Dieses Phänomen wurde bereits im 19. Jahrhundert beobachtet und ist nach seinen Entdeckern als Bunsen-Roscoe Gesetz der Photobiologie benannt [27].

## 1 Einleitung

Thermische Effekte treten durch Erhöhung der kinetischen Energie des Gewebes auf, sodass die Strahlungsenergie in Wärmeenergie konvertiert wird. Die Erwärmung ist dabei abhängig von Strahlenqualität, -intensität und Dauer der Strahlenexposition. Thermische Effekte sind größtenteils im Bereich der Infrarotstrahlung, insbesondere IRB und IRC, zu beobachten. Sie können bei ausreichend hohem Wärmeeintrag biologische Effekte wie Kollagenveränderungen oder die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) begünstigen [18].

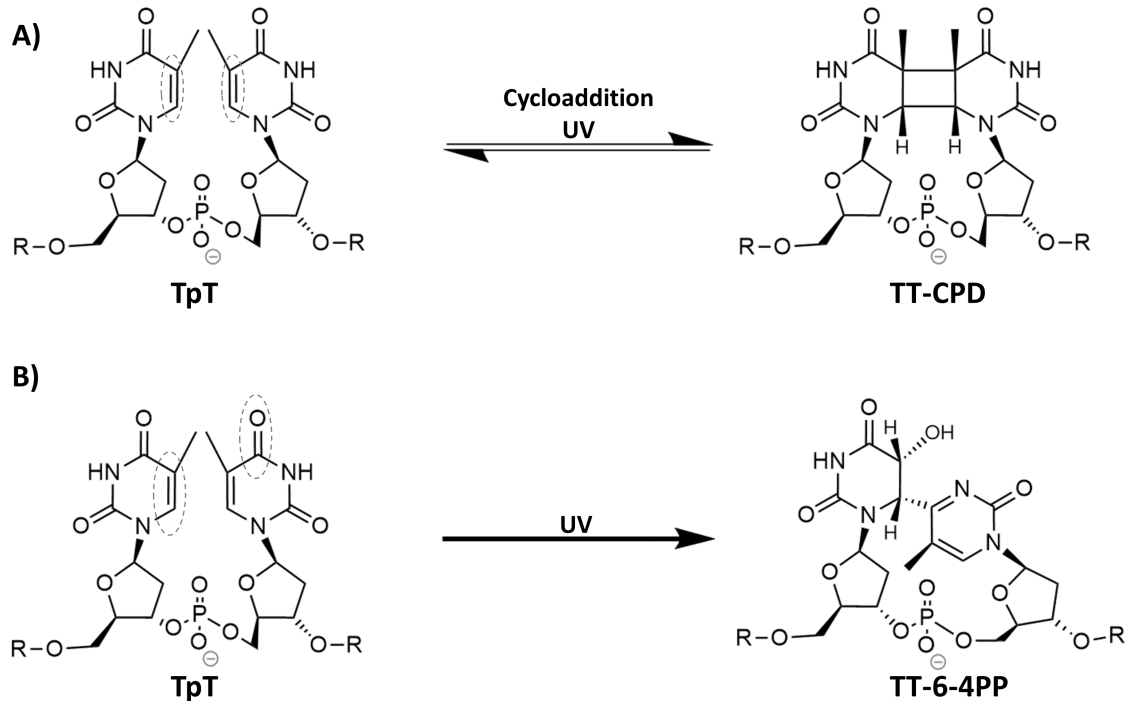
Beide Wirkmechanismen vermitteln in der Haut unterschiedliche Effekte, sowohl akut als auch längerfristig. Akute Folgen sind, DNA-Schäden, Immunsuppression, Inflammation (Erythem), Hautpigmentierung (Bräunung) und Vitamin-D3-Synthese sowie epigenetische Modifikationen (z.B. miRNA-Expression) [14, 28]. Zu den langfristigen Effekten zählen Hautalterung, Schädigung der Netzhaut und insbesondere die Entstehung von Hautkrebs [14, 29].

Im Fokus dieser Arbeit stehen speziell Veränderungen der miRNA Expression nach solarer Strahlung. IRB und IRC, die überwiegend thermische Effekte induzieren, werden daher in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Wichtige photochemische Mechanismen strahlungsinduzierter Effekte (mit Ausnahme von miRNAs, die in Abschnitt 1.3 detailliert erläutert werden) der UVB-, UVA, VIS- und IRA-Strahlung sind im Folgenden aufgeführt.

### 1.2.4.1 UVB

UVB-Strahlung führt zur Bildung von pre-mutagenen Photoprodukten in der DNA durch Absorption der UVB-Photonen (in verringertem Maße auch bei UVA, vgl. Abschnitt 1.2.4.2). Benachbarte Pyrimidinnukleotide (Thymin, Cytosin) werden dabei durch Photodimerisierungsreaktionen kovalent miteinander verbunden. Die häufigsten UV-induzierten Läsionen sind Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidonphotoprodukte (6-4PP), die im Verhältnis 3:1 hervorgerufen werden [15, 30, 31] und deren Formation in Abbildung 1.6 schematisch für anliegende Thyminbasen dargestellt ist.

CPDs entstehen durch zyklische Photoaddition der 5,6-Doppelbindung benachbarter Pyrimidin-Basen [31] und besitzen das größte Mutationspotenzial UV-induzierter Schäden [14]. Sie treten mit unterschiedlicher Frequenz entlang des Genoms abhängig von Faktoren wie Gensequenz, DNA-Struktur und Beeinflussung durch Nukleosomen oder DNA-bindende Proteine auf [33]. Der Großteil der CPDs manifestiert sich als Dimere aus Thyminbasen; Cytosin und Thymin dimerisieren seltener und am seltensten sind Cytosin-Cytosin Läsionen [31, 34]. Die relativen Häufigkeiten wurden als 2:1:0,4:0,1 für TT > TC > CT > CC ermittelt [35]. TT-Dimere sind zunächst nicht mutagen, führen jedoch wie alle DNA-Schäden zum Stopp von Replikations- sowie



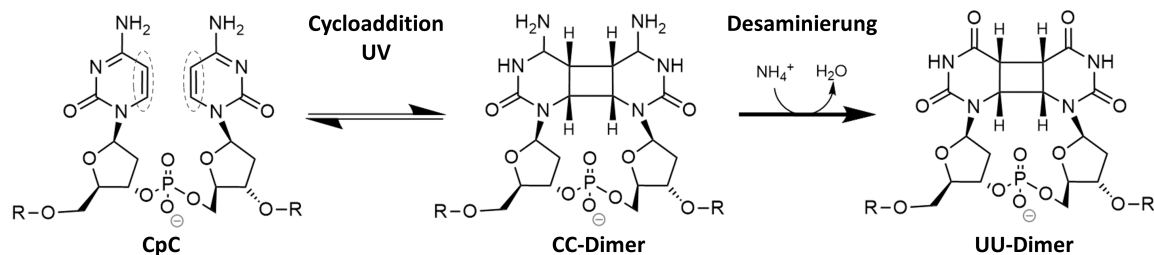
**Abbildung 1.6: UV-induzierte Photoprodukte.** UV-Strahlung, insbesondere UVB, führt durch Absorption der Strahlungsenergie an der DNA zu Photoreaktionen. Die wichtigsten Photoprodukte sind Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidonphotoprodukte (6-4PP), die im Verhältnis 3:1 entstehen. **(A)** Schematische Darstellung der Dimerisierung benachbarter Thyminbasen durch UV-vermittelte Cycloaddition zu einem Thymin-Thymin CPD. **(B)** Schematische Darstellung der Bildung eines Thymin-Thymin 6-4PPs (vgl. [32]). T: Thymin. p: Phosphat. Erstellt mit ChemDraw v21.0.

Transkriptionsprozessen und infolgedessen zur Rekrutierung von Reparaturenzymen [36]. Normalerweise erfolgt die Reparatur von sterischen Aberrationen wie CPDs und 6-4PPs durch die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), welche DNA-Schäden nahezu fehlerfrei entfernt und eine zentrale Rolle bei der Suppression von Hauttumoren einnimmt. Die Wichtigkeit der NER wird durch das Krankheitsbild *Xeroderma pigmentosum* (XP) hervorgehoben, bei der Patienten Defekte in diversen NER-Enzymen aufweisen. Diese seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung ist gekennzeichnet von einer UV-Hypersensitivität einhergehend mit einer Erhöhung des Hautkrebsrisikos um den Faktor 2.000 (SCC und BCC) beziehungsweise 10.000 (Melanom) und einer deutlichen Reduktion der Lebenserwartung [37, 38]. Doch auch in gesunden Zellen ist die Reparaturkapazität begrenzt, nachgewiesen durch eine dosisabhängige Verlangsamung der Reparaturrate [39]. Dadurch ist es möglich, dass fehleranfällige Transläsionspolymerasen den DNA-Strang replizieren ohne den Schaden zu beheben. Dies kann je nach Art des Schadens und der Interaktion mit einer der fünf bekannten Transläsionspolymerasen ( $Pol\eta$ ,  $Pol\kappa$ ,  $Pol\iota$ ,  $Pol\zeta$  und REV1) zu Mutationen durch den Einbau falscher Nukleotide führen [40].

Cytosin-enthaltende Dimere können zusätzlich zu fehlerhaften Replikationsprozessen mutagen wirken, da sie anfällig für eine hydrolytische Desaminierung zu Uracil



## 1 Einleitung



**Abbildung 1.7: Desaminierung von Cytosin zu Uracil.** Schematische Darstellung der Bildung eines Cytosin-Cytosin Dimers mit anschließender Desaminierung zu Uracil. Die Formation des Cyclobutanrings im Bereich der 5,6-Doppelbindung benachbarter Cytosine destabilisiert die C4-N Aminbindung, sodass die Aminogruppe hydrolytisch abgespalten und durch einen doppelt gebundenen Sauerstoff ersetzt werden kann. Im folgenden Replikationszyklus wird das schadhafte UU-Dimer durch zwei Thyminbasen ersetzt. Die Folge ist eine CC  $\rightarrow$  TT Transitionsmutation (vgl. [32]). C: Cytosin. U: Uracil. Erstellt mit ChemDraw v21.0.

sind (Abbildung 1.7), das im nachfolgenden Replikationszyklus durch Thymin ersetzt wird [41]. Diese spontanen Mutationen können in einer Vielzahl von Tumorsuppressorgenen (z.B. *TP53*<sup>1</sup>, *CDKN2A*<sup>2</sup>, *PTCH*<sup>3</sup>) und Onkogenen (z.B. *RAS*<sup>4</sup>) beobachtet werden [42–44]. C  $\rightarrow$  T Transitionen und CC  $\rightarrow$  TT Tandem-Transitionen werden daher auch als *UV signature* Mutationen bezeichnet [45]. Das Gen *TP53* codiert für das Tumorsuppressorproteins p53 und weist beispielsweise in mehr als 90 % aller SCCs in den USA solche *signature* Mutationen auf [44]. Neben den mutagenen Eigenschaften der CPDs wurde auch ein Einfluss auf die transkriptionelle Strahlenantwort nach UVB-Exposition gefunden, welche das Transkriptionsprofil von Transkriptionsfaktoren (*ATF3*<sup>5</sup>, *SNAI1*<sup>6</sup>, *RUNX1*<sup>7</sup>) und zellzyklusregulierenden Genen (*CCNE1*<sup>8</sup>, *CDKN2B*<sup>9</sup>), moduliert [46]. CPDs spielen somit eine wichtige Rolle bei der Hautkrebsentstehung.

6-4PPs verändern die lokale DNA-Struktur deutlich stärker als CPDs (44° vs. 9° Krümmung, [47]). Sie werden infolgedessen schneller detektiert (Halbwertszeit von zwei Stunden gegenüber 33 h bei CPDs, [48]) und mittels NER entfernt. Falls eine 6-4PP Läsion nicht repariert wird, erfolgt die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) mit deutlich erhöhter Wahrscheinlichkeit im Vergleich zu einer CPD-Läsion, sodass möglicherweise entartete Zellen eliminiert werden [49]. 6-4PPs sind daher weniger relevant für die Hautkrebsentstehung als CPDs.

Zusätzlich zu direkten DNA-Schäden, konnten einige indirekte Effekte von UVB-Strahlung auf das Genom und zelluläre Prozesse beschrieben werden [50]. Durch

<sup>1</sup>**TP53:** Protein p53

<sup>2</sup>**CDKN2A:** Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A

<sup>3</sup>**PTCH:** Protein Patched Homolog

<sup>4</sup>**RAS:** Rat Sarcoma

<sup>5</sup>**ATF3:** Aktivierender Transkriptionsfaktor 3

<sup>6</sup>**SNAI1:** Zinkfingerprotein SNAI1

<sup>7</sup>**RUNX1:** Runt-related Transcription Factor 1

<sup>8</sup>**CCNE1:** Cyclin E

<sup>9</sup>**CDKN2B:** Cyclin-abhängige Kinase 4-Inhibitor B

Absorption von UVB-Strahlung an intrazellulären Chromophoren entstehen reaktive Verbindungen, die genotoxisch und zellschädigend wirken. Diese meist oxidativen Schäden sind der Hauptwirkungsmechanismus von UVA-Strahlung und werden im nächsten Abschnitt detailliert beschrieben.

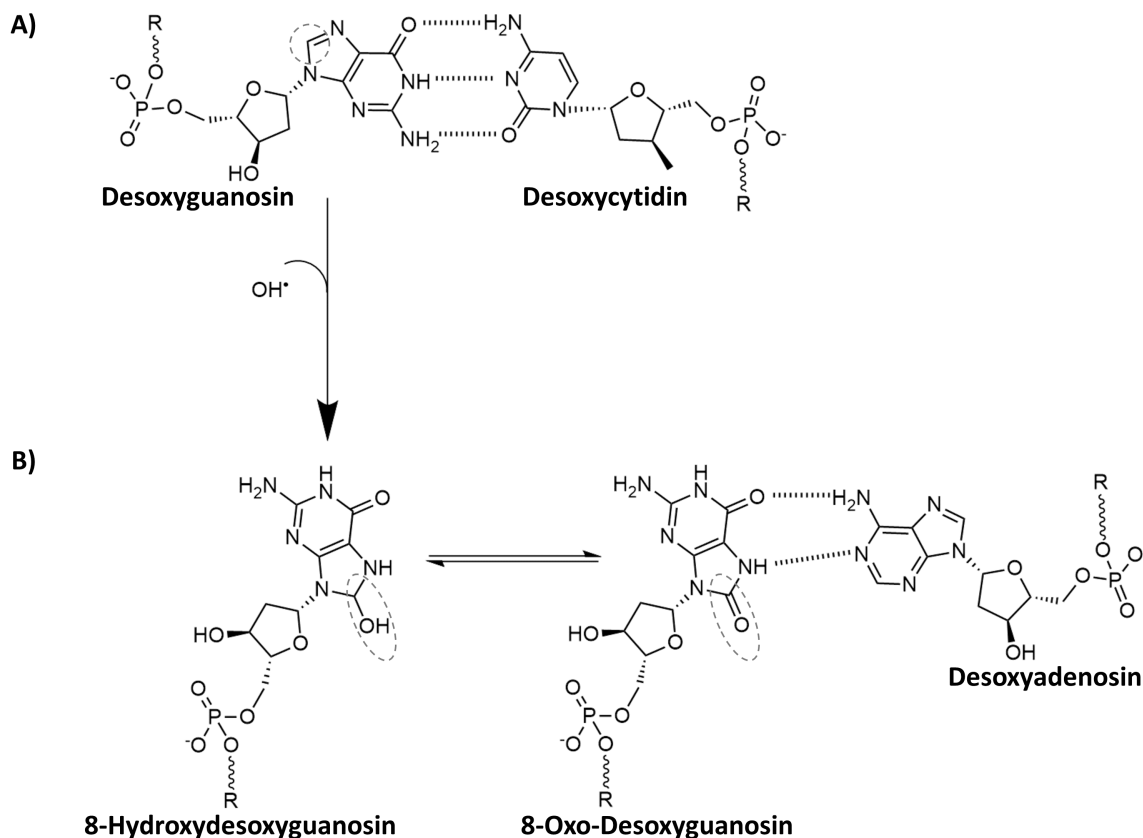
### 1.2.4.2 UVA

Der mutagene Effekt von UVA-Strahlung ist größtenteils auf indirekte, oxidative DNA-Schäden zurückzuführen. Endogene Chromophore wie z.B. Melanin, Riboflavine, Porphyrine [51] oder das UVB-Photoprodukt 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ, [52]) werden durch UVA-Photonen angeregt und katalysieren die Entstehung freier Radikale, reaktiver Stickstoffspezies (RNS) und ROS. Letztere umfassen Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\cdot$ ) sowie Superoxid-Anionen ( $\text{O}_2^\cdot$ ) und führen zu einer Vielzahl zellschädigender Effekte [53]. Unter anderem werden DNA-Protein-Crosslinks, Proteinmodifikationen, Einzel- und Doppelstrangbrüche, oxidative Basenschäden sowie alkalilabile Stellen induziert [45, 54, 55].

Die Oxidation von Guanin am C8 führt zur Bildung von 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) und stellt den häufigsten UVA-vermittelten oxidativen Basenschaden dar [56], grafisch dargestellt in Abbildung 1.8. 8-OHdG tautomerisiert zu 8-Oxo-Desoxyguanosin, das sich vorzugsweise über eine Hoogsteen-Basenpaarung [57] mit Adenin anstatt über eine Watson-Crick Basenpaarung [58] mit Cytosin paart. Bei ausbleibender Reparatur wird das 8-OHdG während der Replikation durch ein Thymin ersetzt, sodass eine G → T Transversionsmutation entsteht. Diese konnte in isolierten Hauttumoren nachgewiesen werden und unterstreicht den karzinogenen Effekt oxidativer Basenschäden [59]. Die Alteration einzelner Basen hat keine DNA-Strukturveränderung zur Folge, sodass Basenschäden nicht von der NER erkannt werden. Stattdessen erfolgt eine Reversion oxidativer Schäden mittels Basenexzisionsreparatur (BER), um Mutationen vorzubeugen. Zu diesem Pathway gehören spezifische Glycosylasen, welche die DNA auf Basenmodifikationen wie Desaminierung, Oxidation oder Alkylierung untersuchen. Bei Detektion einer schadhafte Base, wird die Verbindung des Nukleotids zum Phosphodiester-Rückgrat durch Lyse der N-Glykosyl Bindung zwischen Base und Desoxyribose getrennt, sodass eine abasische Stelle entsteht. Diese wird anschließend unter Zuhilfenahme des Komplementärstrangs als Matrix mit der korrekten Base aufgefüllt [60]. Defekte im BER-Pathway führen einerseits zu erhöhten Mutationsraten und sind mit der Tumorigenese assoziiert, andererseits nutzen Tumorzellen die BER, um oxidativen Stress zu tolerieren [61].

UVA-Strahlung induziert ebenfalls CPDs [62], deren genauer Entstehungsmechanismus noch unvollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung ist. Kürzlich konnten Portillo-Esnaola *et al.* jedoch zeigen, dass UVA-Strahlung – mediiert durch

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.8: Oxidation von Desoxyguanosin zu 8-Hydroxydesoxyguanosin.** (A) Normalerweise paart Guanin mit Cytosin über eine Watson-Crick-Basenpaarung in der DNA-Sequenz. (B) Eine Oxidation am C8 des Guanins durch freie Radikale oder ROS führt zur Bildung von 8-Hydroxydesoxyguanosin. Dieses tautomerisiert zu 8-Oxo-Desoxyguanosin, das sich über eine Hoogsteen-Basenpaarung mit Adenin paart. Die Folge sind G → T Transversionsmutationen. Erstellt mit ChemDraw v21.0.

ROS (Superoxid) und RNS (Stickstoffoxid, Peroxynitrit) – in Melanozyten *in vitro* drei Stunden nach Bestrahlung sog. *dark-CPDs* induziert, deren Formation durch Applikation eines Antioxidants deutlich verringert werden konnte [63]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass oxidative Schäden teilweise für die Bildung von CPDs nach UVA-Exposition verantwortlich sind. Die Effektivität der CPD-Induktion ist dabei um den Faktor 1.000-10.000 geringer als durch UVB (s. Abschnitt 1.2.2). Interessanterweise stellen CPDs den häufigsten UVA-vermittelten DNA-Schaden dar [34, 62, 64]. Außerdem weisen UVA-induzierte CPDs bei äquivalenten physiologischen Dosen eine erhöhte Mutagenität auf, da die *DNA damage response* durch UVA-Strahlung in geringerem Maße aktiviert wird. Ein p53-vermittelter Zellzyklusarrest gekoppelt mit einer verlangsamten DNA-Replikation ist beispielsweise nach UVB-Strahlung deutlich häufiger zu beobachten und länger anhaltend [65], sodass Schäden besser repariert werden können.

Das karzinogene Potential der UVA-Strahlung wird durch die Oxidation von Aminosäureseitenketten weiter verstärkt, insbesondere durch schwefelhaltige Aminosäuren wie Cystein und Methionin. Daraus resultierende Carbonylproteine sind anfällig für Crosslinking mit anderen Proteinen oder eigenen Untereinheiten, verbunden mit einem

Verlust der Funktionalität [66]. Oxidativer Stress durch Absorption von UVA-Strahlung an FICZ, das durch vorherige Absorption von UVB-Photonen an Tryptophan hervorgerufen, inhibiert z.B. die Reparatur UVB-induzierter Schäden durch Alterationen des NER-Proteoms [52].

Darüber hinaus sind sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung in der Lage das Immunsystem zu supprimieren. Besonders wirkungsvoll ist UVA-Strahlung im Bereich von 360 nm bis 380 nm, die zu 75 % der sonneninduzierten Immunsuppression beiträgt [67, 68]. Die UV-induzierte Immunsuppression wird einerseits therapeutisch genutzt z.B. bei der Behandlung von Psoriasis oder Neurodermitis. Andererseits trägt sie zur *immune evasion* bei, die als essentieller Schritt der Tumorentstehung in die *Hallmarks of Cancer* aufgenommen wurde [69].

### 1.2.4.3 Sichtbares Licht und nahe Infrarotstrahlung

Sichtbares Licht wurde in der Strahlenbiologie lange Zeit wenig erforscht, es häufen sich jedoch Hinweise, dass VIS-vermittelte oxidative Schäden ebenfalls eine Rolle bei Hautalterung und Zellschäden spielen. VIS-Photonen können z.B. von endogenen Chromophoren wie Melanin, Hämoglobin, Riboflavin oder Porphyrinen absorbiert werden und ROS induzieren [70]. Experimente mit Dosen, die ungefähr einer Sonnenlichtexposition von 15-90 min entsprechen, konnten zeigen, dass VIS die Expression der matrix-abbauenden Enzyme MMP<sup>10</sup>-1 und MMP-9 fördert und entzündliche Prozesse mittels inflammatorischer Cytokine (IL<sup>11</sup>-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF<sup>12</sup>) mediiert [70, 71]. Diese Mechanismen sind zelltypabhängig, Fibroblasten weisen beispielsweise stärkere ROS-Level nach Bestrahlung als Keratinozyten auf, einhergehend mit einer Akkumulation von DNA-Schäden in genomischer und mitochondrialer DNA [6]. Für direkte DNA-Schäden nach VIS-Bestrahlung gibt es bisher keine Hinweise, eine mögliche CPD-Induktion wurde bereits widerlegt [70]. Außerdem scheinen VIS-induzierte Effekte zu einem Teil von anderen Strahlenqualitäten abzuhängen. Die isolierte Exposition mit VIS zeigte keine Toxizität bei *in vitro* Experimenten mit HaCaT-Keratinozyten [4]. Die vorherige Bestrahlung mit UVA-Strahlung und die anschließende Bildung von Lipofuscin, einem Aggregat aus oxidierten quervernetzten Protein- und Lipidclustern, führte jedoch zu einer Photosensibilisierung. Eine nachfolgende VIS-Exposition erzeugte *in vitro* oxidative premutagene DNA-Schäden [72].

Kurzwellige Infrarotstrahlung (IRA) erzeugt ebenfalls freie Radikale und ist zusammen mit VIS für bis zu 50 % Sonnenlicht-induzierter ROS verantwortlich [73]. Die Absorption von IRA Strahlung erfolgt hauptsächlich in den Mitochondrien an Kupferatomen in Komplex IV der Atmungskette mit anschließender ROS-Bildung [74].

---

<sup>10</sup>MMP: Matrix Metalloproteinase

<sup>11</sup>IL: Interleukin

<sup>12</sup>GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor

## 1 Einleitung

Eine ROS-induzierte MMP-1-Expression in der Dermis mit anschließender Kollagen-degradation konnte z.B. in 80 % IRA exponierter Individuen nachgewiesen werden und begünstigt Hautalterungsprozesse [75]. IRA-Exposition führt weiterhin zur Anregung der Angiogenese sowie Störung mitochondrialer Prozesse. In primären humanen Fibroblasten konnte in der Folge die Modulation von über 600 Genen, die in strahlungs-induzierte Hautalterung und Karzinogenese involviert sind, nachgewiesen werden [73, 76].

### 1.2.4.4 Synergistische und modulatorische Effekte kombinierter Strahlenexposition

Die beschriebenen Strahlenqualitäten führen bereits bei der isolierten Exposition humaner Hautzellen zu einer Vielzahl zellschädigender Effekte und begünstigen die Karzinogenese. Der Großteil verfügbarer Daten stammt aus Versuchen mit nur einer Strahlenqualität. Dabei werden mögliche Synergien oder abschwächende Modulationen bei kombinierter Strahlenexposition vernachlässigt. Außerdem haben die meisten Studien nur UV-Strahlung berücksichtigt und bei kombinierter Bestrahlung lediglich UVA+UVB untersucht. Da die Exposition von UVB- und UVA-Strahlung jedoch größtenteils kombiniert mit VIS und IRA im Sonnenlicht erfolgt, sind solche Synergien/Modulationen besonders wichtig für das Verständnis der Hautkrebsentstehung.

ROS werden beispielsweise in physiologischen Dosen bei Atmungsprozessen in den Mitochondrien produziert und spielen eine wichtige Rolle bei intrazellulären Signalwegen [77]. Ein Schutz vor schädigenden Effekten wird dabei durch Antioxidantien (u.a. Ascorbinsäure (Vitamin C),  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Glutathion) sowie diverse Enzyme (u.a. Catalase, Superoxiddismutase, Peroxidasen) mediiert, die überschüssige ROS neutralisieren [78]. Eine Strahlenexposition kann diese Systeme durch exzessive ROS-Produktion überlasten, sodass zellschädigende Effekte auftreten [79]. Da sowohl UVB und UVA, als auch VIS und IRA, ROS über verschiedene Signalwege induzieren ist ein synergistischer Effekt wahrscheinlich. Hudson *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass die Bestrahlung mit dem gesamten Sonnenspektrum sowohl höhere ROS-Level als auch einen größeren Anteil genomischer und mitochondrialer DNA-Schäden im Vergleich zu kombinierter UVA+UVB Bestrahlung erzeugt [6]. Darüber hinaus konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Kombination von UVA und UVB entweder als UVA+UVB oder im Gesamtspektrum (UVB+UVA+VIS+IR) toxischer auf HaCaT-Keratinocyten wirkt als die Bestrahlung mit UVA oder UVB alleine [4]. Ebenso zeigte sich ein synergistischer Effekt von UVA+UVB auf das klonogene Zellüberleben, wohingegen die Kombination von UVB+IRA die Überlebensfähigkeit weniger beeinträchtigte als UVB alleine [4].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass UVB-Strahlung die meisten DNA-Schäden in Form von CPDs induziert (vgl. Abschnitt 1.2.4.1), die zu UV-signature Mutationen führen und in Hautkrebs (insbesondere BCCs und SCCs) gehäuft zu finden sind.

Trotz dieser hohen Mutagenität führt eine UVB-Phototherapie zur Behandlung von z.B. Psoriasis zu keiner erhöhten Hautkrebsinzidenz unter Patienten [80, 81]. Die Behandlung mit Psoralen/UVA PUVA ist hingegen mit einer signifikanten Erhöhung des Hautkrebsrisikos assoziiert [80]. Unter Berücksichtigung der Beeinflussung des NER-Reparaturkomplexes durch UVA (vgl. Abschnitt 1.2.4.2) und der Häufigkeit UVB-induzierter Schäden im Genom menschlicher Hautkrebszellen ist ein verstärkender Effekt der kombinierten Bestrahlung somit wahrscheinlich. Vermutlich wird die NER verlangsamt, sodass die exzessiven UVB-vermittelten DNA-Schäden nicht rechtzeitig eliminiert werden können und vermehrt Mutationen entstehen [66]. Die ebenfalls beschriebenen Einflüsse von VIS und IRA auf zellschädigende Prozesse erhöhen diese komplexe Interkonnektivität zusätzlich. In diesem Zusammenhang ist es wichtig festzustellen, dass momentan kein ausreichender VIS- und IRA-Schutz in Sonnencremes enthalten [82] ist, sodass zwar die UV-Exposition vermindert, aber durch die vermeintliche Sicherheit eine hohe VIS und IRA-Exposition verbunden mit tiefer Gewebepenetration (vgl. Abschnitt 1.2.3) ermöglicht wird. All diese Aspekte erfordern die Betrachtung des gesamten Sonnenspektrums mit möglichst genauer Abbildung der Strahlenszusammensetzung und Bestrahlungsstärke, z.B. mit einem Bestrahlungsapparat wie kürzlich in [4] vorgestellt.

## 1.3 miRNA

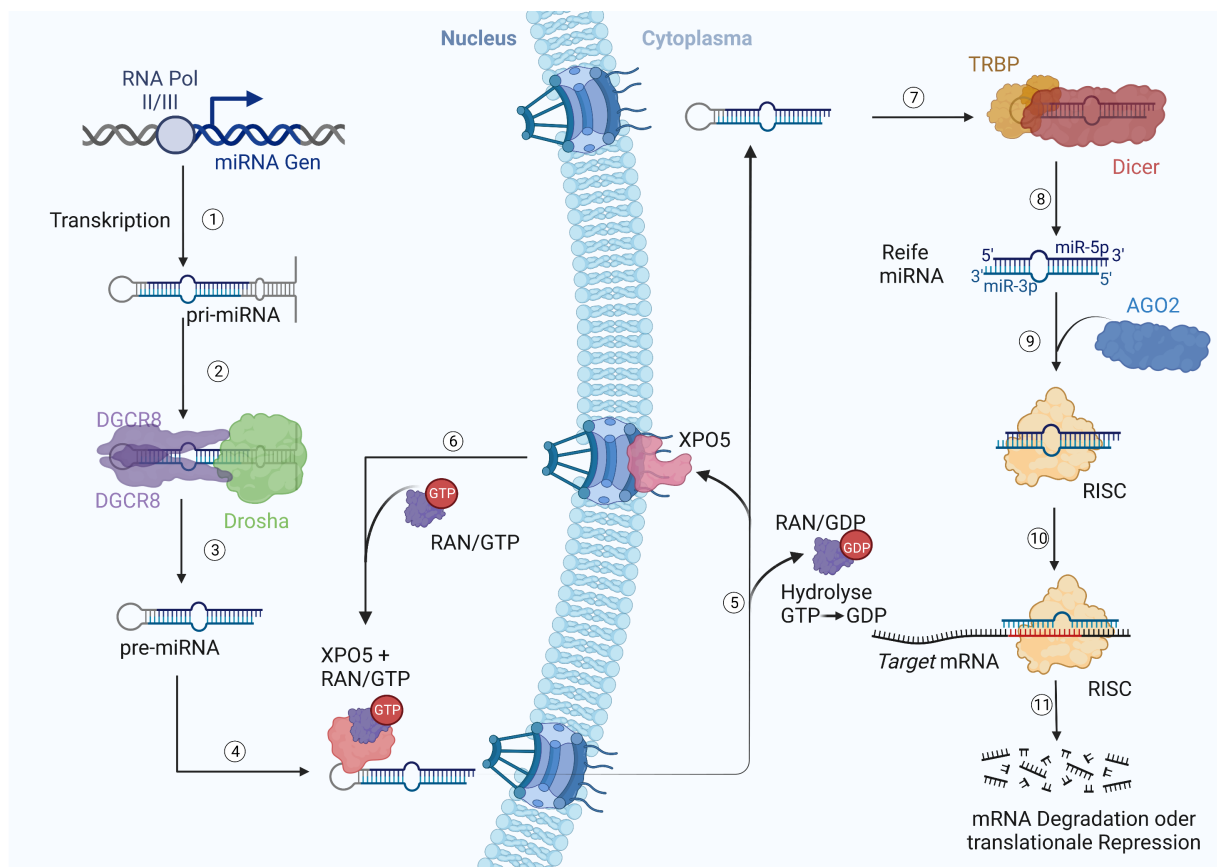
Im Laufe der letzten Jahre haben miRNAs zunehmend an Bedeutung gewonnen, da sie als essentielle regulatorische Instanz in allen Zelltypen eine Rolle bei u.a. Embryonalentwicklung, Karzinogenese und immunologischen Prozessen spielen [83, 84]. miRNAs sind konservierte, kleine, einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 19-24 Nukleotiden. Sie entstammen aus nicht-codierenden Gensequenzen und steuern hauptsächlich die Translation von Target-mRNAs größtenteils durch Bindung an die 3'UTR (*untranslated region*) einer Vielzahl humaner Gene [85, 86]. Die Synthese und Reifung humaner miRNAs, die physiologische Funktion von miRNAs, aberrante Expressions- und Funktionsmuster in Tumoren sowie der Einfluss von UV-Strahlung auf die miRNA-Regulierung sind im Folgenden aufgeführt.

### 1.3.1 miRNA-Biosynthese

Die Expression von miRNA-Genen erfolgt bei Eukaryoten durch die RNA-Polymerasen II [87] und III [88] im Zellkern (Abbildung 1.9, Schritt 1). Der erste Schritt beinhaltet die Transkription der Gensequenz zu einer 500-3000 Nukleotid-langen, primären miRNA (pri-miRNA). Diese wird anschließend durch den sog. *microprocessor complex* zu *pre-cursor* miRNA (pre-miRNA) mit einer Länge von 70 Nukleotiden und einem charakte-

## 1 Einleitung

ristischen *hairpin stem loop* prozessiert [89]. Der *microprocessor complex* besteht aus der Endoribonuklease III Drosha und dem RNA-bindenden Protein DGCR8<sup>13</sup>, welches dimerisiert und zur Stabilisierung der pri-miRNA beiträgt ([90], Abbildung 1.9, Schritt 2). Infolgedessen ist Drosha in der Lage die pri-miRNA an der Basis des *hairpin stem loops* zu spalten, sodass ein 5'-Monophosphat und ein 3'-2-Nukleotid Überhang entstehen ([91], Abbildung 1.9, Schritt 3). Im Anschluss erfolgt die Rekrutierung von Exportin 5 (codiert vom *XPO5*-Gen) zusammen mit der RAN-GTPase<sup>14</sup>, die den Export der pre-miRNA aus dem Nukleus durch die Kernporen mediiert ([92, 93], Abbildung 1.9, Schritt 4).



**Abbildung 1.9: miRNA Biosynthese.** miRNA-Gene werden im Zellkern mittels RNA-Polymerase II/III zu pri-miRNA transkribiert (1) und vom *microprocessor complex* aus Drosha und DGCR8 (2) zu pre-miRNA prozessiert (3). Der Export ins Cytoplasma erfolgt durch die Kernporen nach Bindung von XPO5/RAN/GTP (4). Im Cytoplasma hydrolysiert GTP zu GDP (5) und die pre-miRNA wird infolge der damit verbundenen Konformationsänderungen freigesetzt. XPO5 relokalisiert in den Zellkern, bindet mit RAN/GTP und katalysiert den erneuten Export von pre-miRNAs (6). Die weitere Prozessierung der pre-miRNA erfolgt cytosolisch durch den Komplex aus TRBP und Dicer (7) mit anschließender Inkorporation des *guide strand* in den RISC (8,9). Die Bindung der gebundenen miRNA an die Target-mRNA über die *seed* Sequenz (10) führt zur translationen Repression oder Degradation der mRNA (11). RNA Pol: RNA-Polymerase. RISC: RNA-induced silencing complex. Erstellt mit Biorender.com.

Die nachfolgende Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) im Cytoplasma (Abbildung 1.9, Schritt 5) führt zu einer Konformationsänderung

<sup>13</sup>DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region 8

<sup>14</sup>RAN-GTPase: RAS-related Nuclear Protein-guanosine-5'-triphosphate-ase

des XPO5/RAN/GTP Komplexes und der Freisetzung der pre-miRNA ins Cytoplasma [94]. Das freigewordene XPO5 kehrt in den Nukleus zurück und katalysiert den erneuten Export von pre-miRNA in einem RAN/GTP-abhängigen Kreislauf ([93], Abbildung 1.9, Schritt 6). Die pre-miRNA wird anschließend durch den Komplex aus der Endoribonuklease III Dicer und dem Protein TRBP<sup>15</sup> weiter prozessiert (Abbildung 1.9, Schritt 7). TRBP bindet an die pre-miRNA und stabilisiert Dicer abhängig vom Phosphorylierungsstatus. Ein Verlust der TRBP-Aktivität führt zu einer drastischen Verkürzung der Halbwertszeit von Dicer [95]. In Anwesenheit von TRBP, kann Dicer jedoch den 3'-2-Nukleotid Überhang der pre-miRNA erkennen und den *hairpin stem loop* entfernen [96]. Das Resultat ist ein reifer miRNA Duplex, der aus zwei komplementären Strängen besteht, die mittels Watson-Crick Basenpaarung verbunden sind (Abbildung 1.9, Schritt 8). Die Stränge werden entweder als miR-5p oder miR-3p bezeichnet, je nachdem ob sie dem 5'- oder 3'-Ende des *hairpin stem loops* entstammen [97].

Nachfolgend wird einer der beiden Stränge selektiv in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) geladen, der je nach Zelltyp, interferierender RNA und Spezies verschiedene Proteine umfasst. Der minimale miRNA *induced silencing complex* (miRISC) besteht aus dem Argonautprotein AGO2 (der katalytischen Untereinheit des RISC) und der miRNA; andere Bestandteile sind u.a. TRBP und Dicer ([98, 99], Abbildung 1.9, Schritt 9). Die Spezifität des RISC hängt dabei von der Sequenzkomplementarität zwischen eingebundener miRNA und Target-mRNA (Abbildung 1.9, Schritt 10) in der *seed* Region ab, mit anschließender translationaler Repression oder Degradation der gebundenen mRNA (Abbildung 1.9, Schritt 11).

Die *seed* Sequenz ist meistens zwischen den Nukleotiden 2-7 am 5'-Ende der miRNA lokalisiert und weist perfekte Komplementarität zum 3'UTR der mRNA auf, obwohl Basenfehlpaarungen im Rest der miRNA-Sequenz häufig vorhanden sind [100, 101]. Die Mehrzahl der miRNAs wird entweder als miR-5p oder miR-3p bevorzugt in den RISC eingebaut (*guide* Strang), während die weniger abundante Form (*passenger* Strang) degradiert wird. Trotzdem konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass auch der *passenger* Strang funktional sein kann und während der Evolution vom *guide* Strang unabhängige Regulationsmechanismen entwickelte (u.a. [102]). miR-34 kommt beispielsweise zu gleichen Teilen als miR-34-5p und miR-34-3p vor und reguliert unterschiedliche Zielgene [102, 103]. Weitere prominente Beispiele sind miR-21, miR-31 und miR-155, die als *guide* Strang in der miR-5p Form vorliegen und an onkogenen Prozessen in unterschiedlichen Tumorentitäten, u.a. dem Plattenepithelkarzinom, beteiligt sind [104–106]. In der selteneren miR-3p Form sind sie in die Regulation von u.a. Autoimmunerkrankungen (miR-155-3p [107]), Karzinogenese (Ovarialkarzinom: miR-21-3p [108], Kolonkarzinom: miR-31-3p [109], Hepatozelluläres Karzinom: miR-155-3p [110]) und Stoffwechselerkrankungen (miR-155-3p [111]) involviert.

<sup>15</sup>TRBP: TAR RNA-binding protein



### 1.3.2 Funktion von miRNAs

In einer Mehrzahl bisheriger miRNA-Studien konnte nachgewiesen werden, dass miRNAs ihre inhibierende Funktion durch Bindung an das 3'UTR der Target-mRNA ausüben (z.B. [85, 86]). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass eine Bindung von miRNAs an die 5' UTR oder codierende Sequenzen zur Verringerung der Genexpression führt [112]. Eine ebenfalls beobachtete Interaktion mit Promotorsequenzen hatte hingegen die Induktion der Genexpression zur Folge [113].

miRNAs können abhängig von der Sequenzkomplementarität auf zwei unterschiedlichen Wegen die Translation inhibieren (Abbildung 1.10). Eine perfekte Basenpaarung von miRNA und mRNA führt zur Spaltung der mRNA mediiert durch die Endonukleaseaktivität von AGO2 ([114], Abbildung 1.10A). Allerdings destabilisiert diese Interaktion die Bindung von AGO2 und dem 3'Ende der miRNA verbunden mit einer 3'-Uridylierung und erhöhten Degradationsrate der miRNA [85]. In tierischen Zellen sind daher häufig Fehlpaarungen im Zentrum der miRNA vorhanden, die eine Degradation der miRNA verhindern. Gleichzeitig wird jedoch die endonukleäre Spaltung der mRNA durch AGO2 inhibiert [101]. In diesem Fall erfolgt die mRNA-Regulation zunächst durch Interferenz des miRISC mit dem eIF4F-Komplex. Im Anschluss mediiert die Bindung von *scaffold* Proteinen der GW182-Familie die Rekrutierung von Poly(A)-Deadenylasen wie PAN2<sup>16</sup>-PAN3<sup>17</sup> und CCR4<sup>18</sup>-NOT<sup>19</sup> (Abbildung 1.10 B). Der PAN2-PAN3 Komplex initiiert die Deadenylierung des mRNA Poly(A)-Schwanzes, die durch CCR4-NOT komplettiert wird [115, 116]. Die Bindung von PABPC<sup>20</sup> an C-terminale Tryptophan(W)-Seitenketten der GW182-Proteine begünstigt diesen Deadenylierungsprozess. Anschließend erfolgt der Abbau des 7N-Methylguanosins (m<sup>7</sup>G) an der 5'-Cap durch die Decapping-Enzyme DCP1<sup>21</sup> und DCP2 [115] sowie die nachfolgende 5' → 3' Degradation mittels Exoribonuklease 1 (XRN1) [117].

Die miRNA-vermittelte Genregulation hängt von intrazellulärer Lokalisation des RISC und der Target-mRNA, Zellstatus und zelltypabhängigen Differenzen der miRNA-Expression ab. Das (FANTOM5) Konsortium konnte beispielsweise zeigen, dass in jedem beliebigen humanen Zelltyp die Top-5 miRNAs durchschnittlich 50 % aller exprimierten miRNAs ausmachen. Insgesamt ist die Hälfte der exprimierten miRNAs zelltypabhängig angereichert, ein Viertel wird ubiquitär exprimiert und die restlichen miRNAs zeigten eine geringe Expression in allen untersuchten Zelltypen [118]. miRNAs regulieren Gen-Netzwerke entweder dynamisch mittels feedback und feedforward Mechanismen [119] oder durch die konstante Hoch/Herunterregulierung bestimmter

<sup>16</sup>PAN2: Poly(A) specific ribonuclease subunit PAN2

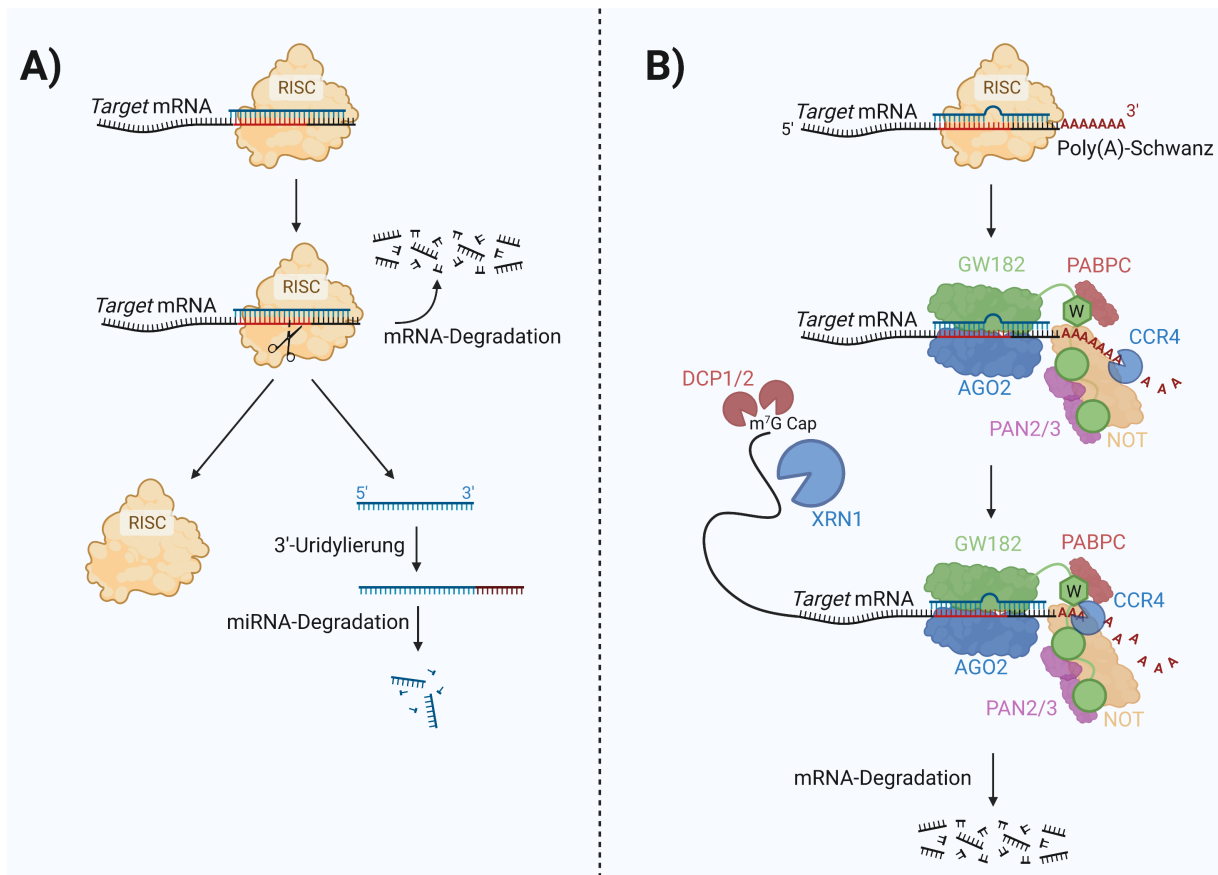
<sup>17</sup>PAN3: Poly(A) specific ribonuclease subunit PAN3

<sup>18</sup>CCR4: Carbon catabolite repression

<sup>19</sup>NOT: Negative On TATA-less

<sup>20</sup>PABPC: Poly(A)-binding protein C

<sup>21</sup>DCP: mRNA-Decapping-Enzym



**Abbildung 1.10: miRNA-vermittelte mRNA Degradation.** (A) Bei perfekter Sequenzkomplementarität von miRNA und mRNA spaltet AGO2 innerhalb des RISC die gebundene mRNA, sodass diese degradiert wird. Infolgedessen wird die Bindung von AGO2 und dem 3'-Ende der miRNA destabilisiert. Die miRNA löst sich aus dem RISC und eine 3'-Uridylierung der miRNA im Cytosol fördert anschließend die miRNA Degradation. (B) Basenfehlpaarungen (meist im Zentrum der miRNA-mRNA Interaktion) führen zur Rekrutierung von GW182 *scaffold* Proteinen durch AGO2. Dort können die Poly(A)-Deadenylen Komplexe PAN2-PAN3 und CCR4-NOT binden und den Abbau des Poly(A)-Schwanzes katalysieren. Die Hydrolyse des N7-Methylguanins am 5'-Ende der mRNA durch DCP1 und DCP2 legt ein 5' phosphoryliertes mRNA-Fragment frei, das der Exoribonuklease XRN1 als Substrat dient, sodass diese die mRNA in 5' → 3' Richtung abbauen kann. Erstellt mit Biorender.com.

Gene z.B. in Embryogenese, Differenzierungsprozessen und der Ätiologie bestimmter Krankheitsbilder (inklusive Krebsentstehung und -progression) [83, 120, 121].

Jede miRNA kann an eine Vielzahl von mRNAs binden, wohingegen jede mRNA von einer Vielzahl unterschiedlicher miRNAs reguliert werden kann. Eine solche kooperative Regulation durch verschiedene miRNAs beschleunigt den Abbau und verstärkt die Inhibition der Target-mRNA [122]. Somit führen Sets von miRNAs selbst durch geringe individuelle Änderungen im Expressionsmuster zu synergistischen Effekten auf die Regulation einzelner Gene oder ganzer Genexpressions-Netzwerke [121]. Der Tumorsuppressor *CDKN1A*<sup>22</sup> ist z.B. Ziel von mindestens 28 unterschiedlichen miRNAs, die in einigen Tumoren gemeinsam hochreguliert werden und *CDKN1A* inhibieren [123, 124].

<sup>22</sup>*CDKN1A*: Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1A

## 1 Einleitung

Generell kann eine gestörte miRNA-Regulation in Tumoren durch Chromosomenaberrationen, transkriptionelle Veränderungen, epigenetische Alterationen und Defekte in der miRNA-Biosynthese bzw. -Prozessierung ausgelöst werden, wobei häufig eine Induktion onkogener miRNAs (onco-miRs) und Inhibition von Tumorsuppressor-miRNAs zu beobachten ist [125]. Eine Fehlregulation der miRNA-Expression kann anschließend zur Karzinogenese durch die Beteiligung an essentiellen zellulären Prozessen wie Zellzyklusregulation, Apoptose, EMT, Zellmigration, Proliferation und Zellüberleben beitragen [8]. miRNAs üben ihre Funktion jedoch nicht nur in den Zellen aus, in denen sie synthetisiert werden: Sie können entweder als freie miRNAs oder verpackt in Vesikel (z.B. Exosomen) an die Zellumgebung (*microenvironment*) oder in den Blutkreislauf abgegeben werden, wo sie systemische Effekte medieren [126, 127]. Insbesondere letzteres wird als neuer Mechanismus beschrieben, wie Tumorzellen Fernmetastasen bilden, indem sie (exosomale) miRNAs sezernieren, die metastatische Nischen mit einem für die Tumorzellen günstigen *microenvironment* schaffen [127, 128].

Der Nachweis von (exosomalen) miRNAs in Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Urin, Zerebrospinalflüssigkeit) als Liquid Biopsies ist daher ein vielversprechendes Forschungsgebiet, um Diagnose und Prognose von Krankheiten zu verbessern und Therapieerfolge minimalinvasiv zu verfolgen [129].

### 1.3.3 miRNA-Regulierung durch solare Strahlung

Solare Strahlung ist in der Lage miRNAs sowohl transkriptionell als auch post-transkriptionell zu inhibieren beziehungsweise zu induzieren. Die Inhibition erfolgt durch Verringerung der miRNA-Expression, Verlangsamung der miRNA-Reifung sowie Beschleunigung der miRNA-Degradation. Eine Induktion kann durch die Erhöhung der miRNA-Expression, Beschleunigung der miRNA-Reifung oder Verlangsamung der miRNA-Degradation bedingt werden [130]. Die Regulation ist abhängig von u.a. Strahlenqualität, Art der miRNA sowie Zelltyp und erfolgt hauptsächlich über zwei Mechanismen: Direkte bzw. indirekte DNA-Schäden mit anschließender *dna damage response* (DDR) oder eine Störung der Redox-Homöostase durch oxidativen Stress. Auf molekularbiologischer Ebene sind die wichtigsten Effektoren die zellulären Schadenssensoren ATM<sup>23</sup> / ATR<sup>24</sup>, der MAPK<sup>25</sup>-Signaltransduktionsweg und epigenetische Modifikationen in miRNA-Genen durch die Methyltransferasen DNMT1<sup>26</sup> und DNMT3. Außerdem spielen die veränderte miRNA-Expression durch redox-sensitive oder schadensindu-

---

<sup>23</sup>ATM: Ataxia telangiectasia mutated

<sup>24</sup>ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

<sup>25</sup>MAPK: mitogen-aktivierte Proteinkinase

<sup>26</sup>DNMT: DNA-Methyltransferase

zierte Transkriptionsfaktoren (p53, NF- $\kappa$ b<sup>27</sup>, c-Jun<sup>28</sup>, c-Myc<sup>29</sup>) sowie die Relokalisation von Proteinen (u.a. Dicer, AGO2) der RNA-Interferenz ([131, 132], Abbildung 1.11) eine wichtige Rolle bei der miRNA-Regulation.

Da UV-Strahlung sowohl direkte DNA-Schäden als auch ROS verursacht, beeinflusst eine UV-Exposition das miRNAom besonders stark [132]. So konnte die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase ATM entweder durch DNA-Schäden und eine ATR-vermittelte Phosphorylierung an S1981 [133] oder oxidatives Crosslinking zweier ATM-Monomere über Disulfidbrücken zu einem ATM-Dimer nachgewiesen werden [134]. Anschließend ist ATM in der Lage das Protein KSRP<sup>30</sup> an den Serinresten S132, S274 und S670 zu phosphorylieren. In der (tri)-phosphorylierten Form bindet KSRP über GGG-Sequenzen an den *hairpin stem loop* der pri-miRNA (z.B. von pri-miR-16, pri-miR-21, pri-miR-199a) und fördert die Prozessierung zu pre-miRNA [135, 136]. Eine Phosphorylierung von KSRP durch p38 der MAPK-Kaskade an T692 wurde ebenfalls beschrieben [137]. Ob dies die miRNA-Reifung beeinflusst ist noch nicht geklärt. p38 kann jedoch stressinduziert Drosha N-terminal phosphorylieren, was eine reduzierte Interaktion mit DGCR8 zur Folge hat. Anschließend wird der nukleäre Export von Drosha und die Degradation mittels Calpain gefördert [138]. Außerdem führt oxidativer Stress zur Aktivierung von ERK<sup>31</sup>, einer weiteren Kinase aus dem MAPK-Signalweg, die TRBP phosphoryliert und folglich zur Reifung der pre-miRNA zu miRNA-Duplexen beiträgt.

Darüber hinaus stellen epigenetische Mechanismen eine wichtige Regulationsinstanz dar. Dazu zählt u.a. die erhöhte DNMT1-Expression in menschlicher Haut nach UV-Bestrahlung zusammen mit einer ROS-induzierten Rekrutierung von DNMT1 an DNA-Schäden. Dies führt im Melanom z.B. zur Hypermethylierung des miR-125b Promotors mit anschließender Herunterregulierung von miR-125b [132]. miR-125b inhibiert Proliferation, Migration sowie Invasion und ist im cSCC ebenfalls gering exprimiert [139]. Darüber hinaus konnte auch die Inhibition von miR-9, miR-29c, miR-34b, miR-34c, miR-148, und miR-199a durch Hypermethylierung nachgewiesen werden, unter Beteiligung von DNMT1 und DNMT3 [132].

Ergänzend zu epigenetischen Regulationsmechanismen, spielen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der miRNA-Homöostase. Diese kann durch DNA-Schäden und oxidativen Stress gestört werden. p53 ist einer der prominentesten und am besten charakterisierten Transkriptionsfaktoren, der als *Wächter des Genoms* eine Vielzahl zellulärer Prozesse steuert. Insbesondere durch die Beteiligung an Initiierung des Zellzyklusarrests, DNA-Reparatur und Apoptose nach DNA-Schadensinduktion ist p53 ein wichtiger Tumorsuppressor. Mutationen im *TP53*-Gen sind in fast allen Krebsentitäten

<sup>27</sup>NF- $\kappa$ b: nuclear factor ' $\kappa$ -light-chain-enhancer' of activated B-cells

<sup>28</sup>c-Jun: Transcription Factor AP-1 Subunit Jun

<sup>29</sup>c-Myc: Proto-Onkogen C-Myc

<sup>30</sup>KSRP: KH-Type Splicing Regulatory Protein

<sup>31</sup>ERK: Extracellular Signal-regulated Kinases

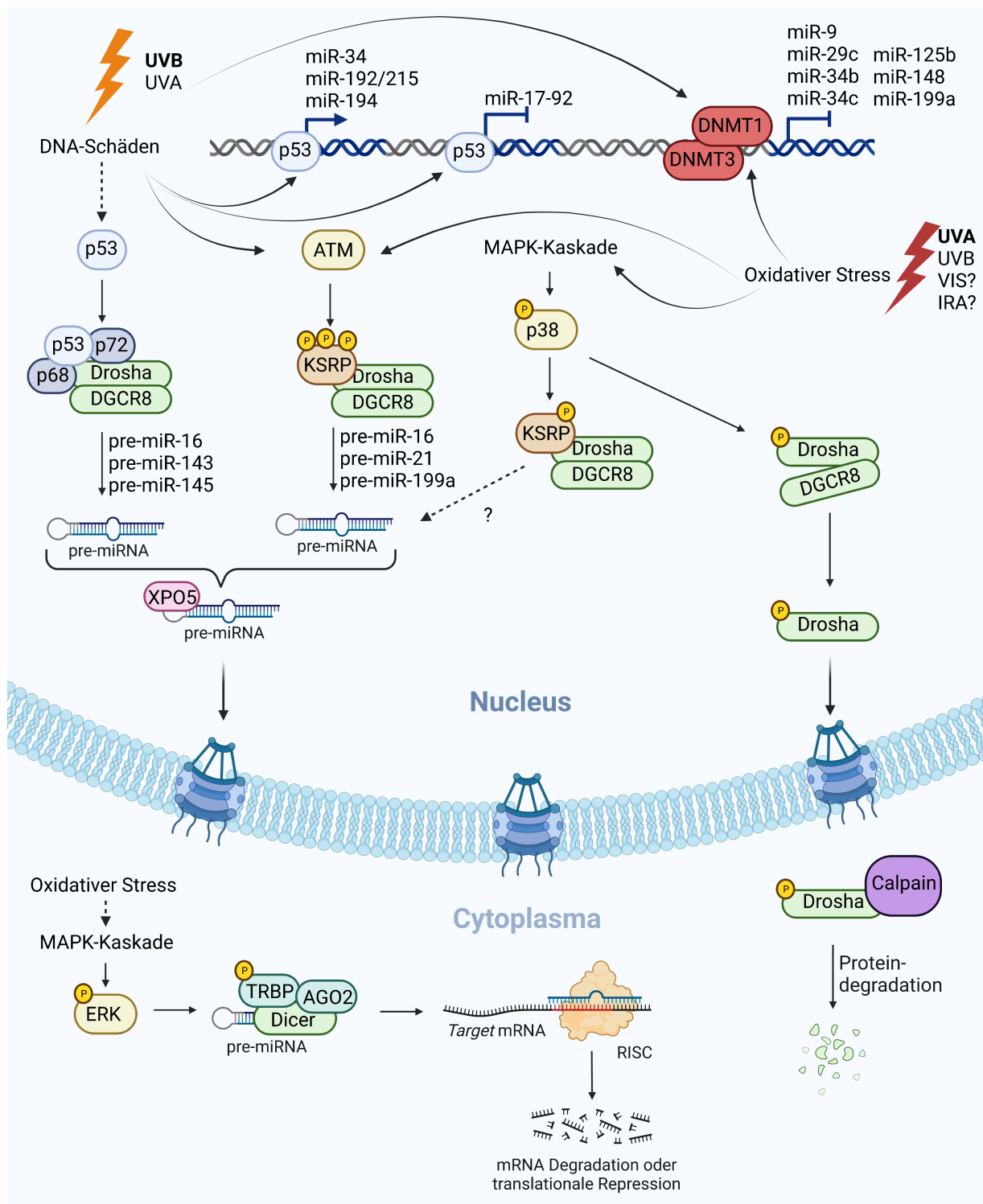
## 1 Einleitung

zu finden und rangieren zwischen 10 % und 100 % [140, 141]. In der physiologischen Form bindet p53 an die Promotorregion verschiedener miRNAs und induziert (u.a. miR-34 [142], miR-194, miR-192/215 [143]) bzw. inhibiert (u.a. miR-17-92 Cluster [144]) deren Expression als zelluläre Antwort auf DNA-Schäden. miR-194 und miR-192/215 sind z.B. wichtige Regulatoren, deren Aktivitätsverlust zur verminderten Effizienz des p53/MDM2-Signalwegs führt [143], wohingegen das miR-17-92 Cluster in vielen Tumorentitäten überexprimiert wird [145]. Außerdem erleichtert p53 die Prozessierung von pri-miRNAs (u.a. pri-miR-16, pri-miR-143, pri-miR-145) durch Bindung an den *microprocessor complex* in Koordination mit p68 und p72 [146]. Die Beteiligung von p53 an Reifungsprozessen wird gestützt von der Beobachtung, dass *TP53*-Mutationen die miRNA-Biogenese stören [147].

Weiterhin konnte im Rahmen der DDR nach UV-Schäden nachgewiesen werden, dass AGO2 zellzyklusabhängig in Stress-Granula relokalisiert. Diese Relokalisation ist verbunden mit umfangreichen Änderungen der miRNA-Expression abhängig von der Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) [131]. Die miRNA-Änderungen und Assemblierung von Stress-Granula traten früher als Anpassungen des Transkriptionsprofils auf und waren am ausgeprägtesten in den ersten Stunden nach der Schadensinduktion [148]. miRNAs scheinen also schnelle Effektoren auf äußere Einflüsse zu sein, die zur Organisation einer effektiven Schadensantwort beitragen.

Da VIS und IRA ebenfalls ROS induzieren (s. Abschnitt 1.2.4.3) ist eine veränderte miRNA-Expression wahrscheinlich. Umfassende Studien zu dem Zusammenhang von VIS/IRA auf miRNA-Muster in der Haut des Menschen gibt es hingegen noch nicht. Allerdings deuten Hinweise aus Mausstudien an der Retina an, dass insbesondere das miR-183/96/182 Cluster sowie miR-132 und miR-211 durch sichtbares Licht induzierbar sind [130].

Insgesamt zeigen die beschriebenen Mechanismen eine Vielzahl verschiedener Induktionsmöglichkeiten strahlungssensitiver miRNA-Veränderungen. Insbesondere die Unterschiede zwischen DNA-Schäden und oxidativem Stress könnten differentielle miRNA-Expressionmuster nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten erklären [149, 150].



**Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der strahlungsinduzierten miRNA-Regulation.** DNA-Schäden führen zur veränderten miRNA-Regulation z.B. über Transkriptionsfaktoren wie p53. p53 beschleunigt außerdem die Reifung von pri-miRNAs zu pre-miRNAs durch Bindung an den Komplex aus Drosha und DGCR8 zusammen mit p68 und p72. Die Aktivierung von ATM durch DNA-Schäden oder oxidativen Stress hat die Phosphorylierung des Proteins KSRP zur Folge, das ebenfalls an den *microprocessor complex* bindet und die Reifung von pri-miRNAs forciert. Oxidativer Stress führt weiterhin zur transkriptionellen Inhibition von miRNAs über DNMT1/3 vermittelte Promotorhypermethylierung. Der Abbau von Drosha im Cytosol sowie die beschleunigte cytoplasmatische Reifung von pre-miRNAs über den MAPK-Signalweg sind weitere Folgen von Redox-Imbalancen. UV-Strahlung konnte bereits in zahlreichen Studien als Ursache für die miRNA-Regulation identifiziert werden. Für VIS und IRA ist ein solcher Zusammenhang noch kaum erforscht. Ein Einfluss auf die miRNA-Biosynthese ist jedoch wahrscheinlich, da sie ebenfalls ROS induzieren. →: Aktivierung, ⇢: Inhibition. Erstellt mit Biorender.com.

### 1.4 Kutanes Plattenepithelkarzinom

Das cSCC entsteht durch Entartung von epidermalen Hautzellen (Keratinocyten) und ist nach dem BCC der zweithäufigste (20 %) Hauttumor mit einer geschätzten (bisher in den meisten Krebsregistern nicht erfasst) Inzidenz von 200.000 - 1.000.000 Fällen pro Jahr allein in den USA [2, 151]. Die Inzidenz ist in den letzten drei Dekaden um 50-200 % gestiegen und eine weitere jährliche Zunahme, insbesondere in Hinblick auf den demographischen Wandel (alternde Bevölkerung), wird für die Zukunft prognostiziert [7, 152]. Metastasen oder Lokalrezidive entwickeln sich bei wenigen (<5 %) Patienten, sind aufgrund fehlender effektiver Therapien jedoch häufig tödlich [3, 152]. Die 10-Jahres Überlebensraten für Patienten mit lokoregionären Lymphknotenmetastasen bzw. Fernmetastasen betragen 2019 z.B. lediglich 20 % bzw. 10 % [3]. Obwohl Melanome von einer deutlich höheren Mortalität gekennzeichnet sind, tragen cSCCs aufgrund der hohen Inzidenz zu 20 % aller Hautkrebs-assoziierten Todesfälle bei [153]. Erste Studien mit Immuntherapien versprechen eine Verbesserung der Prognose [3, 154], ein umfassendes Verständnis der Tumorentstehung und -progression ist jedoch unabdingbar, um Therapieoptionen auszuweiten und die Patientenversorgung zu verbessern.

Risikofaktoren für die Ausbildung eines cSCCs umfassen Alter, kumulative UV-Exposition, helle Haut, Immunsuppression und vorherige Hautkrebserkrankungen [155]. Die Entwicklung eines cSCCs in immunsupprimierten Patienten nach einer Organtransplantation ist beispielsweise um den Faktor 65 bis 250 erhöht [151–153]. Dennoch gilt die kumulative UV-Exposition als Hauptrisikofaktor für die Bevölkerung und ist für ca. 93 % aller nicht-melanozytären Hautkrebserkrankungen verantwortlich [156]. Dies wird durch ein gehäuftes Auftreten von cSCCs an sonnenexponierten Stellen z.B. im Kopf-Hals Bereich (55 %) oder den Extremitäten (18 %) [157] verdeutlicht. Außerdem weisen cSCCs eine hohe Mutationslast auf, vor allem als *UV signature*-Mutationen (s. Abschnitt 1.2.4), die zu *loss of function* in Tumorsuppressorgenen oder *gain of function* in Proto-Onkogenen führen [44, 158]. Epigenetische Veränderungen im Methylierungsmuster [159, 160] oder Alterationen der miRNA-Expression kutaner SCCs [104, 161] sind neben genetischen Faktoren, zusätzliche wichtige Effektoren in der cSCC-Ätiologie. Insbesondere ein Verständnis der miRNA-Veränderungen in der cSCC-Entstehung und -Progression ist von Bedeutung, da miRNAs als Biomarker in Körperflüssigkeiten genutzt werden können um pathologische Prozesse oder Therapien longitudinal zu verfolgen. Aufgrund der miRNA-Induktion/Repression nach UV-Exposition (s. Abschnitt 1.3.3), stellt eine UV-vermittelte miRNA-Regulation wahrscheinlich eine zusätzliche Ebene der UV-induzierten Krebsentstehung dar. Gestützt wird die These durch *In silico* Analysen von differentiell exprimierten miRNAs nach UVA- und/oder UVB-Bestrahlung, die in Signalwege der Hautkrebisentstehung involviert sind [149]. Ein Einfluss von VIS und IRA auf die cSCC-Karzinogenese ist noch nicht nachgewiesen.

Aufgrund der verursachten oxidativen Schäden (s. Abschnitt 1.2.4.3) und dem Einfluss auf zelluläre Prozesse *in vitro* [4], ist dies jedoch nicht auszuschließen.

In humanen cSCCs wurden bereits einige differentiell exprimierte miRNAs untersucht. Let-7a, miR-9, miR-21, miR-31, miR-135b, miR-142, miR-186, miR-365 sind beispielsweise hochreguliert, wohingegen eine Herunterregulation von miR-20a, miR-34a, miR-124, miR-125b, miR-148a, miR-181a, miR-193b, miR-199a, miR-203, miR-204, miR-214 und miR-483-3p beobachtet wurde [8, 105, 156].

Zusammenfassend ist das cSCC ein häufig auftretender Tumor mit steigenden Inzidenzen und einer multifaktoriellen Ätiologie mit UV-Strahlung als Hauptrisikofaktor und einer Vielzahl von dysregulierten miRNAs, die in der Zukunft als prädiktive Biomarker in Liquid Biopsies eingesetzt oder für die Entwicklung zielgerichteter Therapien genutzt werden könnten.





---

## 2 Ziel der Arbeit

---

Das Plattenepithelkarzinom ist der zweithäufigste Hauttumor und entsteht hauptsächlich durch Exposition der Haut mit solarer Strahlung (insbesondere UV-Strahlung). Sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen wie miRNA-Alterationen sind für die Entstehung des cSCCs verantwortlich. Trotz der Vielzahl differentiell regulierter miRNAs, der Identifikation von UV-Strahlung als Hauptrisikofaktor und UV-vermittelter Regulationsmechanismen der miRNA-Expression (s. Abschnitt 1.3.3), gibt es nur wenige Studien [149, 150, 161], die sich intensiv mit dem Einfluss von UV-Strahlung auf die miRNA-Expression im Zusammenhang mit der SCC-Karzinogenese beschäftigen. Insbesondere der Einfluss von UV-Strahlung auf die Tumorprogression und Metastasierung nach initialer Tumorentstehung bedarf noch weiterer Forschung. Darüber hinaus ist der Einfluss von VIS und IRA auf tumorigene Prozesse noch unzureichend untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung des Musters 51 durch Literaturrecherche identifizierter miRNAs in fünf unterschiedlichen cSCC-Zelllinien verschiedener Differenzierungsstadien (Met-1, Met-4, SCC-12, SCC-13, SCL-II) nach chronischer Bestrahlung mit solar simulierter Strahlung (UVB+UVA+VIS+IRA). Die Dosen wurden so gewählt, dass sie einer Sonnenlichtexposition von ca. 15 Minuten (Mitteleuropa, Sommer, Mittagszeit) entsprachen und physiologische Bedingungen widerspiegeln. Das miRNA-Expressionsmuster sollte anschließend zwischen den Zelllinien verglichen werden, um Unterschiede der miRNA-Expression in Abhängigkeit von Differenzierungsstatus und Bestrahlung zu analysieren. Zusätzlich wurde die miRNA-Expression in Gewebeproben von Probanden an sonnenlichtexponierten und sonnenlichtgeschützten Bereichen mit cSCC-Tumorgewebe verglichen. Insbesondere war es wichtig zu untersuchen, ob bestimmte Expressionsmuster differentiell exprimierter miRNAs in Abhängigkeit von *in vitro* und *in vivo* applizierter solarer Strahlung, Hinweise auf ihre Regulationsmechanismen und die involvierten zellulären Pathways liefern können, um mögliche Zusammenhänge mit Tumorprogression bzw. Metastasierung zu beschreiben.



---

# 3 Material

---

## 3.1 Geräte

**Tabelle 3.1:** Geräte und Hersteller.

Gerät	Modell	Hersteller (Ort)
Analysenwaage	870-61	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Absauggerät	Accuvac Basic	Weinmann (Hamburg)
Abzug	7590	Köttermann (Uetze/Hänigsen)
CO <sub>2</sub> Inkubator	CB 210	Binder (Tuttlingen)
Fluoreszenzmikroskop	DMR	Leica (Wetzlar)
Flusszytometer	Guava easyCyte HT	Merck Millipore (Billerica, MD, USA)
Kryostat-Mikrotom	Microm Cryo-Star HM 560 MV	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)
Kühlschrank	KTR	Bosch (Gerlingen)
IRA-Filter	Solaris™ IR S306 filter sheet	PSC Display Window Solutions
IRA-Quelle	750 W LL 240 V	GE Healthcare (Braunschweig)
Magnetrüher	IKAMAK RH	IKA Labortechnik (Staufen)
Mastercycler	Realplex epigradient S	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter	Ph526	WTW (Weilheim)
Photometer	D30	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe	Pipetus-Accu	Hirschmann (Eberstadt)
Schüttelwasserbad	1083	GFL mbH (Burgwedel)
Sterilwerkbank Klasse 2	Gelaire BSB-4A	Flow Laboratories (Bremen)
Stickstoffbehälter	Kseries Cryostorage System	tec-lab GmbH (Hünfelden)
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Comfort 461724	Liebherr (Hamburg)
Tiefkühlschrank (-70 °C)	T1992	Sanyo (München)
Thermocycler	qTower <sup>3</sup>	Anlytik Jena (Jena)
UVA-Filter	Dichroic Type 400	S1 Optics (Nürtingen)
UVA-Quelle	HPA CLEO flexpower 440 W	Philips (Hamburg)
UVB-Filter	Dichroic Type 320	S1 Optics (Nürtingen)
UVB-Quelle	PL-S 9W/12 2P	Philips (Hamburg)
VIS-Filter	Cold Mirror 45°	Knight Optical (Maidstone, UK)
VIS-Quelle	XBO R 300 W/60 C OFR	Osram (Garching)
Zentrifuge	Mikro 200	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge	Universal 320	Hettich (Tuttlingen)

---

## 3.2 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3.2:** Chemikalien und Reagenzien.

Reagenz	Hersteller	Ort
Accutase	Corning	Hagen
Aceton	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Adenin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Annexin-V-FITC	VWR	Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA), 25 %	Gibco	Paisley, Schottland
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Choleratoxin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Chloroform	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Citronensäuremonohydrat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
DAPI	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Dextrose	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Dispase II	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)	Gibco	Paisley, Schottland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
EDTA Titriplex III (99 %)	Merck	Darmstadt
Ethanol (100 %)	Merck	Darmstadt
FKS CP18-2361	Capricorn	Ebsdorfergrund
Geltrex <sup>®</sup>	Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
Gentamycin	Merck	Darmstadt
Goat Serum	Dako	Glostrup, Dänemark
Ham's F12	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
HCl	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
h-EGF	Promo Kine	Heidelberg
HEPES	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Hydroxycortison	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Insulin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
KCl	Merck	Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt
Kollagenase (Typ IV)	Gibco	Paisley, Schottland
Methanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat	
Mitomycin C	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
NaCl	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
PBS-Tabletten	Invitrogen	Hamburg
Pen/Strep	Gibco	Paisley, Schottland
10.000 U/mL Penicillin		
10.000 µg/mL Streptomycin		

Reagenz	Hersteller	Ort
Phenolrot	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Propidiumjodid (PJ)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
RPMI-1640	Gibco	Paisley, Schottland
Roti-Block (10x)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Sulfamethoxazol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
TGF- $\beta$ 1 (rekombinant, ab50036)	Abcam	Cambridge, GB
Tris-HCl	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Triton-X	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Trypsin Pulver	Biochrom	Berlin
Wasser, Nuklease-frei, sterilfiltriert, bide-stilliert	Carl Roth GmbH	Karlsruhe

### 3.3 Antikörper

**Tabelle 3.3:** Verwendete Antikörper.

Epitop	Ursprung	Fluorophor	Hersteller (Ort)
Anti-mouse IgG	Ziege	Alexa594	Invitrogen (Dreieich)
E-Cadherin (CD324)	Maus	APC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
N-Cadherin (CD325)	Maus	PE	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Vimentin, Klon VIM 13.2	Maus		Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 3.4 Kits

**Tabelle 3.4:** Kits und Hersteller.

Name	Hersteller	Ort
ab218342 - FirePlex <sup>®</sup> Assay Core Reagent Kit V2- Biofluid	Abcam	London, GB
ab233247 - Custom 51-plex FirePlex <sup>®</sup> Assay Panel	Abcam	Cambridge, MD, USA
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen	Hilden
Human TGF beta1 ELISA Kit	Invitrogen	Dreieich
miRCURY LNA <sup>™</sup> RT Kit	Qiagen	Hilden
miRCURY LNA <sup>™</sup> miRNA PCR Assay	Qiagen	Hilden
miRNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden
SensiFAST <sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit	Bioline	Luckenwalde
SensiMix <sup>™</sup> SYBR No-ROX Kit	Bioline	Luckenwalde

## 3.5 Zellkulturmedien

Nährmedien wurden mit *aqua dest* angesetzt und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Vor Gebrauch wurde den Nährmedien fötales Kälberserum (FKS) beigefügt, gebrauchsfertiges DMEM und Fibroblastenmedium enthielten 10 % FKS (v/v), FAD enthielt 5 % (v/v) FKS.

**Tabelle 3.5:** Zellkulturmedien.

---

<b>DMEM</b>	<b>FAD</b>
13,38 g DMEM-Pulver	5 µL Choleratoxin
3,7 g NaHCO <sub>3</sub>	500 µL Insulin
10 mL Pen/Strep	25 µL Hydroxycortison
ad 1 L <i>aqua dest</i>	5 µL h-EGF
pH 7,3	500 µL Adeninlösung
	125 mL Ham's F12
<b>Einfriermedium</b>	375 mL DMEM
70 % FKS-freies Medium	
20 % FKS	<b>Fibroblastenmedium</b>
10 % DMSO	500 mL RPMI-1640
	5 mL Pen/Strep
	23.8 mM NaHCO <sub>3</sub>

---

## 3.6 Puffer und Gebrauchslösungen

Die Puffer und Gebrauchslösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit bidestilliertem, sterilem Wasser (*aqua dest*) angesetzt. Für die Verwendung in der Zellkultur wurden entsprechende Lösungen entweder mittels Autoklavieren oder Sterilfiltration (Membranfilter, Porengröße 0.22 µm) sterilisiert. Die Lagerung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT).

Tabelle 3.6: Puffer und Gebrauchslösungen.

<b>Adeninlösung</b> 24 mg/mL Adenin Lagerung: -20 °C	<b>Dispase II 0,48 %</b> 1 g Dispase II 208 mL PBS <sup>-/-</sup> pH 7,4 Lagerung: -20 °C	<b>PBS<sup>++</sup></b> 132 mg CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 50 mg MgCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O ad 1 L PBS <sup>-/-</sup>
<b>Annexin-Inkubationspuffer</b> 10 mM HEPES 140 mM NaCl 5 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,4	<b>FACS-Puffer</b> 2 mM EDTA 0,5 % BSA in PBS <sup>-/-</sup> pH 7,2	<b>PFA-Lösung (4 %)</b> 8 g PFA 200 mL PBS <sup>-/-</sup> pH 6,9
<b>Annexin-Markierungslösung</b> 2,5 µL Annexin-V-FITC 2,5 µL PJ (0,005 %) 100 µL Annexin-Inkubations- puffer	<b>Goat Serum Lösung (5 %)</b> 2,5 mL Goat Serum ad 50 mL PBS <sup>-/-</sup>	<b>PJ-Lösung</b> 0,01 % RNase 10 ng/mL PJ in PBS <sup>++</sup>
<b>BSA-Lösung (3 %)</b> 6 mL BSA (25 %) ad 50 mL PBS <sup>++</sup> Lagerung: 4 °C	<b>HBSS<sup>++</sup></b> 1,3 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,4 mM MgSO <sub>4</sub> 5,3 mM KCl 0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,2 mM NaHCO <sub>3</sub> 137,9 mM NaCl 0,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,6 mM Dextrose 0,027 mM Phenolrot 3 mL Pen/Strep	<b>Roti-Block (1x)</b> Roti-Block (10x) 1:10 in H <sub>2</sub> O 0,125 % Triton-X
<b>Citronensäurelösung</b> 10 mM Citronensäuremonohydrat pH 3,0 Lagerung: 4 °C		<b>TBS</b> 150 mM NaCl 10 mM Tris pH 7,5
<b>DAPI-Lösung</b> 0,1 µg/mL DAPI in PBS <sup>-/-</sup> Lagerung: 4 °C	<b>PBS<sup>-/-</sup></b> 2 PBS-Tabletten ad 1 L <i>aqua dest</i> pH 7,3	<b>TE</b> 0,1 M EDTA 10 mM Tris pH 8,0
		<b>Trypsin/EDTA</b> 0,25 mg Trypsin 20 mg EDTA ad 100 mL PBS <sup>-/-</sup> pH 7,5 Lagerung: -20 °C



## 3.7 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3.7:** Verbrauchsmaterialien.

Waren	Hersteller	Ort
6-Well-Platten	Greiner Bio-One	Solingen
24-Well-Platten	Greiner Bio-One	Solingen
96-Well-Platten	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
Coverslips	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
Deckgläschen	VWR	Darmstadt
Einwegskalpell	Aditya Dispomed Products Pvt.	Gurugram, Indien
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One	Solingen
Küvetten	Eppendorf	Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht GmbH	Sondheim v.d. Röhn
Objektträger	Karl Hecht GmbH	Sondheim v.d. Röhn
Pasteurpipetten	Henze	Elmshorn
Petrischalen (ø 60 mm)	Greiner Bio-One	Solingen
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen	Ratiolab	Dreieich
Reaktionsgefäße 0,5 mL/1,5 mL/2 mL	Greiner Bio-One	Solingen
Sterilfilter	Merck Millipore	Darmstadt
Transwell-Einsätze (8 µm)	CellQART®	Northeim
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> /75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One	Solingen
Zellschaber	Greiner bio-one	Solingen
Zentrifugenröhrchen 15 mL/50 mL	Greiner Bio-One	Solingen

## 3.8 Zelllinien

### 3.8.1 Met-Zelllinien

Die Met-Zelllinien stammen aus einem primären kutanen SCC (Met-1) oder einer Lymphknotenmetastase (Met-4) desselben Patienten (45 Jahre, männlich, immunsupprimiert). Beide Zelllinien sind durch einen p53-Wildtyp und fehlende Mutationen in RAS-Genen (*NRAS*, *KRAS*, *HRAS*) charakterisiert. Im Mausmodell zeigten beide Zelllinien eine Tumorigenität von 50% nach Innokulation immunsupprimierter Mäuse [162]. Weitere Merkmale sind in Tabelle 3.8 dargestellt [163].

**Tabelle 3.8:** Merkmale von Met-Zelllinien.

	<b>Met-1</b>	<b>Met-4</b>
Ploidie	Diploid	Hypotetraploid
Differenzierungsgrad	Akantholytisches SCC (niedrig)	niedrig
Zelllinienspezifischer <i>chromosomal gain &amp; loss</i>	-10p, +17q24-qter, +20q11.2-qter	+1q, +2pter-q21, +9pter-qter, +10q, +12q24.1- q24.3, +14q23-qter, +15q24-qter, +20pter-qter, +Xq22-qter

### 3.8.2 SCC-Zelllinien

Die Zelllinien SCC-12, SCC-13 und SCL-II sind cSCC-Zelllinien, die aus Biopsien des Primärtumors (Lokalisation: Gesicht) verschiedener Patienten generiert wurden und unterschiedliche Differenzierungsgrade (SCC-13 > SCC-12 > SCL-II) aufweisen. Alle Zelllinien tragen Mutationen im *TP53*-Gen, das für p53 codiert, in mindestens einem Allel. SCC-12 weist noch eine geringe p53-Wildtyp Expression auf, die bei SCC-13 und SCL-II nicht detektiert werden konnte. Alle Zelllinien zeigen einen Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 9; SCC-12 und SCC-13 tragen außerdem Mutationen im Codon 12 des *HRAS*-Onkogens [164, 165]. Weitere Charakteristika sind in Tabelle 3.9 aufgeführt .

**Tabelle 3.9:** Merkmale von SCC-Zelllinien.

	<b>SCC-12</b>	<b>SCC-13</b>	<b>SCL-II</b>
Patientendaten	60 Jahre, männlich	56 Jahre, weiblich	91 Jahre, männlich
Ploidie	Hypotetraploid	Hyperdiploid	Hypodiploid
Chromosomenanzahl	79-91	44-50	42-45
Differenzierungsgrad	hoch	hoch	undifferenziert
<i>comparative genomic hybridisation</i>	3p-,9p-,9q-	3p-,9pter-	3p-,9q+
Tumorigenität in Nacktmäusen	100 %	100 %	64 %
p53-Mutation (Gen/Protein)	c.647T>G / p.V216G	c.772C>T / p.Q258K	c.396T>G / p.N132K

## 3.9 Oligonukleotide

### 3.9.1 mRNA PCR-Primer

Die verwendeten Primer wurden entweder selbst designt oder aus bereits veröffentlichten Arbeiten übernommen. Das Primerdesign erfolgte mittels Primer-BLAST Webtool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Die Einstellungen wurden so gewählt, dass das PCR-Produkt eine Länge von 80 - 280 bp umfasste, die Schmelztemperatur der Primer zwischen 59.0 °C und 63.0 °C lag und mindestens eine *exon-exon-junction* zwischen den Bindungsstellen der Primer lokalisiert war. Bei der Primer-Auswahl wurde außerdem berücksichtigt, dass möglichst viele Spleißvarianten amplifiziert wurden und die Selbstkomplementarität der Primer ausreichend gering war, um das Auftreten von Primer-Dimeren zu verringern. Die Primer zur Amplifikation der *Housekeeping*-Gene *ACTB* [166], *HPRT1* [167] und *TBP* [168] sowie die Primer für *SMAD2*, *SMAD3* und *SMAD4* [169] wurden aus der Literatur übernommen. Alle Primer wurden bei der Firma Biomers (Ulm) bestellt, in 1x TE gelöst und auf eine Konzentration von 60 µM eingestellt.

**Tabelle 3.10:** mRNA-Primer.

Gen <sup>1</sup>	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Länge (bp)
<i>ACTB</i>	TTCCTGGGCATGGAGTC	CAGGTCTTTGCGGATGTC	84
<i>BCL2</i>	GATAACGGAGGCTGGGATGC	GGCAGGCATGTTGACTTCAC	166
<i>CDH1</i>	CTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG	GCAGTGTCTCTCCAAATCCG	127
<i>ERBB2</i>	GGCACAGTCTACAAGGGCAT	AGGGCATAAGCTGTGTCACC	214
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	94
<i>INPPL1</i>	ATGCCTCAGATGGGGAGGAT	CTCACAGCTTCCAGGTCCAG	205
<i>ITGA5</i>	GCCGATTCACATCGCTCTC	TCTTCTCCACAGTCCAGCAAG	138
<i>MMP13</i>	CCTTGATGCCATTACCAGTCTCC	AAACAGTCCGCATCAACCTGC	95
<i>SMAD2</i>	ACCGAAATGCCACGGTAGAA	TGGGGCTCTGCACAAAGAT	123
<i>SMAD3</i>	GCCTGTGCTGGAACATCATC	TTGCCCTCATGTGTGCTCTT	127
<i>SMAD4</i>	CTTTGAGGGACAGCCATCGT	TACTGGCAGGCTGACTTGTG	188
<i>TBP</i>	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC	227
<i>TGFB1</i>	TACCTGAACCCGTGTGTGCTCTC	GTGTGCTGAGGTATCGCCAGGAA	122
<i>TGFBR1</i>	GACAACGTCAGGTTCTGGCTCA	CCGCCACTTTCCTCTCCAAACT	124
<i>TGFBR2</i>	GTCTGTGGATGACCTGGCTAAC	GACATCGGTCTGCTTGAAGGAC	118
<i>VEGFA</i>	CATGCCAAGTGGTCCCAGG	GGTCTCGATTGGATGGCAGT	114
<i>ZEB1</i>	ACCTGCCAACAGACCAGAC	TTCCTGTGTCATCCTCCCAG	87
<i>ZEB2</i>	CCACGATCCAGACCGCAAT	CCAGGTGGCAGGTCATTTTCT	235

<sup>1</sup> **ACTB:** Aktin-β. **BCL2:** B-cell Lymphoma 2. **CDH1:** E-Cadherin. **ERBB2:** Erb-b2 Rezeptortyrosinkinase 2. **HPRT1:** Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1. **INPPL1:** Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat 5-Phosphatase 2. **ITGA5:** Integrin Subunit Alpha 5. **MMP:** Matrix Metalloproteinase. **SMAD:** Mothers Against Decapentaplegic Homolog. **TBP:** TATA-binding Protein. **TGFB1:** Transforming Growth Factor β 1. **TGFBR:** TGF-β-Rezeptor. **VEGFA:** Vascular Endothelial Growth Factor A. **ZEB:** Zinc Finger E-box Binding Homeobox.

### 3.9.2 miRNA PCR-Primer

Die miRNA PCR-Primer wurden bei der Firma Qiagen (Hilden) bestellt.

**Tabelle 3.11:** miRNA-Primer.

Name	GeneGlobe ID
hsa-miR-7-5p	YP00205877
hsa-miR-30a-3p	YP00204457
hsa-miR-30d-5p	YP00206047
hsa-miR-126-3p	YP00204227
hsa-miR-135b-5p	YP00204130
hsa-miR-146a-5p	YP00204688
hsa-miR-183-5p	YP00206030
hsa-miR-200a-3p	YP00204707
hsa-miR-205-5p	YP00204487
hsa-miR-424-5p	YP00204736
hsa-miR-16-5p	YP00205702
SNORD44 (hsa)	YP00203902
SNORD48 (hsa)	YP00203903

### 3.9.3 miRNA Inhibitoren

Die miRNA-Inhibitoren wurden bei der Firma Qiagen (Hilden) bestellt.

**Tabelle 3.12:** miRNA-Inhibitoren.

Name	Catalog No.
miRCURY LNA miR-205-5p Inhibitor	339131 YI04101508-DDA
Negative Control A	339136 YI00199006-DDA

## 3.10 Software

**Tabelle 3.13:** Verwendete Software.

Name	Version	Firma/Entwickler
Adobe Reader	11	Adobe
Biorender		<a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a>
ChemDraw	21.0	PerkinElmer Informatics
Guava	3.1.1	Merck Millipore
FirePlex <sup>®</sup> Analysis Workbench Software		Abcam
Flowing Software	2.5.1	Perttu Terho
ImageJ	1.53s	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/developer/index.html">https://imagej.nih.gov/ij/developer/index.html</a>
Mendeley Reference Manager	2.79.0	Mendeley Ltd.
Microsoft Excel	2016	Microsoft
miEAA	2.0	<a href="https://ccb-compute2.cs.uni-saarland.de/mieaa2/">https://ccb-compute2.cs.uni-saarland.de/mieaa2/</a>
MiKTeX	2.9.6751	Christian Schenk
miRTargetLink	2.0	<a href="https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2">https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2</a>
Mod Fit LT <sup>™</sup>	6.0	Verity Software House
QuantAssay		Biosan
NCBI Homepage	06.10.2022	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
qPCR Soft	4.0.8.0	Analytik Jena
R	4.2.1	R Core Team
TeXstudio	2.12.18	Jan Sundermeyer, Daniel Braun, Tim Hoffmann

---

# 4 Methoden

---

## 4.1 Zellbiologische Methoden

### 4.1.1 Kultivierung humaner Hautkrebszelllinien

Die Zellkultivierung erfolgte unter Standardbedingungen (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>) durch Einsaat von 1\*10<sup>6</sup> Zellen in T75-Zellkulturflaschen. Die Zelllinien Met-1, Met-4 und SCL-II wurden in DMEM + 10 % (v/v) FKS (CP18-2361, Capricorn), die Zelllinien SCC-12 und SCC-13 in FAD + 5 % (v/v) FKS kultiviert. Die Zellen wurden wöchentlich im Verhältnis 1:10 passagiert (s. Abschnitt 4.1.3), ein Mediumwechsel erfolgte zwei bis drei Mal pro Woche.

### 4.1.2 Isolierung und Kultivierung primärer Fibroblasten

Die Isolation von Fibroblasten erfolgte wie in [170] beschrieben, um den Einfluss des *microenvironments* (Fibroblasten in der Dermis) auf humane Hautkrebszellen *in vitro* zu modellieren. Humane Vorhaut, gesammelt nach Beschneidungen der klinischen Routine, wurde mit PBS<sup>-/-</sup> und Ethanol (70 %) gewaschen, in längliche Streifen geschnitten und erneut mit PBS<sup>-/-</sup> (angereichert mit je 200 µg/mL Gentamycin und Sulfamethoxazol) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation in 0.48 % Dispase II über Nacht bei 4 °C. Nach Trennung von Epidermis und Dermis, wurde die Dermis zerkleinert und 1 h bei 37 °C in Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> enthaltende *Hanks' balanced salt solution* (HBSS<sup>++</sup>) mit 500 U/mL Kollagenase Typ IV gegeben. Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte nach schrittweiser Verdünnung und Filtration durch Einsaat von 2\*10<sup>4</sup> dermalen Zellen/cm<sup>2</sup> in Fibroblastenmedium +10 %FKS (v/v) analog zu Abschnitt 4.1.1.

### 4.1.3 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden einmal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und in 1 mL Trypsin/EDTA-Lösung 10 min (Hautkrebszellen) bzw. 3 min (Fibroblasten) im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Nach Überprüfung des Ablöseprozesses unter dem Mikroskop wurden die Zellen aufgeklopft und mit einer Pasteurpipette vereinzelt. Anschließend erfolgte die Neutralisation der Trypsinaktivität durch Zugabe von 9 mL Zellkulturmedium. Nach Bestimmung der Zellzahl (s. Abschnitt 4.1.4) konnten die Zellen entsprechend der weiteren Verwendung in neue Zellkulturflaschen, Petrischalen oder 6/24-Well Platten eingesät oder eingefroren (s. Abschnitt 4.1.5) bzw. analysiert werden.

### 4.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde die Zellsuspension auf den Neubauer-Objektträger mit aufgelegtem Deckglas pipettiert, sodass sich die Suspension aufgrund der Kapillarkraft in den Zwischenraum mit definiertem Volumen saugen konnte. Die Zellen in den vier Quadranten der Zählkammer wurden gezählt und gemittelt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte anschließend anhand folgender Formeln.

$$c = \frac{n}{A_{NB} * h_{NB} * Vf} = \frac{n}{1 \text{ mm}^2 * 0.1 \text{ mm} * Vf} = 10^4 * \frac{n}{Vf} * \frac{1}{\text{mL}} \quad (4.1)$$

mit der Zellkonzentration  $c$  (Zellen/mL), der ausgezählten und gemittelten Zellzahl  $n$ , der Fläche eines Quadranten  $A_{NB} = 1 \text{ mm}^2$ , der Höhe des Zwischenraums zwischen Zählkammer und Deckgläschen  $h = 0.1 \text{ mm}$  und dem Verdünnungsfaktor  $Vf$ . Mithilfe von Formel (4.1) lässt sich die Gesamtzellzahl  $n_{\text{ges}}$  berechnen:

$$n_{\text{ges}} = c * V \quad (4.2)$$

mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension  $V$  (mL).

### 4.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden in flüssigem Stickstoff ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gelagert. Für die Zellkultivierung (s. Abschnitt 4.1.1) wurden sie im Wasserbad ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) aufgetaut, in mit 10 mL Medium gefüllte Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 min bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 mL des entsprechenden Zellkulturmediums resuspendiert und in T75-Zellkulturflaschen überführt.

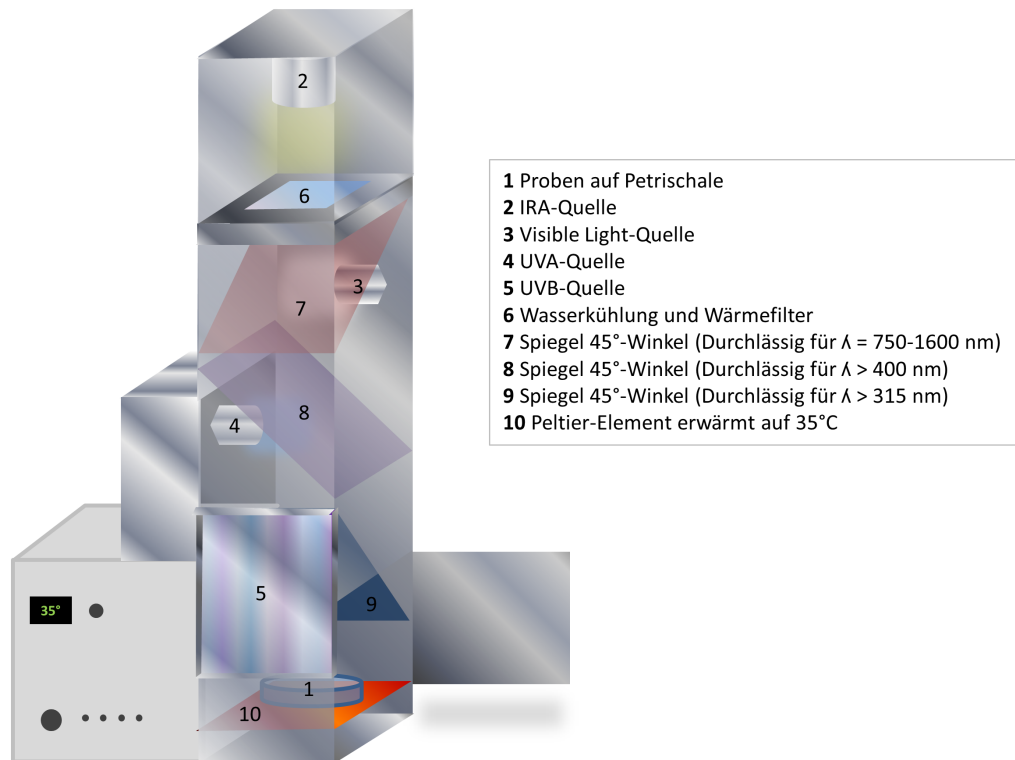
Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen trypsinisiert (s. Abschnitt 4.1.3), nach dem Abstoppen in 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 min bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Einfriermedium resuspendiert und auf eine Zellkonzentration von  $1 * 10^6$  Zellen/mL eingestellt. Im Anschluss wurde je 1 mL Zellsuspension in Kryoröhrchen gegeben und sukzessive eingefroren (30 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min bei  $-72 \text{ }^\circ\text{C}$  und nachfolgend bei  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

### 4.1.6 UV-Bestrahlung von Zellen

#### 4.1.6.1 KAUVIR-Strahlungsquelle

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einer spezialangefertigten Bestrahlungsquelle (Abbildung 4.1, [4]). Die Besonderheit dieser Lampe ist die Möglichkeit der Kombinationsbestrahlung mit UVA, UVB, IRA und VIS zu unterschiedlichen Anteilen ähnlich

der solaren Strahlung. Dies wird durch die spezielle Anordnung der jeweiligen Strahlungsquellen (in absteigender Reihenfolge: IRA-Quelle (Abbildung 4.1, 2), VIS-Quelle (Abbildung 4.1, 3), UVA-Quelle (Abbildung 4.1, 4), UVB-Quelle (Abbildung 4.1, 5)) sowie selektiv durchlässiger Filter erreicht, deren Notwendigkeit sich aus der Emission ungewünschter Wellenlängen der jeweiligen Strahlungsquellen ergibt.



**Abbildung 4.1: KAUVIR-Lampe.** Für die Bestrahlung werden Proben in bis zu vier Petrischalen (1) auf einem auf 35 °C erwärmten Peltier-Element (10) platziert. Die Bestrahlung erfolgte mit Strahlung aus einer IRA- (2), VIS- (3), UVA- (4), und UVB-Quelle (5), nach Filterung ungewünschter Wellenlängen mittels wassergekühltem Acrylfilter (6) bzw. dichroitischen Spiegel, die Strahlung wellenlängenabhängig entweder reflektieren oder passieren lassen. IRA kann den ersten Spiegel (7) passieren, wohingegen VIS in Richtung Probe gelenkt wird. Der zweite Spiegel (8) ist durchlässig für  $\lambda > 400$  nm und reflektiert UVA-Strahlung in Richtung Probe. UVB-Strahlung wird vom dritten Spiegel (9), der durchlässig für Wellenlängen größer als 315 nm ist, in Richtung Probe gelenkt. Mit freundlicher Genehmigung von Bente Siebels [171].

Die Strahlung der IRA-Quelle (750 W LL 240 V, GE Healthcare) wird mittels Acrylfilter (Solaris™ IR S306 filter sheet, PSC Display Window Solutions), der undurchlässig für längerwellige Wärmestrahlung ist, gefiltert (Abbildung 4.1, 6). Die Absorption der Wärmestrahlung im Filter führt zu einer starken Hitzeentwicklung, sodass eine Wasserkühlung notwendig ist, um die Lampe vor Überhitzung zu schützen. Den anderen Strahlungsquellen ist jeweils ein dichroitischer Spiegel im 45° Winkel nachgeschaltet, der durchlässig für Wellenlängen oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes ist und Strahlung mit geringerer Wellenlänge reflektiert. Der erste Spiegel (Cold Mirror 45°, Knight Optical) ist durchlässig für Wellenlängen  $\geq 750$  nm, sodass von der VIS-Quelle



## 4 Methoden

(XBO R 300 W/60 C OFR, Osram) emittierte IRA-Strahlung die Probe nicht erreicht (Abbildung 4.1, 7). Wellenlängen  $< 750$  nm werden in Richtung Probe reflektiert und mit der IRA-Strahlung der IRA-Quelle kombiniert. Anschließend passieren die Wellenlängen der IRA- und VIS-Quelle den zweiten Spiegel (Dichroic Type 400, S1 Optics), der durchlässig für  $\lambda > 400$  nm ist und vereinigen sich mit der UVA-Strahlung aus der UVA-Quelle (HPA CLEO flexpower 440 W), die vom Spiegel reflektiert wird (Abbildung 4.1, 8). Der letzte Teilerspiegel (Dichroic Type 320, S1 Optics) ist durchlässig für Wellenlängen oberhalb von 315 nm und reflektiert die kürzerwellige UVB-Strahlung aus der UVB-Quelle (PL-S 9W/12 2P, Philips), die ebenfalls in Richtung Probe gelenkt wird (Abbildung 4.1, 9). Diese wird auf einem auf 35 °C erwärmten Peltier-Element (Abbildung 4.1, 10) platziert, um gleichbleibende Versuchsbedingungen zu gewährleisten und Ungenauigkeiten aufgrund von Temperaturschwankungen zu vermeiden. Weitere Details und Spezifikationen der Lampe sind [4] zu entnehmen.

### 4.1.6.2 Zellpräparation und Bestrahlung

Die einzelnen Strahlungsquellen der Lampe (s. Abschnitt 4.1.6.1) lassen sich individuell steuern, sodass verschiedene Strahlungskombinationen untersucht werden können. Die jeweilige Bestrahlungsdosis lässt sich dabei durch die Bestrahlungsdauer regulieren. In dieser Arbeit wurde jedoch lediglich das Gesamtspektrum (UVB+UVA+VIS+IRA) genutzt, um eine solare Strahlung zu simulieren.

Für die Bestrahlung wurden Zellen in Petrischalen ( $\varnothing$  60 mm) subkonfluent kultiviert. Vor der Bestrahlung wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 5 mL PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend mit 3 mL PBS<sup>-/-</sup> versetzt. Bis zu vier Petrischalen wurden auf dem Peltier-Element der Lampe platziert. Kontrollen wurden analog behandelt und für die Dauer der Bestrahlung bei 35 °C inkubiert. Die Bestrahlungszeit der Zellen betrug 315 s (5 min 15 s). In diesem Zeitraum erhielten die Zellen eine physikalische Gesamtdosis von 102.52 kJm<sup>-2</sup> - entsprechend einer CIE gewichteten Dosis (s. Abschnitt 1.2.2) von 61.43 Jm<sup>-2</sup> (ca. 1/4 MED). Weitere Angaben zur Bestrahlungsstärke, -dosis und biologischer Gewichtung sind in Tabelle 4.1 angegeben. Nach abgeschlossener Bestrahlung wurde das PBS<sup>-/-</sup> abgenommen, 5 mL des jeweiligen Mediums auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden entweder weiterkultiviert oder entsprechend der anschließenden Analyse aufbereitet.

**Tabelle 4.1:** Daten zur Bestrahlung von humanen cSCC-Zelllinien und primären Fibroblasten.

Strahlungsart	Bestrahlungsstärke (Wm <sup>-2</sup> ) (physikalisch)	Bestrahlungsstärke (Wm <sup>-2</sup> ) (CIE gewichtet)	Dosis (kJm <sup>-2</sup> ) (physikalisch)	Dosis (Jm <sup>-2</sup> ) (CIE gewichtet)
UVB	0,78	0,17	0,25	54,75
UVA	39,72	0,02	12,50	6,62
VIS	89,90	0,00	28,03	0,00
IRA	196,60	0,00	61,74	0,00
cSS	327,00	0,19	102,52	61,43

#### 4.1.7 Transfektion

Die Transfektion der Zellen erfolgte einen Tag nach Aussaat von 40.000 - 60.000 Zellen in 24-Well Platten mittels HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen). Das Transfektionsreagenz enthält eine Mischung aus kationischen sowie neutralen Lipiden und ermöglicht eine effiziente Transfektion kleiner Oligonukleotide wie z.B. siRNA, miRNA-Inhibitoren und miRNA-*mimics*. Pro Transfektionsansatz wurden 25 pmol miRCURY LNA miR-205-5p Inhibitor (Qiagen) bzw. 2.5 pmol Negative Control A (Qiagen) als Transfektionskontrolle in 100 mL FKS-freies Medium gegeben, mit 3 µL Transfektionsreagenz vermennt und durch 10 s Vortexen gemischt. Die Lösung wurde nachfolgend für 10 min bei RT inkubiert, sodass sich Transfektionskomplexe bilden konnten. Anschließend erhielten die Zellen 400 µL frisches FKS-haltiges Medium und je 100 µL des Transfektionsansatzes, der tröpfchenweise auf die Zellen gegeben wurde. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Transfektionskomplexe durch einmaliges Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> entfernt und 0.5 mL frisches Medium auf die Zellen gegeben.

#### 4.1.8 Bestimmung des Zellwachstums

Für die Bestimmung des Zellwachstums wurden 40.000 Zellen pro Well in eine 24-Well Platte eingesät. Nach 24 h wurde ein Teil der Zellen abgelöst und das Zellwachstum mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt (s. Abschnitt 4.1.4). Die restlichen Zellen wurden mittels HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen) und entweder 50nM miRCURY LNA miR-205-5p Inhibitor (Qiagen) oder 5 nM Negative Control A (Qiagen) transfiziert (s. Abschnitt 4.1.7). Anschließend wurde die Zellzahl zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h, 96 h und 168 h nach Einsaat bestimmt.

### 4.1.9 Behandlung mit TGF- $\beta$ 1

Zur Untersuchung des Einflusses bestimmter miRNAs auf die EMT und das mögliche Zusammenspiel mit dem TGF- $\beta$ -Pathway, wurde die künstliche Aktivierung des TGF- $\beta$ 1-Pathways analysiert.

Zwei Mikrogramm aktives, rekombinantes TGF- $\beta$ 1 (Abcam, ab50036) wurden in 40  $\mu$ L Citronensäurelösung (10 mM, pH 3.0) gelöst, sodass sich eine Konzentration von 50 ng/ $\mu$ L in der Stammlösung ergab. Diese Lösung wurde für maximal einen Monat bei 4 °C gelagert und anschließend neu angesetzt, um eine Degradierung des Proteins zu vermeiden und reproduzierbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Abhängig von der nachfolgenden Analyse wurden Zellen für 24 h, 48 h oder 72 h mit entweder 10 ng/mL oder 130 ng/mL TGF- $\beta$ 1 im Zellkulturmedium kultiviert. Als Kontrolle diente die Kultivierung von Zellen in normalem Zellkulturmedium.

### 4.1.10 Durchflusszytometrie

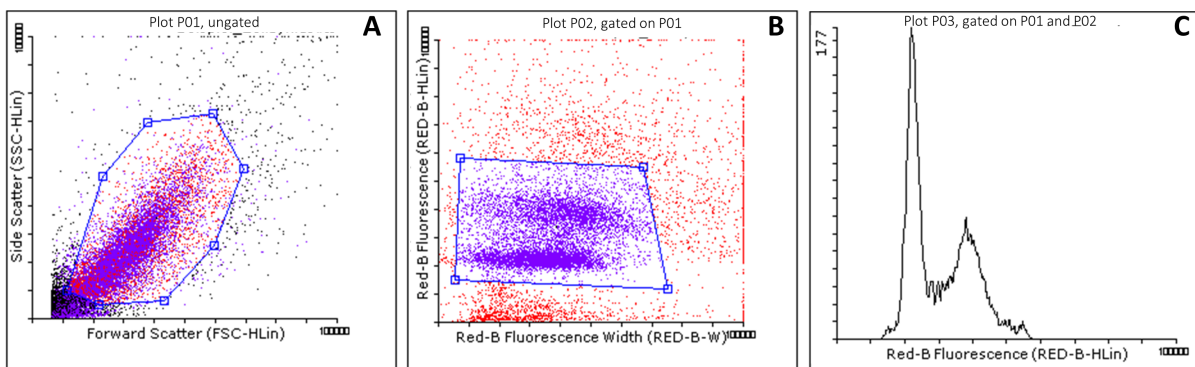
Im Flusszytometer können Streulichteigenschaften von Zellen zur Bestimmung der Morphologie detektiert werden. Vorwärts gerichtetes Streulicht (*forward scatter*, FSC) korreliert mit der Zellgröße, wohingegen seitwärts gerichtetes Streulicht (*side scatter*, SSC) die Granularität der Zellen widerspiegelt. Dadurch können unterschiedliche Zelltypen charakterisiert, sowie Zellaggregate von Einzelzellen und lebende von apoptotischen/nekrotischen Zellen unterschieden werden. Darüber hinaus ist es möglich die Proteinexpression durch die Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper zu quantifizieren oder den DNA-Gehalt von Zellen durch die Inkorporation interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe zu bestimmen.

Im Prozess werden Zellen hydrodynamisch innerhalb einer Kapillare fokussiert, sodass einzelne Zellen Anregungsquellen (Laser) verschiedener Emissionswellenlängen passieren und das anschließende Signal einer spezifischen Zelle zugeordnet werden kann. Die Laser sind orthogonal zur Kapillare ausgerichtet und führen je nach Absorptionswellenlänge des gebundenen Fluorophors über die Konversion mittels Photomultiplier zur Induktion eines elektrischen Signals. Dieses ist proportional zur Menge des Fluorophors und ermöglicht die Quantifizierung der o.g. Endpunkte.

Die Analyse erfolgte am Flusszytometer Guava easyCyte 8HT (MerckMillipore) mit dazugehöriger Software Guava 3.1.1. Protokolle zur Zellzyklusanalyse, Messung der Früh- und Spätapoptose sowie die Detektion von Oberflächenproteinen sind im Folgenden dargestellt.

#### 4.1.10.1 Zellzyklusanalyse

Die Analyse des Zellzyklus beruht auf Unterschieden im DNA-Gehalt während verschiedener Zellzyklusphasen. Die  $G_1$ -Phase ist gekennzeichnet von einem einfachen Chromosomensatz und dient als Referenz. Im Laufe der S-Phase wird neue DNA synthetisiert, sodass in der  $G_2$ /M-Phase ein doppelter Chromosomensatz vorliegt, der anschließend auf zwei Tochterzellen aufgeteilt wird. Durch Anfärbung der DNA mit einem Interkalationsfarbstoff wie z.B. Ethidiumbromid oder Propidiumjodid (PJ) lässt sich der DNA-Gehalt quantifizieren und der Anteil der jeweiligen Zellzyklusphasen in der Zellpopulation ableiten. Da sich der DNA-Gehalt von Dubletten (nicht getrennte Einzelzellen) in der  $G_1$ -Phase nicht von Einzelzellen in der  $G_2$ /M-Phase unterscheidet, müssen Dubletten von der Messung ausgeschlossen werden. Außerdem ist es wichtig intakte von toten Zellen zu unterscheiden. Dies erfolgt durch die Auswahl distinkter Zellpopulationen (Gating), die beispielhaft in Abbildung 4.2 dargestellt ist. In der Analyse wird zunächst der SSC gegen den FSC aufgetragen, um lebende von apoptotischen/nekrotischen Zellen zu trennen (Abbildung 4.2 A). Anschließend wird die Signalthöhe gegen die Signalbreite des gebundenen Interkalationsfarbstoffs der lebenden Zellen gegeneinander aufgetragen, wodurch die Separation von Einzelzellen und Dubletten ermöglicht wird (Abbildung 4.2 B). Nachfolgend kann der DNA-Gehalt dieser lebenden Einzelzellen mittels *density plot* der Fluoreszenz bestimmt werden (Abbildung 4.2 C).

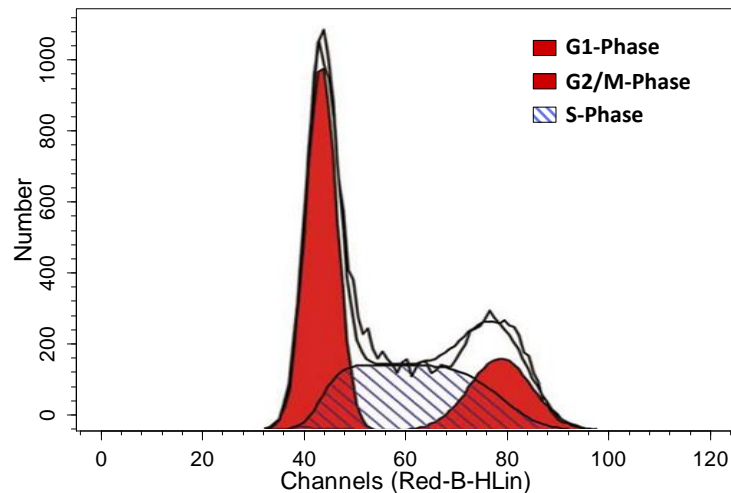


**Abbildung 4.2: Setzen von Gates zur Zellzyklusanalyse.** (A) Lebende Zellen (innerhalb des gesetzten Gates) und tote Zellen (Cluster in der unteren linken Ecke des plots) können durch Auftragung von SSC und FSC differenziert werden. (B) Lebende Zellen (Gate aus Plot A) können durch Auftragung der Signalthöhe gegen die Signalbreite der PJ-Fluoreszenz weiter in Einzelzellen (innerhalb des Gates) und Dubletten unterschieden werden. Die untere Zellpopulation innerhalb des Gates enthält Zellen in der  $G_1$ -Phase, die obere Zellpopulation innerhalb des Gates enthält Zellen in der  $G_2$ /M-Phase. (C) Anhand der Verteilung der PJ-Fluoreszenz lässt sich der Anteil der jeweiligen Zellzyklusphasen ableiten. Die Auswertung erfolgte mit Mod Fit LT™ (s. Abbildung 4.3). Einheiten der Fluoreszenz in *arbitrary units* (a.u.). Blau: gesetztes Gate. Rot: Lebende Zellen. Violett: Einzelzellen. Guava easyCyte 8HT.

Im ersten Peak des *density plots* sind Zellen der  $G_1$ -Phase, im zweiten Peak Zellen der  $G_2$ /M-Phase lokalisiert. Dazwischen befinden sich Zellen in der S-Phase. Die jeweiligen Anteile können entweder durch Setzen manueller Gates oder die Verwendung eines

## 4 Methoden

Algorithmus z.B. in der Software Mod Fit LT™ (Verity Software House) bestimmt werden. Letzteres wurde aufgrund höherer Genauigkeit in dieser Arbeit eingesetzt. Die Messdaten wurden an eine Gaußsche Glockenkurve für Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase und Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase angepasst. Anschließend konnte anhand dieser angepassten Daten der Anteil an Zellen in der S-Phase ermittelt werden (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3: Zellzyklusanalyse mit Mod Fit™.** Der Anteil von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase und G<sub>2</sub>/M-Phase wird durch Anpassung der Daten an eine Gaußsche Glockenkurve ermittelt. Restliche Zellen werden der S-Phase zugeordnet. Auftragung von Zellzahl gegen PJ-Fluoreszenz. Mod Fit LT™.

Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff PJ nach folgendem Protokoll:

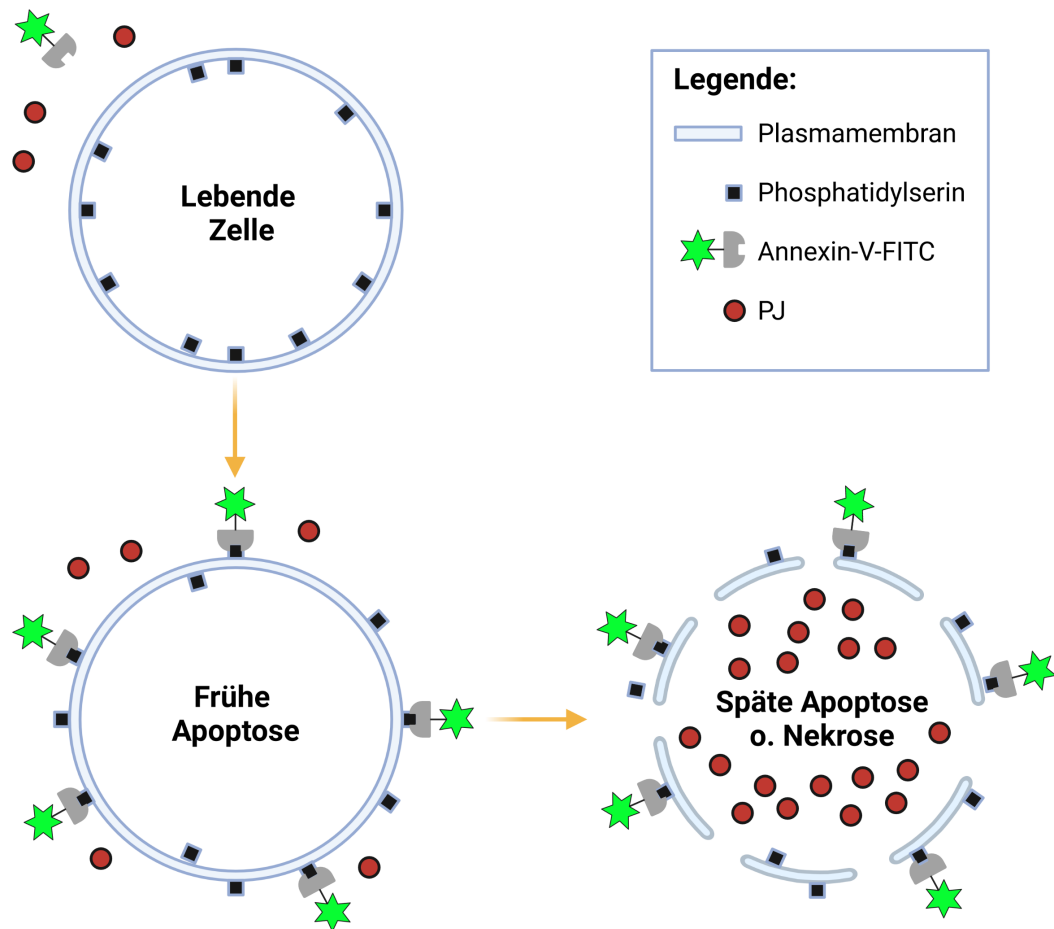
- Transfizierte Zellen (s. Abschnitt 4.1.7) mit 500 µL Trypsin/EDTA (10 min, 37 °C) ablösen
- Zellsuspension in 15 mL Zentrifugenröhrchen überführen und auf 10 mL mit Zellkulturmedium auffüllen, Zellen auszählen
- 10 min bei 190 g zentrifugieren
- Überstand absaugen, Pellet resuspendieren und mit 10 mL PBS<sup>-/-</sup> waschen (Zentrifugation: 10 min, 190 g)
- Überstand absaugen, Pellet resuspendieren und mit 300 µL 70 % Ethanol pro 1\*10<sup>6</sup> Zellen fixieren (Lagerung bei -20 °C)
- 85 µL der in Ethanol gelagerten Zellsuspension in 96-well Platte vorlegen
- 85 µL TBS hinzufügen und mittels Auf- und Abpipettieren mischen
- 3 min bei 500 g zentrifugieren, Überstand abkippen
- Zellen in 160 µL Roti-Block (1x) resuspendieren und 5 min inkubieren
- 3 min bei 500 g zentrifugieren, Überstand abkippen

- Zellen in 160  $\mu\text{L}$  PJ-Lösung (10 ng/mL) resuspendieren und 15 min im Dunkeln inkubieren
- Messung von mindestens 5.000 (idealerweise 10.000) Zellen im Flusszytometer und Auswertung mit Guava 3.1.1 und Mod Fit LT™

### 4.1.10.2 Messung von Früh- und Spätapoptose mittels Annexin-V

Im Zuge der Apoptose verändert sich die Zellmembran der apoptotischen Zellen (Abbildung 4.4). In einem frühen Stadium der Apoptose (Frühapoptose) wird die Verteilung bestimmter Phospholipide verändert. Phosphatidylserin, das normalerweise auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert ist, tritt vermehrt auf der Außenseite der Membran auf. Das Protein Annexin-V kann spezifisch an Phosphatidylserin binden und die Membranveränderungen lassen sich durch fluoreszenzmarkiertes Annexin-V (Annexin-V-FITC) nachweisen. Spätapoptotische oder nekrotische Zellen werden ebenfalls durch Annexin-V gebunden, weisen anders als frühapoptotische Zellen jedoch keine intakte Zellmembran mehr auf. Die gleichzeitige Färbung mit einem Interkalationsfarbstoff wie PJ, das durch die permeabilisierte Membran eindringen kann, ermöglicht daher die Unterscheidung von früh- und spätapoptotischen/nekrotischen Zellen im Flusszytometer.

Um den Einfluss von miR-205-5p Inhibitoren (vgl. 4.1.7) auf die Apoptose zu untersuchen, wurden 40.000 Zellen in einer 24-Well Platte mit miR-205-5p Inhibitor oder Kontrollsequenz mit 0,1  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin, einem Kinasehemmer, 3 h in Vollmedium 3 h inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Staurosporinzugabe. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen abgelöst (s. Abschnitt 4.1.3) und mit dem Überstand vereinigt. Die Mischung aus Zellsuspension und Überstand wurde ausgezählt und 10 min bei 200 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen in 500  $\mu\text{L}$  PBS<sup>-/-</sup>/10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert und 125  $\mu\text{L}$  dieser Lösung ( $2,5 \cdot 10^5$  Zellen) in eine 96-Well Platte mit spitzem Boden überführt. Einer 5-minütigen Zentrifugation bei 150 g, dem Abkippen des Überstands und einem Trocknen der Platte folgte die Resuspension des Zellpellets in 100  $\mu\text{L}$  Annexin-Markierungslösung für 15 min im Dunkeln. Nach Zugabe von 80  $\mu\text{L}$  Annexin-Inkubationspuffer wurden die Zellen im Flusszytometer gemessen.



**Abbildung 4.4: Annexin-V-Apoptose-Assay.** Bei intakter Plasmamembran sind Phosphatidylserinreste auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert. Diese Zellpolarität geht in frühen Schritten der Apoptose verloren, sodass fluoreszenzmarkiertes Annexin-V an die Phosphatidylserinreste binden kann. Eine Permeabilisierung der Zellmembran in späteren Phasen der Apoptose sowie bei nekrotischen Prozessen ermöglicht das Eindringen von PJ, das die DNA anfärbt. Lebende Zelle: keine Fluoreszenz. Frühapoptotische Zelle: grüne Annexin-V-FITC-Fluoreszenz. Spätapoptotische/nekrotische Zellen: grüne Annexin-V-FITC-Fluoreszenz und rote PJ-Fluoreszenz. Erstellt mit biorender.com.

#### 4.1.10.3 Doppelanfärbung der Oberflächenproteine E- und N-Cadherin

Nach Einsaat von 40.000 Zellen in eine 24-Well Platte wurden Zellen entweder mit einem miR-205 Inhibitor oder einer Kontrollsequenz transfiziert (s. Abschnitt 4.1.7), mit 10 ng/mL bzw. 130 ng/mL TGF- $\beta$ 1 (s. Abschnitt 4.1.9) über einen Zeitraum von 24 h oder 48 h inkubiert oder zunächst transfiziert und anschließend mit 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 behandelt. Als Kontrollen eines mesenchymalen Phänotyps dienten unbehandelte Fibroblasten, die subkonfluent kultiviert wurden. Das Ernten der Zellen erfolgte durch 10-minütige Inkubation mit 500  $\mu$ L Accutase, um die Integrität der Oberflächenproteine zu erhalten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Vollmedium abgestoppt, gefolgt von der Auszählung der Zellen. Insgesamt wurden 50.000 Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Dafür wurden die Zellen zunächst 10 min bei 300 g zentrifugiert,

der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer resuspendiert. Die Anfärbung erfolgte durch Inkubation mit 2  $\mu\text{L}$  anti-N-Cadherin Antikörper (PE-konjugiert, Miltenyi Biotec) und 10  $\mu\text{L}$  anti-E-Cadherin Antikörper (APC-konjugiert, Miltenyi Biotec) für 10 min bei 4 °C. Nach Zugabe von 40  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer wurden die Zellen im Flusszytometer vermessen.

### 4.1.11 Immunhistochemie

Coverslips wurden in 24-Well Platten platziert, gefolgt von der Einsaat von 20.000 Zellen pro Well und Behandlung mit 10 ng/mL oder 130 ng/mL TGF- $\beta$ 1 für 24 h oder 48 h. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS<sup>-/-</sup> (5 min) gewaschen und durch Inkubation mit Methanol (10 min, -20 °C) gefolgt von Aceton (10 min, -20 °C) fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> (5 min), erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 3% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS<sup>++</sup> für 30 min bei RT. Überschüssiges BSA wurde durch einmaliges Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> (5 min) entfernt, gefolgt von der Blockierung mit Goat Serum (5 % in PBS<sup>-/-</sup>) für 30 min bei RT. Der anti-Vimentin (Klon VIM 13.2, Sigma-Aldrich) Primärantikörper (1:300 verdünnt in 3%BSA/PBS<sup>++</sup>) inkubierte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> (je 10 min), erfolgte die Inkubation des Goat anti-mouse Alexa594 (Invitrogen) Sekundärantikörpers (1:500 verdünnt in 3%BSA/PBS<sup>++</sup>) für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS<sup>-/-</sup> (je 10 min) gewaschen. Die Kernfärbung der Zellen erfolgte im Dunkeln durch 1-minütige Inkubation in 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI-Lösung, gefolgt von zweimaligem Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> (je 5 min). Abschließend wurden 20  $\mu\text{L}$  Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich) auf Objektträger gegeben, die Coverslips aus der 24-Well Platte entfernt und mit der Oberseite nach unten auf die Objektträger gelegt und mittels Leica DMR Fluoreszenzmikroskop untersucht.

### 4.1.12 Scratch-Assay

Der Scratch Assay ist eine Methode, um die Migrationsgeschwindigkeit und Wundheilung von Zellen bzw. Zellverbänden zu untersuchen. Die Analyse transfizierter Zellen (s. Abschnitt 4.1.7) erfolgte 48 h nach Transfektion. Die konfluenten Zellen wurden für 1 h mit Mitomycin C (EK: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in Vollmedium) inkubiert. Mitomycin C ist ein Antibiotikum mit zytostatischer Wirkung aus *Streptomyces caespitosus*, das zur kovalenten Verbindung zweier DNA-Stränge führt und somit Replikation sowie Transkription der Zellen inhibiert. Der Wundverschluss beruht demnach lediglich auf Migration, ohne einen interferierenden Effekt der Zellproliferation.

Anschließend wurde dem Zellmonolayer eine Kratzwunde mithilfe einer 100  $\mu\text{L}$  Pipettenspitze zugefügt und Zelltrümmer durch einmaliges Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> entfernt. Der Wundheilungsprozess wurde unter einem Lichtmikroskop zum Startzeitpunkt



## 4 Methoden

sowie nach 4 h, 8 h, 12 h und 24 h untersucht und dokumentiert. Die erhaltenen Bilder wurden mit dem ImageJ Plugin *wound healing size tool* [172] analysiert, um die von den migrierenden Zellen geschlossene Fläche zu berechnen.

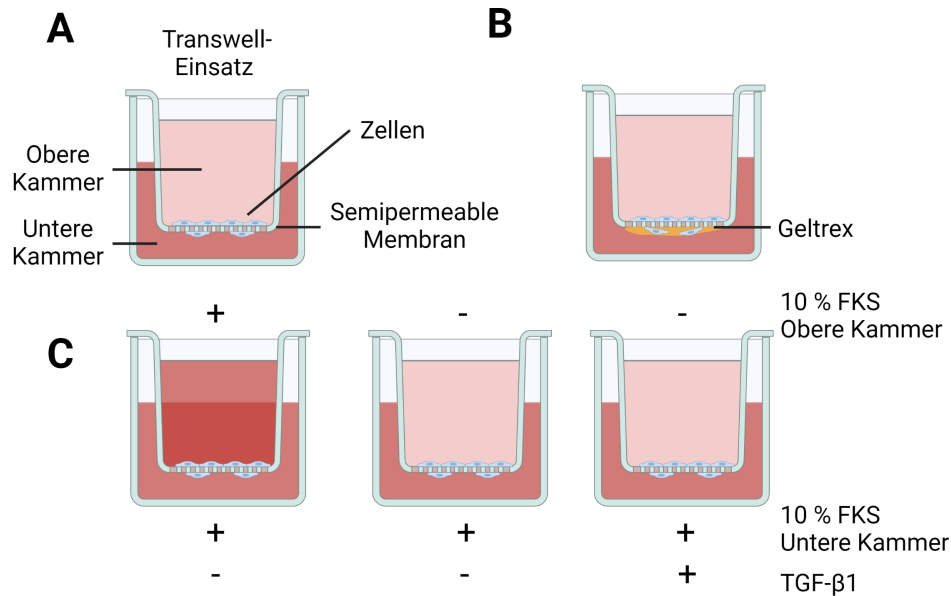
Der Einfluss von TGF- $\beta$  auf die Migrationseigenschaften von Zellen wurde durch Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$ 1 (s. Abschnitt 4.1.9) während des Wundheilungsprozesses untersucht. Nach Erreichen der Konfluenz wurden Zellen für 1 h mit Mitomycin C inkubiert, eine Kratzwunde appliziert und die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> mit 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 in Vollmedium versetzt. Die Dokumentation des Wundheilungsprozesses erfolgte analog zur Analyse nach Transfektion zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h und 24 h und orientierte sich an [172].

### 4.1.13 Transwell-Assays mittels Boyden-Kammer

#### 4.1.13.1 Migration-Assay

Im Gegensatz zum Scratch Assay wird beim Migration-Assay nicht die kollektive Zellmigration untersucht, sondern das individuelle Migrationspotential einzelner Zellen durch eine semipermeable Membran in Richtung eines chemotaktischen Lockstoffs. Die Analyse erfolgte ähnlich wie in [173] beschrieben. Um die Integrität der für die Migration essentiellen Oberflächenproteine zu erhalten, wurden Zellen durch 12-minütige Inkubation mit Accutase anstatt mit Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend erfolgte die Einsaat von 20.000 Zellen in Transwell-Einsätze (Porengröße: 8  $\mu$ m, CellQART), die in einer 24-Well Platte platziert waren. Als chemotaktischer Lockstoff diente ein FKS-Gradient. Zellen wurden unter Zugabe von TGF- $\beta$ 1 (Endkonzentration (EK): 10 ng/mL) für 48 h kultiviert. Die Kultivierung der Kontrollen erfolgte analog in Zellkulturmedium ohne TGF- $\beta$ 1. Der schematische Versuchsaufbau für die verschiedenen Bedingungen ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

Anschließend wurden die Zellen für 15 min in 4 %-iger PFA-Lösung fixiert, zweifach vorsichtig mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mittels 0,5 %-iger Triton-X Lösung für 10 min permeabilisiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS<sup>-/-</sup>, erfolgte die 15-minütige Inkubation mit 0,1  $\mu$ g/mL DAPI bei RT im Dunkeln. Überschüssige DAPI-Lösung wurde durch zweifaches Waschen mit PBS<sup>-/-</sup> entfernt. Die Transwell-Einsätze lagerten für die Messung in PBS<sup>-/-</sup>, um ein Austrocknen der Membran zu verhindern. Diese wurde probenweise vorsichtig mit einem Skalpell entfernt und mit der Unterseite nach unten auf einem Objekträger platziert. Nachfolgend wurden Bilder mit dem 10X-Objektiv eines Leica DMR Fluoreszenzmikroskops erstellt. Pro Transwell-Einsatz wurden vier zufällig ausgewählte Sichtfelder fotografiert, um anschließend die mittlere Zellzahl pro Sichtfeld zu berechnen. Unmittelbar danach wurden nicht-migrierte Zellen auf der Oberseite der Membran mittels Wattestäbchen entfernt. Eine erneute Aufnahme von Bildern zeigte anschließend die migrierten Zellen. Die Auszählung der Zellen erfolgte



**Abbildung 4.5: Boyden-Kammer.** A) Schematische Darstellung eines Transwell-Einsatzes in einer 24-Well-Platte für die Durchführung eines Migration-Assays. Die untere Kammer wird mit Zellkulturmedium und chemotaktischem Lockstoff (z.B. FKS) befüllt. In die obere Kammer wird die Zellsuspension in Medium ohne Lockstoff gegeben, sodass ein chemotaktischer Gradient in Richtung unterer Kammer entsteht. B) Der Versuchsaufbau für einen Invasion-Assay (s. Abschnitt 4.1.13.2) ist analog zum Migration-Assay, mit zusätzlicher künstlicher Basalmembran (z.B. Geltrex®) auf der Unterseite des Transwell-Einsatzes. C) Drei verschiedene Versuchsbedingungen wurden untersucht (von links nach rechts): Eine Probe ohne chemotaktischen Gradienten und ohne Zusatz von TGF-β1, eine Probe mit chemotaktischem Gradienten und ohne Zusatz von TGF-β1 sowie eine Probe mit chemotaktischem Gradienten unter Zusatz von 10 ng/mL TGF-β1.

in ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) über zwei verschiedene Optionen. Mittels *Process* → *Find Maxima* konnte die Anzahl der Zellen durch Kontrastunterschiede zum Hintergrund automatisch ermittelt werden. Falls dies nicht möglich war, wurden Zellen manuell mittels folgendem Workflow gezählt:

1. *Plugin* → *Analyze* → *Cell counter*
2. *Initialize* auswählen und *Type I* anklicken
3. Auf die mit DAPI gefärbten Zellkerne klicken, um die Zellzahl zu ermitteln

Im Anschluss konnte das Verhältnis von migrierten Zellen zur Gesamtzellzahl berechnet werden, um den Anteil migrierter Zellen zu bestimmen.

#### 4.1.13.2 Invasion-Assay

Beim Invasion-Assay wird die Unterseite der porösen Membran der Boyden-Kammer zusätzlich mit einer künstlichen Basalmembran (z.B. Geltrex® oder Matrigel®) bedeckt (Abbildung 4.5 B) und anstelle des Migrationspotentials wird die Fähigkeit der ECM-Degradation (ECM = Extrazelluläre Matrix) und Zellinvasion gemessen. Die Synthese der künstlichen Basalmembran erfolgte durch Zugabe von 50 µL Geltrex® (1:4 verdünnt

## 4 Methoden

in Vollmedium, Thermo Fisher Scientific) auf die Unterseite der Transwell-Einsätze und anschließender Inkubation bei 37°C für 30 min. Die restlichen Arbeitsschritte wurden analog zum Migration-Assay durchgeführt, lediglich die Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 betrug 72 h.

### 4.1.14 Gewebepräparation

Hautproben sonnenexponierter (Exponierte Haut) und -geschützter (Naive Haut) Bereiche gesunder Probanden sowie cSCC-Gewebe wurden nach Unterzeichnung einer Einverständniserklärung durch die Probanden/Patienten gesammelt. Die Klassifizierung als cSCC-Gewebe erfolgte durch einen Pathologen. Die Proben wurden direkt nach der Exzision eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -196 °C gelagert. Die Lokalisation der Gewebeproben, das Geschlecht sowie Alter und Tumorcharakteristika sind für Hautproben in Tabelle 4.2 bzw. für Tumorproben in Tabelle 4.3 angegeben.

Anschließend wurden Gewebeschnitte der gefrorenen Tumorproben mit einer Dicke von 20  $\mu$ m im Kryostat-Mikrotom Microm Cryo-Star HM 560 MV (Thermo Fisher Scientific) erstellt. Für nachfolgende Versuche wurde RNA aus jeweils zehn Schnitten extrahiert. Für Hautproben wurden lediglich epidermale Proben analysiert und zehn Schnitte (Exponierte Haut) bzw. fünf Schnitte (Naive Haut) für die RNA-Extraktion (s. Abschnitt 4.2.1) gesammelt. Kontaminationen mit dermalen Zellen wurden durch Kontrollfärbungen ausgeschlossen.

**Tabelle 4.2:** Daten zu den Hautgewebeproben.

Probename	Lokalisation	Geschlecht	Alter (a)
Naive Haut-1	Axilla	weiblich	69
Naive Haut-2	Inguinal	weiblich	47
Naive Haut-3	Axilla	männlich	63
Naive Haut-4	Inguinal	weiblich	72
Naive Haut-5	Inguinal	weiblich	56
Naive Haut-6	Inguinal	männlich	73
Exponierte Haut-2	Ohr läppchen	weiblich	81
Exponierte Haut-3	Capillitium	weiblich	44
Exponierte Haut-4	Temporal	männlich	68
Exponierte Haut-5	Capillitium	männlich	56
Exponierte Haut-6	Wange	männlich	69

Tabelle 4.3: Daten zu den cSCC-Gewebebeobachten.

Probename	Lokalisation	Geschlecht	Alter (a)	Tumorcharakteristika
cSCC-Tumor-1	Retroaurikulär	männlich	78	Differenziertes cSCC
cSCC-Tumor-3	Parietal	männlich	71	Dermal-subkutane Metastase, moderat differenziert
cSCC-Tumor-4	Capillitium	männlich	71	Dermal-subkutane Metastase, moderat differenziert
cSCC-Tumor-5	Retroaurikulär	männlich	84	Primärtumor, moderat differenziert
cSCC-Tumor-6	Wange	männlich	84	Ulzeriertes Spindelzell-cSCC

Die cSCC-Tumorproben #3/#4 und #5/#6 entstammen jeweils dem gleichen Patienten.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Isolation und Aufreinigung von Ribonukleinsäure (RNA)

Zellen wurden durch Zugabe von 700 µL QiAzol Lysepuffer (Qiagen) aufgeschlossen und mittels miRNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Zunächst erfolgte die Zugabe von 140 µL Chloroform zum Zellysate, gefolgt von 15 s vortexen zur Durchmischung und 3-minütiger Inkubation bei RT. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert; folgende Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die obere wässrige Phase (ca. 300 µL) wurde vorsichtig entnommen, mit 450 µL Ethanol (100 %) gemischt und in eine *RNeasy Mini spin* Säule, die in einem 2 mL Reaktionsgefäß platziert war, überführt. Im Anschluss erfolgte eine 15 s Zentrifugation bei 8000 g. Die gesammelte Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule mit der gebundenen RNA dreimal gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte durch Zugabe von 700 µL RWT-Puffer und 15 s Zentrifugation bei 8000 g, gefolgt von zweimaligem Waschen mit 500 µL RBE-Puffer und Zentrifugation (15 s) bei 8000 g. Zur Trocknung der Säulenmembran wurde die Säule in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Die Elution erfolgte durch Transfer der Säule in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß, Zugabe von 50 µL nukleasefreiem Wasser und Zentrifugation für 1 min bei 10.000 g. Abschließend wurde die RNA-Konzentration gemessen (s. Abschnitt 4.2.2) und die aufgereinigte RNA entweder bei -70 °C gelagert oder direkt für folgende Experimente genutzt.

Die mRNA und miRNA-Isolation verliefen identisch, da das Zellysate sowohl mRNA als auch miRNA enthielt.

### 4.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration der aufgereinigten Proben wurde mittels Biophotometer (Eppendorf) bestimmt. Als Hintergrund diente die Messung von 85  $\mu\text{L}$  TE-Puffer. Anschließend wurden 5  $\mu\text{L}$  aufgereinigte RNA (s. Abschnitt 4.2.1) zusammen mit 80  $\mu\text{L}$  TE in eine Küvette (Eppendorf) gegeben. Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm, einer spezifischen Absorptionsbande von Nukleinsäuren. Die Reinheit der Proben wurde durch simultane Messung der Absorption bei 280 nm und Bildung des Verhältnisses von 260 nm/280 nm ermittelt. Proben mit einer Reinheit zwischen 1,8 und 2,0 wurden für nachfolgende Analysen genutzt.

### 4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde 1986 etabliert und ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Sequenzen [174]. Das Prinzip beruht auf der exponentiellen, enzymatischen Vervielfältigung von DNA durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. *Taq*-Polymerase) in einem zyklischen Prozess. Das Reaktionsgemisch enthält neben der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, einzelne Desoxynukleotidtriphosphate und Oligonukleotide, die komplementär zum 3'-Ende des jeweiligen DNA-Strangs sind (Primer). In einem Thermocycler erfolgt die kontrollierte Temperatursteuerung eines dreischrittigen Amplifikationsprozesses. Dieser besteht aus der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei ca. 95 °C, der Hybridisierung der komplementären Primer an die einzelsträngige DNA bei der primer-spezifischen Schmelztemperatur von ca. 60 °C und der DNA-Synthese bei 72 °C (Elongation). Diese Reaktionsabfolge wird  $\geq 30$  Mal wiederholt, um eine ausreichende DNA-Menge zu generieren. Neben dem Nachweis von z.B. Virus-DNA oder der DNA-Amplifikation für nachfolgende Experimente kann die PCR auch zur Quantifizierung anderer Nukleinsäuren wie mRNA oder miRNA genutzt werden. Dazu muss die RNA mittels reverser Transkriptase zunächst in *copy* DNA (cDNA) umgeschrieben werden (s. Abschnitt 4.2.3.1). Anschließend kann die RNA in einer quantitativen PCR (qPCR) analysiert werden (s. Abschnitt 4.2.3.2 für mRNA und Abschnitt 4.2.3.3 für miRNA).

#### 4.2.3.1 Reverse Transkription

Reverse Transkription bezeichnet die Konversion von RNA in cDNA, katalysiert durch das Enzym Reverse Transkriptase. Dieses retrovirale Enzym wurde erstmals 1970 beschrieben [175] und ist heutzutage essentieller Bestandteil molekularbiologischer Methoden, da die cDNA als Template für eine PCR-Reaktion dienen kann.

Die reverse Transkription isolierter mRNA erfolgte mittels SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline). Das Reaktionsvolumen betrug 20  $\mu\text{L}$  pro Probe und enthielt 4  $\mu\text{L}$  5x

TransAmp Buffer, 1  $\mu\text{L}$  Reverse Transkriptase und 1  $\mu\text{g}$  aufgereinigte RNA, aufgefüllt auf 20  $\mu\text{L}$  mit nukleasefreiem Wasser. Im Thermocycler qTower<sup>3</sup> (Analytik Jena) erfolgte die cDNA-Synthese durch folgendes Programm:

- Primer-Annealing: 25 °C, 10 min
- Reverse Transkription: 42 °C, 15 min
- Hitzeinaktivierung: 85 °C, 5 min
- Lagerung: 4 °C bis zur nachfolgenden qPCR

Die isolierte miRNA wurde mittels miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Pro Probe wurden 2  $\mu\text{L}$  5x miRCURY RT Reaction Buffer, 1  $\mu\text{L}$  miRCURY RT Enzyme Mix, 2  $\mu\text{L}$  Template-RNA (eingestellt auf eine Konzentration von 5 ng/ $\mu\text{L}$ ) und 5  $\mu\text{L}$  nukleasefreies Wasser gemischt. Die reverse Transkription erfolgte durch 60-minütige Inkubation bei 42 °C und anschließender Hitzeinaktivierung bei 95 °C für 5 min. Die entstandene cDNA wurde bis zu eine Woche bei 4 °C gelagert oder direkt vermessen.

### 4.2.3.2 qPCR

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren wird im Rahmen einer qPCR durch die Zugabe eines Interkalationsfarbstoffs (z.B. *SYBR Green*) zum Reaktionsgemisch und der Fluoreszenzmessung am Ende eines jeden Amplifikationszyklus ermöglicht. Fluoreszenzsignal und gebildetes PCR-Produkt sind proportional zueinander, sodass sich der relative, ursprüngliche (c)DNA-Gehalt durch Analyse der Fluoreszenz und Vergleich zu Referenzproben ableiten lässt. Die Quantifizierung der (c)DNA erfolgt am Anfang des exponentiellen Wachstums anhand des  $C_t$ -Wertes ( $C_t$ : *cycle threshold*). Dieser Schwellenwert beschreibt den Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal deutlich vom Hintergrund absetzt und ist invers zum (c)DNA-Gehalt korreliert.

Das SensiMix<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> No-ROX Kit (Bioline) wurde zur mRNA-Quantifizierung genutzt. Forward- und Reverse-Primer wurden zu einem äquimolaren Gemisch vereinigt und auf eine Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  eingestellt. Pro Probe wurden 2  $\mu\text{L}$  des Primergemisches und 1  $\mu\text{L}$  der synthetisierten cDNA (s. Abschnitt 4.2.3.1) mit 10  $\mu\text{L}$  SensiMix<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> No-ROX und 7  $\mu\text{L}$  nukleasefreiem Wasser vermengt. Das PCR-Programm am qTower<sup>3</sup> (Analytik Jena) ist in Tabelle 4.4 dargestellt. Die Überprüfung der Primerspezifität erfolgte durch eine Schmelzkurve am Ende des Programms. Die Housekeeping Gene  $\beta$ -Aktin (*ACTB*), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) und TATA-Box-bindendes Protein (*TBP*) dienten der Normalisierung. Die Auswertung erfolgte mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode zur relativen Quantifizierung der Proben zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen [176]. Der  $\Delta\Delta C_t$ - oder ddCT-Wert ent-

## 4 Methoden

spricht dabei dem logarithmischen Verhältnis zur Basis Zwei zwischen Referenzprobe sowie behandelter Probe.

**Tabelle 4.4:** PCR-Programm.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Polymerase-Aktivierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	} 40 Zyklen	95 °C	15 s
Hybridisierung		61,5 °C	20 s
Elongation		72 °C	20 s
Schmelzkurve	60-95 °C	10 min	
Kühlung	4 °C		

### 4.2.3.3 miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay

Die miRNA-Expression wurde mittels miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay (Qiagen) analysiert. Vier Mikroliter cDNA-Template (1:30 verdünnt in nukleasefreiem Wasser) wurden mit 5 µL 2x miRCURY SYBR Green Master Mix und 1 µL des jeweiligen PCR-Primer-Mix gemischt und im Thermocycler qTower<sup>3</sup> (Analytik Jena) amplifiziert. Das PCR-Programm ist in Tabelle 4.5 abgebildet. Die Housekeeping Gene miR-16-5p, *SNORD44* und *SNORD48* dienen der Normalisierung. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode zur relativen Quantifizierung der Proben.

**Tabelle 4.5:** miRCURY LNA™miRNA PCR-Programm.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Hitzeaktivierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	} 40 Zyklen	95 °C	10 s
Hybridisierung/Elongation		56 °C	60 s
Schmelzkurve	60-95 °C	10 min	
Kühlung	4 °C		

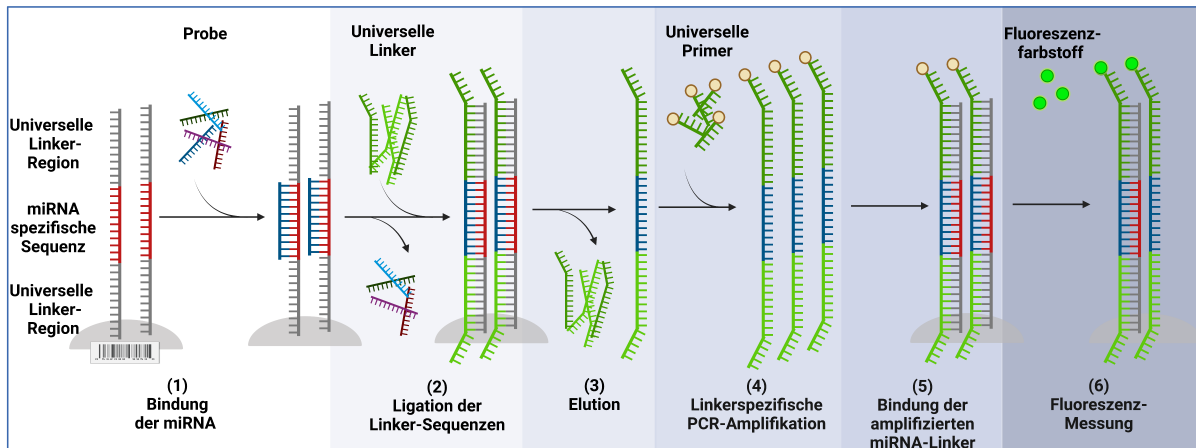
#### 4.2.4 FirePlex<sup>®</sup> Assay

Der FirePlex<sup>®</sup> Assay (Abcam) bietet als Multiplex-Assay die Möglichkeit zur simultanen Messung der Expression von bis zu 60 unterschiedlichen miRNAs. Untersuchte miRNAs sind in Tabelle 4.6 aufgelistet. Die Quantifizierung erfolgte durch fluoreszierende Hydrogel-Mikropartikel, die mit komplementären Sequenzen und einem Barcode zur Identifizierung der jeweiligen miRNA verbunden waren (Abbildung 4.6). Fünf Nanogramm aufgereinigte RNA (s. Abschnitt 4.2.1) wurden zu maßgeschneiderten Firefly<sup>®</sup>-Partikeln (35 µL) gegeben und bei 37 °C auf einem Schüttler (60 min, 1125 U/min) inkubiert. Anschließend wurden die Partikel mit gebundener miRNA zweifach mit Rinse Buffer A gewaschen. Das 5'- und 3'-Ende der miRNA wurde mit universellen Linker-Sequenzen ligiert (RT, 60 min, 1125 U/min) und die Partikel erneut mit Rinse Buffer B und A gewaschen. Die miRNA-Linker wurden mit nukleasfreiem Wasser bei 55 °C eluiert und über eine linkerspezifische PCR vervielfältigt. Der erneuten Bindung der amplifizierten miRNA-Linker Paare an die Partikel (37 °C, 60 min, 1125 U/min) folgte die Kopplung mit einem fluoreszenten Reporter (RT, 15 min, 1125 U/min). Dieser ermöglichte die Quantifizierung der miRNA-Expression durch Messung der Fluoreszenzintensität im Flusszytometer (Guava easycyte 8HT, MerckMillipore). miRNA-Expressionslevel wurden auf die zwölf stabilsten miRNAs (Tabelle 4.6, fettgedruckte miRNAs) normalisiert und mithilfe der FirePlex<sup>®</sup> Analysis Workbench Software (Abcam) ausgewertet. miRNAs mit einem medianen Fluoreszenzsignal < 2,5 a.u. wurden von der Analyse ausgeschlossen.

**Tabelle 4.6:** FirePlex<sup>®</sup>-Panel. Die zwölf stabilsten miRNAs wurden zur Normalisierung genutzt und sind fettgedruckt.

hsa-let-7c-5p	hsa-mir-26b-5p	hsa-mir-126-3p	<b>hsa-mir-221-3p</b>
<b>hsa-let-7f-5p</b>	<b>hsa-mir-29a-3p</b>	hsa-mir-130a-3p	hsa-mir-296-5p
hsa-let-7i-5p	hsa-mir-29b-3p	hsa-mir-135b-5p	hsa-mir-378i
hsa-mir-7-5p	<b>hsa-mir-29c-3p</b>	hsa-mir-146a-5p	hsa-mir-424-5p
hsa-mir-9-5p	hsa-mir-30a-3p	hsa-mir-148a-3p	hsa-mir-495-3p
<b>hsa-mir-15a-5p</b>	<b>hsa-mir-30b-5p</b>	hsa-mir-155-5p	hsa-mir-503-5p
hsa-mir-19b-3p	hsa-mir-30d-5p	hsa-mir-181a-3p	<b>hsa-mir-16-5p</b>
hsa-mir-21-5p	hsa-mir-31-5p	hsa-mir-181a-5p	hsa-mir-101-3p
<b>hsa-mir-22-3p</b>	hsa-mir-32-5p	hsa-mir-183-5p	hsa-mir-378g
<b>hsa-mir-23a-3p</b>	hsa-mir-34a-5p	hsa-mir-200a-3p	hsa-mir-382-5p
<b>hsa-mir-23b-3p</b>	hsa-mir-34c-5p	hsa-mir-200b-3p	hsa-mir-1246
<b>hsa-mir-24-3p</b>	hsa-mir-92a-3p	hsa-mir-203a-3p	hsa-mir-4454
<b>hsa-mir-26a-5p</b>	hsa-mir-125b-5p	hsa-mir-205-5p	





**Abbildung 4.6: FirePlex® Assay.** Bis zu 60 miRNAs können an komplementäre Sequenzen, die von universellen Linker-Regionen flankiert und an ein Barcode-markiertes Hydrogel-Partikel gekoppelt sind, binden (1). Nach Ligation universeller Linker (2) und Elution der miRNA-Linker (3) erfolgt die Amplifikation in einer PCR mit universellen Primern, die unspezifisch mit den Linkern hybridieren (4). Das amplifizierte PCR-Produkt bindet erneut über die miRNA-spezifische Sequenz an die Hydrogel-Partikel (5) und wird fluoreszenzmarkiert (6). Im Flusszytometer erfolgt anschließend die Quantifizierung der miRNA-Expression. Abcam FirePlex® Particle Technology. Abgewandelt nach <https://www.abcam.com/kits/how-does-the-fireplex-mirna-assay-work-1> (Abrufdatum: 25.10.2022). Erstellt mit biorender.com.

#### 4.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das der Detektion von Proteinen dient. Das Prinzip beruht auf der Adsorption antigenspezifischer Antikörper an eine Polystyrol-Mikrotiterplatte und nachfolgende Bindung des zu untersuchenden Antigens. Im nächsten Schritt bindet ein zweiter, enzymgekoppelter Antikörper an das Antigen. Durch Zugabe eines Enzymsubstrats und Umwandlung in ein kolorimetrisches Signal kann die Konzentration des gebundenen Antigens quantifiziert werden [177].

Der ELISA wurde mit dem Human TGF beta1 ELISA Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zwanzig Mikroliter Zellkulturüberstand wurden mit 180 µL Assay-Puffer (1x) und 20 µL 1N HCl vermengt und 1 h bei RT inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit, wurden die Mikrowell-Streifen zweifach mit 400 µL Waschpuffer gewaschen und für 5 min kopfüber getrocknet, wobei darauf geachtet wurde, dass die Wells nicht austrocknen. Anschließend wurden 20 µL 1N NaOH hinzugegeben und 40 µL der verdünnten Probe zusammen mit 60 µL Assay-Puffer (1x) in die Wells überführt, und 2 h auf einem Schüttler (RT, 400 rpm) inkubiert. Die Wells wurden dreimal gewaschen, mit 100 µ verdünntem Biotin-Konjugat (1:100 in Assay-Puffer) versetzt und 1 h auf einem Schüttler (RT, 400 rpm) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte die einstündige Inkubation mit 100 µL Streptavidin-HRP (1:100 verdünnt in Assay-Puffer) auf einem Schüttler (RT, 400 rpm). Die Wells wurden erneut fünfmal gewaschen und nach Zugabe von 100 µL TMB-Substratlösung lichtgeschützt für 30 min inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 100 µL Stopplösung gestoppt, gefolgt von der Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Proben bei 450 nm. Die parallele Messung

einer Standardreihe mit Konzentrationen von 2000 pg/mL bis 31 pg/mL, die durch sukzessive 1:2 Verdünnung der Stammlösung von 2000 pg/mL hervorging, ermöglichte die Bestimmung der Konzentration durch Abgleich der OD zwischen Standardreihe und Proben.

## 4.3 Bioinformatische Analyse und Statistik

### 4.3.1 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen erfolgten in R 4.2.1 oder höher (<https://www.r-project.org/>). Messungen erfolgten als Duplikate und Daten wurden, falls nicht anderweitig notiert, aus drei unabhängigen Experimenten gesammelt. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD), geometrisches Mittel (geoMean)  $\pm$  geometrische Standardabweichung (geoSD) oder Median  $\pm$  Interquartilsabstand (IQR). Gruppenvergleiche für mehr als zwei Gruppen wurden entweder mit einer einfaktoriellen ANOVA oder Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Nachgeschaltete Tests zum Vergleich einzelner Subgruppen waren entweder ein Games-Howell post-hoc Test oder Dunnett's Test (ANOVA) beziehungsweise ein Dunn's Test (Kruskal-Wallis). Gruppenvergleiche von zwei Gruppen erfolgten mit Welch's-t-Test. Relative Veränderungen der  $\Delta\Delta C_t$ -Werte bei qPCR-Experimenten wurden mittels Nested-ANOVA oder Einstichproben-t-Test mit  $\mu = 0$  analysiert.

Eine zweifaktorielle ANOVA fand Anwendung bei Gruppenvergleichen von mehr als zwei Gruppen, die nach zwei Beobachtungsvariablen gruppiert wurden, um einen möglichen Interaktionseffekt zu untersuchen. Anschließend wurden die Gruppen faktorweise stratifiziert und die Subgruppen mittels Games-Howell post-hoc Test analysiert. Sowohl einfaktorielle ANOVA als auch zweifaktorielle ANOVA wurden mit *heteroscedasticity corrected covariance matrices* (hccm) berechnet [178], um Varianzheterogenitäten auszugleichen. Das Signifikanzniveau ist durch Sterne angedeutet (\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ ) oder als P-Wert ausgeschrieben. Negative Genexpressionsdaten wurden auf 0 gesetzt, anschließend wurde eins zu allen Werten addiert und der Logarithmus zur Basis Zwei ( $\log_2$ ) gebildet, da die Genexpression log-normalverteilt ist [179]. Relative Veränderungen der Genexpressionsdaten sind als logarithmisches (Basis 2) Verhältnis zu Kontrollen dargestellt ( $\log_2$ -FC). Sie wurden als differentiell exprimiert klassifiziert, falls Veränderungen signifikant waren und sich mindestens um den Faktor 1,5 ( $\log_2$ -FC: 0,58) von den Kontrollen unterschieden. FirePlex<sup>®</sup>-Expressionsdaten wurden mittels qPCR validiert.

Der Wundverschluss beim Scratch-Assay wurde mittels linearer Regression analysiert und sowohl Geradengleichung als auch Gütemaß (Regressionskoeffizient  $R^2$ ) wurden im Graphen abgebildet. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Kontrolle der

Falscherkennungsrate bei Testung multipler Hypothesen gemäß *false discovery rate* (FDR)-Adjustierung nach Benjamini & Hochberg [180]. Alle untersuchten miRNA-Sequenzen repräsentieren die humane Variante der jeweiligen miRNA.

### 4.3.2 PCA

Die Hauptkomponentenanalyse oder *principal component analysis* (PCA) ist ein Verfahren zur Reduktion der Datendimensionalität und findet Anwendung bei komplexen Datensätzen (aus  $n$  Proben mit  $p$  gemessenen Merkmalen), um Muster oder Strukturen in den Daten zu erkennen und die Interpretation der Daten zu vereinfachen. Dies erfolgt durch Identifikation neuer unkorrelierter Variablen, den sog. Hauptkomponenten (PC = *principal component*), welche sukzessive die erklärte Varianz innerhalb eines Datensets maximieren [181]. Die Berechnung dieser Hauptkomponenten erfolgt dabei durch Zentrieren der Daten und einen nachfolgenden iterativen Prozess, bei dem eine zufällige Gerade durch den Mittelwert der Datenpunkte gelegt und so lange rotiert wird, bis der Abstand der auf die Gerade projizierten Datenpunkte zum Zentrum maximal ist. Die Distanzen werden berechnet als:

$$SS(\text{distances}) = d_1^2 + d_2^2 + \dots + d_n^2 \quad (4.3)$$

mit  $SS(\text{distances}) = \text{Eigenwert}$  (Quadratsumme der Distanzen),  $d = \text{Distanz vom projizierten Datenpunkt zum Zentrum}$ ,  $n = \text{Probengröße}$ .

Die Gerade mit dem größten Eigenwert wird als PC1 bezeichnet und trägt am meisten zur Varianzaufklärung bei. Im Anschluss wird die nächste Gerade gesucht, die orthogonal zur ersten Gerade ist und ebenfalls durch den Mittelwert der Datenpunkte verläuft. Nach diesem Grundsatz können (bis zur  $n$ -ten Hauptkomponente) weitere Hauptkomponenten gefunden werden, wobei diese stets orthogonal zu den bisherigen Hauptkomponenten stehen müssen.

Die Reduktion der Dimensionalität beruht darauf, dass die jeweiligen Hauptkomponenten einen unterschiedlich großen (absteigend von PC1 zu PC $n$ ) Anteil der Datenvarianz erklären und es daher in den meisten Fällen ausreicht die ersten drei Hauptkomponenten zu analysieren (welche jeweils als 2-dimensionaler Plot gegeneinander aufgetragen werden), um Gemeinsamkeiten innerhalb der Proben zu identifizieren. Der Anteil der Varianz, der durch die jeweilige Hauptkomponente erklärt wird ( $\text{var}_{\text{explained}}$ ), kann anhand von Formel (4.5) berechnet werden:

$$\text{var}(\text{PC}_i) = \frac{SS(\text{distances}(\text{PC}_i))}{n - 1} \quad (4.4)$$

$$\text{var}_{\text{explained}} = \frac{\text{var}(\text{PC}_i)}{\sum_{j=1}^n \text{var}(\text{PC}_j)} \quad (4.5)$$

mit  $PC_i$  = Hauptkomponente  $i$ .

Die PCA wurde in dem Statistikprogramm R mithilfe der Pakete *factoextra* und *FactoMineR* durchgeführt. Die Ermittlung relevanter Hauptkomponenten erfolgte mittels Skree Plot. Dort werden entweder die Eigenwerte oder die erklärte Varianz gegen die Nummer der jeweiligen Hauptkomponente aufgetragen und mittels einer zunächst steil abfallenden Linie, die sich asymptotisch der Abzisse annähert, verbunden. An dem sog. *elbow* ist ein deutlicher Knick in der Linie zu erkennen. Faktoren, die links dieses Punktes liegen reichen größtenteils aus, um Muster in den Daten zu erklären. Die anderen Faktoren unterscheiden sich oft nicht deutlich von Zufallskorrelationen und sind daher nicht von Bedeutung.

### 4.3.3 Clusteranalyse

Die hierarchische Clusteranalyse zählt ebenso wie die Hauptkomponentenanalyse zu den unüberwachten Lernmethoden, um Muster in (hochdimensionellen) Daten visuell hervorzuheben. Zunächst wird die Ähnlichkeit zwischen Datensätzen mit einem geeigneten Distanzmaß (z.B. euklidische Distanz oder Pearson Korrelation) berechnet. Anschließend werden die Datensätze mit der geringsten Distanz zu einem Cluster zusammengefasst. Im nächsten Schritt wird dieses Cluster als einzelner Datensatz behandelt und die Distanz zwischen den Datensätzen erneut bestimmt. Ist die geringste Distanz zwischen dem ersten Cluster und einem neuen Datensatz, wird dieser in das Cluster aufgenommen. Falls die Distanz zwischen zwei anderen Datensätzen am geringsten ist, werden diese zu einem zweiten Cluster zusammengefasst. Dieser Prozess wird wiederholt, bis alle Datensätze in Clustern enthalten sind. Die entstandene Hierarchie lässt sich als Dendrogramm, meist als Zusatz zu einer Heatmap, abbilden [182].

Die Auswertung der miRNA-Expressionsdaten erfolgte mittels R-Paket *ComplexHeatmap*. Distanzen zwischen unterschiedlichen Proben wurden mit euklidischer Distanz, Unterschiede zwischen miRNAs mit Pearson-Korrelation berechnet. Das Zusammenführen in Cluster erfolgte unter Anwendung eines *average linkage* Algorithmus, gemäß [183].

### 4.3.4 Pathway-Analyse

Pathway-Analysen dienen der Übersetzung von miRNA/Protein/Genexpressionsmustern in biologische Prozesse, an denen die untersuchten Biomoleküle beteiligt sind.

Sie wurden entweder mit dem Webtool miRTargetLink 2.0 [184] oder in R mit dem Paket *RBioMiRGS* [185] durchgeführt. miRTargetLink bietet die Möglichkeit, Netzwerke von miRNAs und Zielgenen zu erstellen, deren Interaktion experimentell validiert

#### 4 Methoden

wurde. Cluster von miRNAs aus der hierarchischen Clusteranalyse, wurden als Input genutzt und Netzwerke aus miRNAs und Genen, die von mindestens zwei miRNAs des Clusters reguliert werden, gebildet. Anschließend erfolgte die Overrepresentation-Analyse (ORA) der Input-miRNAs mit miEAA 2.0 [186] in Hinblick auf angereicherte *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)-Pathways und *Gene Ontology* (GO)-Terme, um biologische Prozesse, in denen die miRNAs involviert sind, zu identifizieren.

*RBioMiRGS* ermöglicht es, aus miRNA-Expressionsdaten zu ermitteln, ob Pathways, die von diesen miRNAs reguliert sind, aktiviert oder reprimiert werden. Dies erfolgt durch ein *Gene Set Enrichment* mittels logistischer Regression und Auftragung von P-Wert gegen den Modellkoeffizienten in einem Volcano Plot. Pathways, die über dem adjustierten Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  liegen und deren Modellkoeffizient positiv ist, sind aktiviert. Ein negativer Modellkoeffizient deutet eine Reprimierung an.

---

## 5 Ergebnisse

---

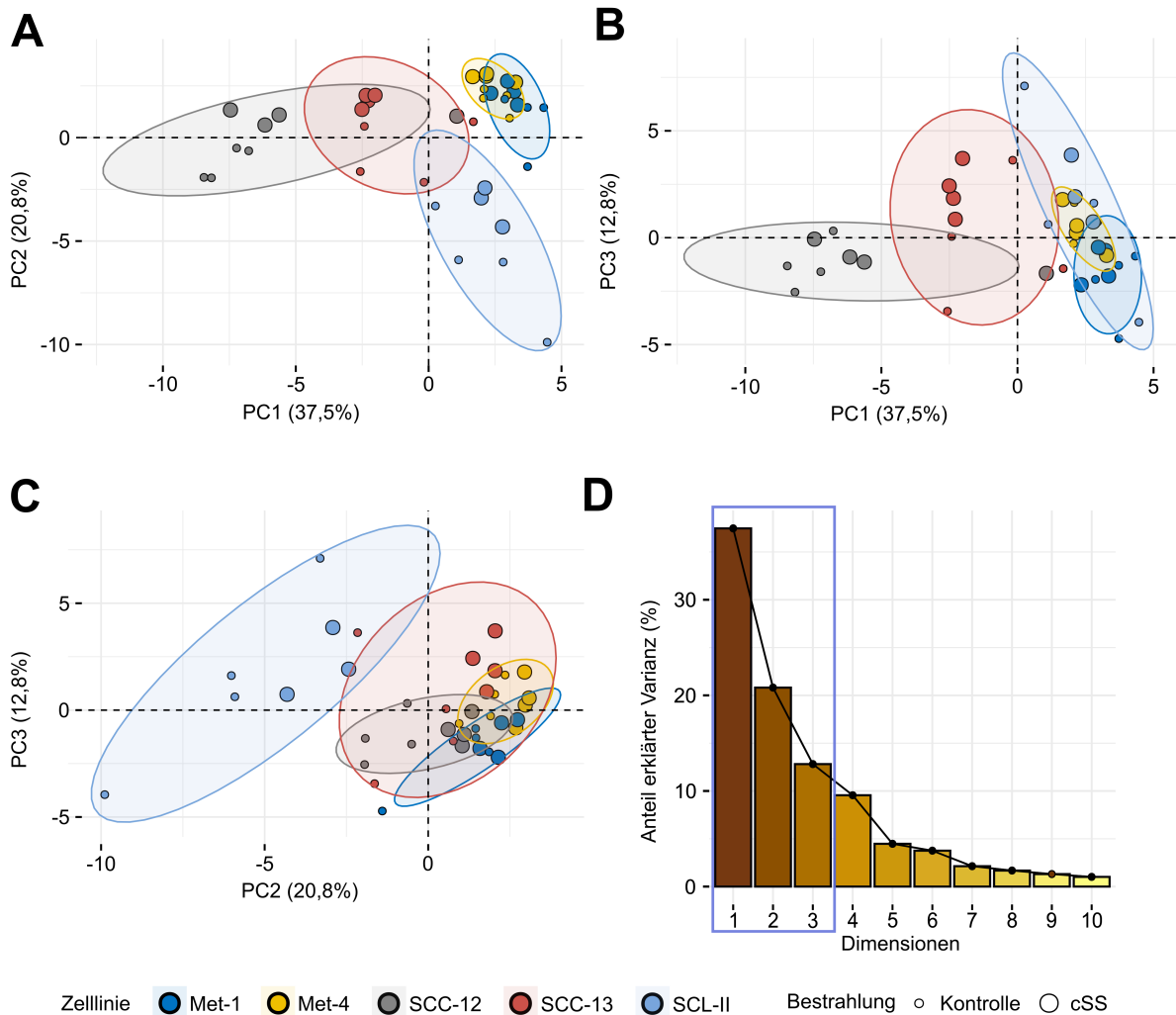
Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines mutmaßlichen Zusammenhangs von solarer Strahlung und Progression/Metastasierung des Plattenepithelkarzinoms mit einem Fokus auf die Beteiligung von miRNAs in Pathways, die in die Progression des cSCCs involviert sind. Für diese Fragestellung wurden in einem Multiplex-Ansatz (FirePlex<sup>®</sup>-Assay) 51 miRNAs in fünf unterschiedlichen Zelllinien sowohl in Hinblick auf Differenzen in der basalen miRNA-Expression als auch auf differentielle Expression nach chronischer cSS-Bestrahlung analysiert. Anschließend wurden die Ergebnisse nach Bestrahlung mit Daten aus Gewebe von cSCC-Patienten und gesunden Probanden verglichen, um tumorrelevante miRNAs, die nach cSS-Bestrahlung ähnlich wie in den Tumorproben reguliert waren, zu identifizieren. Nachfolgend wurde der Einfluss übereinstimmend regulierter miRNAs auf zelluläre Prozesse (Zellwachstum, Zellzyklus, Apoptose, Migrationspotential) in Knockdown-Experimenten geprüft. Zusätzlich wurden Pathways, die von den miRNAs gesteuert werden und mit EMT, Zellmigration und Zellinvasion assoziiert sind, untersucht. Ergänzend wurde der Einfluss chronischer cSS-Bestrahlung auf Proteine dieser Pathways analysiert.

### 5.1 Analyse der Multiplex-Ergebnisse mittels PCA

Eine PCA (s. Abschnitt 4.3.2) ist eine Methode zur Reduktion der Datendimensionalität und diente in dieser Arbeit der Aufklärung molekularer Muster, um die Ähnlichkeit zwischen den cSCC-Zelllinien und die Strahlenantwort im cSCC zu analysieren. In einem naiven Ansatz wurde zunächst die Ähnlichkeit der miRNA-Expression in unterschiedlichen cSCC-Zelllinien mit und ohne cSS-Behandlung mittels PCA untersucht (Abbildung 5.1). Dafür wurden die Zelllinien Met-1, Met-4, SCC-12, SCC-13 und SCL-II über einen Zeitraum von vier Wochen chronisch bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte zweimal pro Woche gemäß Abschnitt 4.1.6.2 mit  $250 \text{ Jm}^{-2}$  UVB +  $12,50 \text{ kJm}^{-2}$  UVA +  $28,03 \text{ kJm}^{-2}$  VIS +  $61,74 \text{ kJm}^{-2}$  IRA entsprechend einer erythemgewichteten Dosis von 0,25 MED. Die akkumulierte Dosis betrug nach insgesamt acht Bestrahlungen  $2 \text{ kJm}^{-2}$  UVB +  $100 \text{ kJm}^{-2}$  UVA +  $224,24 \text{ kJm}^{-2}$  VIS +  $493,92 \text{ kJm}^{-2}$  IRA. Die Lyse der Zellen erfolgte 72 h nach Applikation der letzten Bestrahlungsdosis. Der Zeitpunkt wurde so gewählt, dass transiente Veränderungen durch die DDR weitgehend abgeschlossen waren und eine putative strahlungsinduzierte epigenetische Prägung untersucht werden konnte. Die Quantifizierung der miRNA-Expression erfolgte anschließend durch Aufreinigung der RNA und flusszytometrische Analyse im FirePlex<sup>®</sup>-Assay (s. Abschnitt

## 5 Ergebnisse

4.2.4). Elf der 51 miRNAs wiesen ein Fluoreszenzsignal  $< 2,5$  a.u. auf und wurden von der Analyse ausgeschlossen, um eine stabile statistische Auswertung zu gewährleisten (Tabelle A.1).



**Abbildung 5.1: Identifikation eines Zelllinien- und Bestrahlungseffekts im miRNA-Muster.** Eine PCA zeigt die Auftrennung einzelner Proben für unterschiedliche Zelllinien (Met-1 = blau, Met-4 = gelb, SCC-12 = grau, SCC-13 = rot, SCL-II = hellblau) gruppiert nach Kontrollen (große Punkte) und chronisch cSS-bestrahlten Zellen (kleine Punkte) für (A) PC1 vs. PC2, (B) PC1 vs. PC3 und (C) PC2 vs. PC3. (D) Der Anteil erklärter Varianz ist für die jeweiligen Hauptkomponenten in einem Scree-Plot dargestellt. Das blaue Rechteck umrandet die ersten drei Hauptkomponenten, die zusammen  $>70\%$  der Varianz erklären. Die Ellipsen geben den Konfidenzbereich der jeweiligen Zellliniencluster um den Mittelwert der Datenpunkte an. cSS: Solares Spektrum (UVB+UVA+VIS+IRA).  $n = 4$ .

Die Auftragung der ersten beiden Hauptkomponenten einer PCA (Abbildung 5.1A) zeigt die Bildung von fünf Zelllinienclustern aus bestrahlten Proben (kleine Punkte) und Kontrollen (große Punkte). Die Schnittmenge der Zellliniencluster lässt die Ähnlichkeit von Met-1 und Met-4 sowie SCC-12 und SCC-13 erkennen. SCL-II wird durch PC2 von den anderen Zelllinien separiert. Innerhalb der einzelnen Zelllinien-Cluster ist die Trennung von bestrahlten und unbestrahlten Proben entlang der PC2-Achse zu erkennen. Die Auftragung von PC3 gegen PC1 (Abbildung 5.1B) zeigt die Bildung von

zwei Clustern, einerseits SCC-12 und SCC-13, andererseits Met-1, Met-4 und SCL-II. Eine Subgruppierung von bestrahlten zu unbestrahlten Proben ist nicht zu erkennen. Der PC2-PC3 Plot (Abbildung 5.1C) zeigt die Bildung eines Clusters mit SCC-12, SCC-13, Met-1 und Met-4, das entlang der PC2 Achse von SCL-II getrennt ist. Eine Trennung von bestrahlten und unbestrahlten Proben ist ebenfalls entlang der PC2-Achse zu erkennen.

Insgesamt erklärten die ersten drei Hauptkomponenten >70 % der Varianz (Abbildung 5.1D) in den Proben und trennten die Datenpunkte sowohl durch unterschiedliche Expressionsmuster zwischen Zelllinien (Met-1 und Met-4 waren sich am ähnlichsten; SCC-12 und SCC-13 ähnelten sich ebenfalls; SCL-II wies ein exklusives Expressionsmuster auf) als auch zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben auf, wobei der Zellliniennoteffekt (Trennung entlang der PC1-Achse) ausgeprägter als der Bestrahlungseffekt (Trennung entlang der PC2-Achse) war. Diese beiden Effekte werden in Abschnitt 5.2 bzw. 5.3 näher charakterisiert.

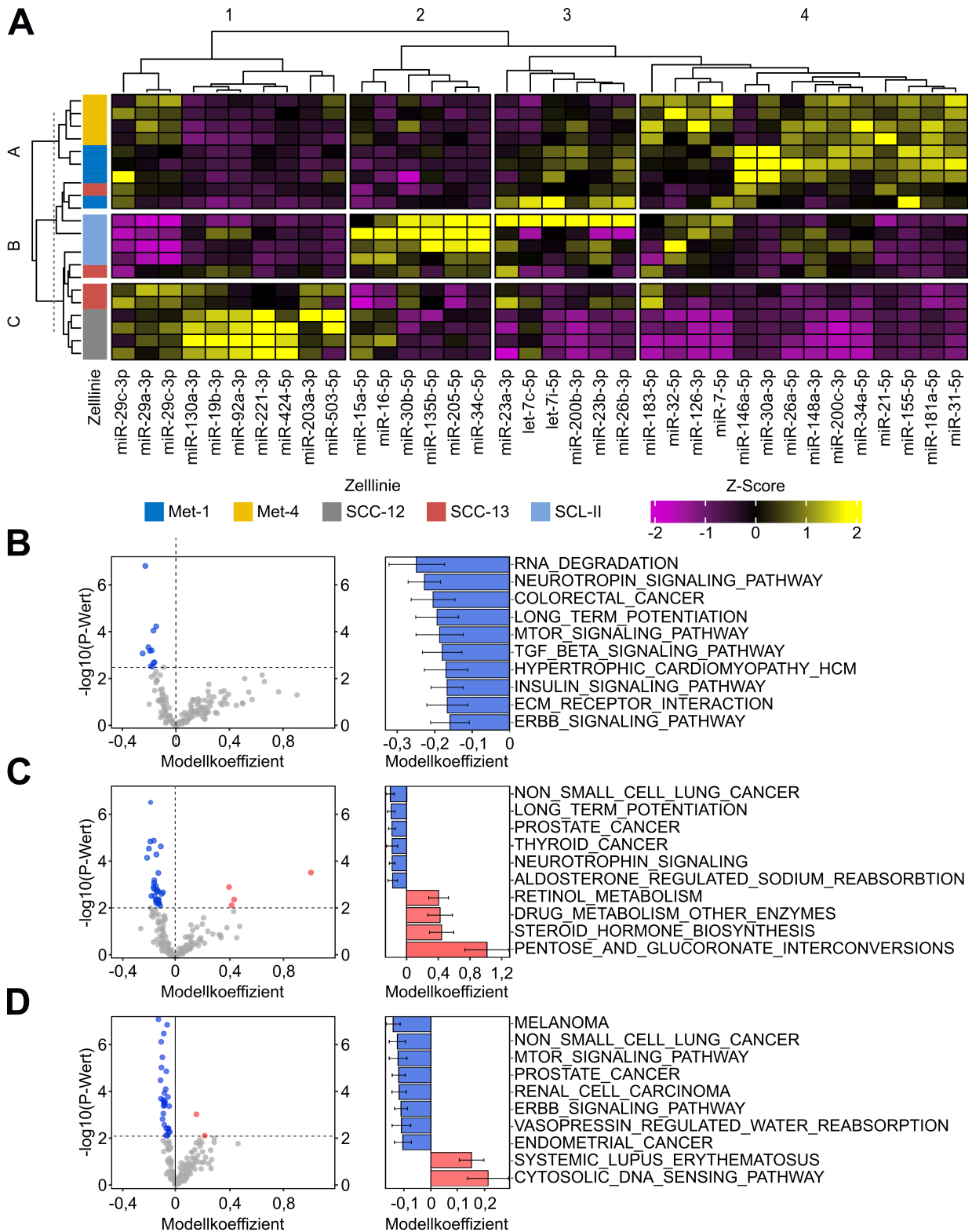
## 5.2 Analyse basaler miRNA-Level in cSCC-Zelllinien unterschiedlicher Differenzierungsgrade

Der zuvor beobachtete Zellliniennoteffekt wurde mittels Clusteranalyse quantitativ in unbestrahlten Kontrollzellen analysiert. Erhaltene Cluster dienten der Charakterisierung des Expressionsmusters mittels *Gene Set Enrichment* (Abbildung 5.2). Die hierarchische Clusteranalyse zeigt analog zur PCA die Auftrennung in drei Cluster, die sich aus Met-1 und Met-4 (Cluster A), SCL-II (Cluster B) sowie SCC-12 und SCC-13 (Cluster C) zusammensetzen (Abbildung 5.2A). Jeweils eine Probe SCC-13 hatte ein ähnliches Expressionsmuster wie Zellen in Cluster A bzw. Cluster B und wurde in die respektiven Cluster eingruppiert. Zusätzlich zum Clustering der Zelllinien (Cluster A-C) wurden miRNAs mit ähnlichem Expressionsmuster zusammengefasst (Cluster 1-4). Zellen in Cluster C zeigten eine Überexpression von miRNAs aus Cluster 1, miRNAs in Cluster 2 waren in Cluster B hochreguliert und Cluster A zeigte eine erhöhte Expression von miRNAs aus Cluster 4. In Cluster 3 ließ sich keine eindeutige Überexpression der miRNAs zwischen den Zelllinienclustern erkennen.

Die miRNAs der jeweiligen Clusterpaare 1C (überexprimierte miRNAs in SCC-12 und SCC-13), 2B (überexprimierte miRNAs in SCL-II) und 4A (überexprimierte miRNAs in Met-1 und Met-4) wurden für die *Gene Set Enrichment*-Analyse mit RBioMiRGS genutzt und die Expression mit den anderen Subclustern des jeweiligen miRNA-Sets verglichen (z.B. 1C vs. 1A/1B), um die Funktion der überexprimierten miRNA-Sets in den jeweiligen Clustern zu analysieren. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels zweiseitigem unabhängigem Zweistichproben-t-Test und anschließender FDR-Adjustierung untersucht.



## 5 Ergebnisse



**Abbildung 5.2: Hierarchische Clusteranalyse und Gene Set Enrichment einzelner Cluster in SCC-Zelllinien.** (A) Eine hierarchische Clusteranalyse zeigt differentiell exprimierte miRNAs zwischen den einzelnen Zelllinien, gemessen im FirePlex<sup>®</sup>-Assay. Herunterregulierte miRNAs sind in lila, hochregulierte miRNAs in gelb als skalierte und zentrierte Werte (Z-score) dargestellt. Zelllinien sind farbig markiert über der Heatmap abgebildet (Met-1 = blau, Met-4 = gelb, SCC-12 = grau, SCC-13 = rot, SCL-II = hellblau). Die einzelnen Cluster sind durch Spaltung der Dendrogramme visuell hervorgehoben. Distanzmaß zwischen Proben: Euklidische Distanz. Distanzmaß zwischen miRNAs: Pearson-Korrelation. Cluster-Algorithmus: *average linkage*.

**Abbildung 5.2:** (fortgeführt von vorheriger Seite) **(B)** Pathway-Analyse der miRNAs aus Cluster 1 als Vergleich zwischen Cluster 1C vs. 1A/1B. **(C)** Pathway-Analyse der miRNAs aus Cluster 2 als Vergleich zwischen Cluster 2B vs. 2A/2C. **(D)** Pathway-Analyse der miRNAs aus Cluster 4 als Vergleich zwischen Cluster 4C vs. 4B/4C. Volcano-Plots zeigen die differentielle Regulation aller KEGG-Pathways durch das jeweilige miRNA-Set. Die Top 10 am stärksten regulierten Pathways sind für die jeweiligen miRNA-Sets als Barplot abgebildet. Positiver Modellkoeffizient: aktivierter KEGG-Pathway. Negativer Modellkoeffizient: reprimierter KEGG-Pathway. Rot: Signifikant aktivierte Pathways. Blau: Signifikant reprimierte Pathways. Signifikanzschwelle für angereicherte Pathways:  $p < 0,05$ . Ein Vergleich der kompletten Zellliniencluster ist unterstützend in Abbildung A.1 dargestellt.

Der  $\log_2$ -FC mit dazugehörigem P-Wert diente als Input für das *Gene Set Enrichment*, welches zur Untersuchung einer signifikanten Anreicherung des miRNA-Sets in KEGG-Pathways genutzt wurde. Eine Pathway-Aktivierung durch Überexpression des miRNA-Sets ist durch einen positiven Modellkoeffizienten im Volcano-Plot gekennzeichnet, wohingegen die Repression durch einen negativen Modellkoeffizienten (Abbildung 5.2B-D) charakterisiert ist.

Eine Hochregulation von miRNAs in Cluster 1C (Abbildung 5.2B) ist mit der Inhibition von u.a. dem TGF- $\beta$ -Signalweg, der ECM-Rezeptor-Interaktion, dem mTOR<sup>1</sup>-Signalweg und dem ERBB-Signalweg assoziiert. Die miRNAs aus Cluster 2B (Abbildung 5.2C) inhibieren u.a. den WNT<sup>2</sup>-Signalweg, den ERBB-Signalweg und den MAPK-Signalweg sowie das Tumorstadium (u.a. Melanom, Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom) und aktivieren metabolische Prozesse (Medikamentenabbau, Steroidhormonsynthese, Retinol- und Pentosemetabolismus). miRNAs aus Cluster 4A (Abbildung 5.2D) sind u.a. korreliert mit verringertem MAPK-Signaling, der Inhibition des ERBB-Signalwegs und des mTOR-Signalwegs sowie der Tumorsuppression (u.a. Melanom, Kolorektalkarzinom, Pankreaskarzinom).

Die Überexpression verschiedener tumorsuppressiver miRNA-Sets in den jeweiligen Zelllinien erschwert die Charakterisierung der molekularen Tumorigenität zwischen den Zelllinien. Um einen solchen Vergleich zu ermöglichen, wurde die Pathway-Analyse ebenfalls für das gesamte Zellliniencluster (z.B. Cluster A vs. B/C) durchgeführt (Abbildung A.1). In Met-1 und Met-4 (Cluster A) zeigte sich die differentielle Regulation von 10 Pathways im Vergleich zu SCL-II, SCC-12 und SCC-13. Neun Pathways waren reprimiert (u.a. ERBB-Signalweg, mTOR-Signalweg) und teilweise mit dem Tumorstadium (u.a. Melanom, Prostatakarzinom) assoziiert, wohingegen der Pathway KEGG\_COAGULATION\_CASCADES aktiviert war. In SCL-II (Cluster B) waren drei Pathways differentieLL reguliert (zwei reprimiert, einer aktiviert). In SCC-12 und SCC-13 (Cluster C) waren keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den anderen Zelllinien zu beobachten. Insgesamt zeigte sich eine geringere Tumorigenität von Met-1 und Met-4 im Vergleich zu SCL-II, SCC-12 und SCC-13 auf molekularer Ebene.

<sup>1</sup>mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

<sup>2</sup>WNT: Wingless and Int-1

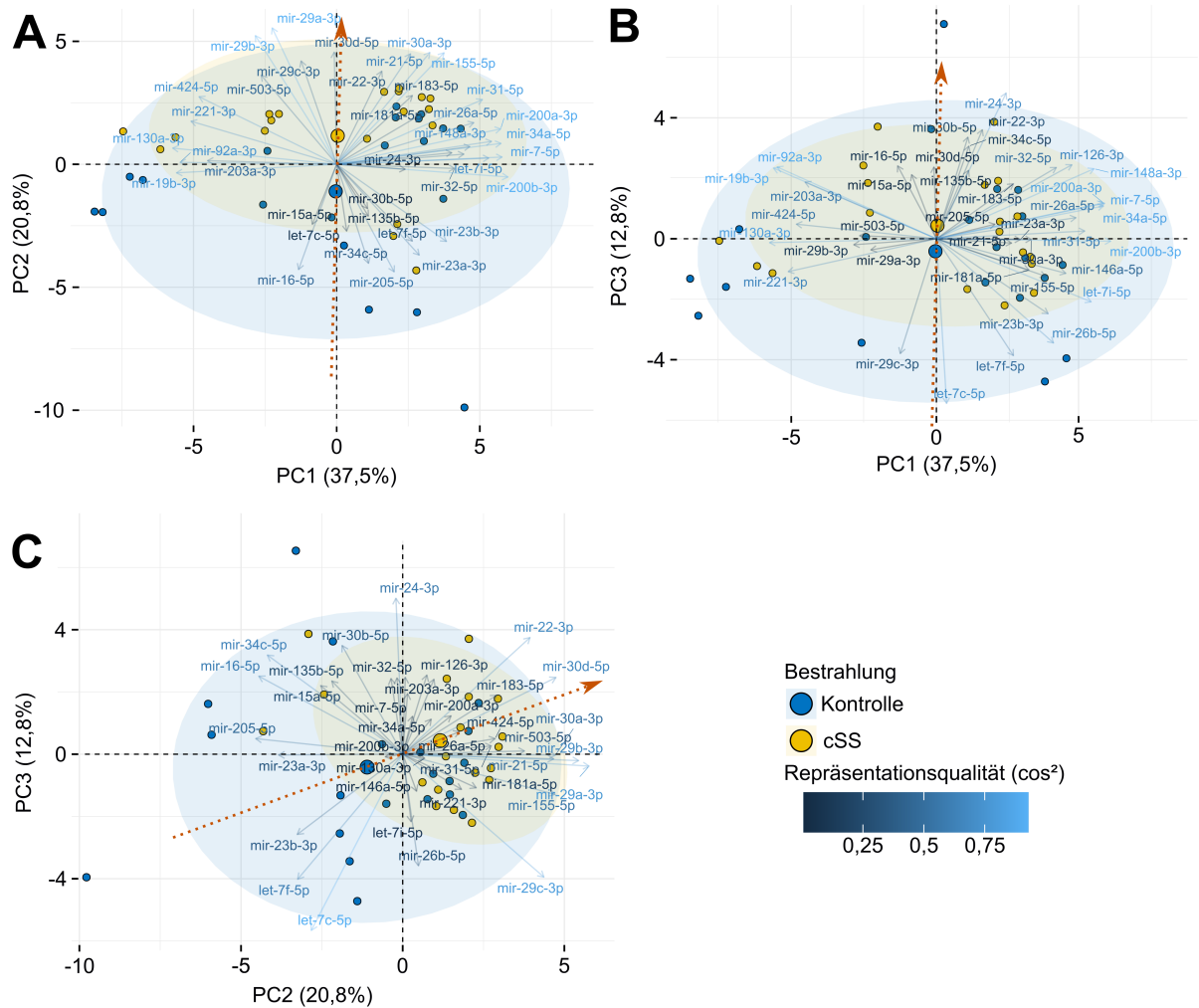
### 5.3 Analyse der miRNA-Expression in cSCC-Zelllinien nach Bestrahlung mit solar simulierter Strahlung

Zusätzlich zum im Abschnitt 5.2 beschriebenen Zelllinienseffekt, ist in Abbildung 5.1 ersichtlich, dass ein Bestrahlungseffekt, vorhanden war, der einen Einfluss auf das miRNA-Expressionsmuster hatte. Dieser steht im Mittelpunkt der Analyse der vorliegenden Arbeit und sollte im Folgenden näher charakterisiert und quantifiziert werden. Dafür wurden die Daten aus Abbildung 5.1 erneut aufgetragen, entsprechend der Bestrahlungsbehandlung farblich markiert und zusammen mit den Korrelationen einzelner miRNAs zu den jeweiligen Hauptkomponenten dargestellt (Abbildung 5.3). Dort ist deutlicher als zuvor zu erkennen, dass PC2 und PC3 mit dem Bestrahlungseffekt korreliert sind, wohingegen PC1 keine Differenzen nach Bestrahlung erklärt (Mittelwert der Gruppen bei PC1 = 0). Die Auftragung von PC2 gegen PC3 (Abbildung 5.3C) erreicht daher die stärkste Trennung von bestrahlten und unbestrahlten Proben. Die miRNAs, die entlang der Geraden zwischen Mittelpunkt der unbestrahlten und bestrahlten Proben liegen (z.B. miR-183-5p, miR-30d-5p), wurden nach Bestrahlung induziert. Entgegengesetzte miRNAs (z.B. miR-23b-3p), wiesen eine reduzierte Expression nach Bestrahlung auf. Orthogonal zur Gerade stehende miRNAs (z.B. miR-29c-3p, miR-34c-5p) waren mit einer Bestrahlung unkorreliert.

Zur quantitativen Analyse des Bestrahlungseffektes wurden miRNAs auf signifikante Veränderungen mittels zweifaktorieller ANOVA (Faktor 1: Zelllinie, Faktor 2: Bestrahlung; mit Interaktionsterm) und anschließender FDR-Adjustierung geprüft. Falls sowohl der adjustierte P-Wert der ANOVA signifikant, als auch Veränderungen zwischen bestrahlter und unbestrahlter Probe in mindestens einer Zelllinie  $> 1,5$  ( $\log_2\text{-FC} > 0,58$ ) waren, wurden miRNAs als differentiell exprimiert klassifiziert. Post-hoc Gruppenvergleiche bei signifikantem Interaktionsterm erfolgten mittels Games-Howell-Test.

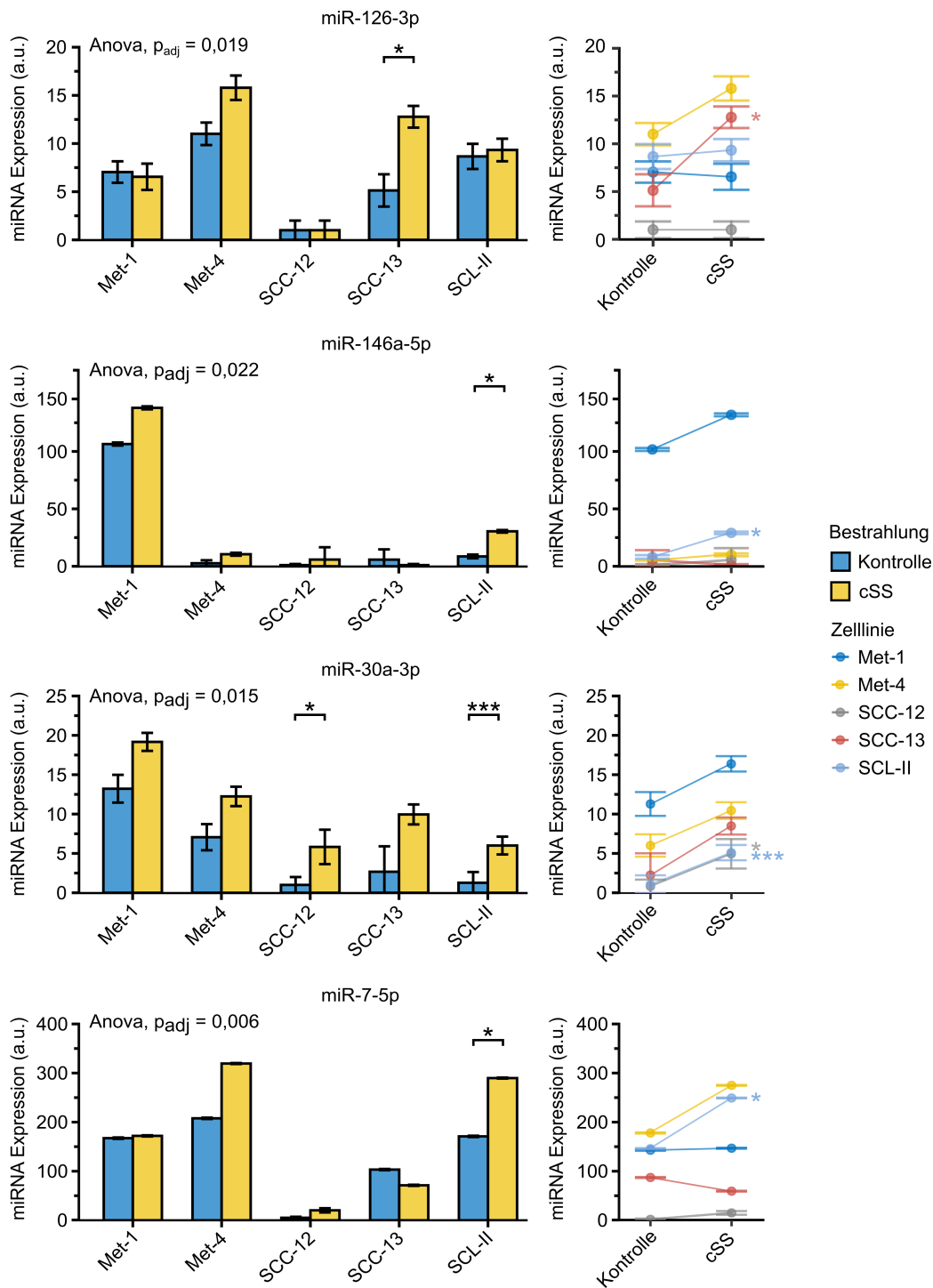
Die miRNAs miR-126-3p ( $p_{\text{adj}} = 0,019$ ), miR-146a-5p ( $p_{\text{adj}} = 0,022$ ), miR-30a-3p ( $p_{\text{adj}} = 0,015$ ) und miR-7-5p ( $p_{\text{adj}} = 0,006$ ) waren differentiell exprimiert und wiesen einen signifikanten Interaktionsterm in der ANOVA auf (Abbildung 5.4). Ein post-hoc Games-Howell Test zeigte für miR-126-3p einen signifikanten Bestrahlungseffekt in SCC-13 ( $p = 0,035$ ). miR-146a-5p war differentiell in SCL-II ( $p = 0,01$ ) exprimiert, wohingegen miR-30a-3p signifikante Veränderungen in SCC-12 ( $p = 0,02$ ) und SCL-II ( $p = 0,00076$ ) aufwies. Ebenfalls signifikant verändert war die miR-7-5p Expression in SCL-II ( $p = 0,04$ ). Signifikante Effekte aller vier miRNAs gingen mit einer erhöhten Expression einher.

### 5.3 miRNA-Expression nach Bestrahlung in cSCC-Zelllinien



**Abbildung 5.3: Untersuchung des Bestrahlungseffekts mittels PCA.** Gezeigt sind die Daten aus Abbildung 5.1 gruppiert nach Bestrahlung anstatt Zelllinie für PC1 vs. PC2 (**A**), PC1 vs. PC3 (**B**) und PC2 vs. PC3 (**C**). Kleine Kreise entsprechen einzelnen Proben. Große Kreise zeigen den Mittelpunkt aller Proben einer jeweiligen Gruppe. Blau: Kontrollen. Gelb: chronisch cSS-bestrahlte Proben. Die miRNAs, deren Pfeile in die gleiche Richtung zeigen wie die orange Gerade in (**C**) zwischen Mittelwert der unbestrahlten Proben (großer Punkt, blau) und Mittelwert der bestrahlten Proben (großer Punkt, gelb), werden durch eine Bestrahlung induziert. Die miRNAs, die in die entgegengesetzte Richtung zeigen, sind invers mit einer Bestrahlung korreliert. Ein Pfeil, der orthogonal zur beschriebenen Geraden steht, zeigt zur Bestrahlung unkorrelierte miRNAs an. Ellipsen geben den Konfidenzbereich der Cluster um den Mittelwert an. cSS: Solares Spektrum (UVB+UVA+VIS+IRA).  $\cos^2$ : Wichtigkeit einer Komponente bei gegebener Observation. Je näher der  $\cos^2$ -Wert an eins ist, desto stärker ist die Ausgangsvariable mit den beiden dargestellten Hauptkomponenten korreliert. n = 20 (jeweils vier Datenpunkte aus fünf Zelllinien pro Bedingung).

## 5 Ergebnisse



**Abbildung 5.4: Zelllinienspezifische miRNA-Expression nach chronischer cSS-Bestrahlung.** Dargestellt sind die Ergebnisse chronischer cSS-Bestrahlungsexperimente ( $8 \times 0,25$  MED) in unterschiedlichen cSCC-Zelllinien. Differentiell exprimierte miRNAs mit signifikantem Interaktionsterm in einer zweifaktoriellen ANOVA und anschließender FDR-Adjustierung sind als Barplot (links) und Lineplot (rechts) abgebildet. Post-hoc Vergleiche wurden ausschließlich zwischen bestrahlter und unbestrahlter Probe für jede einzelne Zelllinie durchgeführt. Signifikante Veränderungen der Gruppenvergleiche mittels Games-Howell-Test sind durch Balken (Barplot) bzw. als farbige markierte Sterne (Lineplot) dargestellt. Die miRNA-Expression wurde im FirePlex<sup>®</sup>-Assay bestimmt. cSS: Solares Spektrum (UVB+UVA+VIS+IRA).  $\text{geoMean} \pm \text{geoSD}$ . \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . a.u.: *arbitrary units*.  $n = 4$ .

### 5.3 miRNA-Expression nach Bestrahlung in cSCC-Zelllinien

In den miRNAs, die keinen signifikanten Interaktionsterm aufwiesen, zeigte sich bei fünf miRNAs ein signifikanter Haupteffekt (Bestrahlungseffekt), der eine allgemeine Regulation der jeweiligen miRNA in allen Zelllinien andeutete (Abbildung 5.5). Eine generelle, signifikante Hochregulation war für miR-183-5p ( $p_{\text{adj}} = 0,0054$ ), miR-200a-3p ( $p_{\text{adj}} = 0,0104$ ), miR-30d-5p ( $p_{\text{adj}} = 0,00212$ ) und miR-424-5p ( $p_{\text{adj}} = 0,00279$ ) zu beobachten. Lediglich miR-205-5p zeigte eine signifikante Repression nach Bestrahlung ( $p_{\text{adj}} = 0,000253$ ). Insgesamt waren acht der neun differentiell exprimierten miRNAs hochreguliert, was darauf hindeutet, dass solare Strahlung eher induktiv als repressiv auf die miRNA-Expression wirkt und wahrscheinlich entscheidende Gene in der Translation mindert, mit Ausnahme von miR-205-5p (s.o.).

Zur Validierung der FirePlex<sup>®</sup>-Ergebnisse erfolgte die Analyse differentiell exprimierter miRNAs mittels qPCR und Vergleich der relativen Expression von bestrahlten Zellen und Kontrollen zwischen FirePlex<sup>®</sup>-Assay (rote Rauten bzw. schwarze Pfeile) und qPCR (Boxplot), dargestellt in Abbildung A.2. Es zeigte sich eine größtenteils hohe Kongruenz zwischen FirePlex<sup>®</sup>-Assay und qPCR, gekennzeichnet durch eine übereinstimmende Richtung der miRNA-Regulation (mit einigen Ausnahmen, z.B. miR-146a-5p in SCC-12: signifikant hochreguliert im FirePlex<sup>®</sup>-Assay, signifikant herunterreguliert in der qPCR). Die größte Übereinstimmung beider Methoden war bei miR-205-5p zu verzeichnen (Abbildung A.2). Signifikante Veränderungen konnten mittels Einstichproben-t-Test ( $\mu = 0$ ) für miR-30a-3p (Hochregulation in SCC-12,  $p_{\text{adj}} = 0,0052$ ), miR-126-3p (Hochregulation in SCC-12,  $p_{\text{adj}} = 0,0118$ ), miR-146a-5p (Hochregulation in Met-4,  $p_{\text{adj}} = 0,0016$ ) und miR-205-5p (Herunterregulation in SCC-12,  $p_{\text{adj}} = 0,0052$ ) nachgewiesen werden.

Um einen Überblick der miRNA-Funktionen zu erhalten, wurde eine Netzwerkanalyse des induzierten 8-miRNA-Sets durchgeführt (Abbildung 5.6A). Diese zeigte die kooperative Regulation diverser Zielgene, u.a. *MYC*, *KRAS* und *EGFR*, denen überwiegend onkogene Funktionen zugeschrieben werden [187, 188]. Ergänzend konnte die Repression tumorassoziierter Signalwege (Abbildung 5.6B) durch die erhöhte miRNA-Expression nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Unter den inhibierten Pathways ist die Involvierung des miRNA-Sets in das Zellwachstum (mTOR-Signalweg [189], WNT-Signalweg [190]) bzw. in verschiedene Krebsentitäten (u.a. Prostatakarzinom, Melanom) hervorzuheben.

Darüber hinaus waren Differenzen zwischen bestrahlten Proben und Kontrollen in den Zelllinien SCC-12, SCC-13 und SCL-II stärker ausgeprägt als in Met-1 und Met-4. Dieses Phänomen ist im folgenden Abschnitt näher charakterisiert.

## 5 Ergebnisse

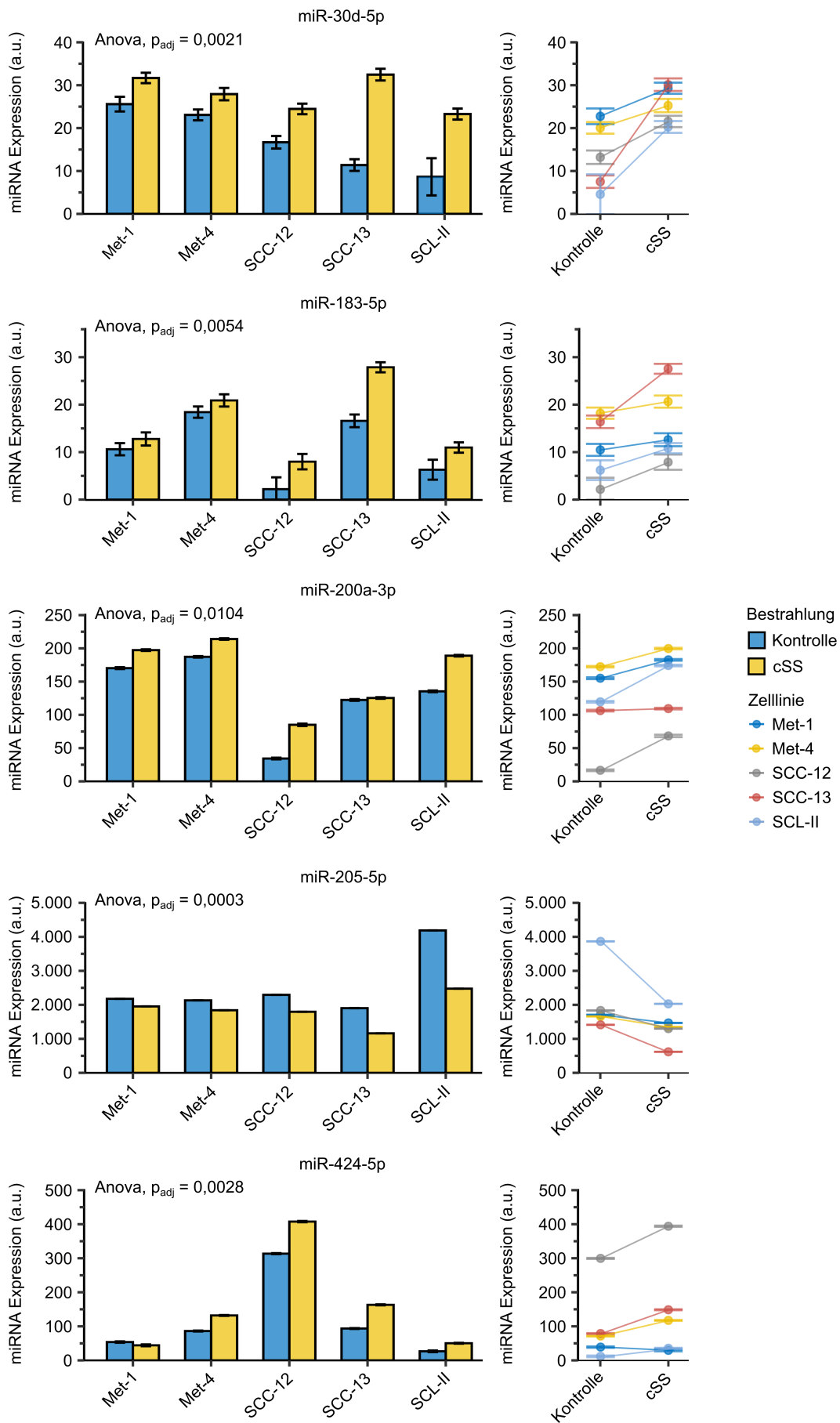
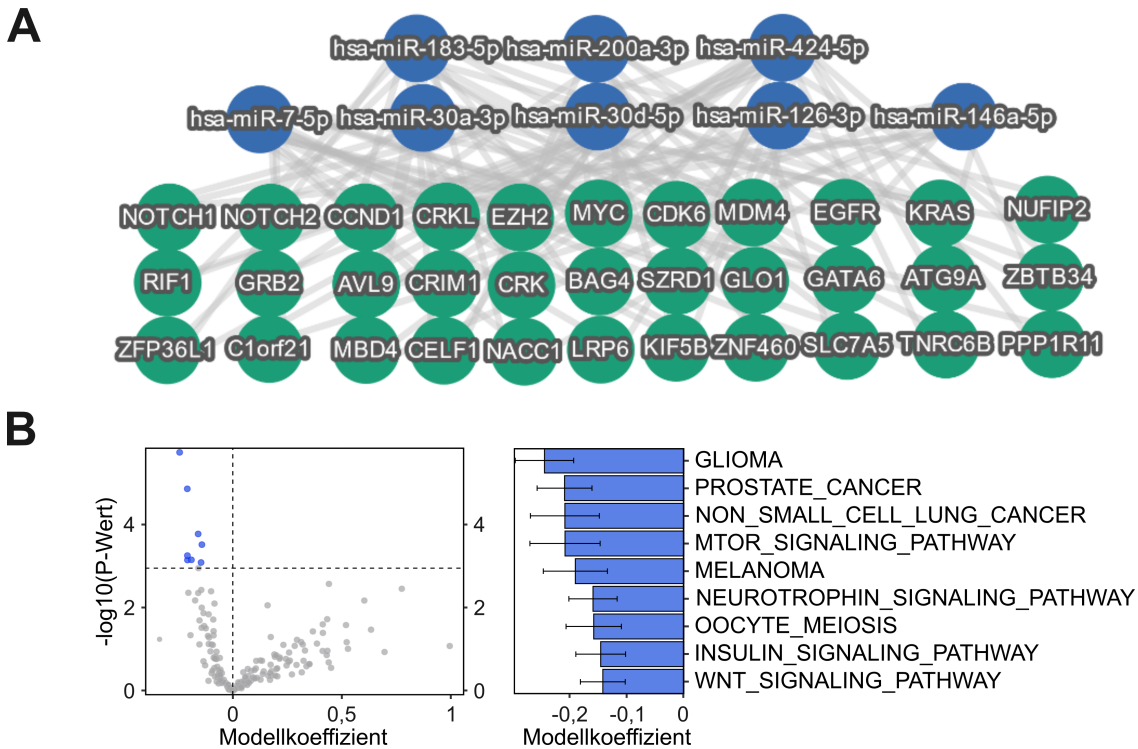


Abbildung 5.5: Universelle miRNA-Expression nach chronischer cSS-Bestrahlung.

**Abbildung 5.5:** (fortgeführt von vorheriger Seite) Dargestellt sind die Ergebnisse chronischer cSS-Bestrahlungsexperimente (8x0,25 MED) in unterschiedlichen cSCC-Zelllinien. Differenziell exprimierte miRNAs mit signifikantem Haupteffekt *Bestrahlung* in einer zweifaktoriellen ANOVA und anschließender FDR-Adjustierung sind als Barplot (links) und Lineplot (rechts) abgebildet. Da lediglich die Hypothese untersucht wurde, ob Bestrahlung zur Erhöhung/Verringerung der miRNA-Expression führt und der Interaktionsterm nicht signifikant war, wurden keine post-hoc Vergleiche durchgeführt. Die miRNA-Expression wurde im FirePlex<sup>®</sup>-Assay bestimmt. cSS: Solares Spektrum (UVB+UVA+VIS+IRA). Die Falscherkennungsrate wurde mittels FDR-Adjustierung kontrolliert. geoMean ± geoSD. a.u.: *arbitrary units*. n = 4.



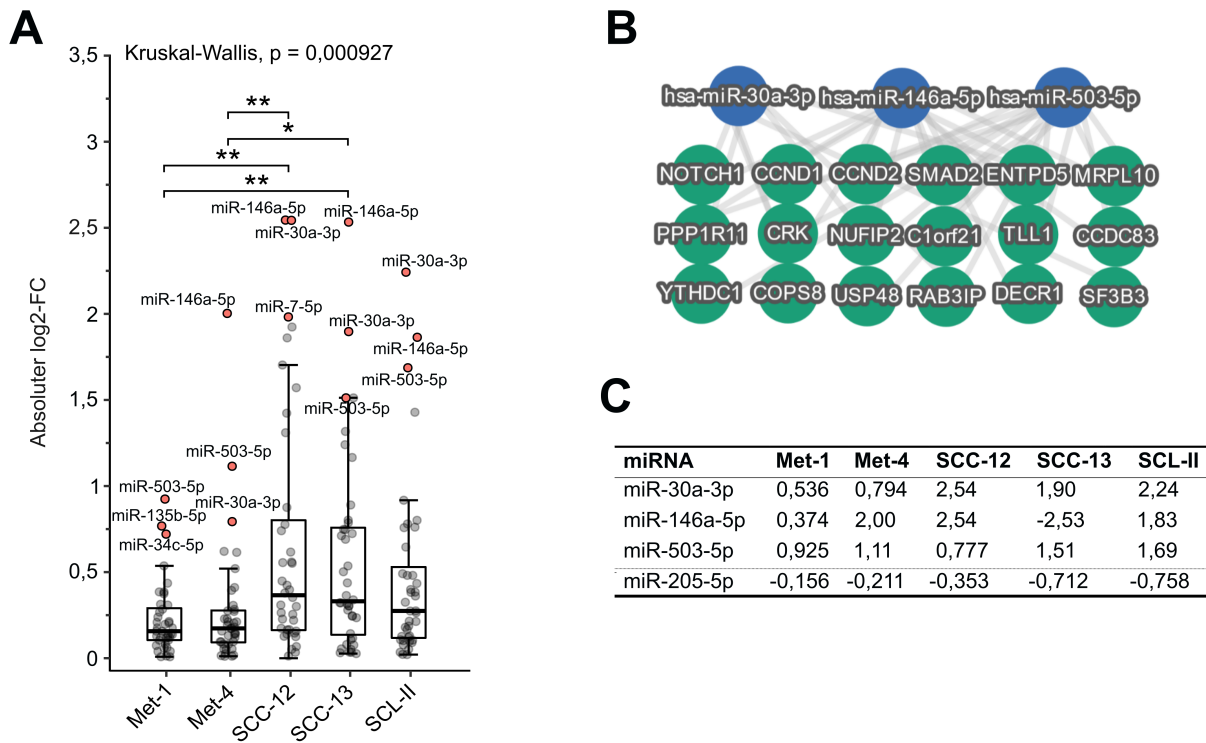
**Abbildung 5.6: Netzwerkanalyse differenziell hochregulierter miRNAs nach cSS-Bestrahlung.** (A) Netzwerk der acht differenziell hochregulierten miRNAs nach cSS-Bestrahlung mit Zielgenen, die von mindestens drei der acht miRNAs reguliert werden (erstellt mit miRTargetLink 2.0, Abrufdatum 18.01.2023). (B) Pathway-Analyse des 8-miRNA-Sets. Volcano-Plots zeigen die differentielle Regulation aller KEGG-Pathways durch das jeweilige miRNA-Set. Signifikant veränderte Pathways sind als Barplot abgebildet. Positiver Modellkoeffizient: aktivierter KEGG-Pathway. Negativer Modellkoeffizient: reprimierter KEGG-Pathway. Blau: Signifikant reprimierte Pathways. Signifikanzschwelle für angereicherte Pathways:  $p < 0,05$ .

## 5.4 Strahlungssensitivität in cSCC-Zelllinien

Zur Untersuchung der bereits angedeuteten Unterschiede in der Strahlungsresponsivität der unterschiedlichen Zelllinien, wurden die Daten des Fireplex<sup>®</sup>-Assays genutzt. Die Strahlungssensitivität ergab sich aus den absoluten Veränderungen einzelner miRNAs nach chronischer cSS-Bestrahlung als absoluter log<sub>2</sub>-FC und ist zelllinienweise in Abbildung 5.7 aufgetragen.



## 5 Ergebnisse



**Abbildung 5.7: Differenzen in der Strahlungssensitivität unterschiedlicher cSCC-Zelllinien.** Ergebnisse aus dem FirePlex<sup>®</sup>-Assay. **(A)** Der Betrag des logarithmischen Verhältnisses (Basis Zwei) von bestrahlter zu unbestrahlter Probe ist für die fünf unterschiedlichen cSCC-Zelllinien dargestellt und dient als Maß für die Regulation der respektiven miRNAs durch cSS-Strahlung. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten. Die drei durch cSS-Strahlung am stärksten regulierten miRNAs pro Zelllinie sind in rot dargestellt. Post-hoc Test: Dunn's-Test. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . **(B)** Netzwerk der drei am häufigsten regulierten miRNAs mit Zielgenen, die von mindestens zwei der drei miRNAs reguliert werden (erstellt mit miRTargetLink 2.0, Abrufdatum 06.12.2022). **(C)** Zelllinienspezifische Expression ( $\log_2$ -FC) strahlungssensitiver miRNAs. Zum Vergleich ist die Expression von miR-205-5p dargestellt.

Die Strahlungssensitivität unterschied sich signifikant zwischen den Zelllinien (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,000927$ ). Met-1 und Met-4 wiesen eine geringere Sensitivität als SCC-12 (Dunn's Test:  $p = 0,00959$ ) und SCC-13 ( $p = 0,00959$  bzw.  $p = 0,0108$ ) auf. SCL-II war etwas strahlungssensitiver als Met-1 und Met-4 ( $p = 0,0675$  bzw.  $p = 0,0767$ ), jedoch nicht signifikant. Sowohl SCC-12 und SCC-13 ( $p = 0,899$ ) als auch SCC-12 und SCL-II ( $p = 0,427$ ) sowie SCC-13 und SCL-II ( $p = 0,489$ ) unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die geringe Strahlungsresponsivität von Met-1 und Met-4 wird möglicherweise durch den intakten p53-Status und eine effizientere DDR nach Bestrahlung (vgl. Abschnitt 3.8) im Vergleich zu den p53-defizienten Zelllinien SCC-12, SCC-13 und SCL-II erklärt.

Trotz Unterschieden in der Strahlungssensitivität zeigten sich qualitativ ähnliche miRNA-Muster nach Bestrahlung. miR-30a-3p (Met-4, SCC-12, SCC-13, SCL-II), miR-146a-5p (Met-4, SCC-12, SCC-13, SCL-II) und miR-503-5p (Met-1, Met-4, SCC-13, SCL-II)

wurden in jeweils vier der fünf Zelllinien stark reguliert und sind in allen Zelllinien (mit Ausnahme von miR-146a-5p in SCC-13) nach Bestrahlung induziert (Abbildung 5.7C). Diese Beobachtung stützt die Hypothese eines induktiven Charakters solarer Strahlung in Hinblick auf die miRNA-Regulation, mit Ausnahme von miR-205-5p (s. Abschnitt sec:miRNAIrradiation), die zum Vergleich ebenfalls in Abbildung 5.7C dargestellt ist. Um die Funktion der miRNAs zu ermitteln, sind experimentell validierte Zielgene, die von mindestens zwei der drei miRNAs reguliert werden, als Netzwerk dargestellt (Abbildung 5.7B). Unter den Zielgenen befinden sich z.B. *CCND1* (Cyclin D1), *CCND2* (Cyclin D2), *SMAD2* und *NOTCH1*<sup>3</sup>, die an Prozessen wie Zellzyklusregulation, p53-Signaltransduktion und Tumorentstehung beteiligt sind (Tabelle A.2).

## 5.5 Differentielle miRNA-Expression in Gewebe von SCC-Patienten

### SCC-Patienten

Zum Abgleich der *in vitro* Daten mit der *in vivo* miRNA-Expression im Plattenepithelkarzinom, wurden Gewebeproben von cSCC-Patienten (sowohl lokale als auch metastatische cSCCs) entnommen und mit der Haut gesunder Probanden verglichen, die aus sonnengeschützten (naive Haut) und sonnenexponierten Bereichen (exponierte Haut) stammte.

Während ein putativer Einfluss der Sonnenexposition auf die miRNA-Expression in menschlichem Hautgewebe sich als komplex erweist (vgl. Abbildung 5.8A, Cluster 4B), zeigt eine hierarchische Clusteranalyse (Abbildung 5.8A) eindeutig die Abgrenzung des Tumorgewebes von Gewebeproben aus der Haut - unabhängig von der Sonnenexposition und des Tumortyps. Differenziell exprimierte miRNAs konnten in vier Cluster unterteilt werden. Cluster 1 enthielt miR-21-5p, miR-31-5p und miR-155-5p, die eine erhöhte Expression im Tumorgewebe aufwiesen. Cluster 4 umfasste 13 herunterregulierte miRNAs: miR-23-3p, miR-23b-3p, miR-29c-3p, miR-101-3p, miR-124-3p, miR-137-3p, miR-148a-3p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-203a-3p, miR-205-5p, miR-429 und miR-449. Cluster 2 und Cluster 3 wiesen eine gemischte miRNA-Expression zwischen Tumor- und Hautproben auf.

Eine Netzwerkanalyse der hochregulierten miRNAs (Abbildung 5.8B) zeigte die gemeinsame Regulation der Transkriptionsfaktoren *E2F2*<sup>4</sup>, *FOXO3*<sup>5</sup> und *SP1*<sup>6</sup> sowie des Muskelproteins Dystrophin (*DMD*).

---

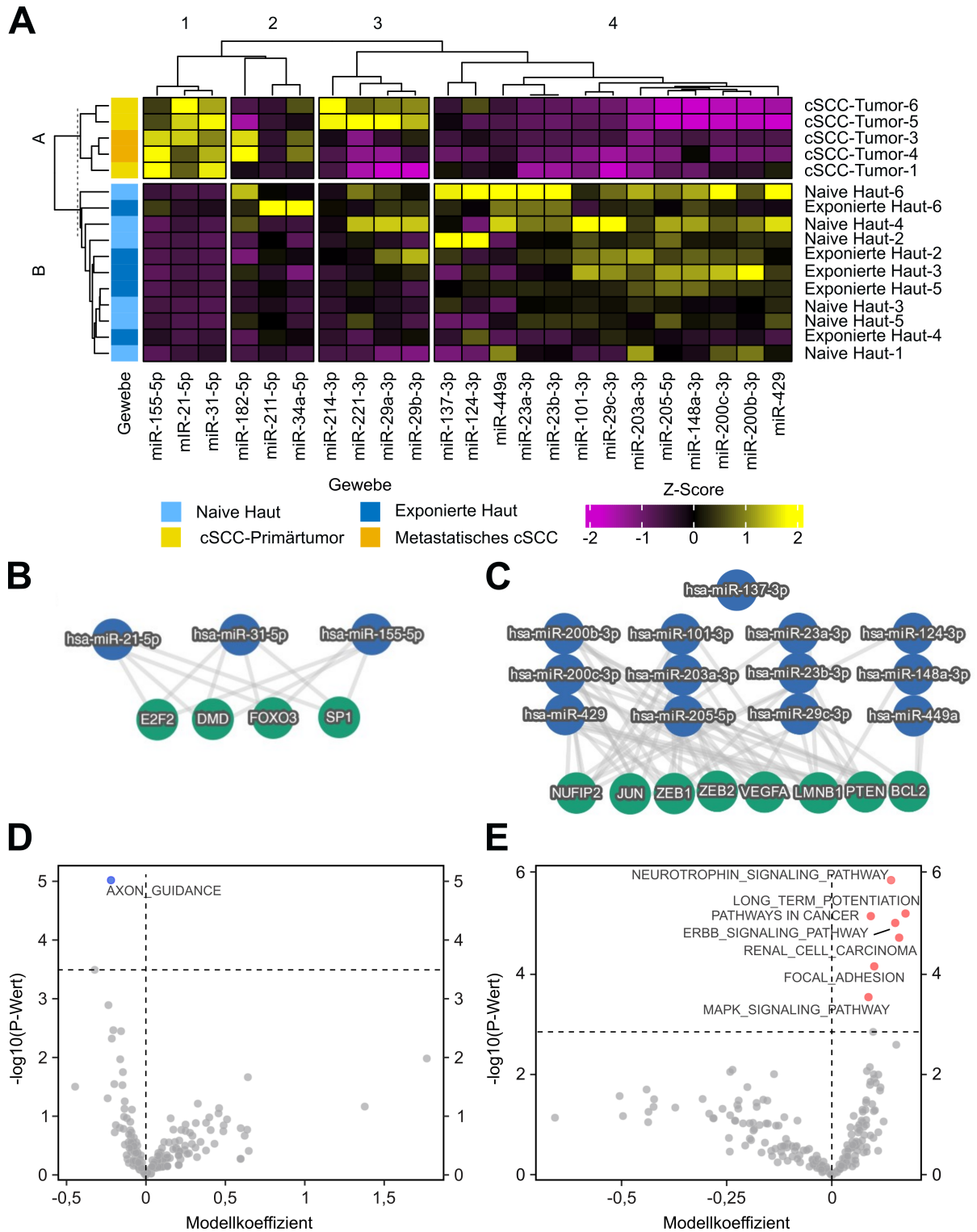
<sup>3</sup>**NOTCH1**: Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1

<sup>4</sup>**E2F2**: E2F Transkriptionsfaktor 2

<sup>5</sup>**FOXO3**: Forkhead-Box-Protein O3

<sup>6</sup>**SP1**: Sp1 Transkriptionsfaktor

## 5 Ergebnisse



**Abbildung 5.8: miRNA-Expression in cSCC-Gewebe verglichen mit sonnengeschützter und sonnenexponierter Haut. (A)** Eine hierarchische Clusteranalyse zeigt differentiell exprimierte miRNAs zwischen Tumorproben und Haut (sonnenlichtgeschützt und -exponiert) gemessen im FirePlex<sup>®</sup>-Assay. Herunterregulierte miRNAs sind in lila, hochregulierte miRNAs in gelb als skalierte und zentrierte Werte (*Z-score*) dargestellt. Proben sind farbig markiert über der Heatmap abgebildet (Dunkelblau: Exponierte Haut, Hellblau: Naive Haut, Gelb: cSCC-Primärtumor, Orange: Metastatisches cSCC). Die einzelnen Cluster sind durch Spaltung der Dendrogramme visuell hervorgehoben. Distanzmaß zwischen Proben: Euklidische Distanz. Distanzmaß zwischen miRNAs: Pearson-Korrelation. Cluster-Algorithmus: *average linkage*.

**Abbildung 5.8:** (fortgeführt von vorheriger Seite) **(B)** Zielgene, die von allen drei miRNAs aus Cluster 1 reguliert werden. **(C)** Zielgene, die von mindestens 6 der vorhandenen miRNAs aus Cluster 1 reguliert werden. Erstellt mit miRTargetlink (Abrufdatum 24.11.2022). **(D)** Pathway-Analyse der miRNAs aus Cluster 1 mit RbiomiRGS. **(E)** Pathway-Analyse der miRNAs aus Cluster 4 mit RbiomiRGS. Positiver Modellkoeffizient: aktivierter KEGG-Pathway. Negativer Modellkoeffizient: reprimierter KEGG-Pathway. Rot: signifikant aktivierte Pathways. Blau: signifikant reprimierte Pathways. Signifikanzschwelle für angereicherte Pathways:  $p < 0,05$ .

Herunterregulierte miRNAs (Cluster 4) steuern kooperativ die Expression von acht Zielgenen, des Tumorsuppressors *PTEN*<sup>7</sup> sowie der Proto-Onkogene *ZEB1*, *ZEB2*, *JUN*, *BCL2*, *VEGFA*, *LMNB1*<sup>8</sup> und *NUFIP2*<sup>9</sup> (Abbildung 5.8C).

Die erhöhte Expression von miRNAs in Cluster 1 und die nachfolgende Repression von Zielgenen führt zur signifikanten Inhibition des KEGG-Pathways *AXON\_GUIDANCE in silico* (Abbildung 5.8D). Die verringerte Expression von miRNAs in Cluster 4 und die anschließende Induktion von Zielgenen ist assoziiert mit der signifikanten Aktivierung des ERBB-Signalwegs, des MAPK-Signalwegs, des Neurotrophin-Signalwegs, der Fokalen Adhäsion und der Tumorbildung *in silico* (Abbildung 5.8E).

Eine ergänzende Analyse signifikant veränderter GO-Terme (Tabelle A.3) zeigte außerdem ein Zusammenspiel des herunterregulierten miRNA-Sets (Cluster 4) mit UV-induzierten Veränderungen. Demnach waren z.B. die GO-Terme GO:0072593 (*Reactive oxygen species metabolic process*), GO:0009314 (*Response to radiation*) und GO:0010224 (*Response to UVB*) unter den Top 20 der durch das miRNA-Set regulierten biologischen Prozesse. Insgesamt zeigte sich eine tumorsuppressive Funktion des 13-miRNA-Sets, das ebenfalls in die (UV-)Strahlenantwort involviert ist.

## 5.6 Analyse der miR-205-5p Funktion im cSCC

miR-205-5p war nach chronischer Bestrahlung in allen Zelllinien herunterreguliert und zeigte die höchste Übereinstimmung zwischen FirePlex<sup>®</sup>-Assay und qPCR. miR-205-5p war im Gewebe von cSCC-Patienten niedriger exprimiert als in der Haut gesunder Probanden und die einzige miRNA, die sowohl nach cSS-Bestrahlung als auch im Tumor in die gleiche Richtung reguliert war. Zusätzlich führten unterschiedliche Bestrahlungsarten (akut vs. chronisch) und Bestrahlungsdosen (akut: 0,25 MED, chronisch: 5x0,25 MED oder 8x0,25 MED) zu einer stabilen, signifikanten Verringerung der miR-205-5p Expression (Abbildung A.3). Anscheinend kommt miR-205-5p sowohl in der Strahlenantwort *in vitro* als auch in der Tumorgenese des cSCCs wegen ihrer gegenläufigen Expression im Vergleich zu anderen miRNAs eine besondere Bedeutung zu. Dies wird ebenfalls durch die Tatsache unterstützt, dass miR-205-5p die Regulierung der

<sup>7</sup>**PTEN:** Phosphatase and Tensin Homolog

<sup>8</sup>**LMNB1:** Lamin B1

<sup>9</sup>**NUFIP2:** Nuclear FMR1 Interacting Protein 2

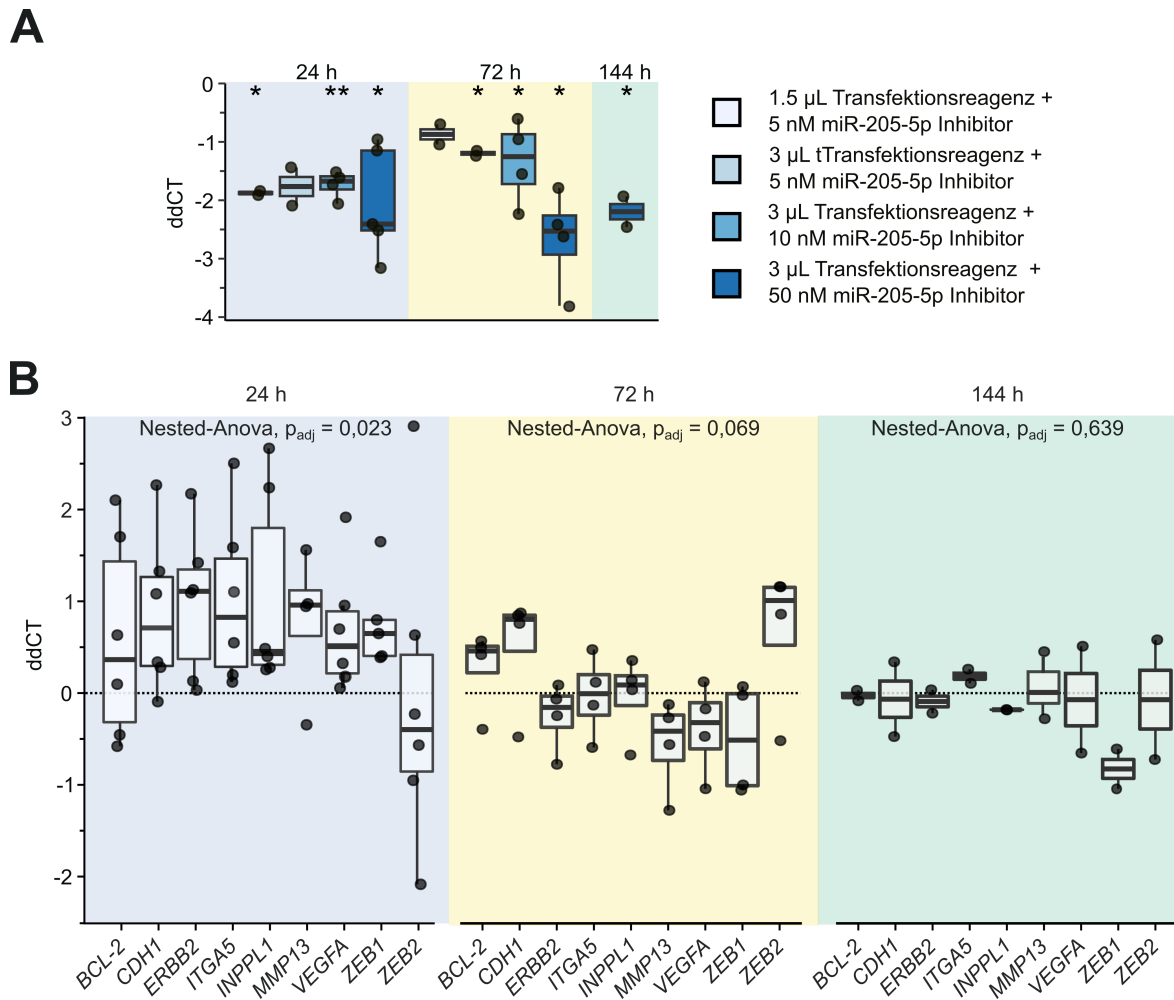
## 5 Ergebnisse

Gene *ZEB1* und *ZEB2* als wichtige Regulatoren der EMT, die einen essentiellen Schritt der Metastasierung darstellt, steuert [191]. Daher sollte in dieser Arbeit die Funktion von miR-205-5p im cSCC in Knockdown-Experimenten untersucht werden. Als Modellzelllinie für diese Untersuchung diente SCC-12 aufgrund ihrer guten Zellkultivierungs- und Transfektionseigenschaften. In SCC-12 wurden die folgenden Fragestellungen untersucht:

- Effektivität und Dauer des miR-205-5p Knockdowns nach Transfektion mit einem miR-205-5p Inhibitor
- Analyse der Expressionsdynamik verschiedener Zielgene von miR-205-5p nach Behandlung mit einem miR-205-5p Inhibitor
- Prüfung des Einflusses von miR-205-5p auf zelluläre Prozesse (Zellzyklus, Zellwachstum, Apoptose, Migration)

SCC-12 Zellen wurden mit entweder 1,5  $\mu\text{L}$  oder 3  $\mu\text{L}$  Transfektionsreagenz und 5 nM, 10 nM oder 50 nM miR-205-5p Inhibitor behandelt (vgl. Abschnitt 4.1.7). Nach 24 h, 72 h oder 144 h wurde die miR-205-5p Expression mittels qPCR bestimmt. Die Behandlung führte zu einem langanhaltenden Knockdown (Abbildung 5.9A), der auch 144 h nach Transfektion noch eine ca. 4,5-fache Reduktion ( $p_{\text{adj}} = 0,0486$ ,  $\text{ddCT} \pm \text{SD}: -2,20 \pm 0,371$ ) der miR-205-5p Expression zur Folge hatte. Signifikante Verringerungen der miR-205-5p Expression konnten außerdem für die Kombinationen aus 1,5  $\mu\text{L}$  Transfektionsreagenz + 5 nM miR-Inhibitor nach 24 h ( $p_{\text{adj}} = 0,0131$ ), 3  $\mu\text{L}$  Transfektionsreagenz + 5 nM miR-Inhibitor nach 72 h ( $p_{\text{adj}} = 0,0205$ ), 3  $\mu\text{L}$  Transfektionsreagenz + 10 nM miR-Inhibitor nach 24 h ( $p_{\text{adj}} = 0,00308$ ) und 72 h ( $p_{\text{adj}} = 0,025$ ) sowie 3  $\mu\text{L}$  Transfektionsreagenz + 50 nM miR-Inhibitor nach 24 h ( $p_{\text{adj}} = 0,0128$ ) und 72 h ( $p_{\text{adj}} = 0,0128$ ) nachgewiesen werden. Die Kombination aus 3  $\mu\text{L}$  Transfektionsreagenz und 50 nM miR-Inhibitor wurde aufgrund der stärkeren miR-205-5p Reduktion nach 72 h (ca. 6-fache Reduktion verglichen mit einer 1,8–2,5-fachen Reduktion für die anderen Transfektionsbedingungen) für nachfolgende Versuche genutzt.

Der Einfluss der miR-205-5p Inhibition auf intrazelluläre Prozesse, wurde anschließend mittels qPCR von acht repräsentativen, experimentell validierten Zielgenen, die mit der cSCC-Karzinogenese assoziiert sind (Tabelle 5.1), untersucht. Zusätzlich wurde die Genexpression von *CDH1* (E-Cadherin) bestimmt, das von *ZEB1* und *ZEB2* reguliert wird und essentiell am Prozess der EMT beteiligt ist [192]. Die Hypothese, ob Zielgene durch eine miR-205-5p Inhibition hochreguliert werden und ob *CDH1* durch die putative erhöhte *ZEB1/ZEB2* Expression herunterreguliert wird, wurde im Folgenden geprüft (Abbildung 5.9B).



**Abbildung 5.9: Die Behandlung mit einem miR-205-5p Inhibitor führt zum langanhaltenden miR-205-5p Knockdown und transientser Hochregulation von Zielgenen.** (A) Dargestellt ist das Expressionslevel von miR-205-5p nach Behandlung von SCC-12 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen eines miR-205-5p Inhibitors 24 h, 72 h und 144 h nach der Transfektion. Statistischer Test: Einstichproben-t-Test mit  $\mu = 0$  und FDR-Adjustierung. \*:  $p_{adj} < 0,05$ ; \*\*:  $p_{adj} < 0,01$ .  $n \geq 2$ . Kontrollzellen wurden mit einer Kontrollsequenz transfiziert. (B) Dargestellt sind die Ergebnisse einer qPCR mit Nested-ANOVA, um Unterschiede der Genexpression zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Transfektion mit einem miR-205 Inhibitor zu analysieren. Jeder Datenpunkt zeigt das Ergebnis einer unabhängigen Probe. Zeitpunkte geben die Zeit nach Transfektion an. ddCT: Expression ermittelt mit der delta-delta CT Methode; entspricht dem  $\log_2$ -FC. Ein nachgeschalteter Einstichproben-t-Test mit  $\mu = 0$  zeigte nach FDR-Adjustierung keine signifikanten Veränderungen einzelner Gene an.  $n \geq 2$ . Kontrollzellen wurden mit einer Kontrollsequenz transfiziert.

## 5 Ergebnisse

**Tabelle 5.1:** Zielgene von miR-205-5p und deren Funktion im cSCC.

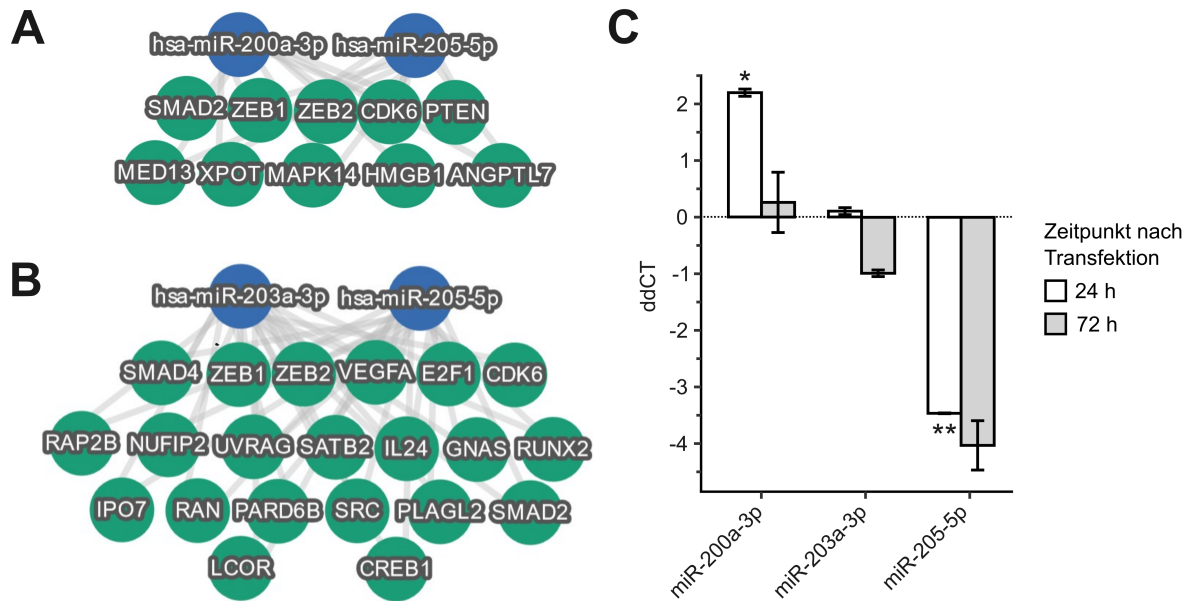
Zielgen	Funktion des Zielgens	Assoziation zur cSCC-Karzinogenese
<i>BCL2</i>	Membranprotein der äußeren Mitochondrienmembran	Inhibition der Apoptose [193]
<i>ERBB2</i>	Rezeptortyrosinkinase	Zellwachstum, Zellüberleben [194]
<i>INPPL1</i>	Phosphatase	Inhibition der Zellmigration in Keratinozyten [195]
<i>ITGA5</i>	Integrin	Migration, Zellüberleben [196]
<i>MMP13</i>	Proteinase	Proliferation, Migration, Invasion [139]
<i>VEGFA</i>	Wachstumsfaktor	Proliferation, Zellüberleben [193]
<i>ZEB1</i>	Zinkfinger-Protein	Induktion der EMT [197]
<i>ZEB2</i>	Zinkfinger-Protein	Induktion der EMT [8]

Eine Nested-ANOVA zur Feststellung ob sich die allgemeine Genexpression nach miR-205-5p Knockdown von den Kontrollen unterschied ( $ddCT \neq 0$ ), zeigte die signifikante Hochregulation der Zielgene nach 24 h ( $p_{adj} = 0,023$ ). Ein nachgeschalteter Einstichproben-t-Test mit  $\mu = 0$  deutete nach FDR-Adjustierung jedoch nicht auf signifikante Veränderungen einzelner Gene hin. Der miR-205-5p Knockdown führte somit nicht zur starken Expression einzelner Zielgene, sondern zur moderaten Hochregulation eines Targetnetzwerks nach 24 h. Eine ZEB1/ZEB2 vermittelte *CDH1*-Inhibition konnte hingegen nicht beobachtet werden.

Nach 72 h begann die Genexpression sich zu normalisieren ( $p_{adj} = 0,069$ ) und fiel nach 144 h wieder auf das Ausgangslevel zurück ( $p_{adj} = 0,639$ ), sodass trotz langanhaltendem miR-205-5p Knockdown, lediglich eine transiente Veränderung der Genexpression festgestellt werden konnte (vgl. Abbildung 5.9).

Eine mögliche Erklärung ist ein Regulationsmechanismus komplementärer miRNAs, der durch die verringerten miR-205-5p Level aktiviert wird. Daher wurde die Expression von miR-200a-3p und miR-203a-3p, die ähnliche Ziele wie miR-205-5p regulieren und denen tumorsuppressive Eigenschaften in verschiedenen Krebsentitäten zugeschrieben werden, untersucht. miR-200a-3p ist Teil der miR-200 Familie (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 und miR-429), die zusammen mit miR-205-5p den EMT-Switch durch Inhibition von ZEB1/ZEB2, reguliert [191]. miR-203a-3p ist ein Differenzierungsmarker in Keratinozyten und verlangsamt die cSCC-Proliferation durch Inhibition des Onkogens *CMYC* [198]. Ein Netzwerk validierter Zielgene, die von miR-200a-3p und miR-205-5p reguliert werden, ist in Abbildung 5.10A dargestellt. Gemeinsame Zielgene von miR-203a-3p und miR-205-5p sind in Abbildung 5.10B präsentiert. Auffällig ist die Regulierung von ZEB1/ZEB2 sowie *SMAD2* (zusammen mit ZEB1/ZEB2 involviert in den TGF- $\beta$ -Signalweg und Induktion der EMT [199]) in beiden Netzwerken.

Die Untersuchung der miRNA-Expression (Abbildung 5.10C) nach miR-205-5p Knockdown zeigte eine signifikante Erhöhung der miR-200a-3p Expression nach 24 h (Einstich-



**Abbildung 5.10: Analyse komplementärer miRNAs nach miR-205 Inhibition.** Dargestellt sind Zielgen-Netzwerke von miR-200a-3p/miR-205-5p (**A**) und miR-203a-3p/miR-205-5p (**B**) sowie die miRNA-Expression von miR-200a-3p, miR-203a-3p und miR-205-5p nach miR-205-5p Knockdown ermittelt mit qPCR (**C**). Die Netzwerkanalyse in (**A**) und (**B**) erfolgte mit miRTargetLink 2.0 (Abrufdatum 22.12.2022). Zeitpunkte geben die Zeit nach Transfektion an. ddCT: Expression ermittelt mit der delta-delta CT Methode; entspricht dem  $\log_2$ -FC. Statistischer Test: Einstichproben-t-Test mit  $\mu = 0$  und FDR-Adjustierung. \*:  $p_{\text{adj}} < 0,05$ ; \*\*:  $p_{\text{adj}} < 0,01$ . Mittelwert  $\pm$  SD.  $n = 2$ . Kontrollzellen wurden mit einer Kontrollsequenz transfiziert.

proben-t-Test mit FDR-Adjustierung:  $p_{\text{adj}} = 0,0393$ ), die sich nach 72 h wieder dem Ausgangslevel anglich ( $p_{\text{adj}} = 0,616$ ). Mir-203a-3p war nach 24 h unverändert ( $p_{\text{adj}} = 0,304$ ) und nach 72 h um das 2-fache (jedoch nicht signifikant) reduziert ( $p_{\text{adj}} = 0,053$ ). Die zuvor beschriebene Herunterregulierung von miR-205-5p konnte erneut beobachtet werden, mit einer signifikanten Verringerung der miR-205-5p Expression nach 24 h ( $p_{\text{adj}} = 0,00532$ ), jedoch nicht nach 72 h ( $p_{\text{adj}} = 0,0729$ ).

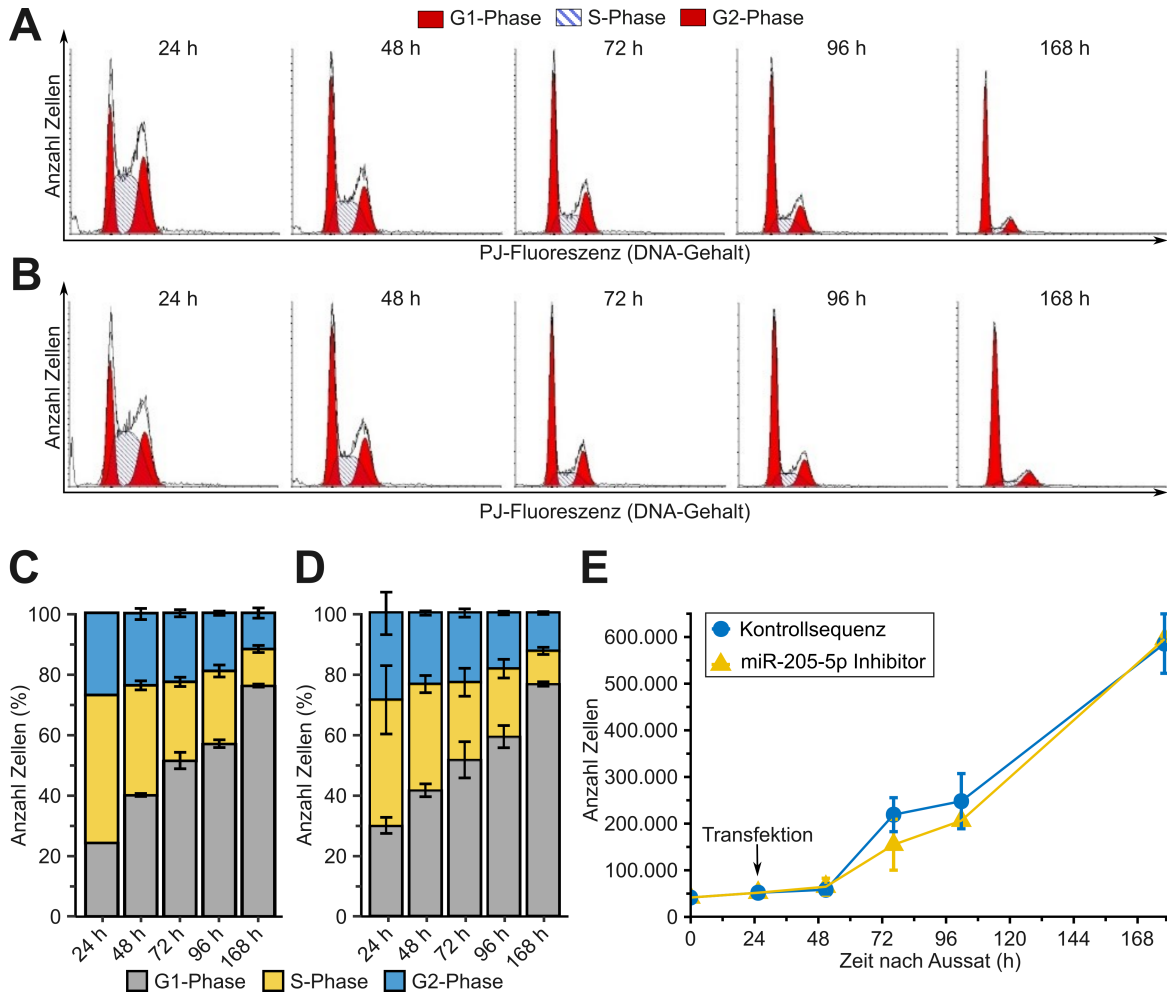
miR-205-5p hat mutmaßlich mehrere hundert Zielgene [200] und ein Einfluss auf phänotypische Veränderungen ist trotz schneller Herstellung des Ausgangszustands für die untersuchten, repräsentativen Zielgene nicht auszuschließen. Daher wurden im Folgenden zelluläre Prozesse, die mit der Karzinogenese und Tumorprogression assoziiert sind, nach miR-205-5p Knockdown analysiert.

Eine Bestimmung des Zellwachstums und eine dazugehörige Zellzyklusanalyse dienten der Untersuchung einer möglichen Einflussnahme von miR-205-5p auf die Proliferationseigenschaften des cSCCs. SCC-12 Zellen wurden 24 h nach der Einsaat mit einem miR-205-5p Inhibitor transfiziert und zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h, 96 h sowie 168 h nach der Einsaat analysiert. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer zu den angegebenen Zeitpunkten. Abgelöste und ausgezählte Zellen wurden anschließend fixiert und später im Flusszytometer zur Ermittlung der Zellzyklusverteilung durch Anfärbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff



## 5 Ergebnisse

PJ vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Der Zeitpunkt der Transfektion ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.



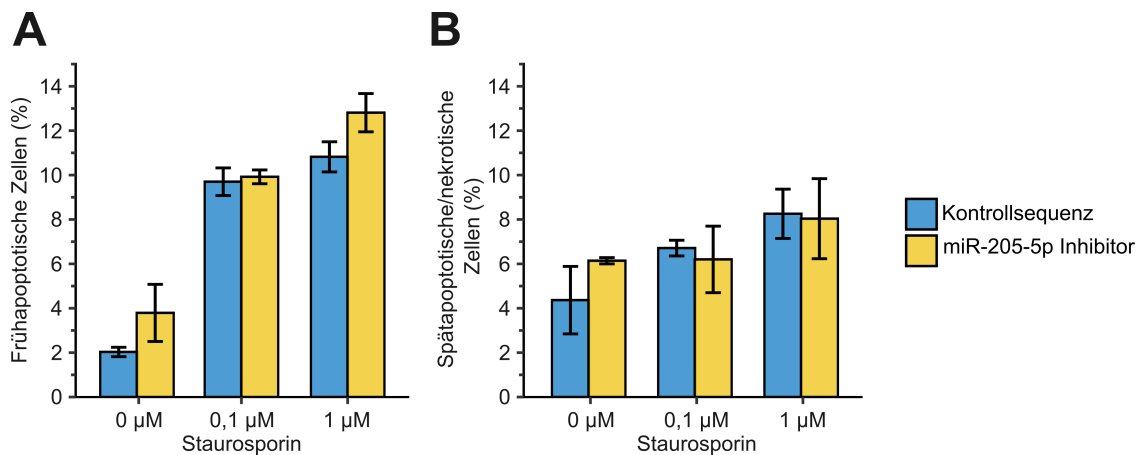
**Abbildung 5.11: Die Zellzyklusverteilung und das Zellwachstum in SCC-12 werden durch eine miR-205 Inhibition nicht beeinflusst.** Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit einem miR-205 Inhibitor (50 nM) oder einer Kontrollsequenz (5 nM) transfiziert. (A) Zellzyklusverteilung in Kontrollzellen. (B) Zellzyklusverteilung in Zellen nach miR-205 Inhibition. (C) Quantitative Analyse der Zellzyklusverteilung aus (A). (D) Quantitative Analyse der Zellzyklusverteilung aus (B). (E) Zellwachstum zu den jeweiligen Zeitpunkten, an denen die Zellzyklusverteilung gemessen wurde. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD. Für keine der Bedingungen wurden signifikante Veränderungen gefunden. Signifikanztest für (C) und (D):  $\chi^2$ -Test der absoluten Häufigkeiten. Signifikanztest für (E): Welch's-t-Test mit anschließender FDR-Adjustierung.

Flusszytometrische Diagramme, die den DNA-Gehalt in Kontrollzellen und miR-205-5p Knockdown-Zellen darstellen, unterschieden sich optisch kaum voneinander (Abbildung 5.11A bzw. B). Auch die Auftragung als prozentualer Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen und Prüfung auf Signifikanz mittels  $\chi^2$ -Test der absoluten Häufigkeiten zeigte keine Differenzen (Abbildung 5.11C/D). Das Zellwachstum (Abbildung 5.11E) unterschied sich innerhalb der ersten 48 h nicht, war zu den Zeitpunkten 72 h und 96 h etwas höher in Zellen, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden, und glich sich anschließend wieder den miR-205-5p Knockdown-

Zellen an. Eine Prüfung der Unterschiede mittels Welch's-t-Test und anschließender FDR-Adjustierung führte nicht zur Detektion signifikanter Veränderungen. Insgesamt konnten keine Hinweise gefunden werden, dass miR-205-5p einen Einfluss auf die Proliferationseigenschaften des cSCCs *in vitro* hat. Zeitabhängige Unterschiede in der Zellzyklusverteilung sind durch die Zunahme der Konfluenz zu erklären.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob miR-205-5p die Apoptose induziert bzw. die Apoptoseinduktion nach Applikation einer Noxe (Staurosporin) beeinflusst. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Zellen nach Transfektion mit Kontrollsequenz oder miR-205-5p Inhibitor für 3 h mit 0,1  $\mu\text{M}$  oder 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin versetzt. Die Apoptoseinduktion wurde direkt im Anschluss mittels Annexin-V-Assay (Abbildung 5.12) untersucht.

Die Repression von miR-205-5p führte zur leichten Erhöhung des Anteils frühapoptotischer Zellen (um ca. zwei Prozentpunkte) sowohl in Zellen ohne Staurosporin-Zugabe, als auch nach Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin. Die gleiche Beobachtung konnte bei spätapoptotischen/nekrotischen Zellen ohne Staurosporin-Zugabe gemacht werden. Ein  $\chi^2$ -Test der absoluten Häufigkeiten zeigte, dass keine der Veränderungen signifikant waren. Zusammenfassend wurden keine eindeutigen Hinweise für einen Einfluss der miR-205-5p Expression auf die Apoptose gefunden.



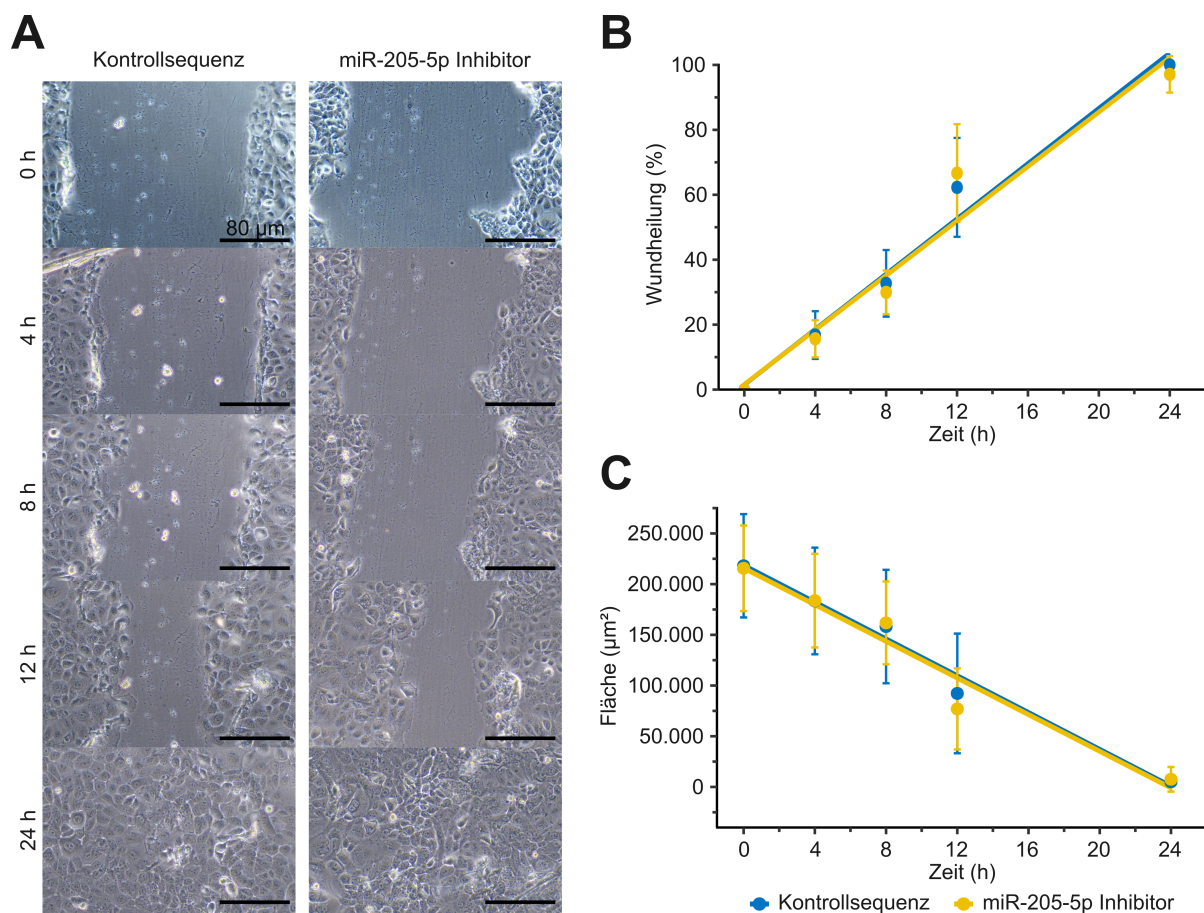
**Abbildung 5.12: Ein miR-205-5p Knockdown hat keinen Einfluss auf die Apoptoseinduktion in SCC-12.** Dargestellt ist die Frühapoptose (A) und Spätapoptose/Nekrose (B) für SCC-12 Zellen nach Transfektion mit einem miR-205-5p Inhibitor (50 nM) oder einer Kontrollsequenz (5 nM) und Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des Kinasehemmers Staurosporin. Ein  $\chi^2$ -Test der absoluten Häufigkeiten zeigte keine signifikanten Veränderungen nach miR-205-5p Repression. Annexin-V-Assay. Mittelwert  $\pm$  SD.

Neben unkontrolliertem Zellwachstum und Inhibition der Apoptose ist die Zellmigration ein weiterer essentieller Schritt bei der Karzinogenese, insbesondere in Hinblick auf die Tumorprogression und Metastasierung. Daher wurde das Migrationspotenzial von SCC-12 Zellen nach miR-205-5p Inhibition mittels Scratch-Assay analysiert (Abbildung 5.13). Um sicherzustellen, dass der Wundverschluss ausschließlich von der Migration abhängt, wurden die Zellen vor Applikation der Kratzwunde für 1 h mit dem

## 5 Ergebnisse

Mitosehemmer Mitomycin C inkubiert, um die Zellproliferation zu unterbinden. Zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h wurden Bilder der Wunden mit einem Lichtmikroskop aufgenommen, die anschließend mit dem ImageJ Plugin *wound healing size tool* [172] analysiert wurden.

Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Wundheilung bzw. der geschlossenen Fläche und der Zeit, welcher durch die miR-205-5p Inhibition nicht beeinflusst wurde. Nach 24 h waren die Wunden in beiden Konditionen komplett verschlossen.



**Abbildung 5.13: Die miR-205-5p Inhibition hat keine Auswirkungen auf das Migrationsverhalten von SCC-12.** Dargestellt sind die Ergebnisse eines Scratch-Assays. (A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h nach Applikation einer Kratzwunde mittels 100 µL Pipettenspitze. Schwarzer Balken: 80 µm. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ. (B) Wundheilung als Anteil der geschlossenen Fläche (C) in Prozent. Einzelne Datenpunkte sind als Mittelwert ± SD abgebildet. Die Geraden geben eine lineare Regression durch die Punkte an.

Insgesamt waren trotz langanhaltendem miR-205-5p Knockdown keine phänotypischen Veränderungen (Zellwachstum, Apoptose, Zellmigration) der SCC-12 Zellen zu beobachten. Dies liegt mutmaßlich an der Normalisierung der Zielgen-Expression durch Feedback-Mechanismen, die teilweise durch die Alteration von miRNA-Konzentrationen (miR-200a-3p) erklärt werden können. Außerdem ist ein komplexeres Zusammenspiel zellulärer Faktoren wahrscheinlich, die zusätzlich zur miRNA-Regulation einen Ein-

fluss auf intrazelluläre Prozesse haben. Eine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways, der eine wichtige Rolle bei der EMT spielt [192] und dessen Effektorproteine ZEB1 und ZEB2 durch miR-205-5p reguliert werden [191], wurde daher im Folgenden analysiert.

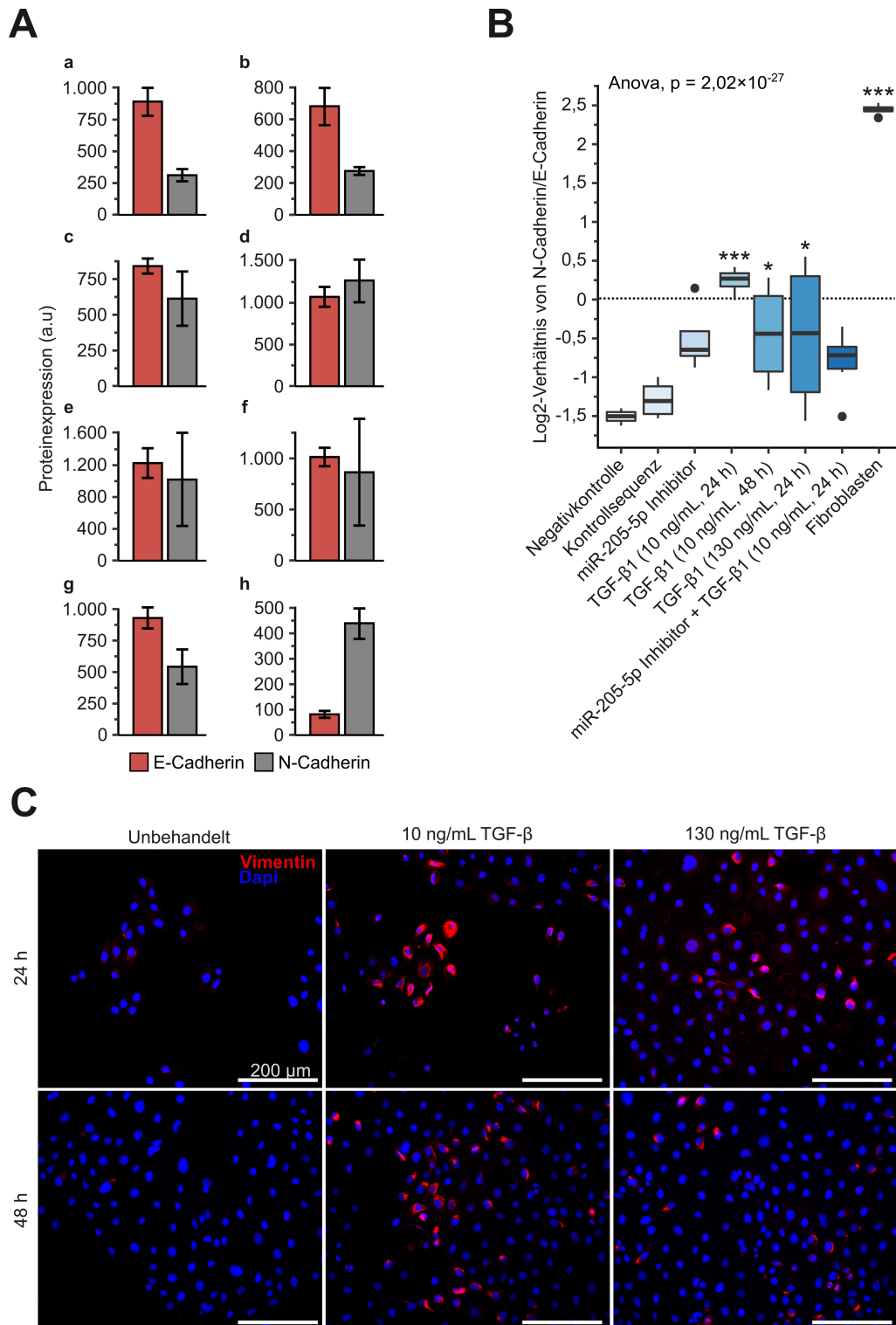
## 5.7 Expression von EMT-Markern in SCC-12 Zellen nach miR-205 Knockdown oder Behandlung mit TGF- $\beta$ 1

Zur Untersuchung einer potentiellen EMT-Induktion durch TGF- $\beta$ 1 wurden SCC-12 Zellen mit 10 ng/mL oder 130 ng/mL eines rekombinanten, aktiven TGF- $\beta$ 1 Proteins (Abcam, #ab50036) für 24 h oder 48 h behandelt. Anschließend erfolgte die flusszytometrische Analyse der Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und des mesenchymalen Markers N-Cadherin. Zusätzlich wurde die Expression beider Proteine nach Transfektion mit Kontrollplasmid oder miR-205p-5p Inhibitor sowie nach kombinierter Behandlung mit miR-205-5p Inhibitor und TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) bestimmt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte SCC-12 Zellen. Als Positivkontrolle dienten Fibroblasten, die einen mesenchymalen Phänotyp repräsentieren. Die Proteinexpression von E- und N-Cadherin (Abbildung 5.14A) sowie das logarithmische ( $\log_2$ ) Verhältnis aus N-Cadherin zu E-Cadherin (Abbildung 5.14B) ist in Abbildung 5.14 dargestellt. Ein niedriges Verhältnis entspricht einem epithelialen Phänotyp, ein hohes Verhältnis einem mesenchymalen Phänotyp.

Erwartungsgemäß zeigten die Negativkontrolle sowie die Transfektionskontrolle eine niedrige N-Cadherin Expression, die um den Faktor 2,86 ( $\log_2$ -FC: -1,52) bzw. 2,50 ( $\log_2$ -FC: -1,32) kleiner als die E-Cadherin Expression war. Die miR-205-5p Inhibition führte weder isoliert (Dunnett-Test:  $p = 0,0725$ ) noch in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 ( $p = 0,177$ ) zur erhöhten N-Cadherin Expression im Vergleich zur Negativkontrolle. TGF- $\beta$ 1 alleine zeigte hingegen die Induktion der N-Cadherin Expression sowohl nach Behandlung für 24 h mit 10 ng/mL ( $p = 0,00025$ ) und 130 ng/mL ( $p = 0,0190$ ) als auch nach Behandlung für 48 h mit 10 ng/mL ( $p = 0,0320$ ). Die Behandlung mit 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 für 24 h führte als einzige Bedingung (neben Fibroblasten mit einem  $\log_2$ -FC von 2,44) zu einer höheren N-Cadherin als E-Cadherin Expression ( $\log_2$ -FC: 0,257).

Insgesamt konnte die graduelle Transition eines epithelialen Phänotyps (SCC-12 Kontrollzellen) zu einem mesenchymalen Phänotyp (Fibroblasten) biochemisch durch einen E-Cadherin zu N-Cadherin Switch nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung nachgewiesen werden.

Zur unabhängigen Überprüfung der EMT-Induktion nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung sollte im Folgenden die Expression eines weiteren mesenchymalen Markers (Vimentin) immunhistochemisch bestimmt werden.



**Abbildung 5.14: TGF- $\beta$  induziert einen mesenchymalen Phänotyp auf Proteinebene *in vitro*.** Die Proteinexpression des epithelialen Markers E-Cadherin und des mesenchymalen Markers N-Cadherin wurde flusszytometrisch bestimmt. **(A)** Barplots zeigen die absolute Proteinexpression in a.u. von E-Cadherin (rot) und N-Cadherin (grau) für die unbehandelte Negativkontrolle (a), Transfektionstkontrolle (b), Zellen nach miR-205-5p Knockdown (c), Zellen nach Behandlung mit 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 für 24 h (d) und 48 h (e) sowie Behandlung mit 130 ng/mL TGF- $\beta$ 1 für 24 h (f), kombinierte miR-205-5p Inhibition + TGF- $\beta$ 1-Behandlung mit 10 ng/mL für 24 h (g) und in Fibroblasten (h), die als Positivkontrolle dienten. Mittelwert  $\pm$  SD.

## 5.8 Migrationspotential von SCC-12 Zellen nach TGF-beta Behandlung

**Abbildung 5.14:** (fortgeführt von vorheriger Seite) **(B)** Die Boxplots zeigen die relative Proteinexpression von N-Cadherin/E-Cadherin als logarithmisches ( $\log_2$ ) Verhältnis für die unterschiedlichen Bedingungen. Ein epithelialer Phänotyp ist durch ein ähnliches medianes Verhältnis wie bei der Negativkontrolle gekennzeichnet. Der Switch zu einem mesenchymalen Phänotyp ist durch den Anstieg des Verhältnisses in Richtung der Positivkontrolle (Fibroblasten) angedeutet. Einfaktorielle ANOVA. Post-hoc Test: Dunnett's Test gegen die Negativkontrolle. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .  $n = 4$ . **(C)** Immunhistochemische Vimentin-Anfärbung von SCC-12 Zellen nach Behandlung mit 10 ng/mL oder 130 ng/mL TGF- $\beta$ 1 über einen Zeitraum von 24 h (oben) oder 48 h (unten). Blau: Zellkerne gefärbt mit DAPI. Rot: Vimentin. Weißer Balken: 200  $\mu$ m.

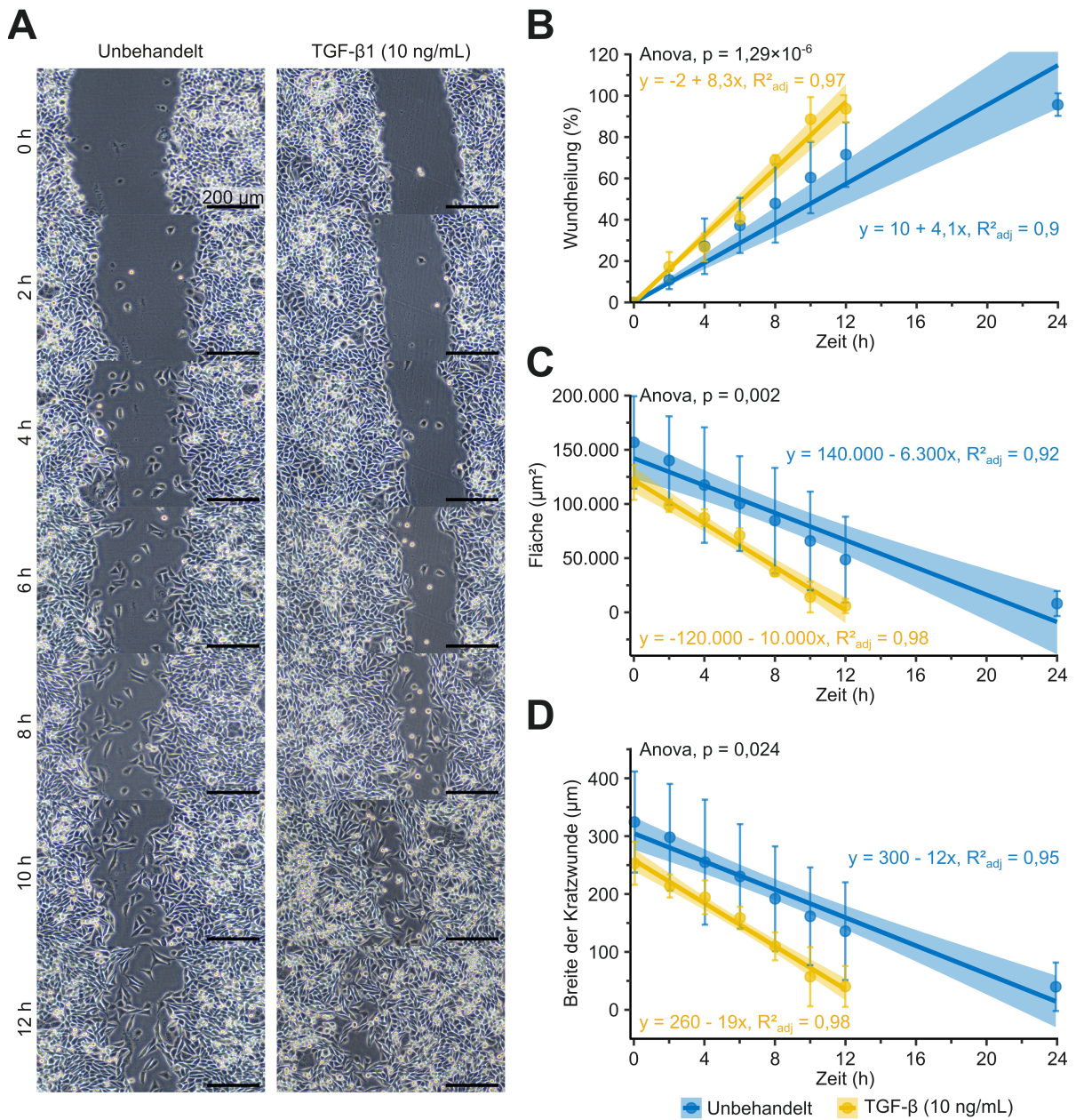
SCC-12 Zellen wurden für 24 h oder 48 h einer TGF- $\beta$ 1-Konzentration von 10 ng/mL oder 130 mg/mL ausgesetzt, mit einem anti-Vimentin Primärantikörper (Klon VIM 13.2, Sigma-Aldrich) und einem Alexa594-gelabelten Goat anti-mouse Sekundärantikörper (Invitrogen) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mittels DAPI.

Abbildung 5.14C zeigt eine Induktion der Vimentin-Expression nach allen TGF- $\beta$ 1-Behandlungen, die stärker bei niedrigeren TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen war, wohingegen Unterschiede in der Behandlungsdauer nicht ersichtlich waren. Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen aus Abbildung 5.14, dass TGF- $\beta$ 1 einen mesenchymalen Phänotyp in SCC-12 Zellen begünstigt, der durch geringe TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen ausgeprägter ist. Für folgende Experimente wurde daher 10ng/mL TGF- $\beta$ 1 über einen Zeitraum von 24 h appliziert.

## 5.8 Migrationspotential von SCC-12 Zellen nach TGF-beta Behandlung

Im Folgenden wurde der Einfluss der zuvor beobachteten Unterschiede in der Proteinexpression auf zelluläre Prozesse, die mit der Tumorprogression (Migration, Invasion) assoziiert sind, untersucht. Für einen Scratch-Assay wurden SCC-12 Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und für 1 h mit Mitomycin C inkubiert. Anschließend erfolgte die Applikation einer Kratzwunde mit einer 100  $\mu$ L Pipettenspitze und die Kultivierung in TGF- $\beta$ 1-haltigem Medium (10 ng/mL). Der Wundverschluss wurde über einen Zeitraum von 12 h alle 2 h dokumentiert. Nach 24 h wurde kontrolliert, ob die Wunde komplett verschlossen war. Die Auswertung erfolgte in ImageJ mit dem *wound healing size tool* [172]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.15 dargestellt.

## 5 Ergebnisse



**Abbildung 5.15: TGF-β fördert die Migration von SCC-12 im Zellverbund.** (A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen eines Scratch-Assays zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h und 12 h nach Applikation einer Kratzwunde mittels 100 μL Pipettenspitze. Schwarzer Balken: 200 μm. (B) Wundverschluss in Prozent der Anfangsfläche. (C) Wundfläche in μm<sup>2</sup>. (D) Breite der Kratzwunde in μm. Datenpunkte geben den Mittelwert ± SD an. Geradengleichungen sind auf zwei signifikante Stellen gerundet. Die farbig hinterlegten Bereiche geben Konfidenzintervalle der Regressionsgeraden an. Unterschiede in der Steigung der Geraden wurden mittels zweifaktorieller ANOVA analysiert. Dargestellt ist der Interaktionsterm. Blau: Unbehandelte Zellen. Gelb: Zellen nach TGF-β1-Behandlung (10 ng/mL).

Der Wundverschluss erfolgte in einer konstanten Rate, ohne signifikante Abweichungen über den Zeitraum, gezeigt durch hohe adjustierte Regressionskoeffizienten ( $R_{adj} > 0,9$  in Abbildung 5.15B-D). Die Wundheilung (Abbildung 5.15B) war in TGF-β1-behandelten Zellen bereits nach 12 h abgeschlossen (>95 % Wundverschluss) und

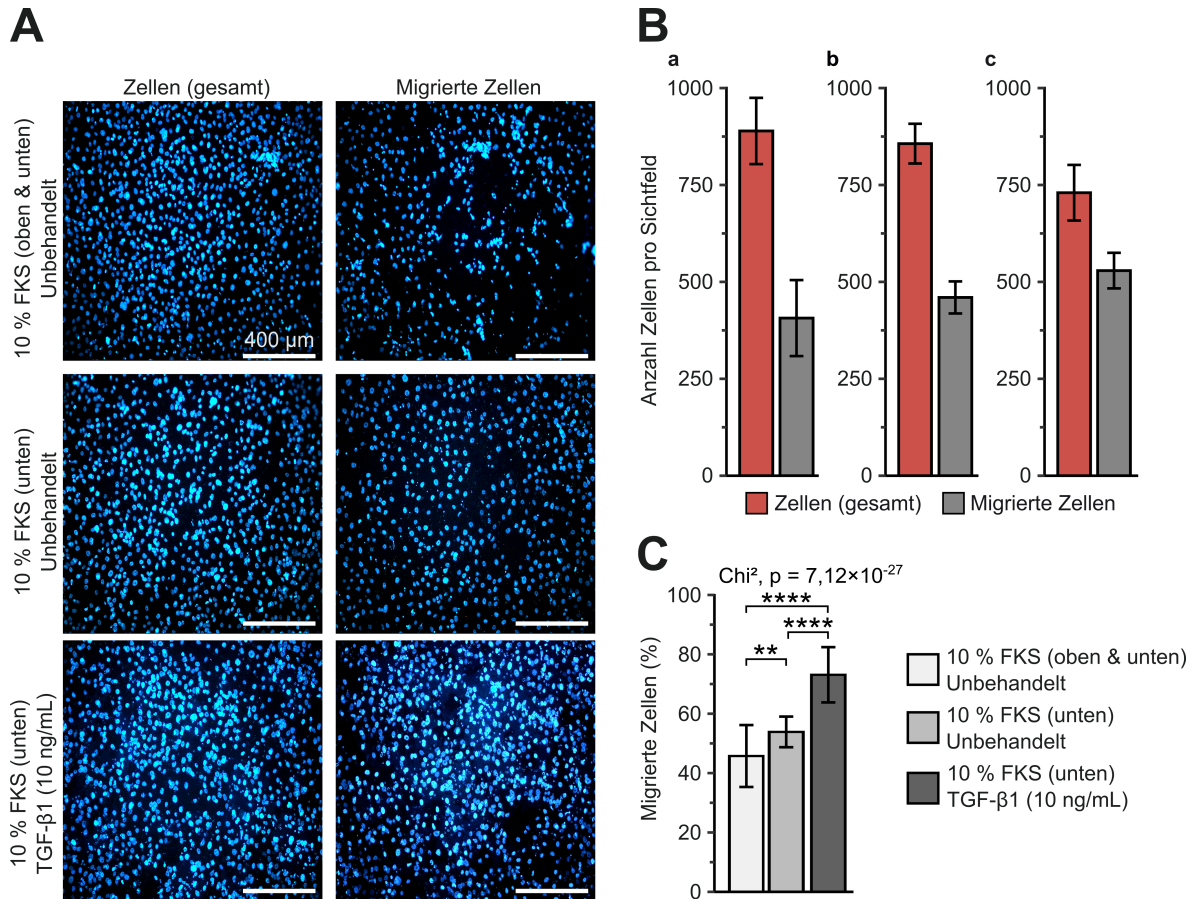
## 5.8 Migrationspotential von SCC-12 Zellen nach TGF-beta Behandlung

unterschied sich signifikant von den Kontrollzellen (Interaktionsterm einer zweifaktoriellen ANOVA,  $p = 1,29 \cdot 10^{-6}$ ) mit einer doppelt so starken Steigung nach linearer Regression (8,3 %/h vs. 4,1 %/h). Die Differenzen waren teilweise durch die durchschnittlich größeren Kratzwunden in den Kontrollen bedingt. Trotzdem unterschied sich die geschlossene Fläche (Abbildung 5.15C) signifikant ( $p = 0,002$ ) mit einer 1,5-fach schnelleren Rate nach TGF- $\beta$ 1-Applikation ( $-10.000 \mu\text{m}^2/\text{h}$  vs.  $-6.300 \mu\text{m}^2/\text{h}$ ). Differenzen in der Steigung der Regressionsgeraden waren ebenfalls ersichtlich für die Breite der Kratzwunde (Abbildung 5.15D) um den Faktor 1,5 ( $p = 0,024$ ,  $-19 \mu\text{m}/\text{h}$  vs.  $-12 \mu\text{m}/\text{h}$ ). Zusammenfassend führte die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 zur beschleunigten Migration im Zellverbund *in vitro*.

Neben der Migration als Zellverbund fördern das Ablösen einzelner Tumorzellen aus dem Primärtumor und die individuelle Migration die Metastasierung durch Einwanderung in Blutgefäße und die Distribution im Organismus mit anschließender Einnistung an entfernten metastatischen Nischen. Im weiteren Verlauf wurde daher das Migrationspotential einzelner Zellen durch eine semipermeable Membran mittels Migration-Assay in einer Boyden-Kammer (vgl. Abbildung 4.5) untersucht. SCC-12 Zellen wurden für 48 h mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) in An- oder Abwesenheit eines chemotaktischen Gradienten (10 % FKS) inkubiert, mit DAPI gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Nach Aufnahme der Bilder für die Gesamtanzahl der Zellen, wurden nicht-migrierte Zellen auf der Membranoberfläche entfernt und Bilder der migrierten Zellen erstellt. Für die Analyse wurden pro Probe bis zu vier nicht-überlappende Bilder aufgenommen, die anschließend gemittelt wurden. In Abbildung 5.16 sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt.



## 5 Ergebnisse



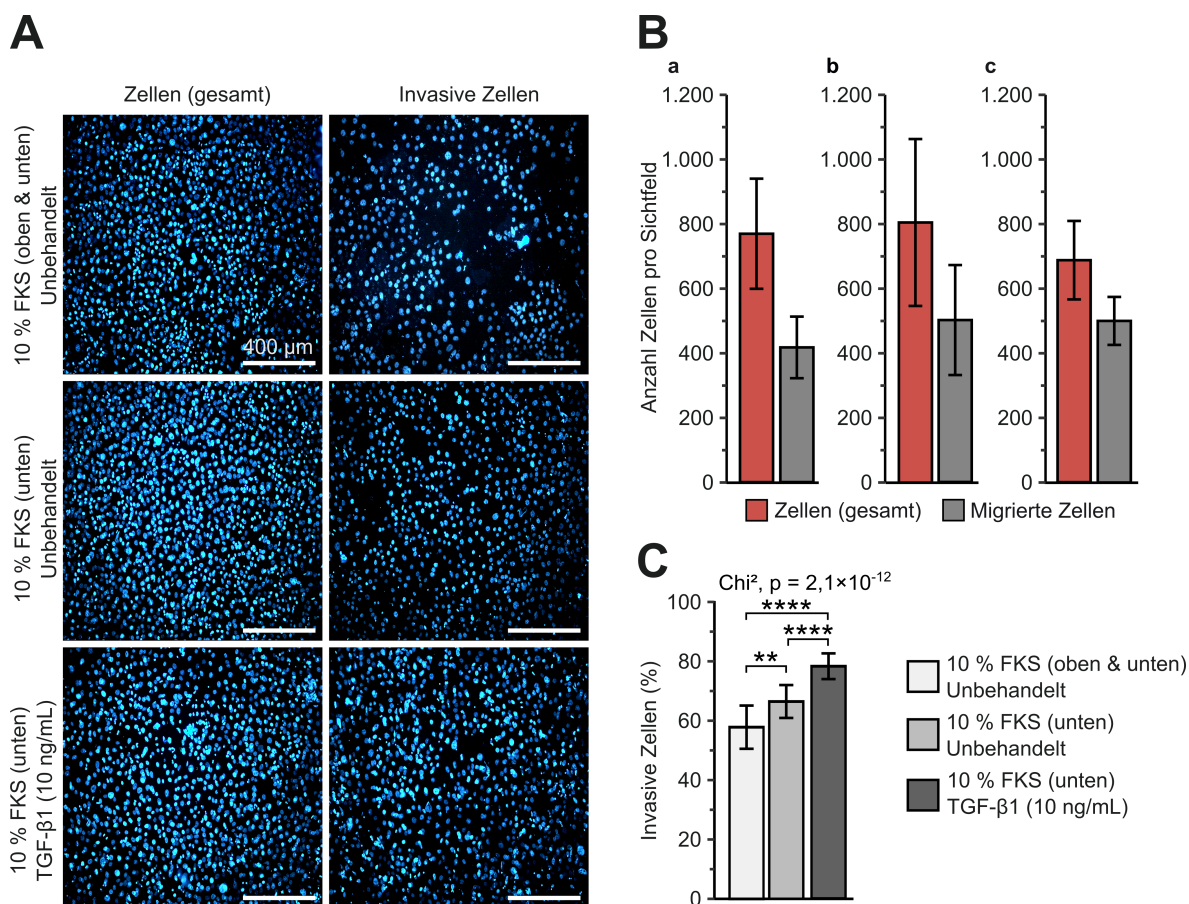
**Abbildung 5.16: TGF-β erhöht das Migrationspotenzial einzelner SCC-12 Zellen durch eine semipermeable Membran.** Die Behandlung erfolgte mit 10 ng/mL TGF-β1 über einen Zeitraum von 48 h in einer Boyden-Kammer mit (10 % FKS unten) und ohne (10 % FKS unten und oben) chemotaktischen Gradienten. **(A)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aller Zellen und der migrierten Zellen ohne chemotaktischen Gradienten und ohne TGF-β1 (oben), mit chemotaktischem Gradienten ohne TGF-β1 (Mitte) und mit chemotaktischem Gradienten und TGF-β1 (unten). Die Auszählung erfolgte mit ImageJ. Weißer Balken: 400 μm. **(B)** Durchschnittliche Anzahl von Zellen pro Sichtfeld für die Gesamtanzahl (rot) und die Anzahl migrierter Zellen (grau). **(a)** Unbehandelte Zellen ohne chemotaktischen Gradienten. **(b)** Unbehandelte Zellen mit chemotaktischem Gradienten. **(c)** Mit TGF-β1 (10 ng/mL) behandelte Zellen mit chemotaktischem Gradienten. **(C)** Verhältnis von migrierten Zellen zur Gesamtanzahl der Zellen. Mittelwert ± SD. Chi<sup>2</sup>-Test der absoluten Häufigkeiten (global) und gruppenweise mit FDR-Adjustierung. \*\*: p<sub>adj</sub> < 0,01. \*\*\*\*: p<sub>adj</sub> < 0,0001. Pro Probe wurden die Daten von bis zu vier nicht-überlappenden Bildern gemittelt. n = 4.

Die Behandlung mit TGF-β1 führte zur gesteigerten Zellmigration. Der Anteil migrierter Zellen war mit 45,7 % ± 10,4 % am niedrigsten in Kontrollzellen ohne chemotaktischen Gradienten. Die Applikation eines chemotaktischen Gradienten führte zum signifikanten Anstieg (Chi<sup>2</sup>-Test, p<sub>adj</sub> = 0,0011) auf einen Anteil migrierter Zellen von 53,8 % ± 5,2 %. Nach TGF-β1-Behandlung war ein Anteil migrierter Zellen von 73,0 % ± 9,3 % zu erkennen, der sich signifikant von Kontrollzellen ohne (p<sub>adj</sub> = 1,15 × 10<sup>-26</sup>) und mit (p<sub>adj</sub> = 3,02 × 10<sup>-14</sup>) chemotaktischem Gradienten unterschied. TGF-β1 führte somit neben der gesteigerten Migration im Zellverbund ebenfalls zur Erhöhung des Migrationspotenzials einzelner Zellen.

## 5.9 Invasionspotenzial von SCC-12 Zellen nach TGF-beta Behandlung

Die Zellmigration ist essentieller Bestandteil des Metastasierungsprozesses, welcher für epitheliale Tumore zunächst das Durchdringen der Basalmembran erfordert. Diese dünne kollagenhaltige Schicht trennt Epithelien vom darunterliegenden Bindegewebe und kann durch gelbildende Reagenzien künstlich auf die Unterseite einer semipermeablen Membran aufgetragen werden (vgl. Abschnitt 4.1.13.2), um das Invasionspotenzial von Zellen zu untersuchen. Die Versuchsdurchführung dieses Invasion-Assays ist analog zum Migration-Assay, der zuvor beschrieben wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.17 dargestellt.

Der zuvor beobachtete Trend eines erhöhten Migrationspotenzials nach TGF- $\beta$ 1-Applikation zeigte sich auch für das Invasionspotenzial. Mit einem Anteil von  $73,1 \% \pm 4,1 \%$  invasiven Zellen unterschieden sich die Zellen signifikant von Kontrollzellen ohne ( $54,5 \% \pm 6,8 \%$ ,  $p_{\text{adj}} = 9,9 \cdot 10^{-13}$ ) und mit ( $62,2 \% \pm 5,2 \%$ ,  $p_{\text{adj}} = 2,8 \cdot 10^{-5}$ ) chemotaktischem Gradienten. Letztere unterschieden sich ebenfalls signifikant voneinander ( $p_{\text{adj}} = 0,0015$ ).



**Abbildung 5.17: TGF-β erhöht das Invasionspotenzial einzelner SCC-12 Zellen durch eine semipermeable Membran mit künstlicher Basalmembran.** Die Behandlung erfolgte mit 10 ng/mL TGF-β1 über einen Zeitraum von 72 h in einer Boyden-Kammer mit (10 % FKS unten) und ohne (10 % FKS unten und oben) chemotaktischen Gradienten. **(A)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aller Zellen und der migrierten Zellen ohne chemotaktischen Gradienten und ohne TGF-β1 (oben), mit chemotaktischem Gradienten ohne TGF-β1 (Mitte) und mit chemotaktischem Gradienten und TGF-β1 (unten). Die Auszählung erfolgte mit ImageJ. Weißer Balken: 400 μm. **(B)** Durchschnittliche Anzahl von Zellen pro Sichtfeld für die Gesamtanzahl (rot) und die Anzahl invasiver Zellen (grau). **(a)** Unbehandelte Zellen ohne chemotaktischen Gradienten. **(b)** Unbehandelte Zellen mit chemotaktischem Gradienten. **(c)** Mit TGF-β1 (10 ng/mL) behandelte Zellen mit chemotaktischem Gradienten. **(C)** Verhältnis von invasiven Zellen zur Gesamtanzahl der Zellen. Mittelwert ± SD. Chi<sup>2</sup>-Test der absoluten Häufigkeiten (global) und gruppenweise mit FDR-Adjustierung. \*\*: p<sub>adj</sub> < 0,01. \*\*\*\*: p<sub>adj</sub> < 0,0001. Pro Probe wurden die Daten von bis zu vier nicht-überlappenden Bildern gemittelt. n = 4.

## 5.10 Einfluss chronischer Bestrahlung von Fibroblasten und SCC-12 auf den TGF-β-Pathway

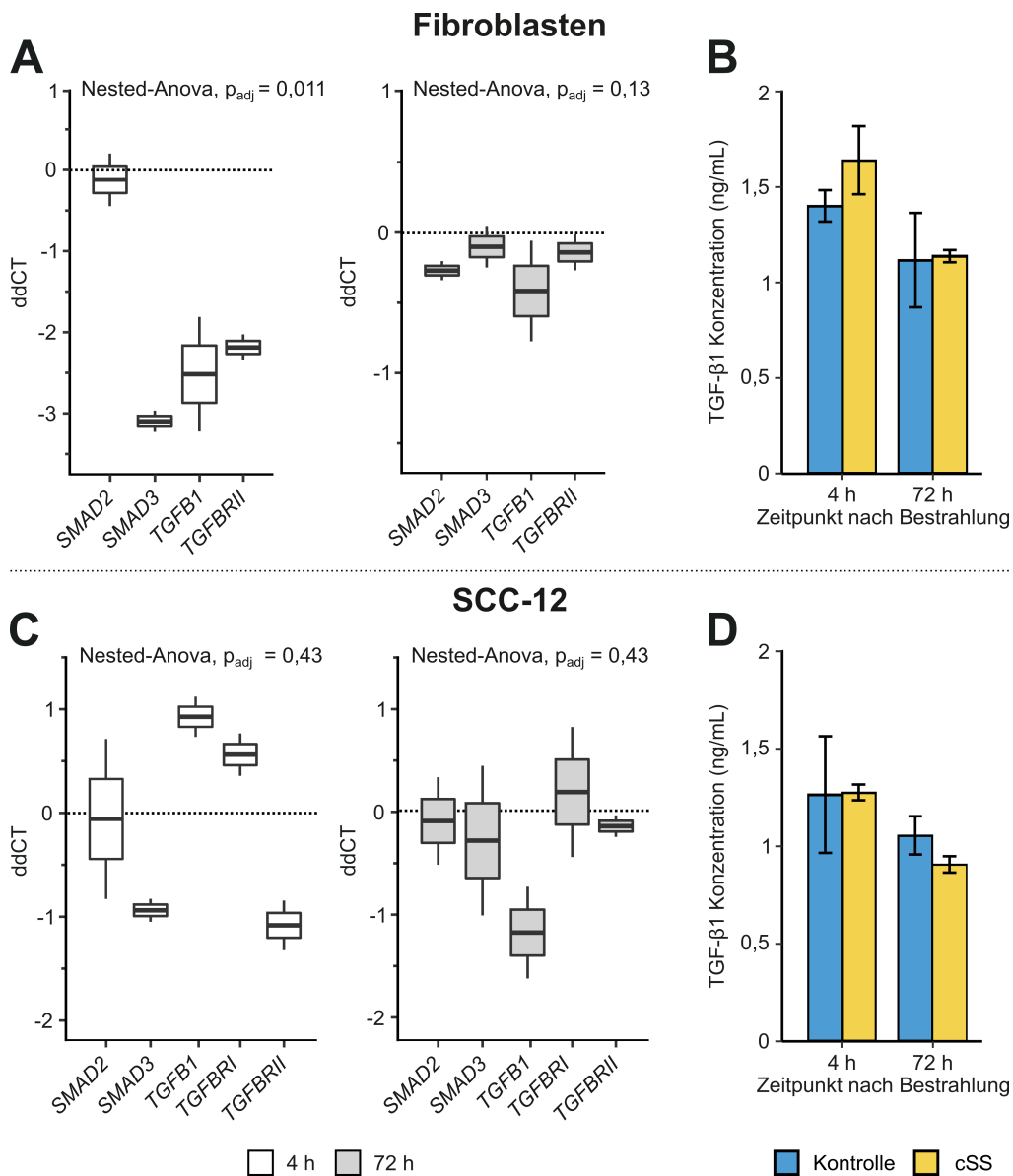
Die tumorfördernden Eigenschaften von TGF-β1 im cSCC wurden in den vorherigen Abschnitten dargestellt. Vor dem Hintergrund der Fragestellung eines putativen Einflusses solar simulierter Strahlung auf die cSCC-Progression und der UV-vermittelten Induktion des TGF-β-Pathways in Keratinozyten [201] und Melanozyten [202], sollte geprüft werden, ob eine Induktion der TGF-β1-Expression bzw. die Aktivierung des TGF-β-Pathways durch eine cSS-Exposition erfolgt. Dafür wurden SCC-12 Zellen

## 5.10 Einfluss chronischer Bestrahlung von Fibroblasten und SCC-12 auf den TGF- $\beta$ -Pathway

innerhalb von fünf Tagen dreimal mit einer Dosis von 0,25 MED cSS bestrahlt und die jeweiligen Endpunkte 4 h und 72 h nach der letzten Bestrahlung analysiert. Die Expression der Gene *SMAD2*, *SMAD3*, *TGFB1*, *TGFBRI* und *TGFBRII*, die in die kanonische TGF- $\beta$ -Signaltransduktion involviert sind [203], wurde mittels qPCR untersucht. Zusätzlich wurde die TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Aufgrund des Zusammenspiels verschiedener Hautkrebszellen und Fibroblasten sowie deren Transformation zu tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs), die ein tumorfreundliches *microenvironment* schaffen, wurden neben SCC-12 Zellen auch primäre Fibroblasten analysiert.

Die Genexpressionsanalyse (Abbildung 5.18) zeigte eine signifikante Verringerung der Expression untersuchter Gene in Fibroblasten 4 h nach Bestrahlung (Nested-ANOVA,  $p = 0,011$ , Abbildung 5.18A). In einem nachgeschalteten Einstichproben-t-Test mit  $\mu = 0$  waren keine signifikant veränderten Gene zu beobachten. Daher ist die Reprimierung des TGF- $\beta$ -Pathways nicht auf die Regulation einzelner Gene sondern auf die Inhibition des Gen-Sets aus *SMAD3*, *TGFB1* und *TGFBRII* zurückzuführen. *TGFBRI* war in Fibroblasten nicht exprimiert und ist daher nicht abgebildet. Eine signifikante Veränderung nach 72 h konnte nicht nachgewiesen werden ( $p = 0,43$ ). In SCC-12 Zellen waren weder signifikante Unterschiede nach 4 h ( $p = 0,13$ ) noch nach 72 h ( $p = 0,43$ ) vorhanden (Abbildung 5.18C). In Abbildung 5.18B/D sind die Ergebnisse des ergänzenden ELISA dargestellt. Dort konnten mittels Welch's-t-Test für keine der untersuchten Bedingungen signifikante Differenzen nachgewiesen werden. Eine zunächst geplante, nachfolgende Co-Kultivierung von Fibroblasten und SCC-12 Zellen, um eine parakrine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways (Sekretion von TGF- $\beta$ 1 in Fibroblasten und Aktivierung des Signalwegs in SCC-12) zu untersuchen, wurde aufgrund fehlender Differenzen in der TGF- $\beta$ 1-Konzentration nicht durchgeführt.

Da weder signifikante Veränderungen der Genexpression kanonischer TGF- $\beta$ -Pathway-Gene noch Unterschiede der TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Zellkulturüberstand der SCC-12 Zellen vorhanden waren, ist sowohl die autokrine als auch parakrine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways in dem untersuchten Setup unwahrscheinlich.



**Abbildung 5.18: Chronische cSS-Bestrahlung führt zur dynamischen Inhibition des TGF- $\beta$ -Pathways in Fibroblasten aber nicht in SCC-12.** Dargestellt sind die Ergebnisse einer qPCR mit Nested-ANOVA, um Unterschiede der Genexpression nach 4 h (weiß) und 72 h (grau) in Fibroblasten (A) und SCC-12 (C) nach chronischer cSS-Bestrahlung (3x0,25 MED) zu analysieren. Der Rezeptor *TGFBR1* war in Fibroblasten nicht exprimiert und ist daher nicht dargestellt. ddCT: Expression ermittelt mit der delta-delta CT Methode; entspricht dem log<sub>2</sub>-FC. Ergebnisse der Nested-ANOVA wurden mittels FDR adjustiert. Ein nachgeschalteter Einstichproben-t-Test mit  $\mu = 0$  zeigte nach FDR-Adjustierung keine signifikanten Veränderungen einzelner Gene an. Ergänzend sind die Ergebnisse eines ELISA für Fibroblasten (B) und SCC-12 (D), zum Nachweis extrazellulärer TGF- $\beta$ 1-Level nach cSS-Bestrahlung, abgebildet. Blau: Unbehandelte Zellen. Gelb: Chronisch bestrahlte (3x0,25 MED) Zellen. Signifikante Unterschiede konnten mittels Welch's-t-Test nicht detektiert werden. Mittelwert  $\pm$  SD. n = 2.

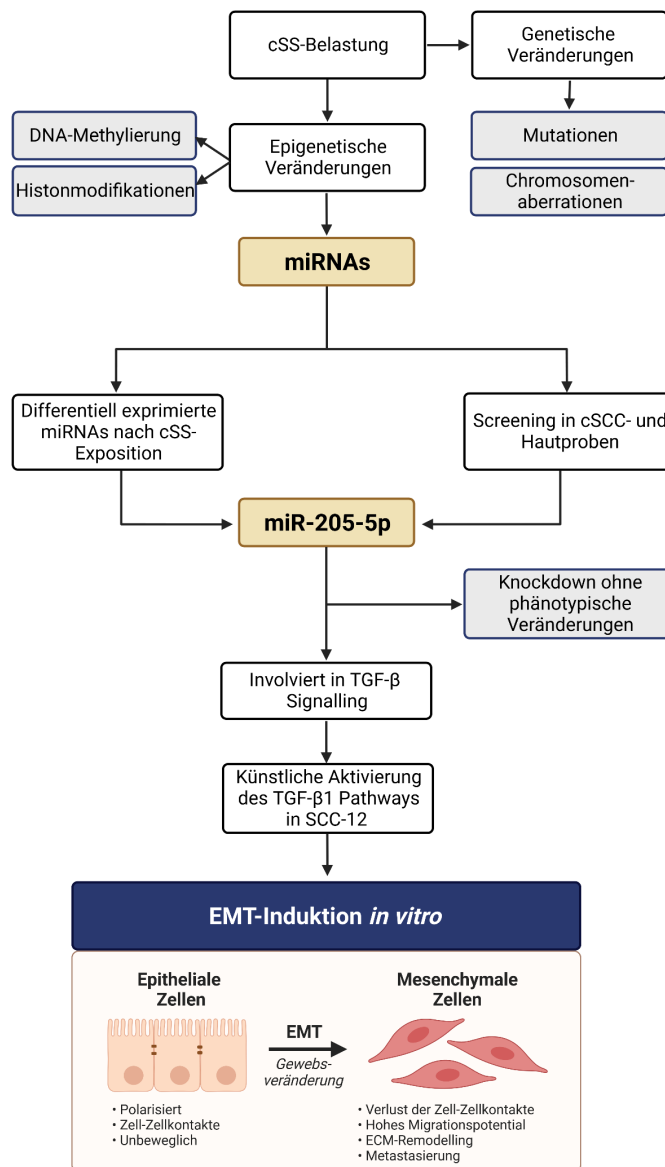
---

## 6 Diskussion

---

Das Plattenepithelkarzinom ist ein häufig vorkommender epidermaler Tumor der Haut, dessen Ätiologie eng mit der Akkumulation von Mutationen infolge solarer Strahlungsexposition (insbesondere UV) verknüpft ist. Bei der Karzinogenese spielen außerdem (UV-induzierte) miRNA-Alterationen und die anschließend veränderte Signaltransduktion in Richtung eines karzinogenen Phänotyps eine wichtige Rolle. Ob eine solche Rolle auch für die Tumorprogression von Primärtumoren zum metastatischen cSCC vorhanden ist, sollte in dieser Arbeit durch chronische Bestrahlungsexperimente humaner cSCC-Zelllinien analysiert werden. Ergänzend wurden *in vivo* Daten von cSCC-Patienten herangezogen, um miRNAs zu identifizieren, die nach Bestrahlung und im Tumor übereinstimmend reguliert waren. Dies traf nur für miR-205-5p zu. Daher wurde die Rolle von miR-205-5p und dem TGF- $\beta$ -Pathway, der durch miR-205-5p reguliert wird, in Bezug auf die Tumorprogression im Detail untersucht (grafisch repräsentiert in Abbildung 6.1).

Die präsentierten Ergebnisse zeigten ein komplexes Expressionsmuster humaner miRNAs im cSCC *in vitro* nach chronischer Bestrahlung mit solar simulierter Strahlung. Die genutzte Bestrahlungsquelle ermöglichte eine Bestrahlung in bisher unerreichter spektraler Auflösung bei möglichst genauer Abbildung des solaren Spektrums und physiologischen Expositionsdosen. Es wurden sowohl zelllinienspezifische als auch universelle miRNA-Veränderungen in Folge der cSS-Bestrahlung detektiert, die auf individuelle und konservierte Elemente der Strahlenantwort hinwiesen. Weiterhin zeigte sich, dass die Tumorheterogenität einen essentiellen Einfluss auf die miRNA-Expression und Strahlungssensitivität hatte. In Tumorproben wurde sowohl ein hochreguliertes onkogenes miRNA-Sets als auch ein reprimiertes tumorsuppressives miRNA-Set gefunden, das in die (UV-)Strahlenantwort involviert ist. Obwohl miR-205-5p nach cSCC-Bestrahlung und in Tumorproben übereinstimmend herunterreguliert war, konnten in Knockdown-Experimenten keine phänotypischen Veränderungen nachgewiesen werden. Die künstliche Aktivierung des assoziierten TGF- $\beta$ -Pathways führte hingegen zu einem molekularen EMT-Switch, durch eine erhöhte N-Cadherin- und Vimentin-Expression sowie die verringerte E-Cadherin-Expression. Dies ging mit einem erhöhten Migrations- und Invasionspotential von cSCC-Zellen *in vitro* einher. TGF- $\beta$ 1 fördert somit die Progression des cSCCs und begünstigt Metastasierungsprozesse. Insgesamt zeigte sich eine komplexe Regulation von zellulären Prozessen durch solare Strahlung, die teilweise zur Tumorprogression beiträgt.



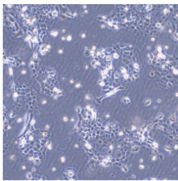
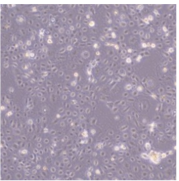
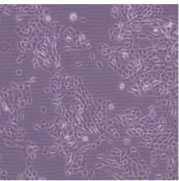
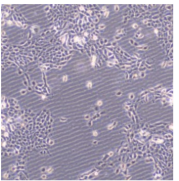
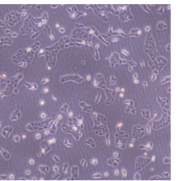
**Abbildung 6.1: Visuelle Repräsentation des Workflows.** Die Abbildung fasst die Rationale für die Analyse von miRNAs und Pathways im Zusammenhang mit ihrer möglichen Involvierung in die cSCC-Progression zusammen.

## 6.1 Die Tumorerheterogenität ist assoziiert mit distinkten Veränderungen der miRNA-Expression und der Strahlungssensitivität

Das primäre Ziel der Arbeit war die Untersuchung des miRNA-Musters in cSCC-Zelllinien nach Bestrahlung. Allerdings zeigte sich in der Hauptkomponentenanalyse (s. Abbildung 5.1), dass insbesondere auch bestrahlungsunabhängige Differenzen im miRNA-Expressionsmuster zwischen den Zelllinien vorhanden waren. Diese Unterschiede legten die Existenz von drei unterschiedlichen Gruppen nahe (s. Abbildung 5.1

## 6.1 Einfluss der Tumorerogenität auf miRNA-Expression und Strahlungssensitivität

und Abbildung 5.2). Die Gruppenzugehörigkeiten ließen sich anhand bereits beschriebener Merkmale der Zelllinien erklären und spiegelten den Differenzierungsstatus, den p53-Mutationsstatus sowie die Herkunft der Zelllinien wider. Die hoch differenzierten Zelllinien SCC-12 und SCC-13 sind p53-defizient und repräsentieren einen aggressiven Phänotyp, gezeigt durch eine 100 %ige Tumorinduktion in Nacktmäusen (vgl. Abschnitt 3.8). Met-1 und Met-4 exprimieren eine intakte Version von p53 und sind weniger differenziert sowie weniger tumorigen (50 % Tumorinduktion in Nacktmäusen) als SCC-12 und SCC-13. SCL-II als undifferenzierte und p53-defiziente Zelllinie mit einer Tumorigenität von 64 % in Nacktmäusen, passte in keines der beiden Cluster und bildete die dritte Gruppe. Eine Zusammenfassung wichtiger zellspezifischer Merkmale ist in Abbildung 6.2 gegeben.

	SCC-13	SCC-12	Met-1	Met-4	SCL-II
Ploidie	Hyperdiploid	Hypotetraploid	Diploid	Hypotetraploid	Hypodiploid
Art des Tumors	Primärtumor	Primärtumor	Primärtumor	Lymphknotenmetastase	Primärtumor
p53-Mutation	+	+	-	-	+
H-ras Mutation (Codon 12)	+	+	-	-	-
Tumorigenität in Nacktmäusen	100%	100%	50%	50%	64%
Morphologie					

Differenzierungsgrad

**Abbildung 6.2: Vergleich genetischer und phänotypischer Merkmale der fünf untersuchten Zelllinien.** Dargestellt ist eine Übersicht zur Unterscheidung relevanter Merkmale für die Zelllinien Met-1, Met-4, SCC-12, SCC-13 und SCL-II. Für weitere Informationen vgl. Abschnitt 3.8.

Quantitativ zeigte sich dies durch zelllinienspezifische miRNA-Expressionsmuster (s. Abbildung 5.2A) und die Überrepräsentation distinkter miRNA-Sets in einzelnen Zelllinienclustern. In SCC-12 und SCC-13 waren insgesamt elf miRNAs im Vergleich zu Met-1, Met-4 und SCL-II überexprimiert. Eine Hochregulation dieses 11-miRNA-Sets war assoziiert mit der Inhibition der Zellmotilität (TGF- $\beta$ -Pathway [204], ECM-Rezeptor Interaktion [205]) und des Zellwachstums (mTOR-Signalweg [189], ERBB2-Signalweg [206]) (s. Abbildung 5.2B). Diese zunächst widersprüchliche Erkenntnis eines tumorsuppressiven miRNA-Sets in den aggressiven Zelllinien SCC-12 und SCC-13 wurde durch die Expression eines ebenfalls tumorsuppressiven 7-miRNA-Sets in SCL-II bzw. eines 14-miRNA-Sets in Met-1 und Met-4 abgeschwächt. Das 7-miRNA-Set in SCL-II war mit der Inhibition des Zellwachstums (u.a. WNT-Signalweg [190], ERBB2-Signalweg [206], MAPK-Signalweg [207]) sowie des Tumorwachstums (u.a. Melanom, Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom) assoziiert (s. Abbildung 5.2C). Das 14-miRNA-Set in Met-1 und



Met-4 inhibiert neben Zellwachstum (u.a. MAPK-Signalweg [207], ERBB-Signalweg [206]) und Zellmotilität (mTOR-Signalweg [189]) ebenfalls das Tumorwachstum (u.a. Melanom, Kolorektalkarzinom, Pankreaskarzinom) (s. Abbildung 5.2D). Beim Vergleich der gesamten Zellliniencluster (s. Abbildung A.1) zeigte sich lediglich bei Met-1 und Met-4 die Repression tumorrelevanter Signaltransduktionswege (ERBB-Signalweg [206], mTOR-Signalweg [189]) und Inhibition von Genen, die in die Entstehung diverser Tumorentitäten (u.a. Melanom, Prostatakarzinom) involviert sind. Zusammenfassend liefern die Ergebnisse eine mögliche Erklärung für die geringere Tumorigenität von Met-1 und Met-4 (vgl. Abschnitt 3.8, Abbildung 6.2) im Vergleich zu den anderen Zelllinien.

Interessanterweise waren die intraindividuellen Unterschiede zwischen Primärtumor (Met-1) und Lymphknotenmetastase (Met-4) geringer ausgeprägt als interindividuelle Unterschiede zwischen unterschiedlichen Primärtumoren (Met-1, SCL-II, SCC-12, SCC-13). Diese Beobachtung war überraschend, da Zellen aus einem Primärtumor im Metastasierungsprozess eine Vielzahl von Schritten durchlaufen, die mit der umfassenden Änderung des Genexpressionsprofils einhergehen [208]. Zu diesen Schritten zählen (1) die lokale Invasion, (2) die Intravasation, (3) das Überleben in der Blutzirkulation, (4) die Extravasation, (5) die Formation von Mikrometastasen und (6) die metastatische Kolonisation [209]. Dass eine solche Transformation weniger Veränderungen im miRNA-Expressionsmuster hervorruft als in Primärtumoren der gleichen Tumorentität vorhanden sind, unterstreicht das Ausmaß der Tumorheterogenität zwischen unterschiedlichen Patienten, die einer der Treiber für das zunehmende Interesse an personalisierter Medizin ist [210, 211].

Neben Expressionsunterschieden in den Zelllinien konnten zusätzlich signifikante Differenzen in der Strahlungssensitivität beobachtet werden, die mit dem p53-Mutationsstatus korrelierten. So wiesen p53-defiziente Zelllinien (SCC-12, SCC-13 und SCL-II) eine deutlich höhere Strahlungssensitivität (s. Abbildung 5.7A) als Met-1 und Met-4 auf. Der Tumorsuppressor p53 ist involviert in eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse und steuert als zentrale Regulationsinstanz vor allem das Zellschicksal nach Schädigung der DNA im Rahmen der DDR [212]. Dies beinhaltet neben dem Zellzyklusarrest, Förderung der DNA-Reparatur und Induktion der Apoptose bei irreparablen Schäden [213] – wie einleitend beschrieben (vgl. Abschnitt 1.3.3) – auch die Regulation von miRNAs. Eine fehlerhafte DDR aufgrund nicht vorhandener p53-Aktivität und die infolgedessen gestörte miRNA-Regulation ist daher eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede.

Trotz unterschiedlicher Strahlungssensitivität waren Überschneidungen der drei am stärksten regulierten miRNAs vorhanden. Die Regulation deutete auf einen induktiven Charakter solarer Strahlung auf die miRNA-Expression hin (s. Abbildung 5.7C). Zu einem ähnlichen Schluss kamen wir bereits in einer früheren Studie [150], bei der 75 % der differentiell regulierten miRNAs nach akuter UV-Bestrahlung in Met-1 induziert wur-

den. Die Induktion von acht der neun differentiell exprimierten miRNAs (vgl. Abschnitt 5.3) stützte diese Beobachtung. Hinweise für die Funktion der strahlungssensitiven miRNAs (miR-30a-3p, miR-146a-5p, miR-503-5p) konnten durch eine Netzwerk- und anschließende Pathway-Analyse gewonnen werden. Die für das Voranschreiten des Zellzyklus essentiellen Proteine Cyclin D1 und D2 (codiert von *CCND1* bzw. *CCND2*) [214], waren ebenso wie *NOTCH1* und *SMAD2* Ziele des 3-miRNA-Sets (s. Abbildung 5.7B). *NOTCH1* reguliert den Zellzyklus durch die erleichterte Bildung der G1-Proteine Cyclin D3 sowie CDK4 und CDK6 [215]. Darüber hinaus steuert der Notch-Signalweg u.a. die Proliferation und ist beteiligt an Prozessen wie Wundheilung und Kanzerogenese [216, 217]. Das Signaltransduktionsprotein Smad2 ist involviert in den TGF- $\beta$ -Pathway, inhibiert das Zellwachstum und fördert die Zellmigration [218]. Insgesamt führt die Expression des Zielgennetzwerks zum Voranschreiten des Zellzyklus. Eine kooperative Regulation der Target-mRNAs durch das 3-miRNA-Set hat somit wahrscheinlich die Inhibition des Zellzyklus durch Repression der Translation der genannten Proteine zur Folge. Dies deckt sich mit einem Zellzyklusarrest nach Bestrahlung im Zuge der DDR [219].

Zusammenfassend ist die interindividuelle Tumorerogenität *in vitro* zwischen Primärtumorzelllinien der gleichen Entität größer als die intraindividuelle Tumorerogenität zwischen Primärtumor und Metastase. Die Tumorerogenität hängt außerdem mit der differentiellen miRNA-Expression sowie p53-abhängigen Unterschieden in der Strahlungssensitivität im cSCC *in vitro* zusammen. Diese Unterschiede sollten insbesondere für zukünftige *in vitro* Bestrahlungsexperimente berücksichtigt werden, um individuelle Differenzen in der Strahlenantwort abzubilden.

## 6.2 Chronische cSS-Exposition führt zu universellen und spezifischen Alterationen der miRNA-Expression im cSCC

Die differentielle Expressionsanalyse nach chronischer cSS-Bestrahlung zeigte die zelllinienspezifische Hochregulation von miR-126-3p, miR-30a-3p, miR-146a-3p und miR-7-5p (s. Abbildung 5.4). Die zuvor diskutierten Aspekte der Tumorerogenität (vgl. Abschnitt 6.1) haben vermutlich einen Einfluss auf diese spezifische Strahlenantwort. Insbesondere die Differenzen in der Funktionalität von p53 als zentralem Element der DDR werden das Expressionsmuster nach Bestrahlung voraussichtlich beeinflussen. Ähnliche Beobachtungen einer zellspezifischen Strahlenantwort konnten zwischen Keratinozyten und HeLa-Zellen gemacht werden [220]. Darüber hinaus konnte in Kolonkarzinom- (HCT116) und Melanomzelllinien (Me45) eine spezifische Strahlenantwort nach UVA-Bestrahlung nachgewiesen werden [221]. Diese Unterschiede spiegeln

jedoch Differenzen zwischen Zelltypen unterschiedlicher Gewebe wider. Die Datenlage zu zelltypabhängigen Unterschieden in Zelllinien der gleichen Zellart ist in Bezug auf die UV-Strahlenantwort hingegen unzureichend. Die Evidenz kann jedoch durch Untersuchungen im Bereich ionisierender Strahlung ergänzt werden. In der Strahlentherapie zeigten sich beispielsweise intratumorale Differenzen bei der Radiosensitivität von Gliomen [222] und Ösophaguskarzinomen [223]. Unterstützend konnten spezifische Strahlenantworten in radiosensitiven und radioresistenten Kopfhalstumorzelllinien (HNSCC) [224, 225], die einige Merkmale kutaner SCCs teilen [226], beobachtet werden.

Die Strahlenantwort nach ionisierender Strahlung und solarer Strahlung unterscheidet sich in Hinblick auf die primär verursachten Schäden. Ionisierende Strahlung ist durch die hohe Strahlungsenergie von mehr als 100 eV in der Lage Doppelstrangbrüche (DSBs) in der DNA-Helix zu induzieren, die primär durch *non homologous end-joining* (NHEJ) [227] und in geringerem Ausmaß durch homologe Rekombination (HR) [228] repariert werden. Solare Strahlung – insbesondere UV-Strahlung – führt hingegen zu oxidativen Schäden und CPDs (vgl. Abschnitt 1.2.4), die durch die BER oder NER repariert werden. Trotz der beschriebenen Unterschiede gibt es Gemeinsamkeiten in der Strahlenantwort [229]. Der intrazelluläre Schadenssensor ATM detektiert z.B. sowohl DSBs als auch UV-induzierte Schäden [227, 229] und spielt eine Rolle bei der Aktivierung von HR, NHEJ, BER und NER [227–229]. Ergänzt wird diese Interaktion durch den Crosstalk von ATM und ATR, das ebenfalls die Schadensantwort beider Strahlungsentitäten reguliert [230].

Daher können Ergebnisse von Experimenten mit ionisierender Strahlung und Experimente unter Verwendung von UV-Strahlung oder solarer Strahlung in einem gewissen Rahmen miteinander verglichen werden. Unter Berücksichtigung der diskutierten Ergebnisse mit ionisierender Strahlung und den Beobachtungen nach cSCC-Bestrahlung aus dieser Studie scheint eine zelllinienspezifische Strahlenantwort somit häufig vorzukommen und ist vermutlich eine Konsequenz der Tumorerheterogenität.

Zusätzlich zu den spezifischen miRNA-Alterationen konnte die universelle Hochregulation von miR-30d-5p, miR-183-5p, miR-200a-3p, und miR-424-5p sowie die verringerte Expression von miR-205-5p nach chronischer cSS-Bestrahlung nachgewiesen werden (s. Abbildung 5.5). Diese Beobachtungen sprechen für die Mitwirkung dieser miRNAs in Pathways, die im Rahmen einer konservierten Strahlenantwort zelllinienübergreifend Effekte mediiieren. In der Tat sind zumindest Teile der DDR nicht nur in einzelnen Geweben oder Zelltypen vergleichbar, sondern zwischen Tieren, Pflanzen und Pilzen konserviert [231]. Unterstützend konnte bereits 1994 gezeigt werden, dass die UV-Strahlenantwort zwischen Säugetieren und Hefe in Bezug auf die Aktivierung des Ras-Signalwegs konserviert ist [232], ebenso wie Gemeinsamkeiten in der UV-Strahlenantwort zwischen Enchyträen (*Enchytraeus crypticus*) und Menschen gefunden wurden [233]. Gemeinsamkeiten in der Strahlenantwort trotz großer phylogenetischer

Distanz zwischen den beschriebenen Reichen bzw. Spezies unterstreichen die Wichtigkeit einer funktionierenden (UV)-Strahlenantwort bzw. DDR, die sich zu Teilen bereits früh in der Stammesgeschichte entwickelte.

Zusammenfassend ist die Strahlenantwort im cSCC zusammengesetzt aus konservierten Elementen, die speziesübergreifend ähnliche Pathways und Proteine umfasst, sowie Aspekten die zelltypspezifisch sind und mit der Tumorerheterogenität zusammenhängen. Beide Effekte wurden innerhalb dieser Studie durch ein zelllinienspezifisches bzw. universelles miRNA-Muster widerspiegelt.

### 6.2.1 Funktion der differentiell exprimierten miRNAs

Für die Einordnung der beschriebenen miRNA-Veränderungen in den Kontext der Kanzerogenese bzw. der Progression und Metastasierung werden im Folgenden die Funktionen der differentiell exprimierten miRNAs auf zellulärer Ebene und in verschiedenen Tumorentitäten erläutert. Aufgrund der kooperativen Bindung an die Target-mRNA und der damit verbundenen komplexen Regulation durch miRNAs ist eine Netzwerkanalyse gemeinsamer Targets sinnvoll, um die biologische Funktion der miRNAs aufzuschlüsseln. Eine Netzwerkanalyse des hochregulierten 8-miRNA-Sets (s. Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5) zeigte primär die Inhibition prominenter Protoonkogene wie z.B. *MYC*, *KRAS* und *EGFR* [187, 188] sowie von Genen, die in den Notch-Signalweg (*NOTCH1*, *NOTCH2*) [216, 217] oder die Zellzyklusregulation (*CCNE1*<sup>1</sup>, *CDK6*) [214, 215] involviert sind (s. Abbildung 5.6A). Diese Beobachtungen gehen mit einer Inhibition von Signalwegen des Zellwachstums (mTOR-Signalweg [189], WNT-Signalweg, [190]) und der Tumorsuppression von u.a. Prostatakarzinom und Melanom einher (s. Abbildung 5.6B). Im Kontrast zu diesem tumorsuppressiven Profil des 8-miRNA-Sets steht die erhöhte miR-200a-3p Expression in metastatischen cSCCs verglichen mit Primärtumoren [234] und die mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) nachgewiesene Überexpression von miR-424-5p im cSCC [235]. Diese Ambivalenz deutet ein komplexes miRNA-Expressionsmuster im cSCC und die kontextabhängige Funktion von miRNAs als Tumorsuppressoren oder Onkogenen an, die bereits für eine Vielzahl verschiedener Krebsentitäten beschrieben wurde [236].

Die bestrahlungsspezifischen Effekte auf das miRNA-Muster waren größtenteils kongruent mit Daten aus der Literatur. So konnten wir bereits *in vitro* zeigen, dass die miR-183-5p Expression durch akute UVB-Bestrahlung und die miR-424-5p Expression durch die Kombination akuter UVA+UVB-Bestrahlung in Met-1 induziert wird [150]. Eine ebenfalls beobachtete miR-183-5p Induktion in murinen Retinaprobe durch VIS-Exposition stützt diese strahlungsvermittelte miRNA-Expression [130]. Eine erhöhte miR-146a-5p Expression wurde bisher nach cSS- oder UV-Bestrahlung nach unserem

---

<sup>1</sup>CCNE1: Cyclin D

Kenntnisstand noch nicht beschrieben, ist durch die UV-vermittelte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs [237, 238], der die miR-146a-5p Expression fördert [239], aber wahrscheinlich. Für die beobachtete miR-30a-3p und miR-126-3p Expression ist die Involvierung in Hautalterungsprozesse [240, 241] und der UV-medierte Prozess des Photoaging [242] eine mögliche Erklärung des Zusammenhangs von cSS-Bestrahlung und Expressionsveränderungen. Veränderungen der miR-200 Familie (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 und miR-429), wurden ebenfalls nach UV-Exposition beschrieben, sind jedoch ambivalent. Einerseits führte UVB-Strahlung in muriner Epidermis zur Inhibition von miR-141 [243]. Andererseits wurde miR-200c-3p durch oxidative Schäden hochreguliert und medierte Apoptose sowie Seneszenz durch *ZEB1*-Inhibition in Endothelzellen [244]. Alterationen der miR-7-5p und miR-30d-5p Expression nach cSS- oder UV-Bestrahlung sind in der Literatur noch nicht beschrieben. Eine Strahlenantwort nach ionisierender Bestrahlung führte jedoch ebenfalls zur Induktion von miR-7-5p [245] und miR-30d-5p [246].

Da miR-205-5p als einzige miRNA sowohl in den untersuchten Zelllinien nach Bestrahlung (s. Abbildung 5.5) als auch im Tumorgewebe (s. Abbildung 5.8) herunterreguliert wurde, war sie nicht Teil der oben beschriebenen Netzwerkanalyse und ihre Funktion wird im Folgenden näher charakterisiert. miR-205-5p ist gemeinsam mit der gesamten miR-200 Familie zentraler Regulator der TGF- $\beta$ -induzierten EMT. Kooperativ inhibieren die genannten miRNAs die Transformation zu einem mesenchymalen Phänotyp durch Inhibition der *ZEB1/ZEB2*-Expression und dem damit verbundenem Erhalt der E-Cadherin-Expression [191]. Auf der anderen Seite ist die Phosphatase SHIP2 (codiert vom *INPPL1*-Gen) Ziel von miR-205-5p. Die Regulation von SHIP2 durch miR-205-5p führt zur Aktivierung des TGF- $\beta$ /Akt-Signalwegs und erhöhten Migrationsraten in Keratinozyten [195]. Bei dieser miRNA wird erneut die kontextabhängige Funktion als Tumorsuppressor-miRNA oder onco-miR deutlich. Sie ist beispielsweise im Melanom oder Prostatakarzinom herunterreguliert, weist im HNSCC jedoch eine erhöhte Expression auf [247]. Im cSCC gibt es widersprüchliche Daten aus der Literatur. Cañueto *et al.* beschreiben miR-205-5p als onco-miR im cSCC, die mit einer schlechteren Prognose von cSCC-Patienten korreliert ist [248]. In Einklang damit steht eine 2013 veröffentlichte Studie, die Gewebeproben von cSCC-Patienten und immunkompetenten Probanden verglich und erhöhte miR-205-5p Level im Gewebe von cSCC-Patienten nachweisen konnte [104]. Kontrastierend dazu war miR-205-5p im metastatischen cSCC geringer exprimiert als in Primärtumoren [234]. In dieser Studie konnten wir darüber hinaus eine verringerte miR-205-5p Expression in cSCC-Proben verglichen mit Hautproben gesunder Probanden nachweisen (s. Abbildung 5.8). Außerdem zeigte eine integrative Studie, die *single cell RNA sequencing* (scRNA-seq) und *assay for transposase-accessible chromatin using sequencing* (ATAC-seq) kombinierte, die Promotorhypermethylierung (einhergehend mit einer Repression) des für miR-205-5p codierenden Gens in einer

undifferenzierten Subpopulation von cSCC-Tumorproben [249]. Ergänzend führte die Re-Expression von miR-205-5p im Mausmodell zur Inhibition der cSCC-Progression durch Repression von EMT-Zielgenen [250]. Dziunycz *et al.* konnten hingegen keine Expressionsveränderungen im cSCC-Gewebe feststellen, beobachteten jedoch eine erhöhte miR-205-5p Expression nach UVA-Bestrahlung und eine verringerte miR-205-5p Expression nach UVB-Bestrahlung in humanen Keratinozyten [251].

Insgesamt zeigt sich eine komplexe Rolle von miR-205-5p in Tumoren – insbesondere im cSCC – und die enge Verknüpfung mit dem TGF- $\beta$ -Pathway sowie der Regulation der EMT. Eine wellenlängenabhängige Induktion (UVA [251]) bzw. Repression (UVB [251], cSS in dieser Studie) nach Bestrahlung konnte ebenfalls nachgewiesen werden und unterstreicht den Zusammenhang von (UV-)Strahlung und cSCC. Aufgrund der ambivalenten Rolle von miR-205-5p und widersprüchlicher Evidenz zu ihrer Funktion im cSCC sowie der verringerten Expression im metastatischen cSCC und in Tumorproben, die im Rahmen dieser Studie analysiert wurden, entschieden wir uns den Einfluss dieser miRNA sowie des assoziierten TGF- $\beta$ -Pathways auf die cSCC-Progression näher zu charakterisieren (vgl. Abschnitt 6.3 bzw. Abschnitt 6.4).

### 6.2.2 Komplementäre Analyse der miRNA-Expression im cSCC-Tumorgewebe

Für einen Transfer der gesammelten *in vitro* Daten in die *in vivo* Situation, wurden Tumorproben aus Primärtumoren und metastatischen cSCCs mit sonnengeschützter bzw. sonnenexponierter Haut gesunder Probanden verglichen. Ein putativer Einfluss der Sonnenlichtexposition auf das miRNA-Muster konnte *in vivo* nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 5.8A), obwohl einige differentiell exprimierte miRNAs in die (UV-)Strahlenantwort involviert waren (s. Tabelle A.3). Der Vergleich von Tumorproben zu den aggregierten Hautproben (sonnengeschützt + sonnenexponiert) zeigte hingegen die differentielle Expression von 23 miRNAs (s. Abbildung 5.8A). Die Überexpression von miR-21-5p, miR-31-5p und miR-155-5p ist im Einklang mit bereits publizierten Daten. miR-21 ist die am häufigsten hochregulierte miRNA in soliden sowie hämatologischen Tumoren und wird daher allgemein als onco-miR charakterisiert [8]. Eine miR-21 Überexpression führt im cSCC durch Repression von *GRHL3*<sup>2</sup> und *PTEN* zur Aktivierung des PI3K<sup>3</sup>/AKT<sup>4</sup>/mTOR-Signalwegs und Induktion aggressiver cSCCs [106, 252]. miR-31 ist im cSCC ebenfalls überexprimiert und mediiert onkogene Prozesse durch Inhibition des Tumorsuppressors *RHOBTB1*<sup>5</sup> [105]. Außerdem wurde *in vitro* gezeigt, dass die Blockade endogener miR-31 Expression die Zellmotilität und

---

<sup>2</sup>GRHL3: Grainyhead-like 3

<sup>3</sup>PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase

<sup>4</sup>AKT: Proteinkinase B

<sup>5</sup>RHOBTB1: Rho Related BTB Domain Containing 1

Fähigkeit der Koloniebildung in UT-SCC-7 Zellen supprimiert [253]. miR-155-5p spielt eine wichtige Rolle in immunologischen Prozessen [254] und war in cSCC-Proben im Vergleich zu Hautproben induziert [104].

Die kooperative Regulation gemeinsamer Zielgene legt die Inhibition der Transkriptionsfaktoren *E2F2*, *FOXO3* und *SP1* sowie des Muskelproteins Dystrophin (*DMD*) nahe (s. Abbildung 5.8B). *E2F2* ist Teil der *E2F*-Familie und inhibiert die Myc-induzierte Proliferation sowie Tumorigenese im Mausmodell [255, 256]. *FOXO3* ist ein Downstream-Target der PI3K-Akt-, Ras-ERK- und JNK<sup>6</sup>/p38/MAPK-Signaltransduktionswege. Die Phosphorylierung von *FOXO3* infolge einer Aktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs führt beispielsweise zur *FOXO3*-Inhibition, die mit der Tumorigenese assoziiert ist [257]. *SP1* kann eine Vielzahl von Tumorsuppressoren und Onkogenen sowohl aktivieren als auch reprimieren, sodass diesem Transkriptionsfaktor eine komplexe und kontextabhängige Rolle zugeschrieben wird [258]. Dystrophin ist ein Protein, das hauptsächlich mit der Krankheit Duchenne Muskeldystrophie in Verbindung gebracht wird. Allerdings zeigte sich in den letzten Jahren, dass Dystrophin eine Rolle in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren spielt und häufig inaktiviert ist, sodass eine tumorsuppressive Funktion angenommen werden kann [259]. Insgesamt wirkt das Zielgenetzwerk tumorsuppressiv und wird durch die kooperative Regulation des 3-miRNA-Sets inhibiert, sodass die Charakterisierung als onkogenes miRNA-Netzwerk untermauert werden kann. Eine fehlende differentielle Regulation von KEGG-Pathways (mit Ausnahme von *AXON\_GUIDANCE*) ist möglicherweise durch die geringe Anzahl an miRNAs als Input bedingt, sodass die statistische Power signifikant angereicherte Pathways zu detektieren, limitiert ist (s. Abbildung 5.8D).

Die verringerte Expression des 13-miRNA-Sets im cSCC-Gewebe war mit der kooperativen Regulation des Tumorsuppressors *PTEN* sowie der proto-Onkogene *ZEB1*, *ZEB2*, *JUN*, *BCL2*, *VEGFA*, *LMNB1* und *NUFIP2* assoziiert (s. Abbildung 5.8C). Diese sind in essentielle Prozesse der Karzinogenese wie EMT, Inhibition der Apoptose, Angiogenese und Zellwachstum involviert [260–265]. Die erhöhte Expression dieses proto-onkogenen Netzwerks durch eine Herunterregulierung des miRNA-Sets war korreliert mit der Aktivierung tumor-assoziiierter Pathways (s. Abbildung 5.8E). Diese waren u.a. involviert in das Zellwachstum (ERBB-Signalweg, MAPK-Signalweg), die Zellmigration (Fokale Adhäsion, MAPK-Signalweg) und die Tumorbildung (*PATHWAYS\_IN\_CANCER*). Sowohl die Funktion der am stärksten regulierten Gene durch das miRNA-Set als auch die Pathway-Analyse unterstützen daher die These einer tumorsuppressiven Funktion des 13-miRNA-Clusters im cSCC.

Generell konnte zwar keine graduelle, strahlungsinduzierte miRNA-Prägung nachgewiesen werden. Die Tumorigenese wird jedoch vermutlich durch Hochregulation des onkogenen 3-miRNA-Sets mit nachfolgender Inhibition tumorsuppressiver Faktoren

---

<sup>6</sup>JNK: C-Jun-N-terminale Kinase

sowie der Herunterregulation des tumorsuppressiven 13-miRNA-Sets und anschließender Aktivierung der Translation onkogener Proteine gefördert. Darüber hinaus ist das 13-miRNA-Set in die (UV-)Strahlenantwort involviert (s. Tabelle A.3), sodass die Verbindung von miRNA-Expression, Tumorentstehung und (UV-)Strahlung hervorgehoben wird.

### 6.3 Der Knockdown von miR-205-5p induziert keine phänotypischen Veränderungen im cSCC *in vitro*

Die Rolle von miR-205-5p im cSCC ist ambivalent (vgl. Abschnitt 6.2.1). Hinweise aus dieser Studie legen jedoch die Hypothese einer tumorsuppressiven Funktion nahe. Zur Prüfung dieser These sollte der Einfluss eines miR-205-5p Knockdowns auf die Expression ausgewählter Zielgene, die in die Tumorprogression des cSCCs involviert sind, untersucht werden. Als weitere Endpunkte wurden Veränderungen des Zellzyklus, des Zellwachstums, der Apoptose und der Zellmigration, als Bestandteil der *Hallmarks of Cancer* [69], nach miR-205-5p Knockdown mittels Antagomir analysiert.

Die Behandlung mit einem miR-205-5p Inhibitor führte zum langanhaltenden Knockdown ( $\geq 144$  h), der am ausgeprägtesten nach 72 h war (s. Abbildung 5.9A). Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen aus einer Studie von De Cola *et al.* überein, in der ebenfalls der miRCURY LNA miR-205-5p Inhibitor (Qiagen) benutzt wurde und ein Knockdown mit ähnlicher Kinetik und Ausprägung in Brustkrebszelllinien nachgewiesen wurde [266]. Trotz dieser langanhaltenden Inhibition der miR-205-5p Expression war nur eine transiente Induktion von validierten Zielgenen nach 24 h vorhanden, die sich bereits nach 72 h wieder dem Ausgangslevel angleich (s. Abbildung 5.9B).

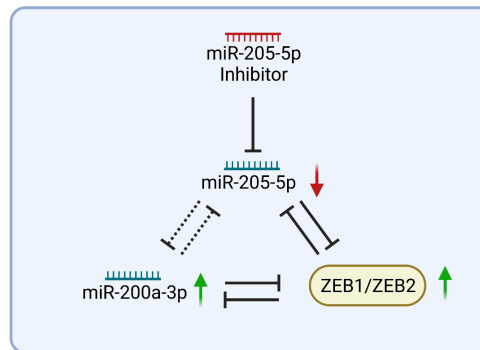
Eine mögliche Erklärung für die Normalisierung der Zielgen-Expression trotz langanhaltendem miR-205-5p Knockdown ist ein Regulationsmechanismus unter Mitwirkung von miR-200a-3p aufgrund von Überschneidungen im Zielgen-Netzwerk (s. Abbildung 5.10A) und der Induktion von miR-200a-3p nach miR-205-5p Inhibition (s. Abbildung 5.10C). Diese Beobachtungen erlauben die Spekulation einer teilweise komplementären Funktion der beiden miRNAs.

Insbesondere der miR-200/miR-205/ZEB1/ZEB2 Feedback-Loop ist interessant in diesem Kontext, da die miR-200 Familie zusammen mit miR-205-5p die ZEB1/ZEB2-Expression inhibiert. ZEB1 und ZEB2 reprimieren wiederum die miR-200/miR-205 Expression [191]. Eine mögliche Erklärung der Beobachtungen in dieser Studie wäre daher die initiale Hochregulation von miR-200a-3p nach miR-205-5p Knockdown als Versuch die Zellhomöostase zu erhalten. Gleichzeitig wird die ZEB1/ZEB2-Expression durch niedrige miR-205-5p Level und erhöhte mRNA-Level induziert. miR-200a-3p führt im Anschluss vermutlich zur Repression der ZEB1/ZEB2-Expression, gezeigt



## 6 Diskussion

durch eine Rückkehr zum Ausgangszustand der Genexpression nach 72 h. Im gleichen Zuge ist die negative Regulation von miR-200a-3p durch ZEB1/ZEB2 wahrscheinlich, deren Expression ebenfalls nach 72 h wieder auf das Ausgangsniveau zurückfiel. Zur Überprüfung dieser Schlussfolgerung wäre die Aufklärung des Mechanismus hinter der miR-200a-3p Induktion infolge der miR-205-5p Inhibition nötig, um eine Kausalität nachzuweisen. Die vorgefundene Korrelation zwischen miR-200a-3p und miR-205-5p Expression gibt jedoch bereits erste Hinweise auf eine solche gegenseitige Regulation (schematisch dargestellt in Abbildung 6.3).



**Abbildung 6.3: Schematische Darstellung des miR-200/miR-205/ZEB1/ZEB2 Feedback-Loops.** miR-200a-3p und miR-205-5p regulieren die Transkriptionsfaktoren ZEB1/ZEB2 negativ. ZEB1 und ZEB2 inhibieren hingegen die miR-200a-3p und miR-205-5p Expression. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine ähnliche gegenseitige negative Regulation auch zwischen miR-200a-3p und miR-205-5p nahe, da miR-200a-3p nach miR-205-5p Inhibition induziert wurde. Roter Pfeil: In dieser Arbeit herunterreguliert. Grüner Pfeil: In dieser Arbeit hochreguliert. —: Inhibition. Erstellt mit biorender.com.

Dieses Beispiel verdeutlicht die Komplexität solcher Feedback-Loops, die aufgrund der Wichtigkeit für den Erhalt der Homöostase als konservierte Elemente sowohl in Eukaryoten [267] als auch in Prokaryoten [268] essentiell sind. miR-205-5p ist zusätzlich zum bereits beschriebenen Feedback-Loop in eine Vielzahl weiterer Feedback-Loops involviert, u.a. mit p63 [269], mit E2F1 und miR-342 [270] oder mit Notch2 und ZEB1 [271]. Diese Komplexität und Interkonnektivität verschiedener Pathways erschwert die genaue Entschlüsselung der molekularen Mechanismen, die schlussendlich zur Wiederherstellung initialer Genexpressionslevel führten.

Da miR-205-5p jedoch vermutlich mehrere hundert Zielgene reguliert [200], die in dieser Studie nicht alle untersucht wurden, sind Veränderungen des Phänotyps trotz geringer und lediglich transienter Genexpressionsveränderungen nicht auszuschließen. Für die Karzinogenese sind außerdem phänotypische Veränderungen, die als *Hallmarks of Cancer* [69] zusammengefasst wurden, wichtiger als einzelne Gen/Proteinveränderungen, da es eine Vielzahl redundanter Regulationsmechanismen [272, 273] in der Zelle gibt und erst der graduelle Verlust dieser Mechanismen zur Tumorentstehung führt [69, 274]. Die Untersuchung phänotypischer Veränderungen zeigte jedoch, dass der miR-205-5p Knockdown weder die Zellzyklusverteilung und das Zellwachstum (s. Abbildung 5.11) noch die Apoptoseinduktion (s. Abbildung 5.12) oder Zellmigration (s.

Abbildung 5.13) beeinflusste. Dieser Befund war insofern unerwartet, dass kontextabhängig sowohl aktivierende als auch inhibierende Funktionen von miR-205-5p auf die genannten Prozesse beschrieben wurden [247].

miR-205-5p wird in der Haut ubiquitär exprimiert [247] und war auch in den fünf untersuchten Zelllinien stark exprimiert (s. Abbildung 5.5). Der Knockdown von solch stark exprimierten miRNAs kann herausfordernd sein [275]. Trotz langanhaltender und bis zu 6-facher Verringerung der miR-205-5p Expression (s. Abbildung 5.9) durch die in dieser Arbeit verwendete Antagomir ist daher nicht auszuschließen, dass der Knockdown unzureichend war, um phänotypische Änderungen zu erzeugen. Ein effektiverer Knockdown könnte möglicherweise durch die Verwendung eines miRNA-Sponges [276] erreicht werden, der kompetitiv mit den mRNAs an die miRNAs bindet, anstatt die miRNA-Degradation zu fördern. Intrazelluläre miRNA-Sponges könnten darüber hinaus zur verminderten Wirksamkeit von Antagomirs, die in ihrem Aufbau miRNAs stark ähneln, führen. Es ist folglich nicht ausgeschlossen, dass sie von miRNA-Sponges gebunden und neutralisiert werden. Die Effektivität des Knockdowns wird jedoch durch die Ergebnisse von De Cola *et al.* – wie zuvor beschrieben – bestätigt, die mit ähnlichen Transfektionsbedingungen unter Verwendung der gleichen Antagomir, neben einem langanhaltenden miR-205-5p Knockdown, auch Veränderungen des Phänotyps nachweisen konnten [266]. Unterschiede bei der verwendeten Zelllinie sind eine mögliche Erklärung. Die zuvor beschriebene Komplementarität zwischen der miR-200 Familie und miR-205-5p sowie der putative Feedback-Mechanismus zwischen miR-200a-3p und den Targets von miR-205-5p bieten einen weiteren Erklärungsansatz für die Beobachtungen. Außerdem ist es möglich, dass in dem Kontext der cSCC-Progression die isolierte Inhibition einer miRNA nicht ausreichend ist, um phänotypische Veränderungen hervorzurufen. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse aus dem cSCC-Gewebe (s. Abbildung 5.8) unterstützt. Dort waren zusätzlich zur miR-205-5p Repression noch zwölf weitere miRNAs herunterreguliert, sodass ein messbarer Effekt möglicherweise erst durch simultane Modulation eines miRNA-Sets und die kooperative Regulation von Zielgenen auftritt. Vor diesem Hintergrund wäre in Zukunft die Untersuchung eines gemeinsamen Knockdowns von miR-205-5p und der miR-200 Familie interessant, um sowohl den putativen Feedback-Mechanismus als auch die Hypothese der kooperativen Regulation zu analysieren.

Insgesamt scheint die isolierte miR-205-5p Inhibition, trotz eines effektiven Knockdowns, keine intrazellulären Effekte im cSCC *in vitro* zu mediieren. Allerdings können miRNAs durch ihre Sekretion in den extrazellulären Raum als freie miRNAs oder durch Verpackung in extrazelluläre Vesikel (z.B. in Exosomen) zur interzellulären Kommunikation beitragen. Von Tumorzellen wird diese Kommunikation häufig genutzt, um das *microenvironment* zu ihren Gunsten zu verändern. Prominente Beispiele sind die Veränderungen des Genexpressionsprofils von Fibroblasten zu CAFs [277] oder die

Modulation des Immunsystems zu einem tolerogenen Phänotyp [278]. Für miR-205-5p sind hohe exosomale miRNA Level und die nachfolgende Aktivierung der Angiogenese eine häufige Beobachtung in unterschiedlichen Krebsentitäten [279–281]. Zwar wurde auch eine tumorsuppressive Funktion exosomaler miR-205-5p im Prostatakarzinom beschrieben [282]. Der Großteil der vorhandenen Evidenz deutet jedoch auf die Förderung onkogener Prozesse durch exosomale miR-205-5p hin. Vor dem Hintergrund der als ambivalent beschriebenen Funktion im cSCC, den Beobachtungen zum Einfluss exosomaler miR-205-5p auf die Krebsentstehung anderer Krebsarten und nicht vorhandener Evidenz zur Rolle von extrazellulärer miR-205-5p im cSCC, ergibt sich ein Ansatz für zukünftige Fragestellungen.

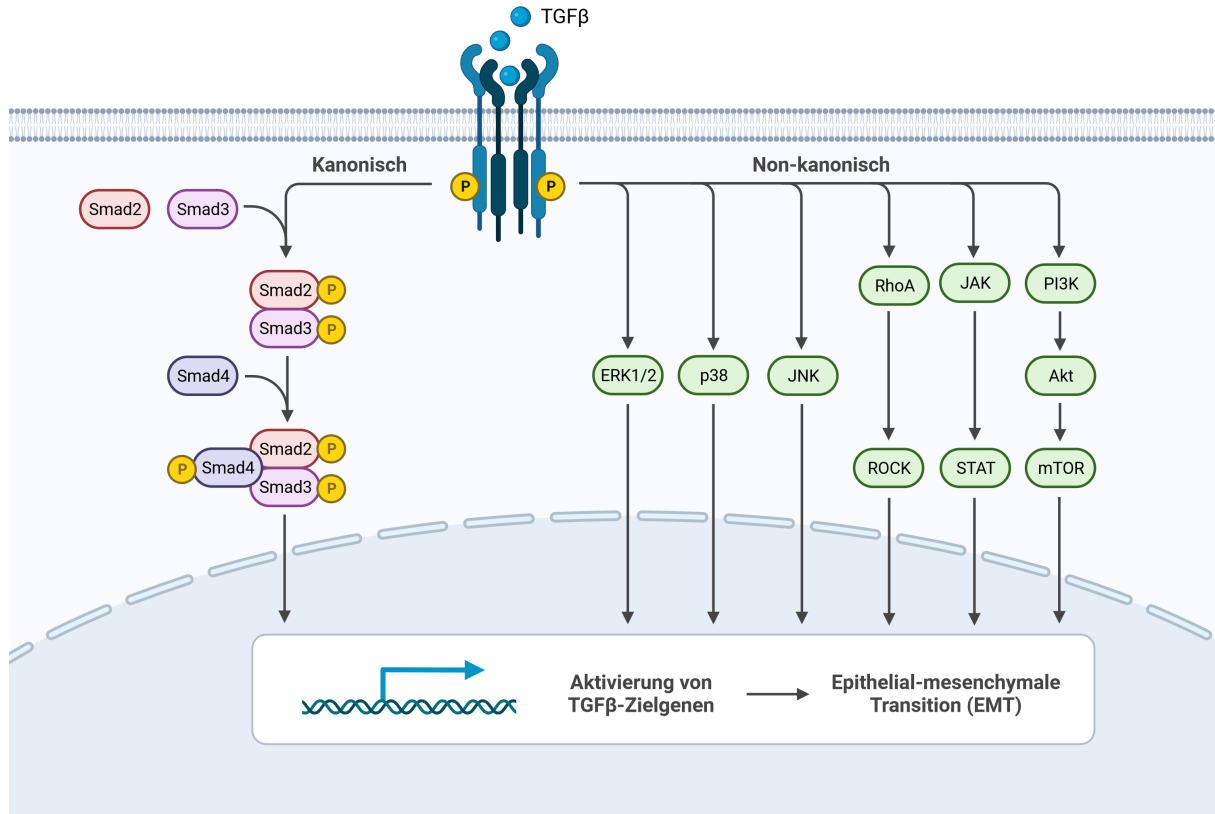
Zusammenfassend führte ein effizienter und langanhaltender miR-205-5p Knock-down im cSCC *in vitro* nicht zur Veränderung von Zellwachstum, Zellzyklus, Apoptose oder Zellmigration trotz verringerter miR-205-5p Expression im cSCC-Tumorgewebe. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine intrazelluläre Funktion von miR-205-5p im cSCC und legen einen Einfluss auf interzelluläre Prozesse nahe, da wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, miR-205-5p als Teil eines tumorsuppressiven miRNA-Sets herunterreguliert war. Dies zeigt die Ergebnisse die Notwendigkeit der Untersuchung von miRNA-Sets, die kooperativ gleiche Zielgene regulieren, anstatt der Analyse isolierter miRNAs.

### 6.4 Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways fördert die EMT im cSCC *in vitro*

TGF- $\beta$  kommt in drei Isoformen – TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 – vor, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind, u.a. Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Zelladhäsion und Migration [283]. TGF- $\beta$  bindet als Homodimer an den homodimeren Komplex des Transmembranproteins TGF- $\beta$ -Rezeptor II (TGFBRII). Diese Bindung führt zur Rekrutierung von zwei Molekülen TGF- $\beta$ -Rezeptor I (TGFBRI), die in der Folge durch die Serin/Threonin-Kinaseaktivität von TGFBRII phosphoryliert und aktiviert werden [284]. Die Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signaltransduktionskaskade erfolgt anschließend auf zwei unterschiedliche Arten: Die kanonische Signaltransduktion über den SMAD-Pathway oder die non-kanonische Signaltransduktion z.B. über den MAPK-Signalweg, den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg oder die Aktivierung von Proteinen der Ras- und Rho-Familie (s. Abbildung 6.4) [285].

Bei der Transformation zu einem mesenchymalen Phänotyp im Zuge der EMT spielt die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs durch TGF- $\beta$ 1 eine wichtige Rolle. Nach Bindung von TGF- $\beta$ 1 an den TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplex erfolgt die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt, die Inhibitoren des mTOR complex 1 phosphoryliert und

## 6.4 Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways fördert die EMT im cSCC *in vitro*



**Abbildung 6.4: Schematische Darstellung der kanonischen und non-kanonischen TGF- $\beta$ -Signaltransduktion.** Die Bindung von TGF- $\beta$  führt zur Assemblierung des heterotetrameren TGF- $\beta$ -Rezeptors, gefolgt von der Phosphorylierung der intrazellulären Domäne der TGFBR1-Untereinheiten durch die Kinaseaktivität von TGFBR2. Die kanonische Signaltransduktion erfolgt anschließend durch Phosphorylierung der Proteine Smad2 und Smad3, die dimerisieren und unter Rekrutierung von Smad4 zur Expression von TGF- $\beta$ -Zielgenen führen, die u.a. die Induktion der EMT fördern. Zusätzlich kann die Genexpression über eine Vielzahl non-kanonischer Signalwege (z.B. MAPK-Signalweg, PI3K/AKT/mTOR-Signalweg) aktiviert werden. Erstellt mit biorender.com.

zu deren Inaktivierung führt. In der Folge wird die ZEB1/ZEB2-Expression induziert. ZEB1 und ZEB2 begünstigen anschließend die Transformation zu einem mesenchymalen Phänotyp durch Hochregulation von Proteinen wie z.B. N-Cadherin, Vimentin, Snail, Slug und MMP-9/13 bei gleichzeitiger Herunterregulation des epithelialen Markers E-Cadherin [286]. Eine zentrale Regulationsinstanz dieser Signaltransduktionskaskade ist miR-205-5p über den miR-200/miR-205/ZEB1/ZEB2 Feedback-Loop (vgl. Abschnitt 6.3) und die Repression des kanonischen TGF- $\beta$ -Signalwegs durch Inhibition von Smad4, das normalerweise zusammen mit Smad2/3 die Expression von TGF- $\beta$ -Zielgenen induziert [287]. Innerhalb dieses Netzwerks spielen (UV-)Strahlung und oxidativer Stress eine wichtige Rolle, einerseits durch Repression der miR-205-5p Expression (s. Abbildung 5.5, [251, 288]). Andererseits aktiviert sowohl UV-Strahlung als auch oxidativer Stress den Schadenssensor ATM (vgl. Abschnitt 1.3.3), der im Anschluss die Expression von ZEB1/ZEB2 fördert [289]. Zusätzlich sind oxidativer Stress [283, 285] und UV-Strahlung [290] in der Lage TGF- $\beta$ 1 zu induzieren. Dabei können

sowohl Krebszellen als auch das umliegende Stroma TGF- $\beta$  produzieren, wodurch über autokrine oder parakrine Effekte das metastastische Potenzial katalysiert wird [285].

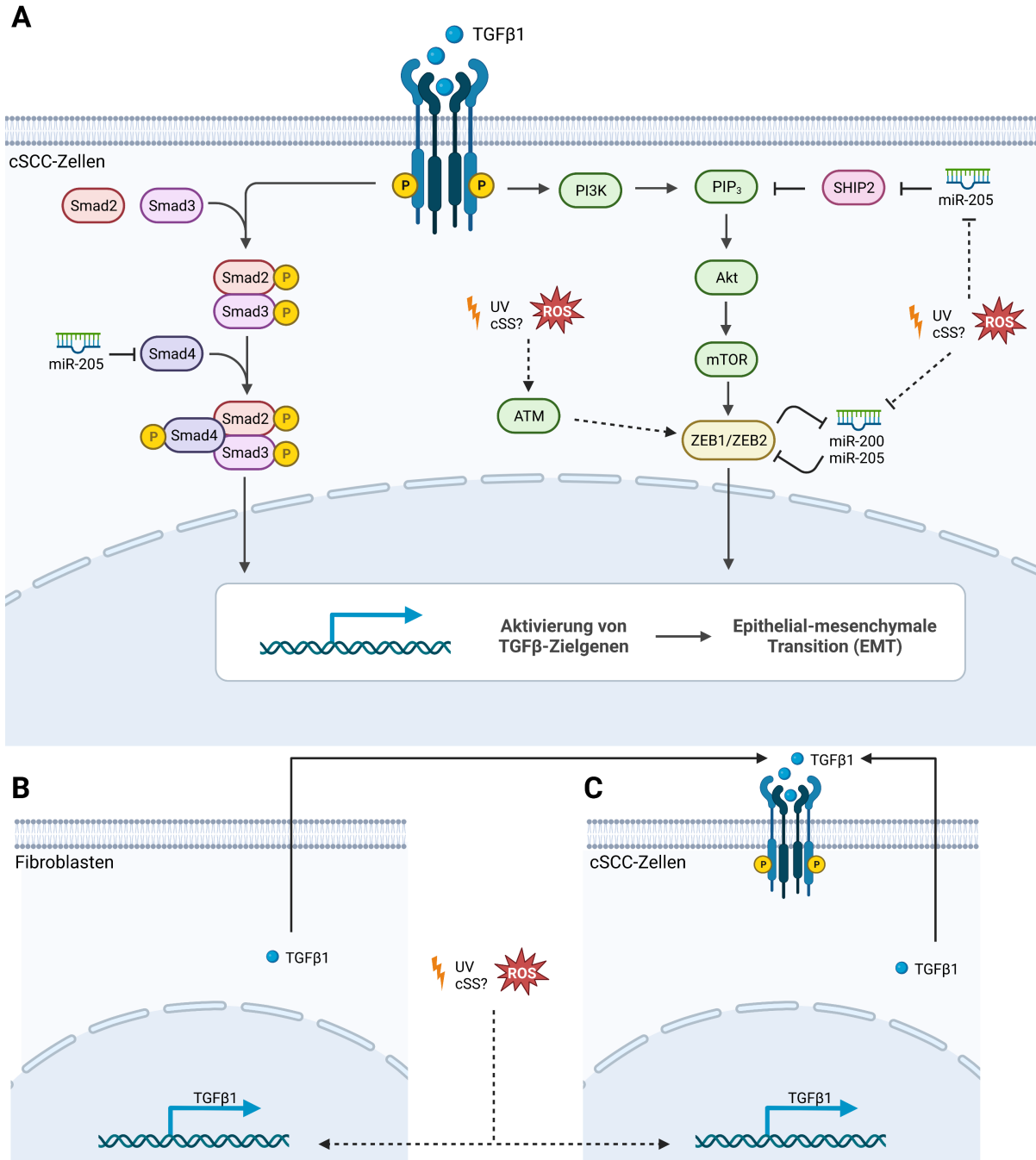
Ein Modell wie die TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs unter Berücksichtigung der Regulation durch miRNAs und UV-Strahlung bzw. oxidativen Stress im cSCC zur Metastasierung führen könnte, ist in Abbildung 6.5 dargestellt. Dort ist neben der Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways in cSCC-Zellen (Abbildung 6.5A), die Bildung von TGF- $\beta$ 1 in Fibroblasten (Abbildung 6.5B) und anschließende parakrine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways in cSCC-Zellen dargestellt. Abbildung 6.5C zeigt analog dazu schematisch die putative, autokrine Aktivierung in cSCC-Zellen.

Dieses vorgeschlagene Modell wurde experimentell durch die künstliche Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways mittels rekombinantem TGF- $\beta$ 1 *in vitro* überprüft. Da miR-205-5p zur transienten Hochregulation eines Zielgensets (u.a. ZEB1/ZEB2) führte, die Änderungen jedoch keine Induktion phänotypischer Effekte zur Folge hatten (vgl. Abschnitt 6.3), wurde ein simultaner miR-205-5p Knockdown mit TGF- $\beta$ 1-Gabe analysiert, um eine mögliche kooperative Regulation des TGF- $\beta$ -Pathways zu untersuchen. Als Endpunkt wurde die Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und des mesenchymalen Markers N-Cadherin analysiert (s. Abbildung 5.14A/B). Der Switch von E-Cadherin zu N-Cadherin ist essentielles Merkmal der EMT und geht mit dem Verlust von Zell-Zellkontakten sowie erhöhter Zellmotilität einher. Ein erhöhtes Verhältnis von N-Cadherin/E-Cadherin ist somit assoziiert mit dem zellulären Migrations- und Invasionspotential sowie der Metastasierung [192].

Der Knockdown von miR-205-5p führte weder isoliert noch in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 zur einer signifikanten Veränderung des Cadherin-Verhältnisses im cSCC *in vitro*. Fehlende Effekte bei der isolierten miR-205-5p Inhibition waren nach den Beobachtungen aus Abschnitt 6.3 zu erwarten. Dass die gleichzeitige Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 keine messbaren Effekte erzeugte, obwohl TGF- $\beta$ 1 isoliert in unterschiedlichen Konzentrationen den Cadherin-Switch induzierte, war hingegen unerwartet. Ein Erklärungsansatz knüpft an die zuvor erwähnten Feedback-Loops an. Vorstellbar wäre ein Feedback-Loop der lediglich durch eine deutliche miR-205-5p Inhibition aktiviert wird, nicht jedoch durch TGF- $\beta$ . Die Aktivierung von SHIP2 durch verringerte miR-205-5p Level und die Dephosphorylierung des Signalmoleküls PIP3 am 5-Phosphat zu Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP2) und die nachfolgende Inhibition der Proteinkinase Akt [291], könnte ebenfalls fehlende Effekte erklären. Dieser Feedback-Mechanismus müsste theoretisch auch durch eine erhöhte ZEB1/ZEB2-Expression infolge der isolierten TGF- $\beta$ 1-Behandlung aktiviert werden, die Ausprägung könnte jedoch geringer als bei einem direkten Knockdown von miR-205-5p sein.

Die Induktion des Cadherin-Switches durch rekombinantes TGF- $\beta$ 1 war hingegen erwartungsgemäß zu beobachten. Unterstützend war die Vimentin-Expression (s. Abbildung 5.14C) nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung erhöht.

## 6.4 Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways fördert die EMT im cSCC *in vitro*



**Abbildung 6.5: Modell der autokrinen und parakrinen Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways durch oxidativen Stress und Bestrahlung im cSCC. (A)** Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways führt mutmaßlich über die PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionskaskade durch Expression von ZEB1/ZEB2 zur EMT und Metastasierung. Innerhalb dieses Netzwerks reguliert miR-205-5p zusammen mit der miR-200 Familie die ZEB1/ZEB2-Expression und inhibiert zusätzlich den kanonischen TGF- $\beta$ -Pathway durch Bindung an die Smad4-mRNA. Kontextabhängig kann miR-205-5p durch Repression des negativen Regulators SHIP2 auch eine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways begünstigen. UV-Strahlung bzw. oxidativer Stress verstärken die ZEB1/ZEB2-Expression über ATM und die miR-205-5p Inhibition. **(B)** Dargestellt ist die Bildung von TGF- $\beta$ 1 in Fibroblasten durch UV-Strahlung bzw. oxidativen Stress und anschließende Sekretion in den extrazellulären Raum. **(C)** Modell der TGF- $\beta$ 1-Induktion nach oxidativem Stress oder Bestrahlung und autokriner Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways. PIP<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat. P: Phosphorylierung.  $\rightarrow$ : Aktivierung.  $\leftarrow$ : Inhibition. Abgewandelt nach [286]. Erstellt mit biorender.com.

Diese Erhöhung ist ebenfalls integraler Bestandteil der EMT und mit der Metastasierung assoziiert [192, 292]. Auf zellulärer Ebene spiegelten sich die molekularen Veränderungen durch die erhöhte Migration im Zellverbund (s. Abbildung 5.15) und einem gesteigerten Migrationspotential einzelner Zellen wider (s. Abbildung 5.16). Außerdem steigerte TGF- $\beta$ 1 die Fähigkeiten von cSCC-Zellen invasiv zu wachsen (s. Abbildung 5.17). Diese Beobachtungen bestätigen eine Aktivierung der EMT durch TGF- $\beta$ 1 im cSCC *in vitro*, die bereits für eine Vielzahl anderer Tumorarten beschrieben wurde und eine onkogene Funktion von TGF- $\beta$ 1 nahelegt [192, 199, 292]. Allerdings zeigt sich eine Kontextabhängigkeit – wie bereits für miRNAs beschrieben – auch bei TGF- $\beta$ . In frühen Stadien der Kanzerogenese wirkt TGF- $\beta$  tumorsuppressiv [293], in späteren Stadien ist die Förderung der Metastasierung durch Aktivierung der EMT ein häufig beobachtetes Phänomen [294]. Diese ambivalente Funktion ist auch im cSCC beschrieben: Der Verlust des kanonischen TGF- $\beta$ -Signalings und die verstärkte Aktivierung des MAPK-Signalwegs führen zur Tumorinitiation [293]. Nach erfolgter maligner Transformation konnte anschließend der Switch in Richtung onkogener Funktionen durch die Aktivierung des kanonischen TGF- $\beta$ -Signalings vermittelt durch das Protein DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) *in vitro* festgestellt werden [295]. Die Daten aus dieser Studie sind daher in Einklang mit publizierten Daten und attestieren TGF- $\beta$ 1 eine onkogene Rolle im cSCC durch die Förderung des Metastasierungsprozesses infolge der EMT-Aktivierung über einen Cadherin-Switch und die Erhöhung der Vimentin-Expression.

Zuletzt wurde der putative Einfluss solarer Strahlung auf den TGF- $\beta$ -Pathway geprüft, um einen Zusammenhang von cSS und Tumorprogression zu untersuchen. Die Abwesenheit von Veränderungen der extrazellulären TGF- $\beta$ 1-Konzentration in cSCC-Zellkulturen nach chronischer cSS-Bestrahlung (3x0,25 MED) spricht gegen eine autokrine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways (s. Abbildung 5.18). In Einklang damit konnten keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von *SMAD2*, *SMAD3*, *TGFB1*, *TGFBRI* oder *TGFBRII* nachgewiesen werden. In Fibroblasten war eine transiente Herunterregulation von *SMAD3*, *TGFB1* und *TGFBRII* auf mRNA-Ebene nach cSS-Bestrahlung vorhanden. Die extrazelluläre TGF- $\beta$ 1-Proteinkonzentration war jedoch unverändert. Eine Fibroblasten-vermittelte parakrine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways im cSCC ist daher ebenfalls unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse sind im Kontrast zu bereits veröffentlichten Daten [283, 285, 290], die – wie zuvor beschrieben – eine TGF- $\beta$ 1-Induktion nach oxidativem Stress bzw. UV-Strahlung nachwiesen. Auf der anderen Seite kann UV-Strahlung den TGF- $\beta$ -Pathway durch Inhibition von *TGFBRII* und Induktion des regulatorischen Proteins *Smad7* blockieren [290, 296]. Solare Strahlung wurde ebenfalls mit der Inhibition des TGF- $\beta$ -Pathways durch Herunterregulierung von *TGFBRII* in Verbindung gebracht [297]. Insgesamt führte UV-Strahlung zur Repression des TGF- $\beta$ -Pathways durch Hemmung

#### 6.4 Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways fördert die EMT im cSCC *in vitro*

der intrazellulären Signaltransduktionskaskade in anderen Studien, obwohl TGF- $\beta$ 1 hochreguliert wurde. Da TGF- $\beta$ 1 in dieser Studie *in vitro* in der Lage war die EMT zu induzieren, könnte dies im Zusammenspiel mit anderen Faktoren die EMT und Metastasierung *in vivo* begünstigen. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Einfluss von TGF- $\beta$ 1 in den Prozess des Photoaging [298]. Dieser führt durch wiederholte und langanhaltende Exposition mit solarer Strahlung zur Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways und zu Mutationen in Genen der Signaltransduktionskaskade (u.a. *TGFBRI*, *TGFBRII*, *SMAD2*, *SMAD4*). Außerdem wurde eine parakrine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways in cSCCs, BCCs und Melanomen durch Sekretion von TGF- $\beta$  im *microenvironment* beobachtet [298]. Zusammengenommen ist eine kurz- und mittelfristige Inhibition des TGF- $\beta$ -Signalings durch UV-Strahlung bzw. solare Strahlung wahrscheinlich. Im Kontext der strahlungsvermittelten Hautalterung ändert sich dies in Richtung einer Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways. Akute Bestrahlungsexperimente oder chronische Bestrahlungsexperimente über einen Zeitraum von mehreren Wochen, wie in dieser Arbeit, entsprechen jedoch nur kurz- bzw. mittelfristigen Effekten und können den über mehrere Jahre/Jahrzente dauernden Prozess der Hautalterung nicht ausreichend abbilden. Da cSCCs hauptsächlich bei älteren Patienten mit einer hohen kumulativen Sonnenexposition und stark photogeschädigter Haut auftreten, ist die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways, trotz widersprüchlicher Ergebnisse aus diversen *in vitro* Studien, möglich.

Unter Berücksichtigung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Aktivierung der EMT bestätigt sich eine eingangs vermutete strahlungsvermittelte Förderung der Tumorprogression im Zuge des Photoagings. Auf miRNA-Ebene konnte dies zwar in dem Versuchsssetup der Studie nicht bestätigt werden, ist aufgrund von Änderungen des miRNA-Musters nach Bestrahlung und der Involvierung von miR-205-5p in den TGF- $\beta$ -Pathway jedoch wahrscheinlich. Diese Änderungen sind vermutlich Teil eines komplexen Netzwerks, das nicht durch isolierte und kurzfristige Effekte beeinflusst wird, sondern als mehrstufiger Prozess im Zuge der Hautalterung – mit solarer Strahlung als integrale Ursache – zur schrittweisen Entartung bzw. Tumorprogression führt.





---

## 7 Ausblick

---

Die vorliegende Arbeit zeigte einen Einfluss der Tumorheterogenität auf das miRNA-Muster und die Strahlungssensitivität sowie differentielle und gemeinsame miRNA-Alterationen nach chronischer cSS-Bestrahlung im Rahmen einer konservierten bzw. spezifischen Strahlenantwort, die teilweise mit der miRNA-Regulation im Gewebe übereinstimmten. Der Knockdown der übereinstimmend herunterregulierten miR-205-5p führte isoliert nicht zu phänotypischen Effekten. Die Aktivierung des assoziierten TGF- $\beta$ -Pathways induzierte hingegen die EMT und fördert die Tumorprogression. Die gesammelten Ergebnisse zeigten ein komplexes Zusammenspiel von miRNAs, dem TGF- $\beta$ -Pathway, solarer Strahlungsexposition und der Tumorheterogenität, mit einem wiederkehrenden Thema der Kontextabhängigkeit. Für das weitere Verständnis ergaben sich daher einige Fragestellungen für zukünftige Projekte.

Zunächst wäre es von Interesse den Mechanismus hinter der miRNA-Regulation nach Bestrahlung weiter aufzuklären. Dort sind bereits einige Mechanismen bekannt, wie Strahlung oder oxidativer Stress das miRNAom beeinflussen können (vgl. Abschnitt 1.3.3). Die Ergebnisse der Strahlungssensitivität legen eine Rolle von p53 nahe, welches in der Lage ist sowohl die Transkription von miRNAs zu fördern oder zu inhibieren als auch die miRNA-Reifung durch Bindung an p68/p72 zu modulieren [146]. Um den Mechanismus zu untersuchen, wäre ein Knockout bzw. die Überexpression der Proteine p68/p72 denkbar, sodass eine mutmaßliche veränderte Prozessierung der miRNAs analysiert werden könnte. Für die Untersuchung des Einflusses von p53 auf die Transkription bietet sich die Analyse der p53 response elements (p53re) an. Einerseits wäre die Aufklärung von cSS-Strahlung auf die Bindung von p53 an p53re interessant [299], andererseits könnte die Untersuchung von p53re in der Genregion der analysierten miRNAs weitere Einblicke in die miRNA-Regulation geben.

Eng mit der p53-Regulation verknüpft, ist die DDR als Zellantwort auf genotoxische Substanzen oder Strahlung. Die beobachteten universellen und spezifischen miRNA-Veränderungen spiegelten Teile einer konservierten und zelltypabhängigen Strahlenantwort wider. Dort wäre interessant, ob die miRNAs eine direkte Rolle innerhalb der Strahlenantwort spielen oder ein Nebenprodukt von anderen zellulären Prozessen wie z.B. der p53-Induktion infolge solarer Strahlung sind. Eine direkte Rolle ließe sich durch Knockdown bzw. Knockout der miRNAs mittels CRISPR/Cas (CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; Cas = CRISPR Associated) [300] und anschließender Bestrahlung untersuchen. Die indirekte Rolle ließe sich durch Modulation der Expression von Upstream-Effektoren wie z.B. p53, Drosha oder Dicer

analysieren. Für den Effekt auf intrazelluläre Prozesse wäre es anschließend hilfreich, das Transkriptom mittels NGS zu charakterisieren.

Die fehlenden phänotypischen Effekte nach miR-205-5p Knockdown waren unerwartet, da miR-205-5p *in vivo* innerhalb eines 13-miRNA-Sets herunterreguliert war. Der vorgestellte miR-200/miR-205/ZEB1/ZEB2 Feedback-Loop und die Induktion der miR-200a-3p Expression nach miR-205-5p Knockdown waren ein Erklärungsansatz für die Beobachtung. Zur Überprüfung wäre der simultane Knockout beider miRNAs sinnvoll. Möglicherweise sollte die gesamte miR-200 Familie zusammen mit miR-205-5p inhibiert werden, da die kooperative Regulation von Zielgenen durch miRNA-Sets vermutlich eher in der Lage ist, den Phänotyp zu beeinflussen. Außerdem könnte eine effektivere Repression von miR-205-5p durch den stabilen Knockout mittels CRISPR/Cas9 erreicht werden, um zu überprüfen, ob die fehlenden Effekte lediglich auf einen unzureichenden Knockdown zurückzuführen sind. Bei der weiteren Untersuchung wäre es aufgrund der Tumorerheterogenität außerdem sinnvoll, mindestens noch eine zusätzliche Zelllinie zu analysieren. Auch ein detaillierter Einblick in das Zusammenspiel von miR-205-5p und TGF- $\beta$ -Pathway würde vermutlich wichtige Erkenntnisse in Hinblick auf die Tumorerprogression liefern, z.B. durch Modulationen des TGF- $\beta$ -Pathways in miR-205-5p Knockout-Zelllinien.

In Bezug auf den TGF- $\beta$ -Pathway und die Induktion der EMT sind ebenfalls einige weiterführende Experimente von Bedeutung. Da der TGF- $\beta$ -Pathway möglicherweise im Zuge des Photoagings aktiviert wird, würde die Hautalterung in der Maus ein wertvolles Modell darstellen. Dort könnte durch die kontinuierliche cSS-Bestrahlung eine Sonnenexposition über einen längeren Zeitraum simuliert werden und der Switch von inhibierter zu aktivierter TGF- $\beta$ -Signaltransduktion nachvollzogen werden. Außerdem könnte die Analyse der parakrinen TGF- $\beta$ -Aktivierung aufschlussreiche Erkenntnisse bringen. Interessant wäre dabei, ob extrazelluläre Vesikel (EV), die eine essentielle Rolle bei der Kommunikation von Tumor und *microenvironment* spielen [301], von Bedeutung sind. Die Behandlung der Mäuse mit EV-Inhibitoren [302] und die Analyse des TGF- $\beta$ -Signalings könnte daher ein Versuchsansatz sein.

---

# Literaturverzeichnis

---

- [1] S. Tokez, M. Wakkee, M. Louwman, E. Noels, T. Nijsten & L. Hollestein. Assessment of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (cSCC) In situ Incidence and the Risk of Developing Invasive cSCC in Patients With Prior cSCC In situ vs the General Population in the Netherlands, 1989-2017. *JAMA Dermatology* 156 (9 2020), 973. DOI: 10.1001/jamadermatol.2020.1988.
- [2] P. S. Karia, J. Han & C. D. Schmults. Cutaneous squamous cell carcinoma: Estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *Journal of the American Academy of Dermatology* 68 (6 2013), 957–966. DOI: 10.1016/j.jaad.2012.11.037.
- [3] D. Ogata & T. Tsuchida. Systemic Immunotherapy for Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Current Treatment Options in Oncology* 20 (4 2019), 30. DOI: 10.1007/s11864-019-0629-2.
- [4] B. Plitta-Michalak, E. Pavez-Lorie, N. Stricker, M. Pollet, I.-P. Chen, J. Krutmann, B. Volkmer, P. Boukamp, R. Greinert & A. Rapp. Development and characterisation of an irradiation device for biomedical studies covering the solar spectrum with individual regulated spectral bands. *Photochemical & Photobiological Sciences* (2022). DOI: 10.1007/s43630-022-00252-w.
- [5] L. Cohen, M. A. Brodsky, R. Zubair, I. Kohli, I. Hamzavi & M. Sadeghpour. Cutaneous Interaction with Visible Light: What Do We Know. *Journal of the American Academy of Dermatology* (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.03.115>.
- [6] L. Hudson, E. Rashdan, C. A. Bonn, B. Chavan, D. Rawlings & M. A. Birch-Machin. Individual and combined effects of the infrared, visible, and ultraviolet light components of solar radiation on damage biomarkers in human skin cells. *FASEB Journal* 34 (3 2020), 3874–3883. DOI: 10.1096/fj.201902351RR.
- [7] S. K. T. Que, F. O. Zwald & C. D. Schmults. Cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 78 (2 2018), 237–247. DOI: 10.1016/j.jaad.2017.08.059.
- [8] N. García-Sancha, R. Corchado-Cobos, J. Pérez-Losada & J. Cañueto. MicroRNA Dysregulation in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (9 2019), 2181. DOI: 10.3390/ijms20092181.

- [9] I. Moll, C. Bayerl, E. Knußmann-Hartig, I. Hadshiew, W. Kimmig, U. Siemann-Harms & S. Stangl. *Duale Reihe Dermatologie*. 7. Aufl. Georg Thieme Verlag, 2010, 3–14. DOI: 10.1055/b-002-11376.
- [10] G. Kindl & W. Raab. *Licht und Haut: Bräunung, Lichtschutz und Pflege; ein Leitfaden für die Beratung in der Praxis*. 4. Aufl. Govi-Verlag, 1998, 27–48.
- [11] M. Mirea, S. Eckensperger, M. Hengstschläger & M. Mikula. Insights into Differentiation of Melanocytes from Human Stem Cells and Their Relevance for Melanoma Treatment. *Cancers* 12 (9 2020), 2508. DOI: 10.3390/cancers12092508.
- [12] BAuA. *Ratgeber zur Gefährdungsbeurteilung. Handbuch für Arbeitsschutzfachleute*. 3. Aufl. 2016. DOI: <http://doi.org/10.21934/baua:fachbuch20160901>.
- [13] IARC. A review of human carcinogens. D. Radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *IARC Monogr* 100 (D 2012), 35–101.
- [14] J. D’Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz & T. Scott. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences* 14 (6 2013), 12222–12248. DOI: 10.3390/ijms140612222.
- [15] R. Greinert, E. de Vries, F. Erdmann, C. Espina, A. Auvinen, A. Kesminiene & J. Schüz. European Code against Cancer 4th Edition: Ultraviolet radiation and cancer. *Cancer Epidemiology* 39 (2015). European Code against Cancer 4th Edition: 12 ways to reduce your Cancer risk (<http://cancer-code-europe.iarc.fr>), S75–S83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2014.12.014>.
- [16] B. L. Diffey. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in Medicine and Biology* 36 (3 1991), 299–328. DOI: 10.1088/0031-9155/36/3/001.
- [17] F. Duarte. *Tunable Laser Applications*. 3rd. CRC Press, 2016, 365–371.
- [18] A. Modenese, L. Korpinen & F. Gobba. Solar Radiation Exposure and Outdoor Work: An Underestimated Occupational Risk. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (10 2018), 2063. DOI: 10.3390/ijerph15102063.
- [19] CIE. *Erythema Reference Action Spectrum and Standard Erythema Dose*. CIE, 1999.
- [20] W. Morison. *Phototherapy and Photochemotherapy of Skin Disease*. Praeger, 1983.
- [21] CIE. *SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS SCCP Opinion on Biological effects of ultraviolet radiation relevant to health with particular reference to sunbeds for cosmetic purposes*. 2006.
- [22] A. R. Young. Chromophores in human skin. *Physics in Medicine and Biology* 42 (5 1997), 789–802. DOI: 10.1088/0031-9155/42/5/004.

- [23] Q. Wu, B. Huang, T. A. Niehaus, X. Yang, J. Fan & R.-Q. Zhang. The role of tryptophans in the UV-B absorption of a UVR8 photoreceptor – a computational study. *Physical Chemistry Chemical Physics* 17 (16 2015), 10786–10794. DOI: 10.1039/C4CP06073C.
- [24] M. Meinhardt, R. Krebs, A. Anders, U. Heinrich & H. Tronnier. Absorption Spectra of Human Skin In Vivo in the Ultraviolet Wavelength Range Measured by Optoacoustics. *Photochemistry and Photobiology* 85 (1 2009), 70–77. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00398.x.
- [25] W. Bruls, H. van Weelden & J. C. van der Leun. Transmission of UV Radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose. *Photochemistry and photobiology* 39 (1 1984), 63–7.
- [26] E. Dupont, J. Gomez, C. Léveillé & D. Bilodeau. From hydration to cell turnover: an integral approach to antiaging. *Cosmetics and Toiletries* 125 (2010), 50–60.
- [27] R. Bunsen & H. Roscoe. III. Photochemical researches.—Part V. On the measurement of the chemical action of direct and diffuse sunlight. *Proceedings of the Royal Society of London* 12 (1863), 306–312. DOI: 10.1098/rsp1.1862.0069.
- [28] S. Völker & H. Schuhmacher. 8. *Symposium Licht und Gesundheit*. Universitätsverlag TU Berlin, 2014, 68.
- [29] J. Jans, G. A. Garinis, W. Schul, A. van Oudenaren, M. Moorhouse *et al.* Differential Role of Basal Keratinocytes in UV-Induced Immunosuppression and Skin Cancer. *Molecular and Cellular Biology* 26 (22 2006), 8515–8526. DOI: 10.1128/MCB.00807-06.
- [30] T. Douki & J. Cadet. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry* 40 (8 2001), 2495–501.
- [31] S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, B. Canguilhem, A. Favier, J. Cadet & T. Douki. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA repair* 4 (7 2005), 836–44. DOI: 10.1016/j.dnarep.2005.05.001.
- [32] W. J. Schreier. “UV-Strahlung und DNA-Schäden — Untersuchung UV-induzierter Prozesse in Nukleinsäuren mit Femtosekunden-Infrarotspektroskopie”. Ludwig-Maximilians-Universität, 2008, 26–30.
- [33] G. P. Pfeifer. Formation and Processing of UV Photoproducts : Effects of DNA Sequence and Chromatin Environment. *Photochemistry and photobiology* 65 (2 1997), 270–283.

- [34] S. Mouret, A. Forestier & T. Douki. The specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. *Photochemical and photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 11 (1 2012), 155–62. DOI: 10.1039/c1pp05185g.
- [35] M. G. Friedel, M. K. Cichon & T. Carell. *DNA Damage and Repair: Photochemistry*. Hrsg. von W. Horspool & F. Lenci. 2004.
- [36] K. Hashiguchi, Y. Matsumoto & A. Yasui. Recruitment of DNA repair synthesis machinery to sites of DNA damage/repair in living human cells. *Nucleic Acids Research* 35 (9 2007), 2913–2923. DOI: 10.1093/nar/gkm115.
- [37] K. H. Kraemer, M. M. Lee, A. D. Andrews & W. C. Lambert. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Archives of dermatology* 130 (8 1994), 1018–21.
- [38] J. J. DiGiovanna & K. H. Kraemer. Shining a Light on Xeroderma Pigmentosum. *Journal of Investigative Dermatology* 132 (3 2012), 785–796. DOI: 10.1038/jid.2011.426.
- [39] R. Greinert, O. Boguhn, D. Harder, E. W. Breitbart, D. L. Mitchell & B. Volkmer. The Dose Dependence of Cyclobutane Dimer Induction and Repair in UVB-irradiated Human Keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology* 72 (5 2000), 701. DOI: 10.1562/0031-8655(2000)072<0701:TDDOCD>2.0.CO;2.
- [40] M. F. Goodman & R. Woodgate. Translesion DNA Polymerases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (10 2013), a010363–a010363. DOI: 10.1101/cshperspect.a010363.
- [41] J. Cadet & P. Vigny. *The Photochemistry of Nucleic Acid in Bioorganic Photochemistry*. John Wiley & Sons, 1990, 1–272.
- [42] P. M. Pollock, F. Yu, L. Qiu, P. G. Parsons & N. K. Hayward. Evidence for u.v. induction of CDKN2 mutations in melanoma cell lines. *Oncogene* 11 (4 1995), 663–8.
- [43] M. D'Errico, A. Calcagnile, F. Canzona, B. Didona, P. Posteraro *et al.* UV mutation signature in tumor suppressor genes involved in skin carcinogenesis in xeroderma pigmentosum patients. *Oncogene* 19 (3 2000), 463–7. DOI: 10.1038/sj.onc.1203313.
- [44] P. J. Rochette, S. Lacoste, J.-P. Therrien, N. Bastien, D. E. Brash & R. Drouin. Influence of cytosine methylation on ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimer formation in genomic DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 665 (1-2 2009), 7–13. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.02.008.

- [45] Y. Matsumara & H. Ananthaswamy. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Frontiers of Bioscience* 7 (2002), 765–83.
- [46] G. Boros, E. Miko, H. Muramatsu, D. Weissman, E. Emri *et al.* Identification of cyclobutane pyrimidine dimer-responsive genes using UVB-irradiated human keratinocytes transfected with in vitro-synthesized photolyase mRNA. *PLoS ONE* 10 (6 2015), 1–19. DOI: 10.1371/journal.pone.0131141.
- [47] D. Perdiz, P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi & E. Sage. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 275 (35 2000), 26732–42. DOI: 10.1074/jbc.M001450200.
- [48] A. R. Young, C. A. Chadwick, G. I. Harrison, J. L. Hawk, O. Nikaido & C. S. Potten. The in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II. *The Journal of investigative dermatology* 106 (6 1996), 1307–13. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12349031.
- [49] H.-L. Lo, S. Nakajima, L. Ma, B. Walter, A. Yasui, D. W. Ethell & L. B. Owen. Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *BMC cancer* 5 (2005), 135. DOI: 10.1186/1471-2407-5-135.
- [50] X. Zhu, N. Li, Y. Wang, L. Ding, H. Chen, Y. Yu & X. Shi. Protective effects of quercetin on UVB irradiation-induced cytotoxicity through ROS clearance in keratinocyte cells. *Oncology Reports* 37 (1 2017), 209–218. DOI: 10.3892/or.2016.5217.
- [51] W. Bäumlner, J. Regensburger, A. Knak, A. Felgenträger & T. Maisch. UVA and endogenous photosensitizers – the detection of singlet oxygen by its luminescence. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (1 2012), 107–117. DOI: 10.1039/C1PP05142C.
- [52] R. Brem, P. Macpherson, M. Guven & P. Karran. Oxidative stress induced by UVA photoactivation of the tryptophan UVB photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) inhibits nucleotide excision repair in human cells. *Scientific Reports* 7 (1 2017), 4310. DOI: 10.1038/s41598-017-04614-8.
- [53] J. Meyskens, L. Frank, P. Farmer & J. P. Fruehauf. Redox Regulation in Human Melanocytes and Melanoma. *Pigment Cell Research* 14 (3 2001), 148–154. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2001.140303.x.
- [54] D. I. Pattison, A. S. Rahmanto & M. J. Davies. Photo-oxidation of proteins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (1 2012), 38–53. DOI: 10.1039/C1PP05164D.



- [55] R. Greinert, B. Volkmer, S. Henning, E. W. Breitbart, K. O. Greulich, M. C. Cardoso & A. Rapp. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic acids research* 40 (20 2012), 10263–73. DOI: 10.1093/nar/gks824.
- [56] M. Kunisada, K. Sakumi, Y. Tominaga, A. Budiyanto, M. Ueda, M. Ichihashi, Y. Nakabeppu & C. Nishigori. 8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer research* 65 (14 2005), 6006–10. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0724.
- [57] K. Hoogsteen. The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallographica* 16 (9 1963), 907–916. DOI: 10.1107/S0365110X63002437.
- [58] J. D. WATSON & F. H. C. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171 (4356 1953), 737–738. DOI: 10.1038/171737a0.
- [59] N. S. Agar, G. M. Halliday, R. S. Barnetson, H. N. Ananthaswamy, M. Wheeler & A. M. Jones. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (14 2004), 4954–9. DOI: 10.1073/pnas.0401141101.
- [60] H. E. Krokan & M. Bjoras. Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4 2013), a012583–a012583. DOI: 10.1101/cshperspect.a012583.
- [61] G. J. Grundy & J. L. Parsons. Base excision repair and its implications to cancer therapy. *Essays in Biochemistry* 64 (5 2020), 831–843. DOI: 10.1042/EBC20200013.
- [62] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet & T. Douki. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (37 2006), 13765–70. DOI: 10.1073/pnas.0604213103.
- [63] M. Portillo-Esnaola, A. Rodríguez-Luna, J. Nicolás-Morala, M. Gallego-Rentero, M. Villalba, Á. Juarranz & S. González. Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers after UVA Exposure (Dark-CPDs) Is Inhibited by an Hydrophilic Extract of *Polypodium leucotomos*. *Antioxidants* 10 (12 2021), 1961. DOI: 10.3390/antiox10121961.
- [64] S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet & T. Douki. Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. *Mutation research* 556 (1-2 2004), 135–42. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.07.011.

- [65] T. M. Runger, B. Farahvash, Z. Hatvani & A. Rees. Comparison of DNA damage responses following equimutagenic doses of UVA and UVB: A less effective cell cycle arrest with UVA may render UVA-induced pyrimidine dimers more mutagenic than UVB-induced ones. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (1 2012), 207–215. DOI: 10.1039/C1PP05232B.
- [66] P. Karran & R. Brem. Protein oxidation, UVA and human DNA repair. *DNA Repair* 44 (2016), 178–185. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.05.024.
- [67] D. Damian, Y. Matthews, T. Phan & G. Halliday. An action spectrum for ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. *British Journal of Dermatology* (2011), no–no. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.10161.x.
- [68] G. M. Halliday, S. N. Byrne & D. L. Damian. Ultraviolet A Radiation: Its Role in Immunosuppression and Carcinogenesis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 30 (4 2011), 214–221. DOI: 10.1016/j.sder.2011.08.002.
- [69] D. Hanahan & R. A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (5 2011), 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [70] F. Liebel, S. Kaur, E. Ruvolo, N. Kollias & M. D. Southall. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. *Journal of Investigative Dermatology* 132 (7 2012), 1901–1907. DOI: 10.1038/jid.2011.476.
- [71] S. Cho, M. J. Lee, M. S. Kim, S. Lee, Y. K. Kim, D. H. Lee, C. W. Lee, K. H. Cho & J. H. Chung. Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo. *Journal of Dermatological Science* 50 (2 2008), 123–133. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2007.11.009.
- [72] P. N. Tonolli, O. Chiarelli-Neto, C. Santacruz-Perez, H. C. Junqueira, I.-S. Watanabe, F. G. Ravagnani, W. K. Martins & M. S. Baptista. Lipofuscin Generated by UVA Turns Keratinocytes Photosensitive to Visible Light. *Journal of Investigative Dermatology* 137 (11 2017), 2447–2450. DOI: 10.1016/j.jid.2017.06.018.
- [73] L. Zastrow, N. Groth, F. Klein, D. Kockott, J. Lademann, R. Renneberg & L. Ferrero. The Missing Link – Light-Induced (280–1,600 nm) Free Radical Formation in Human Skin. *Skin Pharmacology and Physiology* 22 (1 2009), 31–44. DOI: 10.1159/000188083.
- [74] P. Schroeder, C. Calles, T. Benesova, F. Macaluso & J. Krutmann. Photoprotection beyond Ultraviolet Radiation – Effective Sun Protection Has to Include Protection against Infrared A Radiation-Induced Skin Damage. *Skin Pharmacology and Physiology* 23 (1 2010), 15–17. DOI: 10.1159/000257259.

- [75] P. Schroeder, J. Haendeler & J. Krutmann. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Experimental Gerontology* 43 (7 2008), 629–632. DOI: 10.1016/j.exger.2008.04.010.
- [76] S. Grether-Beck, A. Marini, T. Jaenicke & J. Krutmann. Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 30 (2-3 2014), 167–174. DOI: 10.1111/phpp.12111.
- [77] A. U. Khan & T. Wilson. Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry and Biology* 2 (7 1995), 437–445. DOI: 10.1016/1074-5521(95)90259-7.
- [78] Z. Liu, Z. Ren, J. Zhang, C.-C. Chuang, E. Kandaswamy, T. Zhou & L. Zuo. Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Frontiers in Physiology* 9 (2018). DOI: 10.3389/fphys.2018.00477.
- [79] L. Zastrow, O. Doucet, L. Ferrero, N. Groth, F. Klein, D. Kockott & J. Lademann. Free Radical Threshold Value: A New Universal Body Constant. *Skin Pharmacology and Physiology* 28 (5 2015), 264–268. DOI: 10.1159/000435893.
- [80] E. Archier, S. Devaux, E. Castela, A. Gallini, F. Aubin *et al.* Carcinogenic risks of Psoralen UV-A therapy and Narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 26 (2012), 22–31. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2012.04520.x.
- [81] A. Osmanovic, M. Gillstedt, A. Wennberg & O. Larkö. The Risk of Skin Cancer in Psoriasis Patients Treated with UVB Therapy. *Acta Dermato Venereologica* 94 (4 2014), 425–430. DOI: 10.2340/00015555-1753.
- [82] S. Singer, S. Karrer & M. Berneburg. Modern sun protection. *Current Opinion in Pharmacology* 46 (2019), 24–28. DOI: 10.1016/j.coph.2018.12.006.
- [83] M. Dragomir, A. Mafra, S. Dias, C. Vasilescu & G. Calin. Using microRNA Networks to Understand Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7 2018), 1871. DOI: 10.3390/ijms19071871.
- [84] M.-H. T. Nguyen, Y.-H. Luo, A.-L. Li, J.-C. Tsai, K.-L. Wu, P.-J. Chung & N. Ma. miRNA as a Modulator of Immunotherapy and Immune Response in Melanoma. *Biomolecules* 11 (11 2021), 1648. DOI: 10.3390/biom11111648.
- [85] J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed & C. Peng. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology* 9 (2018). DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.
- [86] A. Gajos-Michniewicz & M. Czyz. Role of miRNAs in Melanoma Metastasis. *Cancers* 11 (3 2019), 326. DOI: 10.3390/cancers11030326.

- [87] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek & V. N. Kim. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23 (20 2004), 4051–60. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600385.
- [88] G. M. Borchert, W. Lanier & B. L. Davidson. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology* 13 (12 2006), 1097–1101. DOI: 10.1038/nsmb1167.
- [89] Y. Zeng, R. Yi & B. R. Cullen. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO journal* 24 (1 2005), 138–48. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600491.
- [90] R. I. Gregory, K.-p. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch & R. Shiekhattar. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432 (7014 2004), 235–240. DOI: 10.1038/nature03120.
- [91] B. R. Cullen. Transcription and Processing of Human microRNA Precursors. *Molecular Cell* 16 (6 2004), 861–865. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.12.002.
- [92] K. Wu, J. He, W. Pu & Y. Peng. The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics, proteomics and bioinformatics* 16 (2 2018), 120–126. DOI: 10.1016/j.gpb.2017.09.004.
- [93] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara & B. R. Cullen. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development* 17 (24 2003), 3011–3016. DOI: 10.1101/gad.1158803.
- [94] X. Wang, X. Xu, Z. Ma, Y. Huo, Z. Xiao, Y. Li & Y. Wang. Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5. *RNA* 17 (8 2011), 1511–1528. DOI: 10.1261/rna.2732611.
- [95] R. C. Wilson, A. Tambe, M. A. Kidwell, C. L. Noland, C. P. Schneider & J. A. Doudna. Dicer-TRBP Complex Formation Ensures Accurate Mammalian MicroRNA Biogenesis. *Molecular Cell* 57 (3 2015), 397–407. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.11.030.
- [96] M. Fareh, K.-H. Yeom, A. C. Haagsma, S. Chauhan, I. Heo & C. Joo. TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nature Communications* 7 (1 2016), 13694. DOI: 10.1038/ncomms13694.
- [97] R. Mitra, C.-C. Lin, C. M. Eischen, S. Bandyopadhyay & Z. Zhao. Concordant dysregulation of miR-5p and miR-3p arms of the same precursor microRNA may be a mechanism in inducing cell proliferation and tumorigenesis: a lung cancer study. *RNA* 21 (6 2015), 1055–1065. DOI: 10.1261/rna.048132.114.
- [98] C. L. Noland & J. A. Doudna. Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA* 19 (5 2013), 639–648. DOI: 10.1261/rna.037424.112.

- [99] P. K. Santhekadur & D. P. Kumar. RISC assembly and post-transcriptional gene regulation in Hepatocellular Carcinoma. *Genes and Diseases* 7 (2 2020), 199–204. DOI: 10.1016/j.gendis.2019.09.009.
- [100] L. B. Chipman & A. E. Pasquinelli. miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. *Trends in genetics : TIG* 35 (3 2019), 215–222. DOI: 10.1016/j.tig.2018.12.005.
- [101] H. C. Martin, S. Wani, A. L. Steptoe, K. Krishnan, K. Nones, E. Nourbakhsh, A. Vlassov, S. M. Grimmond & N. Cloonan. Imperfect centered miRNA binding sites are common and can mediate repression of target mRNAs. *Genome Biology* 15 (3 2014), R51. DOI: 10.1186/gb-2014-15-3-r51.
- [102] S. Córdova-Rivas, I. Fraire-Soto, A. M.-C. Torres, L. Servín-González, A. Granados-López *et al.* 5p and 3p Strands of miR-34 Family Members Have Differential Effects in Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3 2019), 545. DOI: 10.3390/ijms20030545.
- [103] H. Feng, F. Ge, L. Du, Z. Zhang & D. Liu. MiR-34b-3p represses cell proliferation, cell cycle progression and cell apoptosis in non-small-cell lung cancer (NSCLC) by targeting CDK4. *Journal of cellular and molecular medicine* 23 (8 2019), 5282–5291. DOI: 10.1111/jcmm.14404.
- [104] C. Bruegger, W. Kempf, I. Spoerri, A. W. Arnold, P. H. Itin & B. Burger. MicroRNA expression differs in cutaneous squamous cell carcinomas and healthy skin of immunocompetent individuals. *Experimental Dermatology* 22 (6 2013), 426–428. DOI: 10.1111/exd.12153.
- [105] N. Lin, Y. Zhou, X. Lian & Y. Tu. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in cutaneous squamous cell carcinoma cells by targeting RhoTBT1. *Oncology Letters* 13 (3 2017), 1078–1082. DOI: 10.3892/ol.2017.5554.
- [106] S. Yin & X. Lin. MicroRNA-21 Contributes to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Progression via Mediating TIMP3/PI3K/AKT Signaling Axis. *International journal of general medicine* 14 (2021), 27–39. DOI: 10.2147/IJGM.S275016.
- [107] M. P. Mycko, M. Cichalewska, H. Cwiklinska & K. W. Selmaj. miR-155-3p Drives the Development of Autoimmune Demyelination by Regulation of Heat Shock Protein 40. *Journal of Neuroscience* 35 (50 2015), 16504–16515. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2830-15.2015.
- [108] P. M. Báez-Vega, I. M. E. Vargas, F. Valiyeva, J. Encarnación-Rosado, A. Roman, J. Flores, M. J. Marcos-Martínez & P. E. Vivas-Mejía. Targeting miR-21-3p inhibits proliferation and invasion of ovarian cancer cells. *Oncotarget* 7 (24 2016), 36321–36337. DOI: 10.18632/oncotarget.9216.

- [109] D. Sur, C. Cainap, C. Burz, A. Havasi, I. C. Chis, C. Vlad, V. Milosevic, O. Balacescu & A. Irimie. The role of miRNA -31-3p and miR-31-5p in the anti-EGFR treatment efficacy of wild-type K-RAS metastatic colorectal cancer. Is it really the next best thing in miRNAs? *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 24 (5 2019), 1739–1746.
- [110] B. Tang, B. Lei, G. Qi, X. Liang, F. Tang, S. Yuan, Z. Wang, S. Yu & S. He. MicroRNA-155-3p promotes hepatocellular carcinoma formation by suppressing FBXW7 expression. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 35 (1 2016), 93. DOI: 10.1186/s13046-016-0371-6.
- [111] S. S. Jankauskas, J. Gambardella, C. Sardu, A. Lombardi & G. Santulli. Functional Role of miR-155 in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Non-Coding RNA* 7 (3 2021), 39. DOI: 10.3390/ncrna7030039.
- [112] A. Brümmer & J. Hausser. MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: Extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *BioEssays* 36 (6 2014), 617–626. DOI: 10.1002/bies.201300104.
- [113] Y. Zhang, M. Fan, X. Zhang, F. Huang, K. Wu *et al.* Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA* 20 (12 2014), 1878–1889. DOI: 10.1261/rna.045633.114.
- [114] M. H. Jo, S. Shin, S.-R. Jung, E. Kim, J.-J. Song & S. Hohng. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular Cell* 59 (1 2015), 117–124. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.027.
- [115] I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork & E. Izaurralde. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes and Development* 20 (14 2006), 1885–1898. DOI: 10.1101/gad.1424106.
- [116] M. Christie, A. Boland, E. Huntzinger, O. Weichenrieder & E. Izaurralde. Structure of the PAN3 Pseudokinase Reveals the Basis for Interactions with the PAN2 Deadenylase and the GW182 Proteins. *Molecular Cell* 51 (3 2013), 360–373. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.07.011.
- [117] J. E. Braun, V. Truffault, A. Boland, E. Huntzinger, C.-T. Chang, G. Haas, O. Weichenrieder, M. Coles & E. Izaurralde. A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature Structural and Molecular Biology* 19 (12 2012), 1324–1331. DOI: 10.1038/nsmb.2413.
- [118] D. de Rie, I. Abugessaisa, T. Alam, E. Arner, P. Arner *et al.* An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology* 35 (9 2017), 872–878. DOI: 10.1038/nbt.3947.

- [119] X. Lai, O. Wolkenhauer & J. Vera. Understanding microRNA-mediated gene regulatory networks through mathematical modelling. *Nucleic Acids Research* 44 (13 2016), 6019–6035. DOI: 10.1093/nar/gkw550.
- [120] J.-f. Zhang, W.-m. Fu, M.-l. He, W.-d. Xie, Q. Lv *et al.* MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. *RNA Biology* 8 (5 2011), 829–838. DOI: 10.4161/rna.8.5.16043.
- [121] M. Sahu & B. Mallick. Deciphering synergistic regulatory networks of microRNAs in hESCs and fibroblasts. *International Journal of Biological Macromolecules* 113 (2018), 1279–1286. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.061.
- [122] R. Denzler, S. E. McGeary, A. C. Title, V. Agarwal, D. P. Bartel & M. Stoffel. Impact of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression. *Molecular Cell* 64 (3 2016), 565–579. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.09.027.
- [123] S. Wu, S. Huang, J. Ding, Y. Zhao, L. Liang, T. Liu, R. Zhan & X. He. Multiple microRNAs modulate p21<sup>Cip1</sup>/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene* 29 (15 2010), 2302–2308. DOI: 10.1038/onc.2010.34.
- [124] T. Abbas & A. Dutta. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer* 9 (6 2009), 400–414. DOI: 10.1038/nrc2657.p21.
- [125] Y. Peng & C. M. Croce. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 1 (1 2016), 15004. DOI: 10.1038/sigtrans.2015.4.
- [126] D. Zheng, M. Huo, B. Li, W. Wang, H. Piao, Y. Wang, Z. Zhu, D. Li, T. Wang & K. Liu. The Role of Exosomes and Exosomal MicroRNA in Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (2021). DOI: 10.3389/fcell.2020.616161.
- [127] S.-G. Shiah, S.-T. Chou & J.-Y. Chang. MicroRNAs: Their Role in Metabolism, Tumor Microenvironment, and Therapeutic Implications in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* 13 (22 2021). DOI: 10.3390/cancers13225604.
- [128] C. Solé & C. H. Lawrie. MicroRNAs in Metastasis and the Tumour Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (9 2021), 4859. DOI: 10.3390/ijms22094859.
- [129] B. Pardini, A. A. Sabo, G. Birolo & G. A. Calin. Noncoding RNAs in Extracellular Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies. *Cancers* 11 (8 2019). DOI: 10.3390/cancers11081170.
- [130] A. Jayanthi & V. Setaluri. Light-Regulated MicroRNAs. *Photochemistry and Photobiology* 91 (1 2015), 163–172. DOI: 10.1111/php.12386.

- [131] J. Pothof, N. S. Verkaik, W. van IJcken, E. A. C. Wiemer, V. T. B. Ta, G. T. J. van der Horst, N. G. J. Jaspers, D. C. van Gent, J. H. J. Hoeijmakers & S. P. Persengiev. MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *The EMBO Journal* 28 (14 2009), 2090–2099. DOI: 10.1038/emboj.2009.156.
- [132] A. Pecorelli & G. Valacchi. Oxidative-Stress-Sensitive microRNAs in UV-Promoted Development of Melanoma. *Cancers* 14 (13 2022), 3224. DOI: 10.3390/cancers14133224.
- [133] T. Stiff, S. A. Walker, K. Cerosaletti, A. A. Goodarzi, E. Petermann, P. Concannon, M. O'Driscoll & P. A. Jeggo. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *The EMBO Journal* 25 (24 2006), 5775–5782. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601446.
- [134] Z. Guo, S. Kozlov, M. F. Lavin, M. D. Person & T. T. Paull. ATM Activation by Oxidative Stress. *Science* 330 (6003 2010), 517–521. DOI: 10.1126/science.1192912.
- [135] X. Zhang, G. Wan, F. G. Berger, X. He & X. Lu. The ATM Kinase Induces MicroRNA Biogenesis in the DNA Damage Response. *Molecular Cell* 41 (4 2011), 371–383. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.01.020.
- [136] M. F. García-Mayoral, I. Díaz-Moreno, D. Hollingworth & A. Ramos. The sequence selectivity of KSRP explains its flexibility in the recognition of the RNA targets. *Nucleic Acids Research* 36 (16 2008), 5290–5296. DOI: 10.1093/nar/gkn509.
- [137] R. K. C. Venigalla & M. Turner. RNA-binding proteins as a point of convergence of the PI3K and p38 MAPK pathways. *Frontiers in immunology* 3 (2012), 398. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00398.
- [138] Q. Yang, W. Li, H. She, J. Dou, D. M. Duong *et al.* Stress Induces p38 MAPK-Mediated Phosphorylation and Inhibition of Drosha-Dependent Cell Survival. *Molecular Cell* 57 (4 2015), 721–734. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.01.004.
- [139] N. Xu, L. Zhang, F. Meisgen, M. Harada, J. Heilborn, B. Homey, D. Grandér, M. Stähle, E. Sonkoly & A. Pivarcsi. MicroRNA-125b Down-regulates Matrix Metalloproteinase 13 and Inhibits Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion. *Journal of Biological Chemistry* 287 (35 2012), 29899–29908. DOI: 10.1074/jbc.M112.391243.
- [140] N. Rivlin, R. Brosh, M. Oren & V. Rotter. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes and cancer* 2 (4 2011), 466–74. DOI: 10.1177/1947601911408889.
- [141] W. Feroz & A. M. A. Sheikh. Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 21 (1 2020), 49. DOI: 10.1186/s43042-020-00089-x.



- [142] F. Navarro & J. Lieberman. miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. *PLOS ONE* 10 (7 2015), e0132767. DOI: 10.1371/journal.pone.0132767.
- [143] F. Pichiorri, S.-S. Suh, A. Rocci, L. D. Luca, C. Taccioli *et al.* Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer cell* 18 (4 2010), 367–81. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.09.005.
- [144] H.-l. Yan, G. Xue, Q. Mei, Y.-z. Wang, F.-x. Ding, M.-F. Liu, M.-H. Lu, Y. Tang, H.-y. Yu & S.-h. Sun. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *The EMBO Journal* 28 (18 2009), 2719–2732. DOI: 10.1038/emboj.2009.214.
- [145] S. Izreig, B. Samborska, R. M. Johnson, A. Sergushichev, E. H. Ma *et al.* The miR-17 - 92 microRNA Cluster Is a Global Regulator of Tumor Metabolism. *Cell Reports* 16 (7 2016), 1915–1928. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.036.
- [146] H. I. Suzuki, K. Yamagata, K. Sugimoto, T. Iwamoto, S. Kato & K. Miyazono. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460 (7254 2009), 529–533. DOI: 10.1038/nature08199.
- [147] F. Garibaldi, E. Falcone, D. Trisciuoglio, T. Colombo, K. Lisek *et al.* Mutant p53 inhibits miRNA biogenesis by interfering with the microprocessor complex. *Oncogene* 35 (29 2016), 3760–3770. DOI: 10.1038/onc.2016.51.
- [148] D. Syed, M. Khan, M. Shabbir & H. Mukhtar. MicroRNAs in Skin Response to UV Radiation. *Current Drug Targets* 14 (10 2013), 1128–1134. DOI: 10.2174/13894501113149990184.
- [149] A. Kraemer, I.-P. Chen, S. Henning, A. Faust, B. Volkmer, M. J. Atkinson, S. Moertl & R. Greinert. UVA and UVB irradiation differentially regulate microRNA expression in human primary keratinocytes. *PloS one* 8 (12 2013), e83392. DOI: 10.1371/journal.pone.0083392.
- [150] I.-P. Chen, M. Bender, I. Spassova, S. Henning, L. Kubat *et al.* UV-type specific alteration of miRNA expression and its association with tumor progression and metastasis in SCC cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 146 (12 2020), 3215–3231. DOI: 10.1007/s00432-020-03358-9.
- [151] P. M. Mulvaney & C. D. Schmults. Molecular prediction of metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Current Opinion in Oncology* 32 (2 2020), 129–136. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000609.
- [152] A. Waldman & C. Schmults. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 33 (1 2019), 1–12. DOI: 10.1016/j.hoc.2018.08.001.

- [153] K. A. Burton, K. A. Ashack & A. Khachemoune. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review of High-Risk and Metastatic Disease. *American Journal of Clinical Dermatology* 17 (5 2016), 491–508. DOI: 10.1007/s40257-016-0207-3.
- [154] M. R. Migden, N. I. Khushalani, A. L. S. Chang, K. D. Lewis, C. D. Schmults *et al.* Cemiplimab in locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma: results from an open-label, phase 2, single-arm trial. *The Lancet Oncology* 21 (2 2020), 294–305. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30728-4.
- [155] L. Fania, D. Didona, F. R. D. Pietro, S. Verkhovskaia, R. Morese *et al.* Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. *Biomedicines* 9 (2 2021), 171. DOI: 10.3390/biomedicines9020171.
- [156] D. N. Syed, R. K. Lall & H. Mukhtar. MicroRNAs and Photocarcinogenesis. *Photochemistry and photobiology* 91 (6 2015), 173–187. DOI: 10.1111/php.12346.
- [157] J. R. Kallini, N. Hamed & A. Khachemoune. Squamous cell carcinoma of the skin: epidemiology, classification, management, and novel trends. *International Journal of Dermatology* 54 (2 2015), 130–140. DOI: 10.1111/ijd.12553.
- [158] S. A. Mueller, M.-E. A. Gauthier, B. Ashford, R. Gupta, V. Gayevskiy *et al.* Mutational Patterns in Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology* 139 (7 2019), 1449–1458.e1. DOI: 10.1016/j.jid.2019.01.008.
- [159] F.-J. Li, Y. Wu, Q. Lv, X.-Y. Yang, M.-J. Jiang & L.-M. Li. Aberrant DNA Methylation in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Dermatology and Venereology* 2 (4 2019), 227–232. DOI: 10.1097/JD9.0000000000000054.
- [160] D. Hervás-Marín, F. Higgins, O. Sanmartín, J. A. López-Guerrero, M. C. Bañó, J. C. Igual, I. Quilis & J. Sandoval. Genome wide DNA methylation profiling identifies specific epigenetic features in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *PLOS ONE* 14 (12 2019), e0223341. DOI: 10.1371/journal.pone.0223341.
- [161] A. Singh, E. Willems, A. Singh, I. M. Ong & A. K. Verma. Ultraviolet radiation-induced differential microRNA expression in the skin of hairless SKH1 mice, a widely used mouse model for dermatology research. *Oncotarget* 7 (51 2016), 84924–84937. DOI: 10.18632/oncotarget.12913.
- [162] C. M. Proby, K. J. Purdie, C. J. Sexton, P. Purkis, H. A. Navsaria, J. N. Stables & I. M. Leigh. Spontaneous keratinocyte cell lines representing early and advanced stages of malignant transformation of the epidermis. *Experimental dermatology* 9 (2 2000), 104–117. DOI: 10.1034/j.1600-0625.2000.009002104.x.
- [163] S. Popp, S. Waltering, P. Boukamp, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, C. Proby & I. M. Leigh. Genetic Characterization of a Human Skin Carcinoma Progression Model: from Primary Tumor to Metastasis. *Journal of Investigative Dermatology* 115 (6 2000), 1095–1103. DOI: 10.1046/J.1523-1747.2000.00173.X.

- [164] J. R. W. Masters & B. Palsson. *Human Cell Culture*. Bd. 1. Springer Netherlands, 1999. DOI: 10.1007/0-306-46872-7.
- [165] S. Popp, S. Waltering, C. Herbst, I. Moll & P. Boukamp. UV-B-type mutations and chromosomal imbalances indicate common pathways for the development of Merkel and skin squamous cell carcinomas. *International Journal of Cancer* 99 (3 2002), 352–360. DOI: 10.1002/ijc.10321.
- [166] A. Szabo, C. M. Perou, M. Karaca, L. Perreard, R. Palais, J. F. Quackenbush & P. S. Bernard. Erratum: Statistical modeling for selecting housekeeper genes (Genome Biology). *Genome Biology* 9 (8 2008). DOI: 10.1186/gb-2008-9-8-405.
- [167] J. Vandesompele, K. D. Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. V. Roy, A. D. Paepe & F. Speleman. Topic-based dissimilarity and sensitivity models for translation rule selection. *Genome* 3 (7 2002).
- [168] A. Radonić, S. Thulke, I. M. Mackay, O. Landt, W. Siegert & A. Nitsche. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (2004), 856–862. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.11.177.
- [169] F.-T. Kuo, K. Fan, G. Ambartsumyan, P. Menon, A. Ketefian, I. K. Bentsi-Barnes & M. D. Pisarska. Relative expression of genes encoding SMAD signal transduction factors in human granulosa cells is correlated with oocyte quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 28 (10 2011), 931–938. DOI: 10.1007/s10815-011-9609-6.
- [170] M. Mhamdi-Ghodhani, C. Starzonek, S. Degenhardt, M. Bender, M. Said, R. Greinert & B. Volkmer. UVB damage response of dermal stem cells as melanocyte precursors compared to keratinocytes, melanocytes, and fibroblasts from human foreskin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 220 (2021), 112216. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112216.
- [171] B. Siebels. "Epigenetische Veränderungen und Reparaturkinetik in humanen Keratinozyten (HaCaT) nach der chronischen Kombinationsbestrahlung (UVA+UVB+VIS+IRA) aus dem solaren Spektrum". Elbe Klinikum Buxtehude, 2019, 24.
- [172] A. Suarez-Arnedo, F. T. Figueroa, C. Clavijo, P. Arbeláez, J. C. Cruz & C. Muñoz-Camargo. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLOS ONE* 15 (7 2020), e0232565. DOI: 10.1371/journal.pone.0232565.
- [173] J. Pijuan, C. Barceló, D. F. Moreno, O. Maiques, P. Sisó, R. M. Marti, A. Macià & A. Panosa. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7 (2019). DOI: 10.3389/fcell.2019.00107.

- [174] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn & H. Erlich. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 (1986), 263–273.
- [175] D. Baltimore. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226 (5252 1970), 1209–1211.
- [176] K. J. Livak & T. D. Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-delta-deltaCT Method. *Methods* 25 (4 2001), 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [177] W. Gaastra. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1 (1984), 349–55. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:349.
- [178] J. S. Long & L. H. Ervin. Using Heteroscedasticity Consistent Standard Errors in the Linear Regression Model. *The American Statistician* 54 (3 2000), 217. DOI: 10.2307/2685594.
- [179] J. Beal. Biochemical complexity drives log-normal variation in genetic expression. *Engineering Biology* 1 (1 2017), 55–60. DOI: 10.1049/enb.2017.0004.
- [180] Y. Benjamini & Y. Hochberg. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57 (1 1995), 289–300.
- [181] I. T. Jolliffe & J. Cadima. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 374 (2065 2016), 20150202. DOI: 10.1098/rsta.2015.0202.
- [182] M. J. Guess & S. B. Wilson. Introduction to Hierarchical Clustering. *Journal of Clinical Neurophysiology* 19 (2 2002), 144–151. DOI: 10.1097/00004691-200203000-00005.
- [183] P. A. Jaskowiak, R. J. Campello & I. G. Costa. On the selection of appropriate distances for gene expression data clustering. *BMC Bioinformatics* 15 (S2 2014), S2. DOI: 10.1186/1471-2105-15-S2-S2.
- [184] F. Kern, E. Aparicio-Puerta, Y. Li, T. Fehlmann, T. Kehl *et al.* miRTargetLink 2.0-interactive miRNA target gene and target pathway networks. *Nucleic Acids Research* 49 (W1 2021), W409–W416. DOI: 10.1093/nar/gkab297.
- [185] J. Zhang & K. B. Storey. RBiomirGS: an all-in-one miRNA gene set analysis solution featuring target mRNA mapping and expression profile integration. *PeerJ* 6 (2018), e4262. DOI: 10.7717/peerj.4262.

- [186] F. Kern, T. Fehlmann, J. Solomon, L. Schwed, N. Grammes, C. Backes, K. V. Keuren-Jensen, D. W. Craig, E. Meese & A. Keller. miEAA 2.0: integrating multi-species microRNA enrichment analysis and workflow management systems. *Nucleic Acids Research* 48 (W1 2020), W521–W528. DOI: 10.1093/nar/gkaa309.
- [187] S. Diersch, M. Wirth, C. Schneeweis, S. Jörs, F. Geisler *et al.* KrasG12D induces EGFR-MYC cross signaling in murine primary pancreatic ductal epithelial cells. *Oncogene* 35 (29 2016), 3880–3886. DOI: 10.1038/onc.2015.437.
- [188] D. G. McFadden, K. Politi, A. Bhutkar, F. K. Chen, X. Song *et al.* Mutational landscape of EGFR-, MYC-, and Kras- driven genetically engineered mouse models of lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (42 2016). DOI: 10.1073/pnas.1613601113.
- [189] Z. Zou, T. Tao, H. Li & X. Zhu. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell and Bioscience* 10 (1 2020), 31. DOI: 10.1186/s13578-020-00396-1.
- [190] Y. Lecarpentier, O. Schussler, J.-L. Hébert & A. Vallée. Multiple Targets of the Canonical WNT/beta-Catenin Signaling in Cancers. *Frontiers in Oncology* 9 (2019). DOI: 10.3389/fonc.2019.01248.
- [191] P. A. Gregory, A. G. Bert, E. L. Paterson, S. C. Barry, A. Tsykin, G. Farshid, M. A. Vadas, Y. Khew-Goodall & G. J. Goodall. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology* 10 (5 2008), 593–601. DOI: 10.1038/ncb1722.
- [192] C.-Y. Loh, J. Chai, T. Tang, W. Wong, G. Sethi, M. Shanmugam, P. Chong & C. Looi. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* 8 (10 2019), 1118. DOI: 10.3390/cells8101118.
- [193] X. Ma, D. Wu, X. Zhang, X. Shao & G. Hu. microRNA-214 Prevents Traits of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma via VEGFA and Bcl-2. *Technology in Cancer Research and Treatment* 19 (2020), 153303382098009. DOI: 10.1177/1533033820980098.
- [194] M. Dahlhoff, S. Muzumdar, M. Schäfer & M. R. Schneider. ERBB2 Is Essential for the Growth of Chemically Induced Skin Tumors in Mice. *Journal of Investigative Dermatology* 137 (4 2017), 921–930. DOI: 10.1016/j.jid.2016.11.023.
- [195] J. Yu, H. Peng, Q. Ruan, A. Fatima, S. Getsios & R. M. Lavker. MicroRNA-205 promotes keratinocyte migration via the lipid phosphatase SHIP2. *The FASEB Journal* 24 (10 2010), 3950–3959. DOI: 10.1096/fj.10-157404.

- [196] Y. S. Lee, C. H. Lee, J. T. Bae, K. T. Nam, D. B. Moon *et al.* Inhibition of skin carcinogenesis by suppression of NF-kappaB dependent ITGAV and TIMP-1 expression in IL-32gamma overexpressed condition. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 37 (1 2018), 293. DOI: 10.1186/s13046-018-0943-8.
- [197] B. Genenger, J. R. Perry, B. Ashford & M. Ranson. A tEMTing target? Clinical and experimental evidence for epithelial-mesenchymal transition in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma (a scoping systematic review). *Discover Oncology* 13 (1 2022), 42. DOI: 10.1007/s12672-022-00510-4.
- [198] W. Lohcharoenkal, M. Harada, J. Lovén, F. Meisgen, N. X. Landén *et al.* MicroRNA-203 Inversely Correlates with Differentiation Grade, Targets c-MYC, and Functions as a Tumor Suppressor in cSCC. *Journal of Investigative Dermatology* 136 (12 2016), 2485–2494. DOI: 10.1016/j.jid.2016.06.630.
- [199] Y. Hao, D. Baker & P. ten Dijke. TGF-beta-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11 2019), 2767. DOI: 10.3390/ijms20112767.
- [200] B. Sánchez-Sendra, E. Serna, L. Navarro, J. F. González-Muñoz, J. Portero, A. Ramos, A. Murgui & C. Monteagudo. Transcriptomic identification of miR-205 target genes potentially involved in metastasis and survival of cutaneous malignant melanoma. *Scientific Reports* 10 (1 2020), 4771. DOI: 10.1038/s41598-020-61637-4.
- [201] H. Wang & I. E. Kochevar. Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF-beta biosynthesis and activation in keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 38 (7 2005), 890–897. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.005.
- [202] P. Wäster, K. Orfanidis, I. Eriksson, I. Rosdahl, O. Seifert & K. Öllinger. UV radiation promotes melanoma dissemination mediated by the sequential reaction axis of cathepsins–TGF-beta1–FAP-alpha. *British Journal of Cancer* 117 (4 2017), 535–544. DOI: 10.1038/bjc.2017.182.
- [203] S. W. Clayton, G. I. Ban, C. Liu & R. Serra. Canonical and noncanonical TGF-beta signaling regulate fibrous tissue differentiation in the axial skeleton. *Scientific Reports* 10 (1 2020), 21364. DOI: 10.1038/s41598-020-78206-4.
- [204] H.-K. Au, J.-H. Chang, Y.-C. Wu, Y.-C. Kuo, Y.-H. Chen *et al.* TGF-beta I Regulates Cell Migration through Pluripotent Transcription Factor OCT4 in Endometriosis. *PLOS ONE* 10 (12 2015), e0145256. DOI: 10.1371/journal.pone.0145256.
- [205] V. Poltavets, M. Kochetkova, S. M. Pitson & M. S. Samuel. The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity. *Frontiers in Oncology* 8 (2018). DOI: 10.3389/fonc.2018.00431.

- [206] C. Sidhanth, P. Manasa, S. Krishnapriya, S. Sneha, S. Bindhya, R. Nagare, M. Garg & T. Ganesan. A systematic understanding of signaling by ErbB2 in cancer using phosphoproteomics. *Biochemistry and Cell Biology* 96 (3 2018), 295–305. DOI: 10.1139/bcb-2017-0020.
- [207] Y.-J. Guo, W.-W. Pan, S.-B. Liu, Z.-F. Shen, Y. Xu & L.-L. Hu. ERK/MAPK signaling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine* (2020). DOI: 10.3892/etm.2020.8454.
- [208] Y. Zhang, F. Chen & C. J. Creighton. Pan-cancer molecular subtypes of metastasis reveal distinct and evolving transcriptional programs. *Cell Reports Medicine* 4 (2 2023), 100932. DOI: 10.1016/j.xcrm.2023.100932.
- [209] S. Valastyan & R. A. Weinberg. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147 (2 2011), 275–292. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.024.
- [210] F. Janku. Tumor heterogeneity in the clinic: is it a real problem? *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 6 (2 2014), 43–51. DOI: 10.1177/1758834013517414.
- [211] S. Sheng, M. M. Bernardo, S. H. Dzinic, K. Chen, E. I. Heath & W. A. Sakr. Tackling tumor heterogeneity and phenotypic plasticity in cancer precision medicine: our experience and a literature review. *Cancer and Metastasis Reviews* 37 (4 2018), 655–663. DOI: 10.1007/s10555-018-9767-4.
- [212] A. B. Williams & B. Schumacher. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (5 2016), a026070. DOI: 10.1101/cshperspect.a026070.
- [213] J. Chen. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (3 2016), a026104. DOI: 10.1101/cshperspect.a026104.
- [214] L. K. Mullany, P. White, E. A. Hanse, C. J. Nelsen, M. M. Goggin, J. E. Mullany, C. K. Anttila, L. E. Greenbaum, K. H. Kaestner & J. H. Albrecht. Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo. *Cell Cycle* 7 (14 2008), 2215–2224. DOI: 10.4161/cc.7.14.6274.
- [215] I. Joshi, L. M. Minter, J. Telfer, R. M. Demarest, A. J. Capobianco, J. C. Aster, P. Sicinski, A. Fauq, T. E. Golde & B. A. Osborne. Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases. *Blood* 113 (8 2009), 1689–1698. DOI: 10.1182/blood-2008-03-147967.
- [216] C. Nowell & F. Radtke. Cutaneous Notch Signaling in Health and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (12 2013), a017772–a017772. DOI: 10.1101/cshperspect.a017772.

- [217] A. G. Condorelli, M. E. Hachem, G. Zambruno, A. Nystrom, E. Candi & D. Castiglia. Notch-ing up knowledge on molecular mechanisms of skin fibrosis: focus on the multifaceted Notch signalling pathway. *Journal of Biomedical Science* 28 (1 2021), 36. DOI: 10.1186/s12929-021-00732-8.
- [218] J. Seoane. Escaping from the TGF  $\beta$  anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 27 (11 2006), 2148–2156. DOI: 10.1093/carcin/bgl068.
- [219] I. García-Santisteban, A. Llopis, L. Krenning, J. Vallejo-Rodríguez, B. van den Broek, A. M. Zubiaga & R. H. Medema. Sustained CHK2 activity, but not ATM activity, is critical to maintain a G1 arrest after DNA damage in untransformed cells. *BMC Biology* 19 (1 2021), 35. DOI: 10.1186/s12915-021-00965-x.
- [220] M. Adachi, A. Gazel, G. Pintucci, A. Shuck, S. Shifteh *et al.* Specificity in Stress Response: Epidermal Keratinocytes Exhibit Specialized UV-Responsive Signal Transduction Pathways. *DNA and Cell Biology* 22 (10 2003), 665–677. DOI: 10.1089/104454903770238148.
- [221] S. Ciesielska, P. Bil, K. Gajda, A. Poterala-Hejmo, D. Hudy & J. Rzeszowska-Wolny. Cell type-specific differences in redox regulation and proliferation after low UVA doses. *PLOS ONE* 14 (1 2019), e0205215. DOI: 10.1371/journal.pone.0205215.
- [222] J. H. McAbee, C. Degorre-Kerbaul, K. Valdez, A. Wendler, U. T. Shankavaram, C. Watts, K. Camphausen & P. J. Tofilon. Detection of glioblastoma intratumor heterogeneity in radiosensitivity using patient-derived neurosphere cultures. *Journal of Neuro-Oncology* 149 (3 2020), 383–390. DOI: 10.1007/s11060-020-03643-0.
- [223] J. C. L. Alfonso & L. Berk. Modeling the effect of intratumoral heterogeneity of radiosensitivity on tumor response over the course of fractionated radiation therapy. *Radiation Oncology* 14 (1 2019), 88. DOI: 10.1186/s13014-019-1288-y.
- [224] E. L. Jonsson, I. Erngren, M. Engskog, J. Haglöf, T. Arvidsson, M. Hedeland, C. Petterson, G. Laurell & M. Nestor. Exploring Radiation Response in Two Head and Neck Squamous Carcinoma Cell Lines Through Metabolic Profiling. *Frontiers in Oncology* 9 (2019). DOI: 10.3389/fonc.2019.00825.
- [225] V. Todorovic, A. Prevc, M. N. Zakelj, M. Savarin, A. Brozic, B. Groselj, P. Strojjan, M. Cemazar & G. Sersa. Mechanisms of different response to ionizing irradiation in isogenic head and neck cancer cell lines. *Radiation Oncology* 14 (1 2019), 214. DOI: 10.1186/s13014-019-1418-6.
- [226] C. R. Pickering, J. H. Zhou, J. J. Lee, J. A. Drummond, S. A. Peng *et al.* Mutational Landscape of Aggressive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 20 (24 2014), 6582–6592. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1768.



- [227] B. L. Mahaney, K. Meek & S. P. Lees-Miller. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical Journal* 417 (3 2009), 639–650. DOI: 10.1042/BJ20080413.
- [228] P. Groth, M. L. Orta, I. Elvers, M. M. Majumder, A. Lagerqvist & T. Helleday. Homologous recombination repairs secondary replication induced DNA double-strand breaks after ionizing radiation. *Nucleic Acids Research* 40 (14 2012), 6585–6594. DOI: 10.1093/nar/gks315.
- [229] J.-L. Ravanat & T. Douki. UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities. *Radiation Physics and Chemistry* 128 (2016), 92–102. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2016.07.007.
- [230] E. A. Fedak, F. R. Adler, L. M. Abegglen & J. D. Schiffman. ATM and ATR Activation Through Crosstalk Between DNA Damage Response Pathways. *Bulletin of Mathematical Biology* 83 (4 2021), 38. DOI: 10.1007/s11538-021-00868-6.
- [231] M. A. Hernandez-Onate & A. Herrera-Estrella. Damage response involves mechanisms conserved across plants, animals and fungi. *Current Genetics* 61 (3 2015), 359–372. DOI: 10.1007/s00294-014-0467-5.
- [232] D. Engelberg. The UV response involving the ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* 77 (3 1994), 381–390. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90153-8.
- [233] S. I. L. Gomes, C. P. Roca, J. J. Scott-Fordsmand & M. J. B. Amorim. Identifying conserved UV exposure genes and mechanisms. *Scientific Reports* 8 (1 2018), 8605. DOI: 10.1038/s41598-018-26865-9.
- [234] J. Gillespie, L. Skeeles, D. Allain, M. Kent, S. Peters, P. Nagarajan, L. Yu, T. Teknos, T. Olencki & A. Toland. MicroRNA expression profiling in metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 30 (6 2016), 1043–1045. DOI: 10.1111/jdv.13098.
- [235] A. Mizrahi, A. Barzilai, D. Gur-Wahnon, I. Z. Ben-Dov, S. Glassberg *et al.* Alterations of microRNAs throughout the malignant evolution of cutaneous squamous cell carcinoma: the role of miR-497 in epithelial to mesenchymal transition of keratinocytes. *Oncogene* 37 (2 2018), 218–230. DOI: 10.1038/onc.2017.315.
- [236] B. Smolarz, A. Durczynski, H. Romanowicz, K. Szylo & P. Hogendorf. miRNAs in Cancer (Review of Literature). *International Journal of Molecular Sciences* 23 (5 2022), 2805. DOI: 10.3390/ijms23052805.
- [237] E. L. O’Dea, J. D. Kearns & A. Hoffmann. UV as an Amplifier Rather Than Inducer of NF-kappaB Activity. *Molecular Cell* 30 (5 2008), 632–641. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.03.017.

- [238] K. J. Campbell, N. R. Chapman & N. D. Perkins. UV stimulation induces nuclear factor kappaB (NF-kappaB) DNA-binding activity but not transcriptional activation. *Biochemical Society Transactions* 29 (6 2001), 688. DOI: 10.1042/0300-5127:0290688.
- [239] B. Lei, J. Liu, Z. Yao, Y. Xiao, X. Zhang, Y. Zhang & J. Xu. NF-kappaB-Induced Upregulation of miR-146a-5p Promoted Hippocampal Neuronal Oxidative Stress and Pyroptosis via TIGAR in a Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15 (2021). DOI: 10.3389/fncel.2021.653881.
- [240] C. Muther, L. Jobeili, M. Garion, S. Heraud, A. Thepot, O. Damour & J. Lamartine. An expression screen for aged-dependent microRNAs identifies miR-30a as a key regulator of aging features in human epidermis. *Aging* 9 (11 2017), 2376–2396. DOI: 10.18632/aging.101326.
- [241] J. Fiedler, E. Grönniger, A. Pfanne, S. Brönneke, K. Schmidt, C. S. Falk, H. Wenck, L. Terstegen, T. Thum & M. Winnefeld. Identification of miR-126 as a new regulator of skin ageing. *Experimental Dermatology* 26 (3 2017), 284–286. DOI: 10.1111/exd.13173.
- [242] G. J. Fisher, Z. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang & J. J. Voorhees. Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. *New England Journal of Medicine* 337 (20 1997), 1419–1429. DOI: 10.1056/NEJM199711133372003.
- [243] B.-R. ZHOU, Y. XU & D. LUO. Effect of UVB irradiation on microRNA expression in mouse epidermis. *Oncology Letters* 3 (3 2012), 560–564. DOI: 10.3892/ol.2012.551.
- [244] A. Magenta, C. Cencioni, P. Fasanaro, G. Zaccagnini, S. Greco, G. Sarra-Ferraris, A. Antonini, F. Martelli & M. C. Capogrossi. miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. *Cell Death and Differentiation* 18 (10 2011), 1628–1639. DOI: 10.1038/cdd.2011.42.
- [245] M. Song, Y. Wang, Z.-F. Shang, X.-D. Liu, D.-F. Xie, Q. Wang, H. Guan & P.-K. Zhou. Bystander autophagy mediated by radiation-induced exosomal miR-7-5p in non-targeted human bronchial epithelial cells. *Scientific Reports* 6 (1 2016), 30165. DOI: 10.1038/srep30165.
- [246] D. Liamina, W. Sibirnyj, A. Khokhlova, V. Saenko, E. Rastorgueva, A. Fomin & Y. Saenko. Radiation-Induced Changes of microRNA Expression Profiles in Radio-sensitive and Radioresistant Leukemia Cell Lines with Different Levels of Chromosome Abnormalities. *Cancers* 9 (12 2017), 136. DOI: 10.3390/cancers9100136.
- [247] E. Ferrari & P. Gandellini. Unveiling the ups and downs of miR-205 in physiology and cancer: transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Cell Death and Disease* 11 (11 2020), 980. DOI: 10.1038/s41419-020-03192-4.

- [248] J. Canueto, E. Cardenoso-Alvarez, J. Garcia-Hernandez, P. Galindo-Villardón, P. Vicente-Galindo *et al.* Micro RNA (miR)-203 and miR-205 expression patterns identify subgroups of prognosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *British Journal of Dermatology* 177 (1 2017), 168–178. DOI: 10.1111/bjd.15236.
- [249] L. Solé-Boldo, G. Raddatz, J. Gutekunst, O. Gilliam, F. Bormann *et al.* Differentiation-related epigenomic changes define clinically distinct keratinocyte cancer subclasses. *Molecular Systems Biology* 18 (9 2022). DOI: 10.15252/msb.202211073.
- [250] E. Skourti, S. Logotheti, C. K. Kontos, A. Pavlopoulou, P. T. Dimoragka, I. P. Trougakos, V. Gorgoulis, A. Scorilas, I. Michalopoulos & V. Zoumpourlis. Progression of mouse skin carcinogenesis is associated with the orchestrated deregulation of mir-200 family members, mir-205 and their common targets. *Molecular Carcinogenesis* 55 (8 2016), 1229–1242. DOI: 10.1002/mc.22365.
- [251] P. Dziunycz, G. Iotzova-Weiss, J. J. Eloranta, S. Läuchli, J. Hafner, L. E. French & G. F. L. Hofbauer. Squamous cell carcinoma of the skin shows a distinct microRNA profile modulated by UV radiation. *The Journal of investigative dermatology* 130 (11 2010), 2686–9. DOI: 10.1038/jid.2010.169.
- [252] C. Darido, S. R. Georgy, T. Wilanowski, S. Dworkin, A. Auden *et al.* Targeting of the Tumor Suppressor GRHL3 by a miR-21-Dependent Proto-Oncogenic Network Results in PTEN Loss and Tumorigenesis. *Cancer Cell* 20 (5 2011), 635–648. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.10.014.
- [253] A. Wang, N. X. Landén, F. Meisgen, W. Lohcharoenkal, M. Stähle, E. Sonkoly & A. Pivarcsi. MicroRNA-31 Is Overexpressed in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Regulates Cell Motility and Colony Formation Ability of Tumor Cells. *PLoS ONE* 9 (7 2014), e103206. DOI: 10.1371/journal.pone.0103206.
- [254] X. Yu & Z. Li. The role of miRNAs in cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20 (1 2016), 3–9. DOI: 10.1111/jcmm.12649.
- [255] R. V. Pusapati, R. L. Weeks, R. J. Rounbehler, M. J. McArthur & D. G. Johnson. E2F2 suppresses Myc-induced proliferation and tumorigenesis. *Molecular Carcinogenesis* 49 (2 2010), 152–156. DOI: 10.1002/mc.20584.
- [256] I. Yuwanita, D. Barnes, M. D. Monterey, S. O'Reilly & E. R. Andrechek. Increased metastasis with loss of E2F2 in Myc -driven tumors. *Oncotarget* 6 (35 2015), 38210–38224. DOI: 10.18632/oncotarget.5690.
- [257] S. Yao, L. Y.-N. Fan & E. W.-F. Lam. The FOXO3-FOXO1 axis: A key cancer drug target and a modulator of cancer drug resistance. *Seminars in Cancer Biology* 50 (2018), 77–89. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.11.018.
- [258] K. Beishline & J. Azizkhan-Clifford. Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS Journal* 282 (2 2015), 224–258. DOI: 10.1111/febs.13148.

- [259] L. Jones, M. Naidoo, L. R. Machado & K. Anthony. The Duchenne muscular dystrophy gene and cancer. *Cellular Oncology* 44 (1 2021), 19–32. DOI: 10.1007/s13402-020-00572-y.
- [260] C. S. Pulford, C. K. Uppalapati, M. R. Montgomery, R. L. Averitte, E. E. Hull & K. J. Leyva. A Hybrid Epithelial to Mesenchymal Transition in Ex Vivo Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Tissues. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (16 2022), 9183. DOI: 10.3390/ijms23169183.
- [261] P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser & J. M. Adams. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (1 2014), 49–63. DOI: 10.1038/nrm3722.
- [262] P. Carmeliet. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology* 69 (Suppl. 3 2005), 4–10. DOI: 10.1159/000088478.
- [263] T. Shimi, V. Butin-Israeli, S. A. Adam, R. B. Hamanaka, A. E. Goldman, C. A. Lucas, D. K. Shumaker, S. T. Kosak, N. S. Chandel & R. D. Goldman. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes and Development* 25 (24 2011), 2579–2593. DOI: 10.1101/gad.179515.111.
- [264] N. Rehage, E. Davydova, C. Conrad, G. Behrens, A. Maiser *et al.* Binding of NUFIP2 to Roquin promotes recognition and regulation of ICOS mRNA. *Nature Communications* 9 (1 2018), 299. DOI: 10.1038/s41467-017-02582-1.
- [265] K. Hettinger, F. Vikhanskaya, M. K. Poh, M. K. Lee, I. de Belle, J.-T. Zhang, S. A. G. Reddy & K. Sabapathy. c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death and Differentiation* 14 (2 2007), 218–229. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401946.
- [266] A. D. Cola, A. Lamolinara, P. Lanuti, C. Rossi, M. Iezzi, M. Marchisio, M. Todaro & V. D. Laurenzi. MiR-205-5p inhibition by locked nucleic acids impairs metastatic potential of breast cancer cells. *Cell Death and Disease* 9 (8 2018), 821. DOI: 10.1038/s41419-018-0854-9.
- [267] J. E. Ferrell. Feedback loops and reciprocal regulation: recurring motifs in the systems biology of the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* 25 (6 2013), 676–686. DOI: 10.1016/j.ceb.2013.07.007.
- [268] H. El-Samad. Biological feedback control—Respect the loops. *Cell Systems* 12 (6 2021), 477–487. DOI: 10.1016/j.cels.2021.05.004.
- [269] A. D. Cola, S. Volpe, M. C. Budani, M. Ferracin, R. Lattanzio *et al.* miR-205-5p-mediated downregulation of ErbB/HER receptors in breast cancer stem cells results in targeted therapy resistance. *Cell Death and Disease* 6 (7 2015), e1823–e1823. DOI: 10.1038/cddis.2015.192.

- [270] X. Lai, S. K. Gupta, U. Schmitz, S. Marquardt, S. Knoll, A. Spitschak, O. Wolkenhauer, B. M. Pützer & J. Vera. MiR-205-5p and miR-342-3p cooperate in the repression of the E2F1 transcription factor in the context of anticancer chemotherapy resistance. *Theranostics* 8 (4 2018), 1106–1120. DOI: 10.7150/thno.19904.
- [271] C.-H. Chao, C.-C. Chang, M.-J. Wu, H.-W. Ko, D. Wang, M.-C. Hung, J.-Y. Yang & C.-J. Chang. MicroRNA-205 signaling regulates mammary stem cell fate and tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation* 124 (7 2014), 3093–3106. DOI: 10.1172/JCI73351.
- [272] M. Delattre & M.-A. Felix. The evolutionary context of robust and redundant cell biological mechanisms. *BioEssays* 31 (5 2009), 537–545. DOI: 10.1002/bies.200800215.
- [273] P. Golstein & G. Kroemer. Redundant cell death mechanisms as relics and backups. *Cell Death and Differentiation* 12 (S2 2005), 1490–1496. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401607.
- [274] Y. Cao. Tumorigenesis as a process of gradual loss of original cell identity and gain of properties of neural precursor/progenitor cells. *Cell and Bioscience* 7 (1 2017), 61. DOI: 10.1186/s13578-017-0188-9.
- [275] J. Krutzfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan & M. Stoffel. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* 438 (7068 2005), 685–689. DOI: 10.1038/nature04303.
- [276] M. S. Ebert, J. R. Neilson & P. A. Sharp. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature Methods* 4 (9 2007), 721–726. DOI: 10.1038/nmeth1079.
- [277] F. Yang, Z. Ning, L. Ma, W. Liu, C. Shao, Y. Shu & H. Shen. Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts. *Molecular Cancer* 16 (1 2017), 148. DOI: 10.1186/s12943-017-0718-4.
- [278] S. Tan, L. Xia, P. Yi, Y. Han, L. Tang *et al.* Exosomal miRNAs in tumor microenvironment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 39 (1 2020), 67. DOI: 10.1186/s13046-020-01570-6.
- [279] W. Yang, S. Tan, L. Yang, X. Chen, R. Yang *et al.* Exosomal miR-205-5p enhances angiogenesis and nasopharyngeal carcinoma metastasis by targeting desmocollin-2. *Molecular Therapy - Oncolytics* 24 (2022), 612–623. DOI: 10.1016/j.omto.2022.02.008.
- [280] L. Wang, F. Zhao, Z. Xiao & L. Yao. Exosomal microRNA-205 is involved in proliferation, migration, invasion, and apoptosis of ovarian cancer cells via regulating VEGFA. *Cancer Cell International* 19 (1 2019), 281. DOI: 10.1186/s12935-019-0990-z.

- [281] E. Durendez-Saez, S. Torres-Martinez, S. Calabuig-Farinas, M. Meri-Abad, M. Ferrero-Gimeno & C. Camps. Exosomal microRNAs in non-small cell lung cancer. *Translational Cancer Research* 10 (6 2021), 3128–3139. DOI: 10.21037/tcr-20-2815.
- [282] Z. Guo, X. Lu, F. Yang, L. Qin, N. Yang, P. Cai, C. Han, J. Wu & H. Wang. The Expression of miR-205 in Prostate Carcinoma and the Relationship with Prognosis in Patients. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2022 (2022), 1–9. DOI: 10.1155/2022/1784791.
- [283] R.-M. Liu & L. P. Desai. Reciprocal regulation of TGF-beta and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biology* 6 (2015), 565–577. DOI: 10.1016/j.redox.2015.09.009.
- [284] K. Tzavlaki & A. Moustakas. TGF-beta Signaling. *Biomolecules* 10 (3 2020), 487. DOI: 10.3390/biom10030487.
- [285] J. Krstic, D. Trivanovic, S. Mojsilovic & J. F. Santibanez. Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015 (2015), 1–15. DOI: 10.1155/2015/654594.
- [286] Y. Song, Y. Chen, Y. Li, X. Lyu, J. Cui, Y. Cheng, L. Zhao & G. Zhao. Metformin inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition-like process and stem-like properties in GBM via AKT/mTOR/ZEB1 pathway. *Oncotarget* 9 (6 2018), 7023–7035. DOI: 10.18632/oncotarget.23317.
- [287] Y. Zeng, J. Zhu, D. Shen, H. Qin, Z. Lei, W. Li, J.-A. Huang & Z. Liu. Repression of Smad4 by miR-205 moderates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cell lines. *International Journal of Oncology* 49 (2 2016), 700–708. DOI: 10.3892/ijo.2016.3547.
- [288] M. Oltra, L. Vidal-Gil, R. Maisto, J. Sancho-Pelluz & J. M. Barcia. Oxidative stress-induced angiogenesis is mediated by miR-205-5p. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24 (2 2020), 1428–1436. DOI: 10.1111/jcmm.14822.
- [289] P. Zhang, Y. Wei, L. Wang, B. G. Debeb, Y. Yuan *et al.* ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nature Cell Biology* 16 (9 2014), 864–875. DOI: 10.1038/ncb3013.
- [290] T. Quan, T. He, S. Kang, J. J. Voorhees & G. J. Fisher. Ultraviolet Irradiation Alters Transforming Growth Factor beta/Smad Pathway in Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 119 (2 2002), 499–506. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01834.x.
- [291] M. P. Thomas, C. Erneux & B. V. L. Potter. SHIP2: Structure, Function and Inhibition. *ChemBioChem* 18 (3 2017), 233–247. DOI: 10.1002/cbic.201600541.

- [292] S. Usman, N. H. Waseem, T. K. N. Nguyen, S. Mohsin, A. Jamal, M.-T. Teh & A. Waseem. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers* 13 (19 2021), 4985. DOI: 10.3390/cancers13194985.
- [293] P. Cammareri, A. M. Rose, D. F. Vincent, J. Wang, A. Nagano *et al.* Inactivation of TGFbeta receptors in stem cells drives cutaneous squamous cell carcinoma. *Nature Communications* 7 (1 2016), 12493. DOI: 10.1038/ncomms12493.
- [294] S. Liu, S. Chen & J. Zeng. TGF-beta signaling: A complex role in tumorigenesis (Review). *Molecular Medicine Reports* (2017). DOI: 10.3892/mmr.2017.7970.
- [295] J. Zhang, H. Jiang, D. Xu, W.-J. Wu, H.-D. Chen & L. He. DNA-PKcs Mediates An Epithelial-Mesenchymal Transition Process Promoting Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Invasion And Metastasis By Targeting The TGF-beta1/Smad Signaling Pathway. *OncoTargets and Therapy* Volume 12 (2019), 9395–9405. DOI: 10.2147/OTT.S205017.
- [296] T. Quan, T. He, J. J. Voorhees & G. J. Fisher. Ultraviolet Irradiation Blocks Cellular Responses to Transforming Growth Factor-beta by Down-regulating Its Type-II Receptor and Inducing Smad7. *Journal of Biological Chemistry* 276 (28 2001), 26349–26356. DOI: 10.1074/jbc.M010835200.
- [297] T. Quan, T. He, S. Kang, J. J. Voorhees & G. J. Fisher. Solar Ultraviolet Irradiation Reduces Collagen in Photoaged Human Skin by Blocking Transforming Growth Factor-beta Type II Receptor/Smad Signaling. *The American Journal of Pathology* 165 (3 2004), 741–751. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63337-8.
- [298] Y. Ke & X.-J. Wang. TGF-beta Signaling in Photoaging and UV-Induced Skin Cancer. *Journal of Investigative Dermatology* 141 (4 2021), 1104–1110. DOI: 10.1016/j.jid.2020.11.007.
- [299] C. Capaccia, S. Diverio, D. Zampini & G. Guelfi. The Complex Interaction between P53 and miRNAs Joins New Awareness in Physiological Stress Responses. *Cells* 11 (10 2022), 1631. DOI: 10.3390/cells11101631.
- [300] A. M. Godden, M. Antonaci, N. J. Ward, M. van der Lee, A. Abu-Daya, M. Guille & G. N. Wheeler. An efficient miRNA knockout approach using CRISPR-Cas9 in *Xenopus*. *Developmental Biology* 483 (2022), 66–75. DOI: 10.1016/j.ydbio.2021.12.015.
- [301] W. Chiangjong & S. Chutipongtanate. EV-out or EV-in: Tackling cell-to-cell communication within the tumor microenvironment to enhance anti-tumor efficacy using extracellular vesicle-based therapeutic strategies. *OpenNano* 8 (2022), 100085. DOI: 10.1016/j.onano.2022.100085.

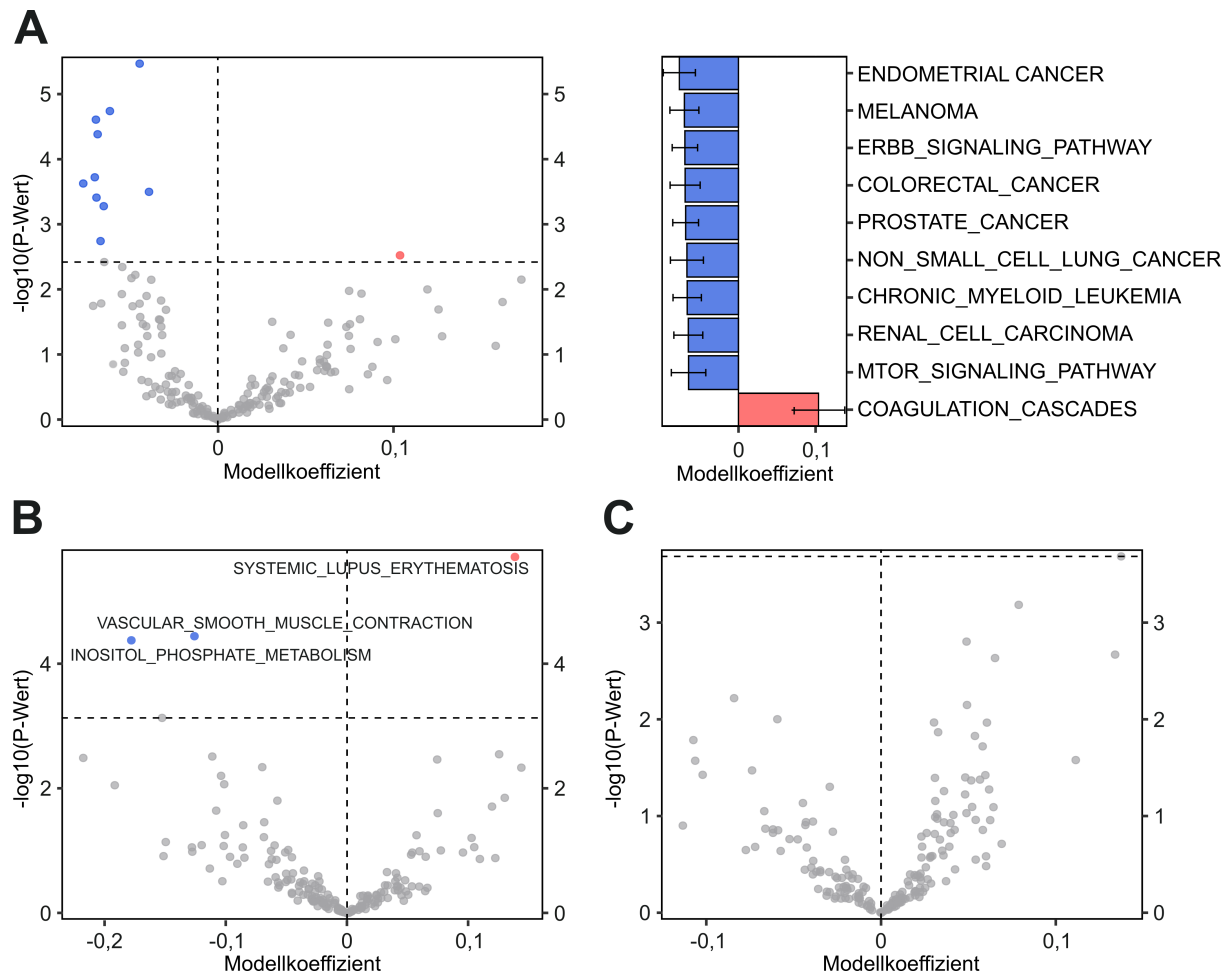
- [302] M. Catalano & L. O'Driscoll. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *Journal of Extracellular Vesicles* 9 (1 2020), 1703244. DOI: 10.1080/20013078.2019.1703244.



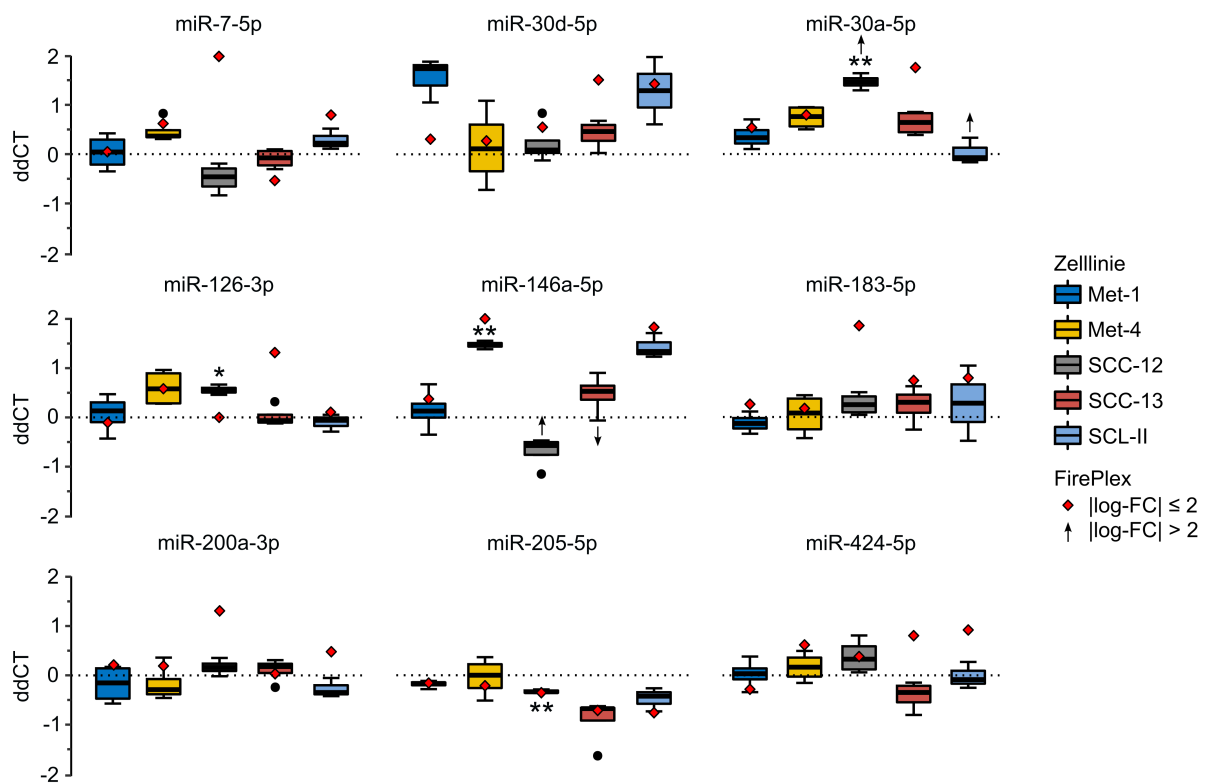


# Anhang

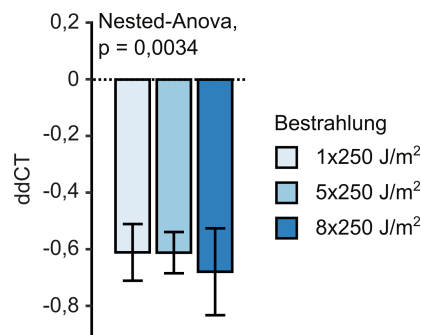
## 1 Ergänzende Abbildungen



**Abbildung A.1: Pathway-Analyse differenziell exprimierter miRNAs zwischen den Clustern A (Met-1/Met-4), B (SCL-II) und C (SCC-12/SCC-13).** Unterstützendes Material zu Abbildung 5.2. **(A)** Cluster A vs. Cluster B/C. **(B)** Cluster B vs. Cluster A/C. **(C)** Cluster C vs. Cluster A/B. Positiver Modellkoeffizient: aktivierter KEGG-Pathway. Negativer Modellkoeffizient: reprimierter KEGG-Pathway. Rot: Signifikant hochregulierte Pathways. Blau: Signifikant reprimierte Pathways. Signifikanzschwelle für angereicherte Pathways:  $p < 0,05$ .



**Abbildung A.2: qPCR-Validierung der Fireplex®-Ergebnisse.** qPCR-Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt. Zum Vergleich sind die Ergebnisse des Fireplex®-Assays (s. Abbildung 5.4 bzw. Abbildung 5.5) als rote Rauten ( $\log_2\text{-FC} < 2$ ) oder schwarze Pfeile ( $\log_2\text{-FC} \geq 2$ ) abgebildet. ddCT: Expression ermittelt mit der delta-delta CT Methode; entspricht dem  $\log_2\text{-FC}$ . Eine signifikante Veränderung der qPCR-Proben im Vergleich zu unbestrahlten Proben wurde mittels Einstichproben-t-Test mit  $\mu = 0$  und FDR-Adjustierung ermittelt. \*:  $p_{\text{adj}} < 0,05$ ; \*\*:  $p_{\text{adj}} < 0,01$ .  $n = 4$ .



**Abbildung A.3: miR-205 Expression nach akuter und chronischer Bestrahlung.** Dargestellt sind die Ergebnisse einer qPCR mit Nested-ANOVA, um Unterschiede der Genexpression zu analysieren. Die Bestrahlungsdosis von  $250 \text{ J/m}^2$  entspricht einer erythemgewichteten Dosis von ungefähr 0,25 MED. Akut bestrahlte Zellen (0,25 MED) und chronisch bestrahlte Zellen mit einer Dosis von  $5 \times 0,25$  MED wurden 24 h nach der Bestrahlung lysiert. Chronisch bestrahlte Zellen mit der vollen Dosis von  $8 \times 0,25$  MED wurden 72 h nach der Bestrahlung lysiert. Ein nachgeschalteter Einstichproben-t-Test mit  $\mu = 0$  zeigte nach FDR-Adjustierung keine signifikanten Veränderungen zu den einzelnen Zeitpunkten an.  $n \geq 2$ .



## 2 Ergänzende Tabellen

**Tabelle A.1:** Gering exprimierte miRNAs im FirePlex<sup>®</sup>-Assay (< 2,5 a.u.).

Name	Mediane Expression (a.u.)
hsa-miR-9-5p	1,34
hsa-miR-101-3p	0*
hsa-miR-125b-5p	0*
hsa-miR-181a-3p	0,0468
hsa-miR-296-5p	0*
hsa-miR-378g	0,886
hsa-miR-378i	0*
hsa-miR-382-5p	0*
hsa-miR-495-3p	0*
hsa-miR-1246	0,357
hsa-miR-4454	0*

\*Negative Expression wurde auf 0 gesetzt.

**Tabelle A.2:** KEGG-Pathway-Analyse (Top 10) der miRNAs aus Abbildung 5.7. Erstellt mit miRTargetLink 2.0, Abrufdatum 06.12.2022

Rang	KEGG-Pathway	Gene	Padj
1	MicroRNAs in cancer	CCND1, CCND2, CRK, NOTCH1	0,0022
2	Pathways in cancer	CCND1, CCND2, CRK, NOTCH1, SMAD2	0,0089
3	Cell cycle	CCND1, CCND2, SMAD2	0,0101
4	Cellular senescence	CCND1, CCND2, SMAD2	0,0128
5	Hippo signaling pathway	CCND1, CCND2, SMAD2	0,0128
6	Focal Adhesion	CCND1, CCND2, CRK	0,0197
7	Hedgehog signaling pathway	CCND1, CCND2	0,0197
8	Human T-cell leukemia virus 1 infection	CND1, CCND2, SMAD2	0,0198
9	Chronic myeloid leukemia	CCND1, CRK	0,0263
10	p53 signaling pathway	CCND1, CCND2	0,0263

**Tabelle A.3:** Signifikant veränderte GO-Terme des im Tumor herunterregulierten 13-miRNA Sets aus Abbildung 5.8. Ermittelt mit miEAA 2.0, Abrufdatum 13.12.2022.

Rang	GO-Term	Padj
1	GO:0000785 Chromatin	$8,1 \cdot 10^{-5}$
2	GO:0040018 Positive regulation of multicellular organism growth	$8,1 \cdot 10^{-5}$
3	GO:0072593 Reactive oxygen species metabolic process	$8,1 \cdot 10^{-5}$
4	GO:0043209 Myelin sheath	$9,3 \cdot 10^{-5}$
5	GO:0071230 Cellular response to amino acid stimulus	$9,3 \cdot 10^{-5}$
6	GO:0006909 Phagocytosis	$1,5 \cdot 10^{-4}$
7	GO:0007507 Heart development	$1,5 \cdot 10^{-4}$
8	GO:0001541 Ovarian follicle development	$1,8 \cdot 10^{-4}$
9	GO:0031953 Negative regulation of protein autophosphorylation	$1,8 \cdot 10^{-4}$
10	GO:0032967 Positive regulation of collagen biosynthetic process	$1,8 \cdot 10^{-4}$
11	GO:0030279 Negative regulation of ossification	$1,8 \cdot 10^{-4}$
12	GO:0005068 Transmembrane receptor protein tyrosine kinase adaptor activity	$2,2 \cdot 10^{-4}$
13	GO:0007155 Cell adhesion	$2,2 \cdot 10^{-4}$
14	GO:0051402 Neuron apoptotic process	$2,2 \cdot 10^{-4}$
15	GO:0009314 Response to radiation	$2,2 \cdot 10^{-4}$
16	GO:0010224 Response to UVB	$2,5 \cdot 10^{-4}$
17	GO:0001666 Response to Hypoxia	$2,6 \cdot 10^{-4}$
18	GO:0006461 Protein complex assembly	$2,6 \cdot 10^{-4}$
19	GO:0006470 Protein dephosphorylation	$2,7 \cdot 10^{-4}$
20	GO:0007179 Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	$2,7 \cdot 10^{-4}$



### 3 Publikationen

I.-P. Chen, M. Bender, I. Spassova, S. Henning, L. Kubat et al. UV-type specific alteration of miRNA expression and its association with tumor progression and metastasis in SCC cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 146 (12 2020), 3215–3231. DOI: 10.1007/s00432-020-03358-9.

M. Mhamdi-Ghodbani, C. Starzonek, S. Degenhardt, M. Bender, M. Said, R. Greinert & B. Volkmer. UVB damage response of dermal stem cells as melanocyte precursors compared to keratinocytes, melanocytes, and fibroblasts from human foreskin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 220 (2021), 112216. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112216.

M. Weichenthal, I.-M. Svane, L. K. Sekulovic, J. Mangana, I. Lugowska et al. 836P Outcome of PD-1 inhibitor therapy of advanced melanoma patients according to demographic factors in a real-world setting across Europe. *Annals of Oncology* 33 (2022), S931. DOI:10.1016/j.annonc.2022.07.962.

M. Weichenthal, I. M. Svane, L. K. Sekulovic, J. Mangana, P. Mohr et al. EMRseq: Registry-based outcome analysis on 1,000 patients with BRAF V600–mutated metastatic melanoma in Europe treated with either immune checkpoint or BRAF- /MEK inhibition. *Journal of Clinical Oncology* 40 (16suppl 2022), 9540–9540. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.16.

P. Mohr, E. Scherrer, C. Assaf, M. Bender, C. Berking et al. Real-World Therapy with Pembrolizumab: Outcomes and Surrogate Endpoints for Predicting Survival in Advanced Melanoma Patients in Germany. *Cancers* 14 (7 2022), 1804. DOI: 10.3390/cancers14071804.

C. Starzonek, M. Mhamdi-Ghodbani, M. Bender, S. Henning, S. Degenhardt, I.-P. Chen, M. Said, R. Greinert & B. Volkmer. Enrichment of Human Dermal Stem Cells from Primary Cell Cultures through the Elimination of Fibroblasts. *Cells* 12 (6 2023). DOI: 10.3390/cells12060949..

M. Bender, I.-P. Chen, C. Starzonek, M. Mhamdi-Ghodbani, S. Henning, S. Degenhardt, B. Volkmer & R. Greinert. Knockdown of Solar Simulated Radiation-Sensitive miR-205-5p does not Induce Progression of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma *in vitro*. Submitted to *Cancers* (MDPI).

M. Bender, I.-P. Chen, P. Mohr, L. Bluhm, B. Volkmer & R. Greinert. LASSO Logistic Regression Reveals a Mixed MiRNA and Serum-marker Classifier for Prediction of Immunotherapy Response in Liquid Biopsies of Melanoma Patients. In preparation.

---

# Danksagung

---

Ich danke Dr. Rüdiger Greinert und Dr. Beate Volkmer für die lange und exzellente Unterstützung meines wissenschaftlichen Werdegangs. Insbesondere für die Betreuung und jegliche Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich bedanken. Vielen Dank für eure Ideen, unsere Diskussionen und euer stetes Engagement für das gesamte Zellbiologielabor.

Bei Prof. Dr. Julia Kehr möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme dieser Arbeit als Gutachterin bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Zellbiologie für die freundliche Art und angenehme Arbeitsatmosphäre. Dr. I-Peng Chen und Stefan Henning danke ich vor allem für die hervorragende Unterstützung bei experimentellen Fragestellungen, interessanten Diskussionen und dem Korrekturlesen der Arbeit. Dr. Mouna Mhamdi-Ghodbani und Dr. Sarah Degenhardt danke ich insbesondere für ihre wertvollen Ideen und Anregungen sowie ihrer Hilfsbereitschaft in jeder Situation. Bei Christin Starzonek möchte ich mich für die aufschlussreichen Diskussionen und angenehme Zusammenarbeit sowie die Hilfe bei der Erstellung von Abbildungen mit Biorender bedanken. Rebecca Keck, Stefanie Balk, Sylke Engel-Haskiris, Maren Brunsen und Regina Börger-Hoppe danke ich für die wertvolle Hilfe bei praktischen Fragestellungen, die exzellente Führung des Labors und dem immer offenen Ohr.

Johannes Zeigert danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit und die langjährige Freundschaft.

Ein besonderer Dank geht an meine Frau und an meine Familie für die stetige Unterstützung und den ausnahmslosen Rückhalt. Ohne euch wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.



---

# Eidesstattliche Erklärung

---

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die eingereichte Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium und dem zur Archivierung im Studienbüro Biologie eingereichten gedruckten Exemplar der Dissertation.

Buxtehude, 13.07.2023

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'H. Bend', is centered on the page.