

Charakterisierung zirkulierender  
mikroRNAs im Blut von  
Brustkrebspatientinnen vor und nach  
chemotherapeutischer Behandlung

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Isabel Stückrath

Hamburg 2015



Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Christian Lohr  
Biozentrum Grindel und Zoologisches Museum  
Martin-Luther King-Platz 3  
20146 Hamburg

PD. Dr. Heidi Schwarzenbach  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,  
Institut für Tumorbologie  
Martinistraße 52  
20246 Hamburg

Tag der Disputation: 28.08.2015



## Zusammenfassung

MikroRNAs sind eine Klasse von natürlich vorkommenden kleinen, nicht kodierenden RNA Molekülen, die auf Grund ihrer Sequenzhomologie an die 3´untranslatierte Region (UTR) ihrer Zielgen-mRNA binden und deren Translation blockieren oder die Degradation der mRNA auslösen. Sie sind an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse, wie z.B. Apoptose, hämatopoetische Differenzierung, Metabolismus, neurale Entwicklung, Tumorentwicklung und Metastasierung, beteiligt.

Für die Quantifizierung der gesamten, zirkulierenden mikroRNAs wurde ein Kollektiv von postoperativen Plasmaproben von 111 Patientinnen vor und nach Chemotherapie und 46 gesunden Frauen verwendet. Die Verwendung von Plasma für diese Analysen hat den Vorteil, dass es als “flüssige Biopsie” Tumorgewebebiopsien vermeidet. Zusätzlich bietet sich durch diesen nicht-invasiven Eingriff die Möglichkeit, Blut vor und nach der Chemotherapie von Patienten zu entnehmen, um den Verlauf der Erkrankung zu verfolgen.

Anhand einer repräsentativen Auswahl von 30 Proben aus beiden Kohorten wurde zunächst ein mikroRNA-Expressions-Microarray aus rund 1300 bekannten mikroRNAs verwendet und ein Expressionsprofil erstellt, das die 30 am stärksten deregulierten mikroRNAs identifizierte. Anschließend wurden daraus sechs mikroRNAs (miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132, miR-146a) ausgewählt und in Einzel-Analysen mittels quantitative Real-Time PCR validiert.

Die gemessene erhöhte miR-16 Expression in den 111 Mammakarzinom-Patientinnen und in der Subgruppe der Lymphknoten-negativen Patientinnen weist darauf hin, dass sich die Expression der miR-16 im Verlauf der Tumorprogression verändert und mit

zunehmender Malignität abnimmt. Die funktionellen Analysen zeigten, dass eine Überexpression der miR-16 die induzierte Apoptose förderte sowie die Migration und Invasion in MDA-MB-231 Zellen inhibierte.

Das erhöhte Expressionsniveau der miR-27a und miR-132 im Plasma von Brustkrebspatientinnen vor einer Chemotherapie nahm nach der Chemotherapie signifikant ab. In den experimentellen Analysen wurde für die miR-27a ein signifikanter Anstieg des Expressionsniveau unter Hypoxie nachgewiesen und für die miR-132 konnte BRCA1 als Zielgen identifiziert werden.

Das erhöhte Expressionsniveau der miR-130a und miR-146a war sowohl mit einem negativen Lymphknoten-Status als auch mit einem positiven HER2-Status assoziiert. Zusätzlich zeigten die funktionellen Analysen, dass die Inhibierung der miR-130a die Zellproliferation reduzierte. Für miR-146a wurde BRCA1 als Zielgen identifiziert.

Die Plasmakonzentration von miR-107 war signifikant in ER-negativen im Vergleich zu ER-positiven Patientinnen erhöht, was auf eine inhibierende Wirkung der miR-107 auf die ER-Expression hinwies. Dies konnte allerdings nicht durch experimentellen Studien bestätigt werden. Die auf Grund des erhöhten Expressionsniveaus der miR-107 in Lymphknoten-negativen Patientinnen vermutete Repression auf das Migrations- bzw. Invasionsverhalten von Tumorzellen wurde anhand der durchgeführten Experimente belegt. Die Überexpression von miR-107 verringerte die Migration und Invasion von MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen, während die Hemmung der miR-107 die Invasion von MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen und die Migration von MCF-7 Zellen stimulierte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die Quantifizierung zirkulierender mikroRNAs im Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen als diagnostischer Biomarker eignen könnte. Anhand signifikant unterschiedlicher Expressionsniveaus der miR-16,

miR-27a und miR-132 konnte sowohl zwischen Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Frauen unterschieden werden als auch zwischen Patientinnen vor und nach Chemotherapie. Zudem konnte eine Korrelation der miR-16, miR-107, miR-130a und miR-146a Konzentration mit dem Lymphknoten- bzw. Rezeptorstatus nachgewiesen werden. Somit könnte sich die Quantifizierung dieser mikroRNAs ebenfalls zur Identifizierung verschiedener Subtypen des Mammakarzinoms und zur Charakterisierung der Tumorprogression eignen.

Neben zellfreien und proteingebundenen mikroRNAs, liegen zirkulierende mikroRNAs auch in Exosomen im Blut vor. Exosomen werden durch aktive Sekretion von einer Vielzahl von Zellen in die Blutzirkulation abgegeben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Exosomen aus dem Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen mit Hilfe des epithelialen Tumorzellmarkers EpCAM zu isolieren. Dies ist ein erster Schritt für die tumor-spezifische Isolierung von Exosomen und liefert die Möglichkeit für die Quantifizierung tumor-spezifischer, exosomaler mikroRNAs.



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	V
Inhaltsverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	XIII
Abbildungsverzeichnis .....	XVIII
Tabellenverzeichnis .....	XX
1. Einleitung .....	1
1.1 Das Mammakarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms .....	1
1.1.2 Histologische und molekulare Klassifizierung des Mammakarzinoms .....	2
1.1.3 BRCA1 und BRCA2 bei Mammakarzinomen .....	7
1.1.4 Behandlungsmaßnahmen beim Mammakarzinom .....	8
1.1.5 Metastasierung des Mammakarzinoms .....	10
1.2 MikroRNAs .....	13
1.2.1 Biogenese der mikroRNAs .....	13
1.2.2 Funktionen der mikroRNAs .....	16
1.2.3 Zirkulierende mikroRNAs und ihre Rolle als Biomarker .....	19
1.3 Exosomen .....	22
1.3.1 Biogenese der Exosomen .....	23
1.3.2 Funktionen der Exosomen .....	25
1.4 Fragestellung .....	28
2. Material .....	30
2.1 Patientenmaterial .....	30
2.1.1 SUCCESS-B Studie .....	30
2.1.2 Patientenmaterial aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie (UKE) .....	31
2.2 Zelllinien .....	32
2.3 Chemikalien und Reagenzien .....	32
2.4 Verbrauchsmaterialien .....	34
2.5 Laborgeräte .....	36
2.6 Puffer, Lösungen und Medien .....	38
2.7 Käuflich erworbene Kits .....	42
2.8 Antikörper .....	43

2.9	Enzyme und Marker.....	43
2.10	Synthetische Oligonukleotide.....	45
2.11	Plasmide und Vektoren.....	49
2.12	Verwendete Programme und Datenbanken.....	49
3.	Methoden.....	50
3.1	Klonierungstechniken.....	50
3.1.1	Hybridisierung und Auffüllen der DNA-Oligonukleotide.....	50
3.1.2	Herstellung der Reporterplasmide.....	51
3.1.3	Restriktionsverdau.....	52
3.1.4	Ligation.....	54
3.1.5	Hitzetransformation kompetenter Bakterien.....	54
3.1.6	Übernachtkulturen und Minipräparation von Plasmid-DNA.....	55
3.1.7	Sequenzierung.....	55
3.2	Zellkultur.....	56
3.2.1	Hypoxie.....	57
3.2.2	Transfektion von Zelllinien.....	58
3.2.3	Luciferase-Assay.....	58
3.2.4	Proliferationsassay.....	60
3.2.5	Durchflusszytometrische Messung der Apoptose.....	61
3.2.6	Zellmigrations- und Invasionsassay.....	63
3.3	Isolierung und Konzentrationsbestimmung der RNA.....	64
3.3.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen.....	64
3.3.2	Isolierung der mikroRNAs aus Plasmaproben.....	65
3.3.3	Isolierung der mikroRNAs für Microarray-Analysen.....	65
3.3.4	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung.....	66
3.4	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	67
3.4.1	RT-PCR der mRNA.....	67
3.4.2	Reverse Transkription der mikroRNAs.....	68
3.5	Quantitative Real-Time PCR.....	68
3.5.1	Quantifizierung der mRNA mittels SYBR Green.....	69
3.5.2	Quantifizierung der mikroRNAs mittels TaqMan Sonden.....	70
3.5.3	Auswertung der Real-Time PCR und relative Quantifizierung.....	71
3.6	Proteinanalyse.....	72
3.6.1	Isolierung von Proteinen.....	72
3.6.2	Messung der Proteinkonzentration.....	73
3.6.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	73
3.6.4	Western Blot.....	74
3.6.5	Immundetektion.....	75

3.7	Isolierung von Exosomen .....	76
3.7.1	Präzipitation der Exosomen .....	76
3.7.2	Isolierung der Exosomen mittels Ultrazentrifugation.....	76
3.7.3	Isolierung von EpCAM-spezifischen Exosomen mittels Microbeads .....	77
3.7.4	Nachweis der Exosomen.....	79
3.8	Statistik .....	80
4.	Ergebnisse .....	81
4.1	Expressionsprofil zirkulierender mikroRNAs im Blut von Mammakarzinom-Patientinnen.....	81
4.1.1	Patientinnen .....	81
4.1.2	Selektion der zirkulierenden mikroRNAs basierend auf den Ergebnissen der Microarray Analysen.....	83
4.1.3	Quantifizierung der zirkulierenden RNA .....	90
4.1.4	MikroRNA-1207 als endogene Kontrolle für die Normalisierung der mikroRNA-Daten .....	91
4.1.5	Quantifizierung der zirkulierenden mikroRNAs miR-16, miR- 27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a mittels Real- Time PCR .....	92
4.1.6	Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen der miR-16, miR-107, miR-130a und miR-146a und dem Lymphknoten- bzw. Rezeptorstatus.....	95
4.2	Funktionelle Analysen der mikroRNAs.....	98
4.2.1	Expressionslevel der miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen.	98
4.2.2	Expressionslevel der mikroRNAs in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 unter hypoxischen Bedingungen .....	99
4.2.3	Einfluss der mikroRNAs miR-16, miR-107 und miR-130a auf die Proliferation der MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen.....	102
4.2.4	Einfluss der mikroRNAs miR-16, miR-107 und miR-130a auf die induzierte Apoptose .....	104
4.2.5	MiR-16, miR-107 und miR-130a verändern das Migrations- und Invasionsverhalten von MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen ....	107
4.2.6	MiR-107 zeigte keinen Einfluss auf die Proteinexpression des Estrogenrezeptors .....	112
4.2.7	Reguliert miR-107 die Expression des Estrogenrezeptors?.....	114
4.2.8	Können die mikroRNAs miR-132 und miR-146a die Expression des Tumorsuppressorgens BRCA1 regulieren?.....	116

4.3	Extraktion von Exosomen aus Plasma und die Separation tumor-spezifischer Exosomen.....	118
4.3.1	Nachweis des exosomalen EpCAM Proteins .....	119
4.3.2	EpCAM-basierte Extraktion und Separation tumor-spezifischer Exosomen .....	120
5.	Diskussion .....	123
5.1	Die Auswahl der Referenz-mikroRNA als endogene Kontrolle.....	124
5.2	Differentielle Plasmakonzentrationen der zirkulierenden, zellfreien miR-16, miR-27a und miR-132 bei Mammakarzinom-Patientinnen.....	127
5.3	Die Plasmakonzentrationen der miR-107, miR-130a und miR-146a ist mit dem Rezeptorstatus assoziiert .....	130
5.4	Detektion tumor-spezifischer Exosomen .....	135
5.5	Fazit und Ausblick .....	137
	Literaturverzeichnis .....	139
	Danksagung .....	149

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ac-pre-miR	<i>Ago2-cleaved-pre-miR</i>
Ago2	<i>Argonaute-2</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	<i>Area under the Curve</i>
Bp	Basenpaar
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer, early onset 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer, early onset 2</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CK	Zytokeratin
CTC	zirkulierende Tumorzelle ( <i>circulating tumor cell</i> )
Cy3	<i>Cyanine Dye3</i>
Cy5	<i>Cyanine Dye5</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CI	Confidence Interval
Cm	Zentimeter
CT	<i>Cycle Treshold</i>
cTNM	klinischer TNM
Da	Dalton
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DGCR8	<i>Di George Critical Region8</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	<i>Desoxynucleoside Triphosphate Set</i>
Ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ER	Estrogen-Rezeptor
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required For Transport</i>
et al.	<i>etalii/etaliae</i>
EtOH	Ethanol
FCS	<i>Fetal Calf Sera</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
G	<i>Grading</i>
G1	hochdifferenzierte Tumoren
G2	mäßigdifferenzierte Tumoren
G3	gering beziehungsweise undifferenzierte Tumoren
GAPDH	Glyceraldehyde3-PhosphateDehydrogenase
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
GnRH	Gonadotropin Releasing-Hormon
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung
IDC	Invasives duktales Karzinom

## Abkürzungsverzeichnis

---

IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
ILC	invasives lobuläres Karzinom
ISH	In situ Hybridisierung
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LOH	Verlust der Heterozygotität (Loss of Heterozygosity)
μ	Micro
μg	Mikrogramm
μL	Microliter
μm	Mikrometer
μM	Micromolar
m	Milli
M	Molar, Fernmetastasen
M0	Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom
M1	Patientinnen mit Fernmetastasen
mg	Milligramm
MET	Mesenchymal-Epitheliale Transition
min	Minute
miR	mikroRNA
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
MVBs	Multivesicular Bodies
MW	Molekulargewicht
n	Nano
N	Regionäre Lymphknotenmetastasen
nm	Nanometer
MRD	minimale residuale Krebserkrankung (minimal residual disease)
OD	Optische Dichte

p	Pico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Propodiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Progesteron-Rezeptor
pre-miR	Vorläufer- (Precursor-) miR
pri-miR	Primäre-miR
PT	Primärtumor
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
pTNM	pathologischer TNM
p-Wert	Wahrscheinlichkeits-Wert (probability)
qPCR	quantitative PCR
Ran	<i>Ras-Related Nuclear Protein</i>
RB1	Retinoblastoma1
RBP	RNA-binding Protein
Rez	Rezediv
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RLC	<i>RISC Loading Complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA-Pol	RNA Polymerase
RNase	Ribonuklease
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
Rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Sec	Sekunde
Std.	Stunde
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

T	Primärtumor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNM	Tumor Nodal Metastasen
TRBP	<i>Tar-RNA Binding Protein</i>
U	<i>Unit</i> = definierte Enzymeinheit
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
UKE	Universitäts-Klinikum-Hamburg-Eppendorf
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
WHO	<i>World Health Organisation</i>
ZfKD	Zentrums für Krebsregisterdaten

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1.1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010.</i> .....	2
<i>Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade nach Pantel &amp; Brakenhoff</i> .....	11
<i>Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) und des Umkehrprozesses der Mesenchymalen-Epithelialen-Transition (MET).</i> .....	12
<i>Abbildung 1.4: Biogenese der mikroRNAs.</i> .....	15
<i>Abbildung 1.5: Zelluläre aktive und passive Abgabe von mikroRNAs in die Blutzirkulation nach Schwarzenbach et al.</i> .....	20
<i>Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Biogenese von Exosomen nach Raposo &amp; Stoorvogel.</i> .....	25
<i>Abbildung 3.1: Schematische Darstellung Schematische Darstellung des pmirGLO-Vektors und dessen Wirkungsmechanismus.</i> .....	59
<i>Abbildung 3.2: Aufbau des Western Blots.</i> .....	74
<i>Abbildung 4.1: Diagramm des ausgewählten Patientinnen Kollektivs der SUCCESS-B-Studie und der durchgeführten Analysen.</i> .....	82
<i>Abbildung 4.2: „Heatmap“ und Dendogramme für den Vergleich der Mammakarzinom-Patientinnen mit den gesunden Frauen.</i> .....	87
<i>Abbildung 4.3: Quantifizierung der zirkulierenden RNA im Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Frauen.</i> .....	91
<i>Abbildung 4.4: Quantifizierung der relativen mikroRNA-Konzentrationen im Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Frauen.</i> .....	93
<i>Abbildung 4.5: Berechnung der Sensitivität und Spezifität der miR-16, miR-27a und.. miR-132.</i> .....	94
<i>Abbildung 4.6: Quantifizierung der relativen mikroRNA-Konzentrationen im Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen.</i> .....	96
<i>Abbildung 4.7: Relative mikroRNA-Konzentrationen in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231.</i> .....	99

*Abbildung 4.8: Relative mikroRNA Konzentrationen unter hypoxischen Bedingungen in den MCF-7 und MDA-MB-231 Zelllinien. .... 101*

*Abbildung 4.9: Messung der Proliferation der transfizierten und nicht-transfizierten MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. .... 103*

*Abbildung 4.10: Durchflusszytometrische Messung der durch Camptothecin induzierten Apoptose bei transfizierten MCF-7 Zellen. .... 106*

*Abbildung 4.11: Der Einfluss von miR-16, miR-107 und miR-130a auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit von MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. .... 111*

*Abbildung 4.12: Regulierung des Estrogenrezeptors durch miR-107..... 113*

*Abbildung 4.13: Einfluss von miR-107 auf die relative Luciferase-Aktivität..... 116*

*Abbildung 4.14: Einfluss von miR-132 und miR-146a auf die relative Luciferase-Aktivität. .... 117*

*Abbildung 4.15: Immundetektion isolierter Exosomen aus Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen..... 119*

*Abbildung 4.16: Immundetektion EpCAM-spezifischer Exosomen, die mittels der Beads des CellSearch-Systems aus Plasmaproben von Mammakarzinom-Patientinnen isoliert wurden. .... 121*

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.1: Überblick über die TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms nach UICC.</i> .....	4
<i>Tabelle 1.2: Überblick über die molekulare Klassifizierung des Mammakarzinoms und die Therapieempfehlung in Abhängigkeit der Subtypen.</i> .....	6
<i>Tabelle 1.3: Übersicht der Eigenschaften von extrazellulären Vesikeln.</i> .....	22
<i>Tabelle 3.1: Parameter der Primärantikörper.</i> .....	75
<i>Tabelle 4.1: Differentiell am stärksten regulierte mikroRNAs zwischen gesunden Frauen und Mammakarzinom-Patientinnen.</i> .....	85
<i>Tabelle 4.2: Microarray Daten der stabil exprimierte mikroRNAs.</i> .....	89

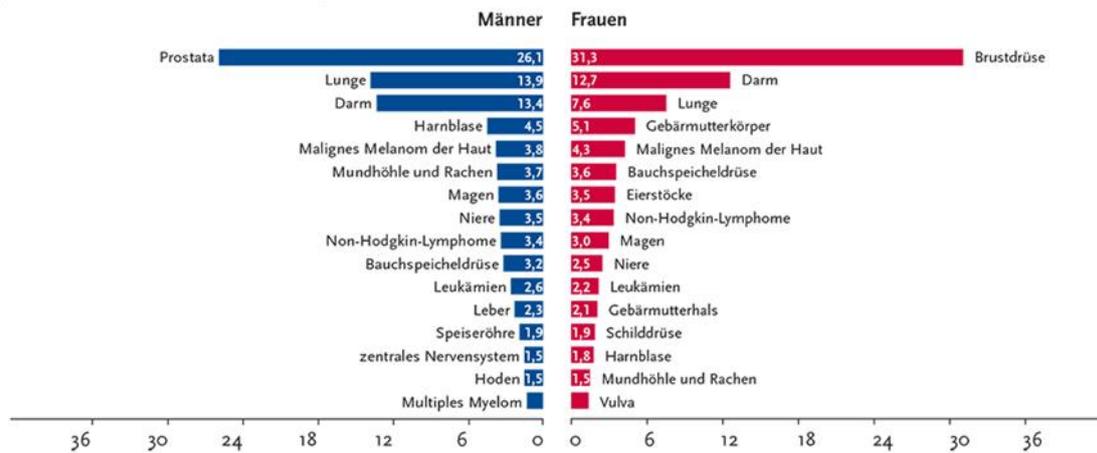
# 1. Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist die häufigste invasive Krebserkrankung bei Frauen. Basierend auf den Daten der *Internationale Agentur für Krebsforschung* (IARC), eine Einrichtung der *Weltgesundheitsorganisation* (WHO), treten weltweit jährlich 1.383.000 Neuerkrankungen auf. Die Anzahl der Brustkrebsbedingten Todesfälle liegt bei rund 458.000 Frauen pro Jahr [1].

Aus den 2013 publizierten Daten der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut ergab sich auch für Deutschland, dass das Mammakarzinom mit einem Anteil von 32 % aller Krebsneuerkrankungen die häufigste Krebserkrankung bei Frauen ist (Abbildung 1 GEKID, RKI 2013). Jede achte bis zehnte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Dies sind in Deutschland etwa 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr oder 171 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren. Nach aktuellen Schätzungen des Robert Koch-Instituts beträgt die relative 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für Brustkrebs-Patientinnen für alle Tumorstadien derzeit 81 % (GEKID, RKI 2013).



**Abbildung 1.1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010.**

(Krebs in Deutschland 2009/2010; 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin, 2013).

## 1.1.2 Histologische und molekulare Klassifizierung des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom fasst zahlreiche Erkrankungen der Brustdrüse zusammen, die sich in ihrer Histopathologie, Malignität und in ihren molekularen bzw. genetischen Eigenschaften unterscheiden. Bei der histologischen Klassifizierung unterscheidet man zwischen dem invasiven duktalem Karzinom (IDC), welches aus Zellen der Milchgänge entsteht und mit 70-80% die am häufigsten diagnostizierte Brustkrebsform repräsentiert. Invasive lobuläre Karzinome (ILC) machen etwa 15% der Karzinome aus und haben ihren Ursprung in den Zellen der Drüsenläppchen. Des Weiteren gibt es invasive tubuläre, medulläre und papilläre Karzinome, die jeweils etwa mit 2% vertreten sind [2-4]. Die Einstufung von malignen Tumoren, basierend auf der TNM (Tumor-, Nodal-, Metastasen)- Klassifizierung, wurde in den Jahren 1943–1952 entwickelt und seit 1950 von der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) weitergeführt (siehe Tabelle 1). Diese Klassifizierung beschreibt die anatomische Ausdehnung eines Tumors, wobei die

lokale Ausbreitung des Primärtumors (T), die regionäre Lymphknotenmetastasierung (N) und die hämatogene Fernmetastasierung (M) berücksichtigt werden. Die Einstufung einer Tumorerkrankung in die einzelnen Kategorien des TNM-Systems erlaubt prognostische Aussagen und bestimmt häufig auch die weitere Therapie [5, 6]. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Beurteilung und für die prognostische Bedeutung von Mammakarzinomen ist der histopathologische Differenzierungsgrad (Grading) des Tumorgewebes. Die Einteilung erfolgt gemäß der WHO entsprechend dem System von Bloom und Richards modifiziert nach Elston und Ellis (sogenannter BRE-Score) [7]. Demnach unterscheidet man gut differenzierte Tumoren (G1) mit geringem Malignitätsgrad, mäßig differenzierte Tumoren (G2) mit mäßigem Malignitätsgrad und schlecht differenzierte Tumoren (G3) mit hohem Malignitätsgrad.

### Molekulare Klassifizierung

Die Heterogenität spiegelt sich neben der histologischen auch in der molekularen Klassifizierung des Mammakarzinoms wider [2]. In den letzten zwei Dekaden wurden Microarray-basierte Genexpressionsanalysen bei Brustkrebstumoren durchgeführt, um detaillierte molekulargenetische Information zu erhalten und genetische Profile zu identifizieren, die mit der Prognose und dem Ansprechen auf die Therapie assoziiert sind [8-10]. Da es für die routinemäßige Diagnostik nicht durchführbar ist, Tumoren basierend auf Microarray-basierten Genexpressionsprofilen zu charakterisieren, wurde eine vereinfachte Klassifizierung, in enger Anlehnung an die von Cheang et al. [11], etabliert.

**Tabelle 1.1: Überblick über die TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms nach UICC.**

<b>Primärtumor (T)</b>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Karzinom <i>in situ</i>
Tis (DCIS)	Duktales Karzinom <i>in situ</i>
Tis (LCIS)	Lobuläres Karzinom <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Isolierter M. Paget der Mamille
T1	Mammakarzinom $\leq 20\text{mm}$
T1mi	$\leq 1\text{mm}$ (Mikroinvasion)
T1a	$> 1\text{mm} \leq 5\text{mm}$
T1b	$> 5\text{mm} \leq 10\text{mm}$
T1c	$> 10\text{mm} \leq 20\text{mm}$
T2	$> 20\text{mm} \leq 50\text{mm}$
T3	$> 50\text{mm}$
T4	Mammakarzinom jeder Größe mit Infiltration in die Brustwand und/oder Haut
T4a	Infiltration in die Brustwand und Befall der Rippen und/oder der Interkostalmuskulatur
T4b	Ödem oder Ulzerationen der Brusthaut oder kutane Tumorsatelliten
T4c	Kriterien für 4a und 4b zutreffend
T4d	Inflammatorisches Mammakarzinom
<b>Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)</b>	
Nx	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Bewegliche Lymphknotenmetastasen in der unteren oder mittleren Achselhöhle
N2	Aneinander oder an anderen Strukturen fixierte Lymphknotenmetastasen in der unteren oder mittleren Achselhöhle oder ausschließlich interne Lymphknotenmetastasen
N2a	Aneinander oder an anderen Strukturen fixierte Lymphknotenmetastasen in der unteren oder mittleren Achselhöhle
N2b	Ausschließlich interne Lymphknotenmetastasen
N3	Apikale Lymphknotenmetastase unterhalb des Schlüsselbeins
N3a	Lymphknotenmetastasen unterhalb des Schlüsselbeins
N3b	Interne Lymphknotenmetastasen der Mamma sowie axilläre Lymphknotenmetastasen
N3c	Lymphknotenmetastasen oberhalb des Schlüsselbeins
<b>Fernmetastasen (M)</b>	
M0	Keine Fernmetastasen
cM0(i+)	Keine Fernmetastasen aber zirkulierende oder disseminierte Tumorzellen nachweisbar
M1	Fernmetastasen

Dabei ist die Expression des Estrogenrezeptors (ER), Progesteronrezeptors (PR) und „Human Epidermal Growth Factor“ Rezeptors 2 (HER2), sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 für die molekulare Einteilung und die Unterscheidung der

Subtypen des Mammakarzinoms entscheidend (siehe Tabelle 2) [12]. Die Bestimmung der Expression von ER, PR und HER2 wird in der Regel an Paraffinmaterial des Primärtumors mittels Immunhistochemie (IHC) durchgeführt. Bei einer nicht eindeutigen Bestimmung der Expression von HER2, werden zusätzlich in situ-Hybridisierungstechniken (ISH) für die Bewertung der HER2-Genamplifikation durchgeführt. Rund 60% der Mammakarzinome sind positiv für ER und PR [4] und 10-15% ausschließlich positiv für HER2, von denen die Hälfte einen der Hormonrezeptoren koexprimieren. Triple-negative Tumoren, die keinen der drei Rezeptoren exprimieren, sind mit ca. 15-20% vertreten [13]. Die Subtypen Luminal A und B weisen einige wichtige molekulare und prognostische Unterschiede auf. Luminal A Tumoren, die etwa 40 Prozent aller Brustkrebskrankungen ausmachen, haben in der Regel eine hohe ER- und PR-Expression, keine Expression des HER2-Gens, und eine geringe Expression der Proliferation-Genen [14, 15]. Sie tragen die beste Prognose aller Brustkrebssubtypen [10, 16, 17]. Die mit rund 20% weniger häufig auftretenden Luminal B Tumoren, sind durch eine schwächere ER-Expression, eine variable Expression des HER2-Gens und eine erhöhte Proliferationsrate charakterisiert. Luminal B Tumoren haben eine schlechtere Prognose als Luminal A Tumoren [18]. Der HER2-Subtyp wird in erster Linie durch die Überexpression oder Amplifikation des HER2-Gens definiert. Zudem ist er negativ für ER und PR [19]. Basal-ähnliche Tumoren weisen meist eine hohe Proliferationsrate, einen schlechten Differenzierungsgrad und schon in frühen Krankheitsstadien eine genomische Instabilität auf. Zudem sind sie durch eine hohe Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und durch die Expression von Zytokeratin (CK) 5, 14 und 17 charakterisiert [10, 20]. Im Vergleich zu den luminalen Subtypen haben sie einen aggressiveren Phänotypen und eine schlechtere Prognose. Ungefähr 80% der basal-

ähnlichen Tumore sind negativ für die drei Rezeptoren, ER, PR und HER2 (triple-negativ) [21].

**Tabelle 1.2: Überblick über die molekulare Klassifizierung des Mammakarzinoms und die Therapieempfehlung in Abhängigkeit der Subtypen (nach [21]).**

Subtyp	Expression	Therapie
Luminal A Rezidivrisiko gering	ER <sup>+</sup> und PR <sup>+</sup> HER2 <sup>-</sup> Ki-67 niedrig (Schwellenwert bei 20%)	Oft nur endokrine Therapie Chemotherapeutika nur in ausgewählten Patientinnen
Luminal B (HER2 <sup>-</sup> ) Rezidivrisiko hoch	ER <sup>+</sup> HER2 <sup>-</sup> und mindestens eine Aussage zutreffend: Ki-67 hoch PR <sup>-</sup> oder gering	Immer endokrine Therapie Oft Chemotherapie
Luminal B (HER2 <sup>+</sup> )	ER <sup>+</sup> HER2 <sup>+</sup> Ki-67 gering oder hoch PR <sup>-</sup> oder PR <sup>+</sup>	Chemotherapie Therapie mit anti-HER2 Antikörper Endokrine Therapie
HER2-überexprimierend	ER <sup>-</sup> und PR <sup>-</sup> HER2 <sup>+</sup>	Chemotherapie anti-HER2 Antikörper
Basal-ähnlich (triple-negativ)	ER <sup>-</sup> und PR <sup>-</sup> HER2 <sup>-</sup>	Chemotherapie

### 1.1.3 BRCA1 und BRCA2 bei Mammakarzinomen

Die meisten dieser Brustkrebsfälle werden durch Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 (Breast Cancer, early onset 1 und 2), die etwa 5% aller Brustkrebserkrankungen ausmachen, ausgelöst [22]. Durch Kopplungsanalysen wurde erstmals 1990 von Jeff Hall et. al ein Zusammenhang zwischen hereditären Mutationen im BRCA1-Gen und der Prädisposition für „früh ausbrechende“ (*early-onset*) Brustkrebserkrankungen beschrieben [23]. Das Erkrankungsrisiko bei Frauen unter 50 Jahren mit einer vererbten Mutation in BRCA1 oder BRCA2 liegt bei ca. 50% und bis 75 Jahren bei 80-90%. Im Durchschnitt tritt die Krankheit etwa 20 Jahre früher und vor dem 50. Lebensjahr, also meist prämenopausal auf als bei Frauen ohne familiär-erbliches Risiko [24].

Beide Gene kodieren für Proteine, die bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA durch homologe Rekombination beteiligt und somit als Tumorsuppressoren wichtig bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität einer Zelle sind [25]. Neben der Funktion bei der DNA-Reparatur [26], ist BRCA1 auch an anderen wichtigen biologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. bei den Kontrollpunkten des Zellzyklus [27], bei der Ubiquitinierung von Proteinen [28] und beim Chromatin Remodling [29].

Tumoren mit BRCA1-Mutationen sind im Hinblick auf histopathologische Eigenschaften häufig schlecht differenziert (G3), haben eine hohe Anzahl an Zellteilungen (*mitotic count*) und zeigen eine hohe Frequenz von Nekrosen [22]. Zudem wurde gezeigt, dass BRCA1-assoziierte Mammakarzinome in 80% als basal-ähnliche Subtypen klassifiziert werden können, da sie die basalen Marker wie z.B. CK 5/6, CK14 und EGFR exprimieren [30, 31]. Zusätzlich weisen BRCA1-assoziierten Tumoren, eine niedrigere Rate von Knochenmetastasen und eine höhere Frequenz der Lunge und Gehirnmastasen auf [32].

### 1.1.4 Behandlungsmaßnahmen beim Mammakarzinom

Gemäß des St. Gallen Konsensus von 2011 wird die Identifikation dieser Subtypen, die in Tabelle 2 dargestellt sind, als Basis für die Entscheidung zur systemischen Therapie empfohlen [12]. Neben der Entfernung des Tumors durch einen operativen Eingriff, gibt es zusätzliche Therapieoptionen, die die Bestrahlung und die medikamentöse Tumorthherapie umfassen. Zur Reduktion der Tumormasse vor einer Operation werden neoadjuvante Therapien (griech. neo, „neu“ und lat. adjuvare, „unterstützen“) durchgeführt. Die weiterführende Therapie nach einem operativen Eingriff bezeichnet man als adjuvante Therapie. Generell wird anhand der Charakteristiken des Tumors entschieden, ob eine endokrine Therapie, eine zytotoxische Chemotherapie, eine HER2-gerichtete Therapie oder eine Strahlentherapie bzw. eine kombinierte Therapie, sinnvoll ist.

Die endokrine Therapie wird bei Patientinnen mit einem positiven ER-Mammakarzinom angewandt, da die hormonabhängigen Tumoren durch Blockierung des ER oder Verhinderung der Estrogenproduktion behandelt werden können. Dabei kommen bei prämenopausalen Patientinnen GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon)-Agonisten, die die Estrogen Produktion in den Ovarien inhibieren oder Tamoxifen, welches die kompetitive Hemmung von ER bewirkt, zum Einsatz. Die Behandlung der postmenopausalen Patientinnen kann neben Tamoxifen auch mit Aromataseinhibitoren (AI) erfolgen. Diese Medikamente verhindern die Synthese von Estrogen aus Androgenen durch die Blockade der Aromatase [33]. Der luminale A Subtyp ist im Vergleich zu dem luminale B Typ sensitiver für endokrine Wirkstoffe. [21, 34].

HER2-überexprimierende Karzinome können mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab behandelt werden, der kompetitiv an den HER2-Rezeptor bindet, dadurch die Bindung von Liganden verhindert und somit die Signaltransduktion blockiert [35].

Als Standard-Therapie triple-negativer Mammakarzinome gilt derzeit noch die Chemotherapie. Allerdings werden zurzeit „zielgerichtete“ molekulare Therapiestrategien (*targeted therapy*) innerhalb von Studien evaluiert, bei denen sogenannten *small molecules* zum Einsatz kommen, durch die gezielt in den Stoffwechsel von Krebszellen eingegriffen wird, um sie am Wachstum zu hindern bzw. zum Zelltod zu führen [36]. Dabei kann es sich wie z.B. bei Trastuzumab, das wie oben beschrieben bei HER2-überexprimierenden Karzinomen eingesetzt wird oder Cetuximab um monoklonale Antikörper handeln. Cetuximab wird u.a. in Kombination mit Chemotherapie bei triple-negativen Mammakarzinome, die eine Überexpression von EGFR aufweisen, eingesetzt. Dabei bindet der Antikörper gezielt an EGFR und inhibiert die Signaltransduktion in das Zellinnere [37, 38].

Adjuvante Chemotherapien senken das Rezidivrisiko [39]. Der individuelle Nutzen ist wiederum abhängig von den biologischen Charakteristika des Tumors, dem Tumorstadium, und von der Art und Intensität der Chemotherapie. In der adjuvanten Chemotherapie des Mammakarzinoms werden mindestens zwei, häufiger drei Zytostatika kombiniert. Sie können simultan oder sequentiell appliziert werden [40]. Eingesetzt werden Anthrazykline, die die Topoisomerase IIa inhibieren und mit der DNA interkalieren. Dadurch verhindern sie die Nukleinsäuresynthese und die DNA Reparatur, was zum Zelltod führt [41, 42]. Die eingesetzten Taxane hemmen die Zellteilung indem sie an die Mikrotubuli binden und dadurch den Abbau des Spindelapparates verhindern [43].

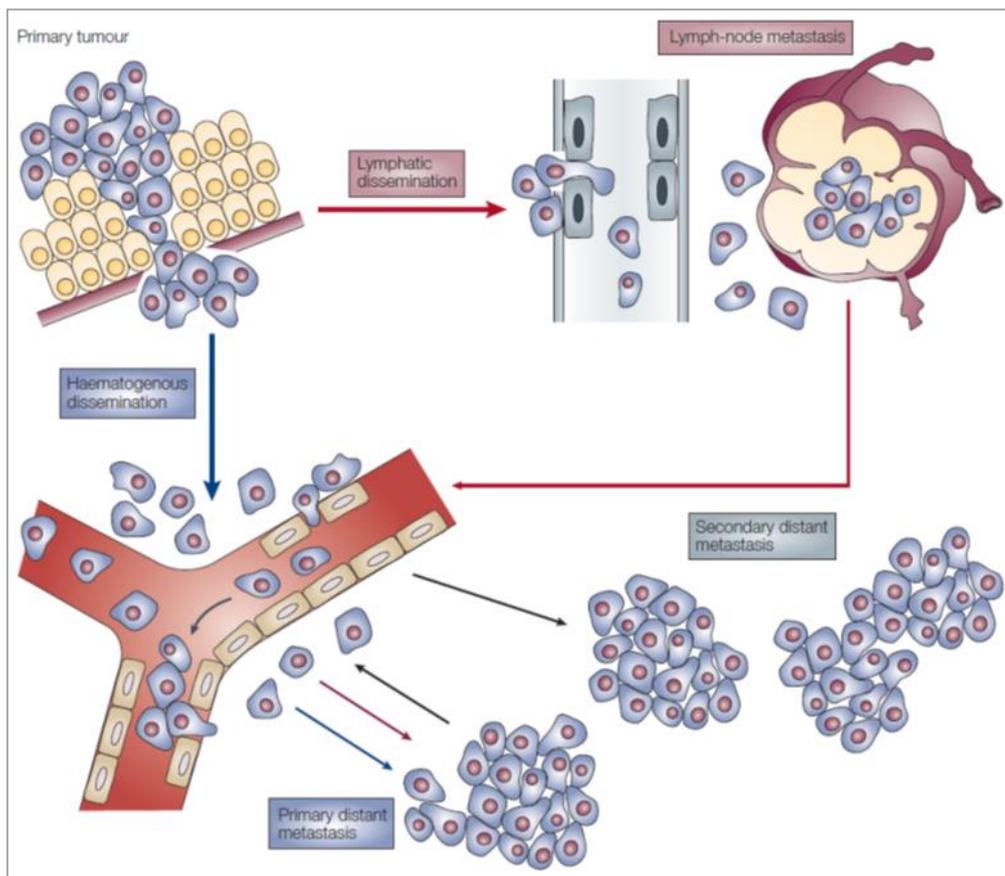
Des Weiteren spielt die Strahlentherapie bei der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms eine wichtige Rolle. Das Ziel ist es unentdeckte Krebszellen und Tumorherde, die nicht durch den operativen Eingriff entfernt wurden, zu zerstören, um das Risiko eines Rezidivs zu verringern [44]. Eine Bestrahlung wird nach einer brusterhaltenden Operation und nach Mastektomie, wenn mehr als vier Lymphknotenmetastasen detektiert wurden, durchgeführt [45, 46].

Generell kann man sagen, dass es sich bei Brustkrebs um eine sehr heterogene Krankheit handelt, die eine angepasste, individuelle Therapie benötigt.

### 1.1.5 Metastasierung des Mammakarzinoms

Nicht der Primärtumor, sondern die sich in anderen Körperregionen und Organen bildenden Metastasen sind der Hauptgrund für den krebsbedingten Tod. Trotz Fortschritte in der adjuvanten und neoadjuvanten Therapie entwickelt sich bei rund 10-15% der Mammakarzinom-Patientinnen innerhalb von 3 Jahren Fernmetastasen nach der Erstdiagnose des Primärtumors. Die häufigsten Regionen, in denen sich Metastasen entwickeln, sind die Lunge, Knochen, Leber und Gehirn [47, 48]. Zusätzlich ist der Nachweis von Fernmetastasen bei Mastektomien nach 10 oder mehr Jahre nach der ersten Diagnose nicht ungewöhnlich und tritt bei 20% der krankheitsfreien Patientinnen auf [49]. Die Metastasierung, wie in Abbildung 1.2 dargestellt, beschreibt die Loslösung der Tumorzellen vom Primärtumor, ihre Invasion durch die Basalmembran, gefolgt von der Intravasation, dem Überleben und der Extravasation in das hämatogene und/oder lymphatische Kreislaufsystem und die anschließende Kolonisation in andere Organe [48]. Um aus ihrem epithelialen Gewebe in das Kreislaufsystem zu gelangen müssen

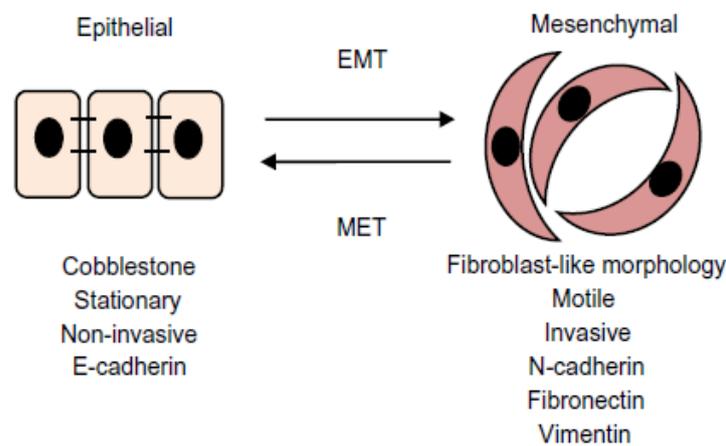
Tumorzellen einen phänotypischen Wechsel (von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp) durchlaufen. Dieser Prozess wird als Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet [50].



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade (nach Pantel & Brakenhoff, Nat. Rev., 2004).**

Krebszellen, die sich vom Primärtumor gelöst haben und durch die Basalmembran migrieren, dringen im nächsten Schritt in das hämatogene (blaue Pfeile) oder in das lymphatische (rote Pfeile) Kreislaufsystem ein. Eine sekundäre hämatogene Disseminierung erfolgt von Fernmetastasen aus (schwarze Pfeile). Die lymphogen disseminierten Tumorzellen können in umliegende Lymphknoten eindringen und dort Lymphknotenmetastasen bilden. Die Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen können wiederum hämatogen disseminieren und sekundäre Fernmetastasen bilden. Die vom Primärtumor hämatogen disseminierten Tumorzellen können auch ohne den Umweg über die Lymphknoten primär Fernmetastasen bilden [51].

Bei der Metastasierung laufen, wie in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt, koordinierte molekulare und zelluläre Veränderungen ab. Bei der EMT kommt es zu einer Verringerung der Zell-Zell-Adhäsion und der apikal-basolateralen Polarität, zur Herunterregulierung der epithelialen Marker, wie z.B. E-Cadherin und der Expression mesenchymaler Marker, wie z.B. N-Cadherin. Dies führt zu einer Fibroblasten-ähnlichen Morphologie der Tumorzellen und ihrer Motilität durch die Basalmembran [50, 52].



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) und des Umkehrprozesses der Mesenchymalen-Epithelialen-Transition (MET).**

Die epithelialen Zellen sind u.a. durch E-Cadherin verbunden, hochpolarisiert und nicht beweglich. Während der EMT verlieren die Zellen ihre epithelialen Eigenschaften und bilden einen mesenchymalen Phänotyp aus, der durch verbesserte Migrationsfähigkeit, Invasivität und hohe Expression von mesenchymalen Marker charakterisiert ist [50].

Die Plastizität des epithelialen Phänotyps wird durch das Auftreten des Umkehrprozesses der Mesenchymalen-Epithelialen-Transition (MET) wieder hergestellt. Durch die wiedererlangten epithelialen Eigenschaften können sich die Tumorzellen in andere Organe ansiedeln und Metastasen bilden [52]. Dabei erklärt die sogenannte *seed and soil*

Theorie von Stephen Paget, dass die Organ-Präferenz von Tumormetastasen das Produkt von günstigen Wechselwirkungen zwischen metastatischen Tumorzellen (seed) und ihre Organumgebung (soil) und den daran beteiligten Signalwegen, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und mikroRNAs ist [53].

## 1.2 MikroRNAs

### 1.2.1 Biogenese der mikroRNAs

MikroRNAs sind eine Klasse von natürlich vorkommenden kleinen, nicht kodierenden RNA Molekülen, die aus 19-25 Nukleotiden bestehen [54]. Computer-basierte Analysen wurden für die mikroRNA-Genidentifizierung entwickelt. Diese Ergebnisse ergaben, dass mikroRNAs hoch konserviert sind und etwa 1% des menschlichen Genoms ausmachen [55, 56]. Man geht davon aus, dass die Expression rund 50% aller Protein-kodierenden Gene von mikroRNAs kontrolliert wird. Funktionelle Studien zeigten zudem, dass mikroRNAs an der Regulation nahezu aller zellulären Prozesse beteiligt sind und dass Veränderungen ihrer Expression mit vielen humanen Krankheiten assoziiert sind [57]. MikroRNAs regulieren die Genexpression, indem sie an bestimmte Regionen, meist der 3'UTR der Ziel-mRNA binden. Diese Bindung induziert den Abbau der mRNA bzw. inhibiert dessen Translation [58].

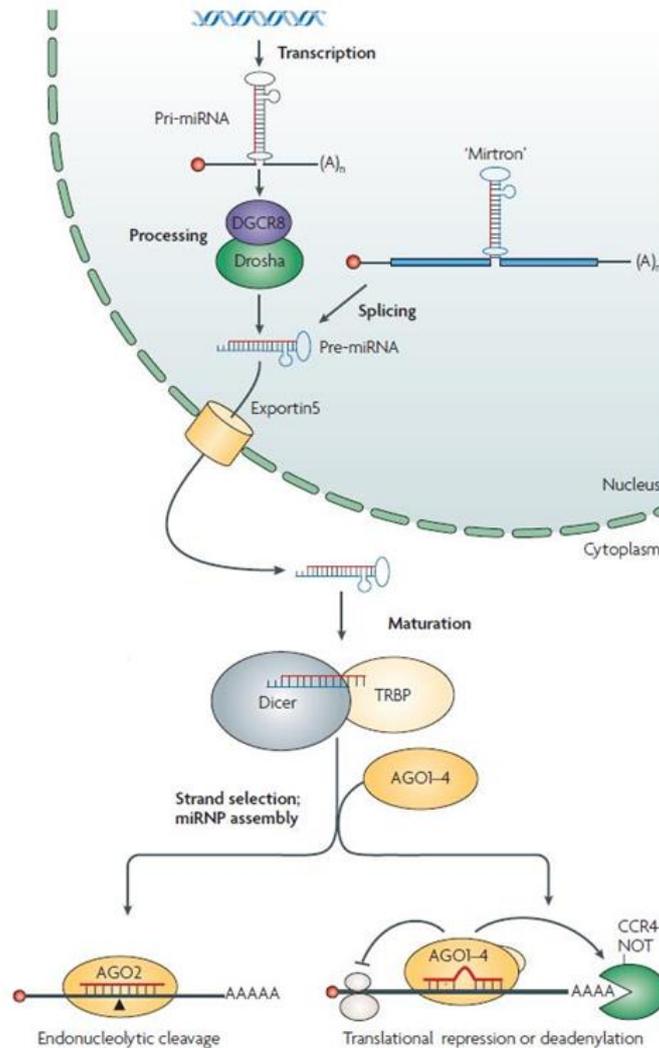
Die genomische Position der meisten mikroRNAs liegt in Regionen außerhalb von Protein-kodierenden Genen und rund 50% der bekannten mikroRNAs sind in direkter Nähe, in sog. *Clustern* lokalisiert. MikroRNAs, die in einem Cluster liegen, können gemeinsam oder unabhängig voneinander transkribiert und reguliert werden [59]. Zudem

können mikroRNAs auch in den Intronregionen bekannter Gene in der Sense- oder Antisense Orientierung lokalisiert sein [60, 61]. Die mikroRNA-Gene werden unabhängig oder als Bestandteile der Introns von Protein-kodierenden Genen von der RNA-Polymerase II transkribiert [62].

Die Biogenese der mikroRNAs ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Die primären Vorläufer-Moleküle (pri-miRNAs) sind durch *Hairpin-Strukturen* gekennzeichnet und enthalten oft die Sequenzen vieler verschiedener mikroRNAs. Die kanonische Reifung der pri-miRNAs beginnt im Nucleus und wird durch den Proteinkomplex, bestehend aus der RNaseIII Droscha und dem dsRNA-Bindeprotein DGCR8 (DiGeorge Critical Region 8), katalysiert. Dadurch werden die pri-miRs in pre-miRs, 70-Nucleotid lange *Hairpin-Strukturen* prozessiert [63-65]. Die direkt in den Introns liegenden mikroRNAs, die sog. *Mirtrons*, werden beim Spleißen der prä-mRNA heraus geschnitten und liegen in der Form der pre-miR vor. Sie umgehen damit die Prozessierung durch Droscha [66]. Über einen aktiven Transportweg, der durch den Transportrezeptor Exportin5 und den GTP- (Guanosintriphosphat)-gebundenen Kofaktor Ran (Ras-related nuclear protein) katalysiert wird, gelangen die pre-mikroRNAs aus dem Nucleus in das Zytoplasma [67]. Anschließend werden sie durch die RNaseIII Dicer und TAR-RNA-Bindeproteine in miR/miR\*-Duplexe geschnitten, die aus 19-25 Basenpaaren bestehen. Der Leitstrang (guide strand, miR) des miR/miR\*-Komplexes wird in den *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) eingebaut, während der Begleitstrang (passenger, miRNA\*) abgelöst und degradiert wird. Allgemein gilt die Aussage, dass der Strang mit dem thermodynamisch weniger stabilen 5'Ende in den RISC-Komplex eingebaut wird. Allerdings wurde auch gezeigt, dass der Begleitstrang nicht nur ein Nebenprodukt ist,

sondern auch in den miRISC-Komplex eingebaut wird und funktionell aktiv ist [68, 69].

Dabei leiten die mikroRNAs den RISC-Komplex zu den Zielsequenzen der mRNAs [70].



**Abbildung 1.4: Biogenese der mikroRNAs.**

Die transkribierten primären mikroRNAs (pri-miRs) werden mittels Drosha-DGCR8 in die pre-miR prozessiert und anschließend durch Exportin-5 und Ran-GTP aus dem Nucleus in das Zytoplasma transportiert. Dort findet eine zweite Prozessierung durch einen Komplex aus Dicer und TRBP statt. Hier entsteht der miR/miR\*-Duplex aus Leit- und Begleitstrang. Der Leitstrang in den RISC (RNA-Induced Silencing Complex) eingebaut. AGO2 vermittelt, durch exakte Basenpaarung der mikroRNA, den Abbau der Ziel-mRNA. Die Repression der Translation oder die Deadanylierung der mRNA erfolgt bei unvollständiger Basenpaarung durch AGO1-4 [71].

Als wichtigen Bestandteil des RISC-Komplexes sind die *Argonaut- (AGO) -Proteine* zu nennen, von denen in Säugetieren vier (AGO1-AGO4) Proteine bekannt sind. Sie binden an mikroRNAs und vermitteln die Repression spezifischer Ziel-mRNA oder die Inhibierung der Translation.

Eine unvollständige Basenpaarung zwischen mikroRNA und der 3'UTR der mRNA führt zur Repression der Translation oder zur Deadenylierung (Entfernung des Poly-A-Schwanzes), was weiter zur Destabilisierung der mRNA führt. Ein enzymatischer Abbau der mRNA kommt bei einer exakten, komplementären Basenpaarung zwischen mikroRNA und mRNA zu Stande. Er wird, wie in Abbildung 1.4 gezeigt, durch das AGO2 Protein katalysiert, welches eine RNase H-ähnliche PIWI-Domäne (P-element induced wimpy testis) besitzt und die mRNA durch endonucleolytisches Schneiden in der Mitte des miRNA-mRNA Komplexes abbauen kann [71].

### 1.2.2 Funktionen der mikroRNAs

Reife mikroRNAs besitzen zwei Regionen. Die 5'-Region, ausgehend von den Nukleotiden 2-8, wird als *Seed-Region* bzw. *-Sequenz* bezeichnet. Sie ist entscheidend für die komplementäre Bindung und für die Erkennungsspezifität der mikroRNA an ihre Zielsequenz. Eine erhöhte fehlerhafte Basenpaarung bei der Bindung führt zu einer signifikant, verringerten Regulationsfunktion der mikroRNA [72, 73]. Die 3'-Region wird als *3'-Mismatch-Tolerant-Region* beschrieben, da sie bei der Bindung an ihre Zielsequenz fehlerhafte, nicht komplementäre Basenpaarungen toleriert [74]. Generell ist die Bindung der mikroRNA an ihre Ziel-mRNA kritisch für die Expression der mRNA. Die Bindung kann durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) sowohl in der

mikroRNA als auch in der Ziel-mRNA beeinflusst werden. Durch SNPs werden bestehende Bindungsstellen aufgehoben oder illegitime Bindungsstellen entstehen. Die dadurch bedingte veränderte Wirkung auf die Gen- und Proteinexpression stellen eine Art der genetischen Variabilität dar, die das Risiko für bestimmte menschliche Krankheiten beeinflusst [75, 76].

Wie beschrieben, regulieren mikroRNAs die Genexpression, indem sie an bestimmte Regionen, die sich vor allem in der 3'UTR der Ziel-mRNA befinden, binden und den Abbau der mRNA bzw. die Inhibierung der Translation bewirken [77]. Allerdings zeigten neue Erkenntnisse, dass es durch mikroRNAs auch zu einer Stimulation der Genexpression kommen kann, indem sie an Promotorbereiche binden und ihn aktivieren [78-80].

Das mikroRNAs eine Rolle in der Pathogenese von Krebserkrankungen spielen, lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass über 50% der mikroRNAs in sogenannten *Krebs-assoziierten genomischen Regionen* oder in *fragilen chromosomalen Regionen* lokalisiert sind [81]. Diese Regionen weisen häufig DNA Deletionen, Amplifikation oder Translokationen in Tumoren auf, die auf die mikroRNA-Expression wirken [82]. Ein Bezug zwischen der veränderten Expression von mikroRNAs und Krebserkrankungen wurde zum ersten Mal 2002 von Calin et al. beschrieben. Diese Autoren zeigten, dass eine Deletion der 13q14 Region, die in mehr als 50% der B-Zell chronischen lymphatischen Leukämie (B-CLL) Fällen auftritt, mit einer fehlenden oder herunterregulierten Expression der in dieser Region lokalisierten miR-15a und miR-16 assoziiert ist [83-85].

*OnkomiRs* sind an der Repression von Tumorsuppressorgenen beteiligt. Ihre Lage in chromosomalen Regionen, die häufig in der Krebsentwicklung amplifiziert sind,

resultiert in einer Expressionserhöhung der *OnkomiRs*. Eine Überexpression von mikroRNAs kann zusätzlich durch die Deregulation eines Transkriptionsfaktors oder durch Demethylierung von CpG-Dinukleotiden in der Promotorregion ausgelöst werden [86]. Dagegen liegen mikroRNAs, die Onkogene reprimieren oft in fragilen Loci, die häufig in der Tumorentwicklung deletiert sind. Ihre Herunterregulierung kann auch durch den Expressionsverlust eines Transkriptionsfaktors oder die DNA-Methylierung ihres Promotors geschehen. Diese Prozesse führen zu einem reduzierten Expressionslevel der *Tumorsuppressor-miR* und einer Überexpression des Ziel-Onkogens [87, 88]. MikroRNAs, die bei der Metastasierung eine Rolle spielen und diese fördern bzw. inhibieren werden als *MetastamiRs* bezeichnet [89].

In zahlreichen Studien wurden die mikroRNA-Konzentrationen in Tumor- und Normalgewebe vor allem mittels Microarray oder Real-Time PCR quantifiziert und verglichen. Es wurde gezeigt, dass die Expressionsprofile sowohl von hoch exprimierten *OnkomiRs* als auch von niedrig exprimierten *Tumorsuppressor-miRs*, mit verschiedenen Krebsarten korrelieren [81]. Bei Brustkrebs gelten z.B. miR-21, miR-155, miR-29b-2 als hochreguliert und miR-143, miR-145, miR-155, miR-200 als herunterreguliert [90].

Das Expressions-Profiling hat ergeben, dass die mikroRNA-Signatur ebenfalls mit der Tumorklassifikation, der Diagnose, der Prognose und der Progression sowie mit dem Ansprechen und der Prediktion auf Behandlungen korreliert [91-93]. Dass man anhand molekularer mikroRNA-Signaturen, zwischen verschiedenen Brustkrebs-Subtypen unterscheiden kann, wurde als erstes von Blenkiron und Kollegen gezeigt [94]. Zudem wurde für schlecht differenzierte Tumoren gezeigt, dass mikroRNA-Profile oft präziser sind als Profile, die auf der mRNA-Expression basieren. Diese Ergebnisse unterstreichen das Potenzial von mikroRNAs in der Krebsdiagnostik [90, 95, 96].

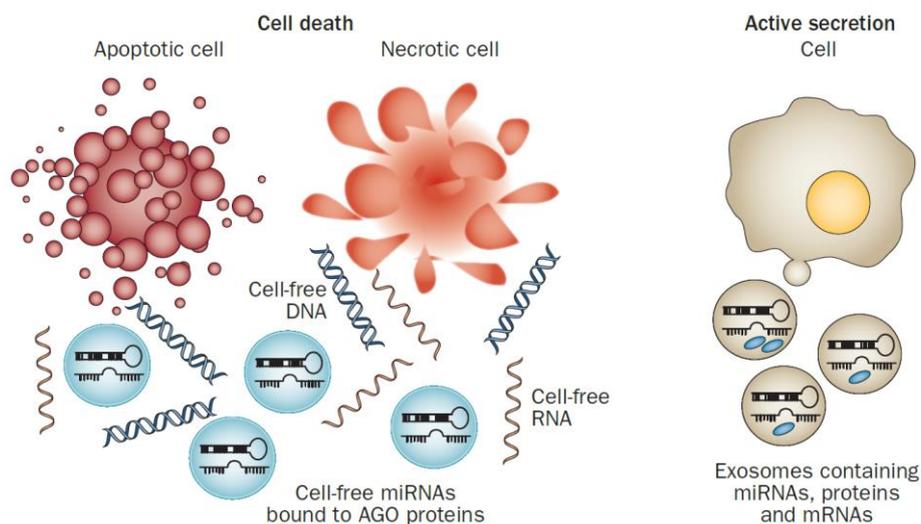
### 1.2.3 Zirkulierende mikroRNAs und ihre Rolle als Biomarker

Mandel und Métais entdeckten bereits 1948, dass zellfreie Nukleinsäuren im menschlichen Blut zirkulieren [97]. Die ersten Studien über zirkulierende mikroRNAs und ihre Korrelationen mit Krebserkrankungen wurden von Lawrie et al. durchgeführt [98]. Gezeigt wurde, dass das Serumlevel von miR-21 mit dem Rezidiv-freien Überleben bei Patienten mit diffusem, großzelligem B-Zell-Lymphom assoziiert ist und das miR-21 als potentieller Biomarker für diese Krankheit dienen könnte [99].

Ein Grund, dass es überhaupt möglich ist mikroRNAs im Blut zu messen, liegt daran, dass sie neben anderen Nukleinsäuren und Proteinen, von Zellen passiv oder aktiv in die Blutzirkulation abgegeben werden (siehe Abbildung 1.5) [100]. Passiv werden mikroRNAs von apoptotischen oder nekrotischen Zellen abgegeben [101]. Eine aktive Sekretion verläuft über extrazelluläre Vesikel, die als Exosomen bezeichnet werden. Sie werden im endosomalen System durch innere Knospung der Membran von MVBs (Multivesicular Bodies) gebildet. Die Fusion der MVBs mit der äußeren Zellmembran führt zur aktiven Sekretion von Exosomen in den Blutkreislauf [102]. In einer nicht malignen Umgebung stammen die meisten mikroRNAs im Blut von zirkulierenden Blutzellen [103]. Bei Tumorpatienten stammen die zellfreien Nukleinsäuren sowohl von gesunden Zellen, wie auch vom Primärtumor zirkulierenden Tumorzellen im Blut sowie von Mikrometastasen [104, 105]. Während der Karzinogenese kommt es zu einer erhöhten Zellproliferation im Primärtumor und verbundenen damit zur Freisetzung von zirkulierenden Nukleinsäuren [105].

Ein weiterer Grund dafür, dass es möglich ist mikroRNAs im Blut oder anderer Körperflüssigkeiten zu messen, besteht in ihrer hohen Stabilität. Die mikroRNAs bleiben

auch bei extremen pH-Werten, wiederholtem Einfrieren und Auftauen, Erhitzen, Inkubation mit RNasen oder Aufbewahrung der Plasmaproben bei Raumtemperatur stabil [106-108]. In der Studie von Chen et al. wurde gezeigt, dass mikroRNAs nach einer dreistündigen Inkubation mit RNasen, im Gegensatz zu mRNAs wie GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) oder  $\beta$ -Aktin, nicht abgebaut werden [106]. Geschützt sind mikroRNAs vor der Degradation durch RNasen dadurch, dass sie in Exosomen eingeschlossen sind. Das zeigt sich in erhöhten Konzentrationen bei Karzinompatienten, die in den Exosomen detektiert wurden [109, 110].



**Abbildung 1.5: Zelluläre aktive und passive Abgabe von mikroRNAs in die Blutzirkulation (nach Schwarzenbach et al., Nat. Rev. 2014).**

Die Endprodukte des programmierten Zelltods sind fragmentierte Zellreste und apoptotische Vesikel, die RNA-Transkripte und kurze DNA-Fragmente enthalten. Bei dem Prozess der Nekrose werden lange DNA-Stränge freigesetzt. Zudem werden von apoptotischen und nekrotischen Zellen RNA-Protein-Komplexe (z.B. mikroRNAs, die an AGO2-Protein gebunden sind) freigesetzt. Durch aktive Sekretion werden mikroRNAs und andere Bestandteile in verschiedenen sezernierten extrazellulären Vesikeln, wie Exosomen, in die Blutzirkulation ausgeschüttet [111].

Auch mikroRNAs, die nicht in Mikrovesikeln verpackt sind, sind durch ihre Bindung an Proteine vor dem Verdau geschützt. Dabei handelt es sich häufig um HDL- (High Density Lipoprotein) [112] oder Argonaut-Proteinen [113]. Ihre Stabilität und ihre Rolle in der Karzinogenese stellt die mikroRNAs in den Fokus der Tumorforschung.

Die Verwendung von zellfreien, zirkulierenden mikroRNAs als diagnostische Biomarker gewann durch die intensive Forschung im Bereich der mikroRNAs zunehmend an Bedeutung.

Da Krebs häufig erst in späten Krankheitsstadien, begleitend mit einer schlechten Prognose, diagnostiziert wird, ist die Entwicklung bzw. der Einsatz von verbesserten Biomarkern notwendig. Obwohl Tumormarker, die bei Biopsien angewandt werden, die Diagnose erheblich verbessern, ist ihre Anwendung durch das invasive, unangenehme und meist umständlichen Diagnoseverfahren eingeschränkt [114, 115]. Es besteht daher ein großer Bedarf für die Identifizierung von neuen nicht-invasiven Biomarkern zur frühen Detektion von Tumoren [106]. Ein idealer Biomarker sollte leicht zugänglich und sensitiv sein, um eine Tumorerkrankung zu detektieren und spezifisch genug sein, um zwischen bösartigen und gutartigen Erkrankungen zu unterscheiden. Auf Grund ihrer hohen Gewebespezifität, Stabilität und aberranten Expression in verschiedenen Tumorarten eignen sich mikroRNAs als diagnostische, prediktive und prognostische Biomarker. Zudem ermöglicht ihre Detektion und Quantifizierung im Blut eine Verringerung der Anzahl an Gewebebiopsien und die regelmäßige Entnahme von Blutproben könnte den Verlauf der Krankheit bzw. der Behandlung genau verfolgen [105].

### 1.3 Exosomen

Es gibt unterschiedliche Arten von sekretierten Membranvesikel, die je nach ihrem intrazellulären Ursprung verschiedene strukturelle und biochemische Eigenschaften haben. Zu den extrazellulären Vesikeln zählen Exosomen, Mikrovesikel, Ektosomen, Membranpartikeln, exosomen-ähnliche Vesikel und apoptotische Vesikel [116]. Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über die Merkmale von Exosomen, Mikrovesikeln und apoptotischen Vesikeln [117].

**Tabelle 1.3: Übersicht der Eigenschaften von extrazellulären Vesikeln.**

	<b>Exosomen</b>	<b>Mikrovesikel</b>	<b>Apoptotische Vesikel</b>
<b>Größe [nm]</b>	30-100	100-1000	50-500
<b>Sedimentation [g]</b>	100.000	10.000-20.000	1.200-10.000
<b>Sekretion</b>	Exozytose der MVBs	Membranabschnürung	„membrane blebbing“ durch Apoptose
<b>Markerproteine</b>	Tetraspanine (CD63, CD9), Alix, TSG101	Integrine, Selectine, CD40L	Histone
<b>Intrazellulärer Ursprung</b>	Endosomen	Plasmamembran	unbekannt

Der Begriff Exosom wurde 1981 zum ersten Mal verwendet, um Mikrovesikel zu beschreiben, die eine 5'Nukleotidaseaktivität enthielten und von einer neoplastischen Zelllinie abgesondert wurden [118]. Einige Jahre später beschrieben die Gruppen von Stahl und Johnstone die Sekretion von Vesikeln endozytotischen Ursprungs von kultivierten Retikulozyten. Sie zeigten, dass die Mikrovesikel (50-100 nm im Durchmesser) aus multivesikulären Endosomen stammen. Mittels

Elektronenmikroskopie konnte die Fusion der multivesikulären Endosomen mit der Plasmamembran beobachtet werden, was zu der Sekretion der internen Vesikeln in das extrazelluläre Medium führt [119, 120].

Exosomen sind seit der Entdeckung, dass sie neben Proteinen auch mRNA, DNA und mikroRNAs transportieren, in den Fokus der Forschung gerückt [110]. Zudem wurde nachgewiesen, dass ihre Zusammenstellung an Proteinen und RNA spezifisch zu sein scheint, was auf eine aktiv gerichtete Sekretion schließen lässt [121].

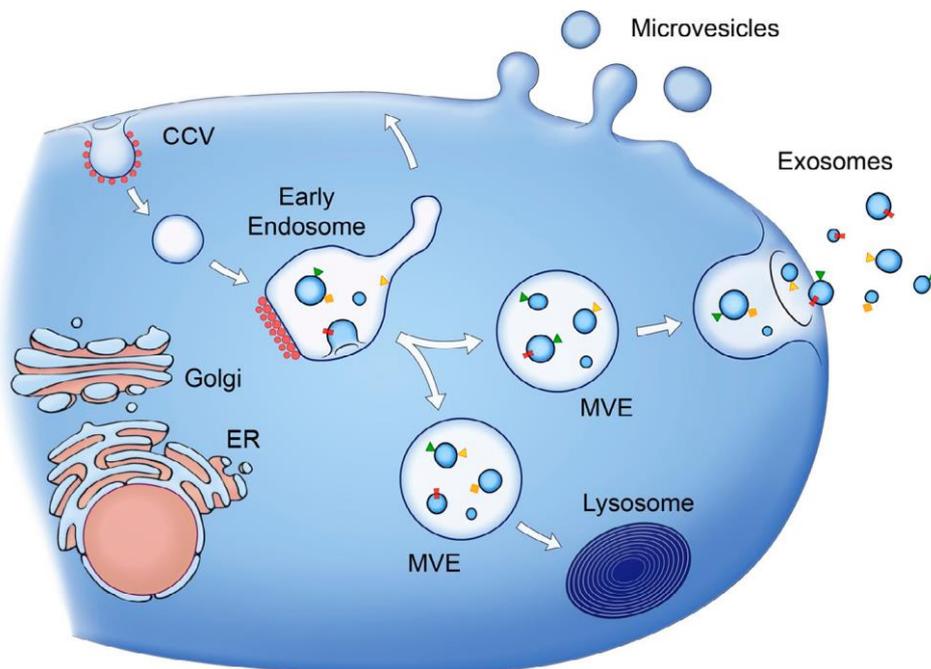
### 1.3.1 Biogenese der Exosomen

Die Biogenese der Exosomen ist in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt und beginnt mit der Bildung von frühen Endosomen. Aus ihnen gehen die MVBs hervor wodurch sie daher oft als multivesikuläre Endosomen (MVE) bezeichnet werden [122].

Die frühen Endosomen sind die Hauptbestandteile des dynamischen Transport- und Sortierungssystem in der Zelle. Sie entstehen durch die Fusion verschiedener endozytotischer Vesikel oder durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Dabei erfolgt die Internalisierung der Rezeptoren und ihrer Liganden durch sog. *clathrin-coated pits*. Viele der aufgenommenen gelösten Bestandteile, wie Makromoleküle und Membranbestandteile können anschließend in späten Endosomen oder Lysosomen abgebaut werden, wohingegen viele der Rezeptoren recycelt und der Membran zurückgeführt werden. Sie können bis zu mehrere hundert Male wiederverwendet werden [123].

Bereits in den frühen Endosomen beginnt die Bildung von internen luminalen Vesikeln, den Exosomen, an speziellen Plaques, die Clathrin und Komponenten des ESCRT

(*Endosomal Sorting Complex Required For Transport*) enthalten [124, 125]. Dieser Multikomponenten-Komplex wählt die Proteine zur Internalisierung meistens auf Grund einer Ubiquitinierung aus und wirkt beim Abschnüren der Vesikel mit. Der genaue Mechanismus dahinter ist allerdings noch nicht bekannt [126]. Nachdem die Bildung der Vesikel beendet ist, findet die Umwandlung in das späte Endosom statt. Dieser Prozess umfasst die Bewegung der Endosomen mittels Mikrotubuli in den perinukleären Bereich der Zelle, den Austausch von Membranbestandteilen und die Verringerung des pH-Wertes [122, 127]. Bei der Bildung der Exosomen in den Endosomen ist neben dem ESCRT-Komplex das Zelloberflächen-Glykoprotein CD63 beteiligt [128], welches als Membranprotein charakteristisch für Exosomen ist. Das CD63 Marker-Protein wird hauptsächlich bei der experimentellen Identifizierung von Exosomen verwendet. Im letzten Schritt fusionieren MVBs entweder mit Lysosomen, um die Exosomen zu degradieren oder mit der Plasmamembran, was zur Entlassung von Exosomen in den extrazellulären Raum führt [114]. Die genauen Signale, die die Fusion mit der Plasmamembran bewirkt, sind noch nicht bekannt.



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Biogenese von Exosomen (nach Raposo & Stoorvogel, J. Cell Biol., 2013).**

Die Bildung der frühen Endosomen ist meist Rezeptor-vermittelt und geschieht über *clathrin-coated pits* (CCV, rote Punkte). In ihnen entstehen durch Endozytose die Exosomen, die auf ihrer Oberfläche Membran-assoziierte und Transmembran-Proteine präsentieren (als farbige Drei- bzw. Vierecke dargestellt). Aus den frühen Endosomen gehen die MVB (auch multivesikuläre Endosomen MVE genannt) hervor. Das Entlassen der Exosomen geschieht bei der Fusion der MVBs mit der Plasmamembran. Die Pfeile geben die Richtung des Protein- bzw. Lipidtransports und die Sekretion der Exosomen an. Im Gegensatz dazu werden Mikrovesikel direkt von der Plasmamembran abgeschnürt [129].

### 1.3.2 Funktionen der Exosomen

Ein Meilenstein in der Exosomen-Forschung ist die Entdeckung, dass sie eine Rolle bei der Immunantwort und in der intrazellulären Kommunikation spielen. Es wurde gezeigt, dass Exosomen MHC (Major Histocompatibility Complex) I und II-Antigen-Komplexe tragen und sie den T-Lymphozyten präsentieren, was zu einer adaptiven Immunantwort führen kann [130, 131]. Die Forschungsarbeiten von Valadi et al. im Jahr 2007 bewiesen

das Vorhandensein von mRNA und mikroRNAs in Exosomen. Des Weiteren haben sie *in vitro* gezeigt, dass die in den Exosomen vorhandene mRNA zu Zielzellen transportiert und dort in Proteine translatiert werden kann. Somit können Exosomen genetische Informationen auf Empfängerzellen übertragen [110]. Die Übertragung von mutierter Tumor-DNA auf eine somatische Empfängerzelle, durch die phagozytotische Aufnahme apoptotischer Vesikel und die daraus resultierende Transformation der Empfängerzelle, wurde bereits 1999 beschrieben. Der Vorgang wurde als *Horizontaler (Gen-) Transfer* bezeichnet [132]. Weiterführend wurde von García-Olmo et al. die *Hypothese der Genometastasierung (hypothesis of genometastasis)* beschrieben. Demnach könnten sich Metastasen aus Empfängerzellen in fernen Zielorganen durch die Aufnahme von im Plasma zirkulierenden, dominanten Onkogenen, die vom Primärtumor stammen, entwickeln [133].

Bei Patienten mit großen Tumoren wurden erhöhte Mengen an Exosomen mit Tumormarkern detektiert, was sowohl auf die Tumorausdehnung als auch auf einen Effekt der Exosomen auf die Tumorprogression zurückgeführt werden kann [134]. Interessant ist vor allem der Nachweis Tumor-assoziiertes Proteine, wie HER2 bei Exosomen von Mammakarzinom-Zelllinien [135]. Exosomen, die von den HER2-überexprimierenden Tumorzelllinien SKBR3 und BT474 abgegeben werden, exprimieren aktive HER2-Moleküle. Sowohl Exosomen aus dem Zellkulturüberstand als auch aus dem Serum von HER2-positiven Brustkrebspatientinnen binden beide den humanisierten Antikörper Trastuzumab. *In vitro* wurde dadurch dessen Aktivität und die inhibierende Wirkung auf die Zellproliferation der SKBR3 Zellen verringert. Diese Ergebnisse weisen auf einen Einfluss der HER2-positiven Exosomen bei der Modulation der Empfindlichkeit gegen Trastuzumab hin [136]. Ihre mögliche Rolle bei der Störung

der therapeutischen Aktivität humanisierter Antikörper als auch die Tatsache, dass die gemessenen Konzentrationen spezifischer mikroRNAs mit Tumorparametern korrelieren und dass Tumore Exosomen mit spezifischem Inhalt ausschütten, eignen sie sich möglicherweise als diagnostische Biomarker.

Beim Ovarialkarzinom wies das mikroRNA-Expressionsprofil von Exosomen, die über den Tumormarker EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) isoliert wurden, eine hohe Korrelation mit dem des Primärtumors auf [134]. Tumorspezifische Exosomen über einen Tumormarker wie EpCAM aus dem Serum oder Plasma von Krebspatienten zu isolieren, bietet neue Möglichkeiten. Dadurch könnte man ein detailliertes tumorspezifisches mikroRNA-Profil erstellen und eindeutige Informationen über den Einfluss der mikroRNAs bei der Karzinogenese bekommen.

## 1.4 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte ein Set von zirkulierenden mikroRNAs im Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen quantifiziert und in Bezug auf ihr diagnostisches Potential und auf ihre Involvierung in der Karzinogenese und Tumorprogression untersucht werden.

Im ersten Schritt sollte mittels Microarray ein mikroRNA Expressionsprofil unter Verwendung von einer repräsentativen Auswahl von 30 Plasmaproben (20 Mammakarzinom-patientinnen, 10 gesunde Frauen) erstellt und, basierend auf diesen Ergebnissen, sechs Mammakarzinom-relevanten mikroRNAs identifiziert werden. Diese sechs geeigneten mikroRNAs sollten im nächsten Schritt im postoperativem Plasma von Frauen mit einem primären Mammakarzinom vor und nach einer Chemotherapie mittels Real-Time PCR quantifiziert und mit den Expressionsniveaus im Plasma von gesunden Frauen verglichen werden. Anschließend sollen die mikroRNA-Konzentrationen mit den klinisch pathologischen Daten, wie dem TNM- (Tumor-, Nodal-, Metastasen-) und dem Rezeptorstatus korreliert werden.

Des Weiteren sollten funktionell untersucht werden, inwieweit die Assoziationen mit den verschiedenen klinischen Parametern, wie z.B. Rezeptor- oder Lymphknoten-Status mit der biologischen Funktion der mikroRNAs zusammen hängt. Hierfür wurden die differenziell exprimierten mikroRNAs weiter analysiert, indem ihre putative Ziel-mRNA und ihr Einfluss auf die Proliferation und Apoptose durch Überexpression oder Inhibierung der mikroRNAs in Mammakarzinom-Zelllinien bestimmt wurden.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Korrelationsanalysen und den experimentellen Ansätzen wurde der Frage nachgegangen, inwieweit es möglich ist einen Blut-Test zu

entwickeln, der aus einem Set von zellfreien, zirkulierenden mikroRNAs besteht und klinisch relevant ist. Dieses Set von tumorspezifisch, deregulierten mikroRNAs sollte im besten Fall Mammakarzinom-Patientinnen verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms charakterisieren, die Progression der Tumorerkrankung reflektieren und den Verlauf der Chemotherapie erfassen und somit als diagnostischer Marker dienen.

## 2. Material

### 2.1 Patientenmaterial

#### 2.1.1 SUCCESS-B Studie

Im Rahmen dieser Arbeit, wurden für die quantitativen Analysen der mikroRNAs Plasmaproben aus der SUCCESS-B Studie verwendet. Dabei handelt es sich um eine multizentrische, prospektiv, randomisierte Phase III Studie, die den Unterschied einer FEC (Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamide)-Docetaxel-Chemotherapie mit einer FEC-Docetaxel+Gemcitabine Chemotherapie vergleicht. Die Plasmaproben wurden zwischen 2008 und 2011 an 251 deutschen Zentren gesammelt.

Die Studie wurde von den Ethik-Kommissionen genehmigt. Die Bestimmung des Tumorstatus zum Zeitpunkt der ersten Diagnose erfolgte nach der überarbeiteten AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) TNM (Tumor, Nodal, Metastasen)-Klassifikation. Die Einstufung der primären Tumoren (*Grading*) erfolgte nach den Vorgaben von Bloom und Richardson. Zur Diagnose von Lymphknotenmetastasen wurden bis zu drei einzelne Lymphknotenareale untersucht. Die Bestimmung des Estrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus, sowie des HER2-Status erfolgte mittels IHC (Immunohistochemie)-Färbung. Für den HER2-Status wurde zusätzlich eine FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)-Analyse durchgeführt, falls die IHC-Färbung nicht eindeutig war.

Aus dieser Studie wurde ein Kollektiv, basierend auf einer gleichmäßigen Verteilung der Risikofaktoren (Hormonrezeptor- und TNM-Status), für die durchzuführenden Quantifizierungen der mikroRNAs zusammengestellt. Die Proben wurden postoperativ

entnommen und von jeder Patientin wurden zwei Proben analysiert. Die erste einen Monat vor Beginn der Chemotherapie und die zweite Probe einen Monat nach abgeschlossener Chemotherapie.

Die Patientinnen und gesunden Blutspenderinnen gaben vor Durchführung der Studie ihr schriftliches Einverständnis.

### 2.1.2 Patientenmaterial aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie (UKE)

Unter der Leitung von Prof. Dr. Müller (Klinik für Gynäkologie, UKE) und Dr. Milde-Langosch (Forschungslabor Gynäkologie, UKE) werden seit 2011 von Mammakarzinom Patientinnen Serum- und Plasmaproben vor dem operativem Eingriff gesammelt.

Für die Extraktion von EpCAM-spezifischen Exosomen wurden Plasmaproben aus diesem Kollektiv verwendet.

## 2.2 Zelllinien

Zelllinie	Typ	Herkunft
MCF-7	Duktales Mammakarzinom	ATCC
MDA-MB-231	Duktales Mammakarzinom	ATCC

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Firma, Ort
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, München
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Merck, Darmstadt
Camptothecin	BioVision, Inc., Milpitas, USA
CD326 EpCAM Beads	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
cOmplete ULTRA Tablets, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protease Inhibitoren Tabletten	
DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Life Technologies, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, München
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma-Aldrich, München
EGF (Epidermal Growth Factor)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
EtOH (Ethanol, 100% pa)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
FGF (Fibroblast Growth Factor)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe

Guanidin-Thiocyanat	Sigma-Aldrich, München
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) 30%	Carl Roth, Karlsruhe
HCl (Salzsäure) 2N	Merck, Darmstadt
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, München
Insulin-Transferrin-Selenium A	Life Technologies, Darmstadt
IPTG	Fisher Scientific, Schwerte
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich, München
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, München
LB (Luria Miller)-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
LB (Luria Miller)-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamine 200 mM	Life Technologies, Darmstadt
Loading Buffer (6x)	Fisher Scientific, Schwerte
Luminol	Sigma-Aldrich, München
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MetaPhor™ Agarose	Lonza, Köln
Methanol	J.T. Baker, Deventer, NL
MTT (Methylthiazolyldiphenyl- Tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich, München
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH (Natriumhydroxid)	Carl Roth, Karlsruhe
Nuklease freies Wasser	Qiagen, Hilden
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, München
ProtoGel 30%	National Diagnostics, Atlanta, USA
Roentoroll 25	Tetenal, Norderstedt
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	Life Technologies, Darmstadt
SeaKemR. LE Agarose	Lonza, Köln
SDS (Sodium dodecyl sulfat)	Affymetrix USB, Santa Clara, USA
S.O.C. Medium	Sigma-Aldrich, München
Streptomycin/Penicillin (200 U/mL)	Life Technologies, Darmstadt

Superfix 25 Tetenal,	Norderstedt
TaqMan mikroRNA Assays	Life Technologies, Darmstadt
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich, München
Total Exosome Precipitation Reagent (für Plasma, Serum oder Zellkultur)	Life Technologies, Darmstadt
Trizma Base	Sigma-Aldrich, München
Trypanblaulösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/ EDTA (25%)	Life Technologies, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Firma, Ort</b>
Aluminiumfolie	Universal, Bristol, England
Amicon Ultra-15 Filtereinheiten	Merck Millipore, Schwalbach
Antifect N Liquid	Schülke und Mayr, Norderstedt
Aqua Stabil	Julabo, Seelbach
Centriplus Filter	Merck Millipore, Schwalbach
Combitips Plus (0,1 mL; 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2,5 mL)	Eppendorf, Hamburg
Deckglas	Carl Roth, Karlsruhe
Drigalski-Spatel, Einweg	VWR, Darmstadt
Fermacidal D2	IC Products SA, Minusio, Schweiz
Filterspitzen (0,1-10 µl; 20-200 µl; 1mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Fuji Medical X-Ray Film	Fujifilm, Düsseldorf
Glasobjektträger	R.Langenbrink, Emmendingen

Immobilon-P Membrane, PVDF	Merck Millipore, Schwalbach
LS Columns (MACS)	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
MicroAmp Optical Adhesive Film	Life Technologies, Darmstadt
Nunc IVF 1,8 mL CryoTube	Fisher Scientific, Schwerte
Whatman-Filter	VWR, Darmstadt
Multiply- $\mu$ StripPro	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Pechiney, Chicago, USA
Pipettenspitzen (0,1-10 $\mu$ L; 20-200 $\mu$ L; 1 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen-Röhrchen 15mL, 50mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Raucotupf Stieltupfer	Lohmann & Rauscher, Neuwied
Reaktionsgefäße, 0,5 mL; 1,5 mL; 2,0 mL	Sarstedt, Nümbrecht
RNAse Zap	Sigma-Aldrich, München
Serologische Einwegpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	BD Biosciences, Heidelberg
twin.tec real-time PCR plate	Eppendorf, Hamburg
6-Well-Platte (9,4 cm <sup>2</sup> )	BD Biosciences, Heidelberg
96-Well Microplate	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturflasche T25, T75	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld

## 2.5 Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma, Ort</b>
Analysenwaage BP610	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage CPA224S-0CE	Sartorius, Göttingen
Automatic-Sarpette	Sarstedt, Nümbrecht
Bakterienschüttler Certomat	B. Braun Biotech, Melsungen
Brutschrank, HeraCell15	Fisher Scientific, Schwerte
Brutschrank, HeraCell150	Fisher Scientific, Schwerte
Brutschrank, Heraeus Function Line	Kendro, Langenselbold
Durchlichtmikroskop, Wilovert S	Helmut Hund, Wetzlar
Eisbereiter FM-120 DE	Hoshizaki, Amsterdam, Niederlande
Elektrophoresekammer	Bioplastics, Landgraaf, Niederlande
ComPor L Mini/Midi	
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage, BP 610	Sartorius, Göttingen
Gefriertruhe, -80°C	Kryotec-Kryosafe, Hamburg
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Kirchdorf
Geldokumentation, GeneGenius 2	Syngene, Cambridge, UK
Genetic Analyzer 3130 Hitachi	Life Technologies, Darmstadt
Inverses Mikroskop, Axiovert 200	Carl Zeiss, Heidelberg
Klein-Zentrifuge, Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
Klein-Zentrifuge, MC 6	Sarstedt, Nümbrecht
Kühl-Gefrierschrank	Liebherr, Ludwigshafen
Kühlzentrifuge, Heraeus Megafuge 40R	Fisher Scientific, Schwerte
Kühlzentrifuge, Heraeus 3S-R	Kendro, Langenselbold
Inkubator HERAcell150	Fisher Scientific, Schwerte
Luminometer, GloMax20/20	Promega, Mannheim
Magnetrührer MR300	Heidolph, Schwabach
Mikroplattenlesegerät LB940 Mithras	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Mikroplattenlesegerät Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz

Mikrowelle 800	Severin, Sundern
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Proteinelektrophoresekammer	Life Technologies, Darmstadt
XCell SureLock	
Realplex Mastercycler egradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Roller, SRT 6	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Röntgenfilmentwickler Curix60	AGFA, Mortsel, Belgien
Scanner Epson 1680	Epson, Meerbusch
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Schüttler, Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Sonicator UP50H	Hielscher Ultrasonics, Teltow
Spannungsgerät, E143	Sigma-Aldrich, München
Spannungsgerät, EV202	Sigma-Aldrich, München
Spektralphotometer, NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank, HeraSafe KS12	Kendro, Langenselbold
Stickstofftank, Taylor Wharton LS 4800	Tec-lab, Mönchengladbach
Thermocycler, peqStar 96 Universal Gradient	Peqlab, Erlangen
Thermocycler, PTC-200	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer HTM 130	HLC, Bocholt
Tischzentrifuge, Heraeus Biofuge pico	Kendro, Langenselbold
Type 70.1 Ti Rotor	Beckman Coulter; Krefeld
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter, Krefeld
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage BP 610	Sartorius, Göttingen
Wasserbad 1003 GFL	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
XCell IITM Blot Module	Life Technologies, Darmstadt
Zählkammer, Neubauer improved	Optik Labor, Friedrichsdorf

## 2.6 Puffer, Lösungen und Medien

Für das Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde, falls nicht anders vermerkt, gefiltertes Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (0,2 µm Filtergröße, MembraPURE GmbH, Bodenheim) verwendet.

### MTT-Lysepuffer

HCl	4 mM
IGEPAL CA-630	0,1%
in Isopropanol	

### 1x PBS (pH 7,2- 7,4)

NaCl	128 mM
KCl	2 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM

### RIPA Puffer

NaCl	150 mM
IGEPAL CA-630	1%
Natrium-Deoxycholat	0,5% (w/v)
SDS	0,1% (w/v)
Tris (pH 8)	50 mM
Protease-Inhibitoren-Cocktail	1x
H <sub>2</sub> O	100 mL

Lysepuffer für Exosomen

NaCl	150 mM
IGEPAL CA-630	1%
Natrium-Deoxycholat	0,5% (w/v)
SDS	0,1% (w/v)
Tris (pH 7,6)	50 mM
Protease-Inhibitoren-Cocktail	1x
H <sub>2</sub> O	100 mL

4x SDS Probenpuffer

Tris (pH 6,8)	240 mM
Glycerol	40% (v/v)
Bromphenolblau	0,1% (w/v)
SDS	4% (w/v)

10x TBS

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
pH-Wert einstellen mit HCl auf	7,6
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

1x TBST

10x TBS	100 mL
H <sub>2</sub> O	900 mL
Tween 20	0,01%

5x Laemmli Laufpuffer

Glycin	960 mM
Tris	125 mM
SDS	17 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

1x Transfer Puffer

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,037% (v/v)
MeOH	20%
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

Blocking Puffer (5 %)

1x TBST	100 mL
Milchpulver oder BSA	5 g

Detektionslösung

Lösung A

p-Cumarsäure	0,2 mM
Luminol	1,25 mM
Tris (pH 8.5)	100 mM
H <sub>2</sub> O	8,85 mL

Lösung B

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.06 % (v/v)
Tris (pH 8.5)	100 mM
H <sub>2</sub> O	9 mL

1x Strippingpuffer (pH 9,5)

Tris	62 mM
Mercaptoethanol	0,8% (v/v)
SDS	69 mM
DTT	0,5 mM frisch zugeben

Medium für die Kultivierung von Bakterien

LB-Medium (Luria Miller)	25 g
Ampicillin	100 µg/mL
H <sub>2</sub> O	1 L

Für die Sterilisierung wurde das Medium für 20 min bei 121°C autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Kurz vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von Ampicillin.

Medium für Agarplatten

LB-Agar (Luria Miller)	40 g
Ampicillin	100 µg/mL
H <sub>2</sub> O	1 L

Das Medium wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert. Für das Gießen der Platten wurde es auf ca.55° C abgekühlt und mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt. Die Platten wurden nach dem Aushärten bei 4°C aufbewahrt.

Medium für die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231

DMEM	90% (v/v)
FCS	10% (v/v)
L-Glutamin	2 mM
Streptomycin /Penicillin	200 U/mL

Hunger-Medium für die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231

DMEM (phenolrot-frei)	99,5% (v/v)
FCS	0,5% (v/v)
Streptomycin /Penicillin	200 U/mL

## 2.7 Käuflich erworbene Kits

<b>Kit</b>	<b>Firma, Ort</b>
CellSearch, Profile Kit	Janssen Diagnostics, USA
Cultrex 24 Well Cell Invasionassay	Trevigen, Gaithersburg, USA
Cultrex 24 Well Cell Migrationassay	Trevigen, Gaithersburg, USA
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega, Mannheim
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fisher Scientific, Schwerte
FITC Annexin V Apoptosis Detection KitI	BD Bioscience, Heidelberg
mirVana PARIS Kit	Life Technologies, Darmstadt
NucleoSeq	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Tissue XS	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan MikroRNA Reverse	Life Technologies, Darmstadt
Transcription Kit	
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden

## 2.8 Antikörper

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Firma, Ort</b>
Anti-BRCA1 (C-terminal), Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-BRCA1 (N-terminal), Maus, monoklonal	Merck Millipore, Darmstadt
Anti-Estrogen Rezeptor, Maus, monoklonal	Thermo Scientific, Waltham, USA
Anti-GAPDH , Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-EpCAM (N-terminal), Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-CD63 (C-terminal), Kaninchen, polyklonal	Abgent, San Diego, USA
<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>Firma, Ort</b>
Anti-Kaninchen, HRP, Schwein, polyklonal	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus, HRP, Kaninchen, polyklonal	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-Ziege, HRP, Kaninchen, polyklonal	Dako, Glostrup, Dänemark

## 2.9 Enzyme und Marker

<b>Substanz</b>	<b>Firma, Ort</b>
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Life Technologies, Darmstadt
BigDye Terminator	Life Technologies, Darmstadt
v3.1 Ready Reaction Mix	
DNA Marker, HyperLadder100 bp	Bioline, Luckenwalde
DNA Marker, VII	Roche, Mannheim
GeneRuler1 kb DNA Ladder	Fisher Scientific, Schwerte
Klenow Fragment	Fisher Scientific, Schwerte

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Fisher Scientific, Schwerte
Proteinmarker, PageRuler prestained	Fisher Scientific, Schwerte
Proteinmarker, PageRuler Plus prestained	Fisher Scientific, Schwerte
TaqMan Gene Expression Master Mix	Life Technologies, Darmstadt
T4-DNA Ligase	Fisher Scientific, Schwerte

**Restriktionsenzym**

**Firma, Ort**

---

EcoRI (20000 U/mL)	New England Biolabs, Frankfurt
EcoRI Buffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt
NEBuffer 4 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt
NEBuffer 2 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt
NheI (10000 U/mL)	New England Biolabs, Frankfurt
XbaI (20000 U/mL)	New England Biolabs, Frankfurt
XhoI (20000 U/mL)	New England Biolabs, Frankfurt

## 2.10 Synthetische Oligonukleotide

Für die Quantifizierung der mikroRNAs in den Plasmaproben der SUCCESS-B-Studie mittels Real-Time PCR wurden folgende mikroRNAs ausgewählt und die spezifischen TaqMan MikroRNA Assays (Life Technologies, Darmstadt) bestellt

### Endogene Kontrollen

hsa-miR-484

hsa-miR-1207

### Exogene (spike-in) Kontrolle

Cel-miR-39

### Zu untersuchende mikroRNAs

hsa-miR-16

hsa-miR-27a

hsa-miR-107

hsa-miR-130a

hsa-miR-132

hsa-miR-146a

Der Einfluss dieser mikroRNAs auf biologische Prozesse wurde anschließend durch funktionelle *in vitro* Analysen untersucht. Hierfür wurden Mammakarzinom-Zelllinien mit synthetisch hergestellten miScript miRNA Inhibitoren bzw. Mimics der Firma Qiagen transfiziert.

Bei den miScript miRNA Inhibitoren handelt es sich um einzelsträngige, modifizierte RNA-Oligonukleotide, die nach der Transfektion spezifisch die endogene mikroRNA in den Zellen inhibieren.

Im Gegensatz dazu sind die miScript miRNA Mimics doppelsträngige, modifizierte RNA-Oligonukleotide, die die endogene, reife mikroRNA nachahmen und somit zu einer Überexpression in der Zelle führen.



antisense: 5`- AGT ATC **TCG AGG** CGC GTG GGC GTG CTG CGG GGC  
GAC CAT GGC TGT AGA CTG TTA CCT CCA GTT CCC  
AC -3`

miR-146a sense: 5`- TGC **AGC TAG** CCC GAT GTG TAT CCT CAG CTT TGA  
GAA CTG AAT TCC ATG GGT TGT GTC AGT GTC AGA -3`

antisense: 5`- AGT ATC **TCG AGA** CGA TGA CAG AGA TAT CCC AGC  
TGA AGA ACT GAA TTT CAG AGG TCT GAC ACT GAC  
AC -3`

Für die Untersuchung einer potenziellen Bindung einer mikroRNA an eine Ziel-mRNA wurden putative Bindestellen dieser mRNA in den pmirGLO Dual Luciferase Expressionsvektor (Promega) kloniert. Einerseits wurde die gesamte 3`UTR Sequenz von BRCA1, die putative Bindestellen für miR-132 und miR-146a besitzt und andererseits die putativen Bindestellen der 3`UTR-Region des ESR1-Gens für miR-107 in den Vektor kloniert. Die Restriktionsschnittstellen sind fett markiert. Die Sequenzen der putativen Bindestellen der miR-107 an ESR1 wurden aus Datenbank *microrna.org* ausgewählt und sind grau unterlegt.

BRCA1-3`UTR sense: 5`- GTT **AGA GCT** CCT GCA GCC AGC CAC AGG  
TAC -3`

antisense: 5`- CTC ATC TAG AGT TTG CTA CCA AGT TTA TTT  
GCA GTG -3`

ESR1-hsa-miR-107 sense: 5`- **CTA GCC** ATT **ATT GTT TTC TAA GTA ATT GCT**  
**GCC** TCT GAA CTT TTA AAA TAT GTA AAT GCT  
**GCC** ATG TTT -3`

antisense:                    5`- CTA GAA CAT GGC AGC ATT TAC ATA TTT TAA  
                                  AAG TTC AGA GGC AGC AAT TAC TTA GAA AAC  
                                  AAT AAT GGG -3`

Nach den Klonierungsschritten wurde mittels Sequenzierung überprüft, ob die jeweiligen Sequenzen korrekt in die Vektoren eingebaut wurden. Nachfolgend sind die verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

pcDNA3.1(+T7) sense:        5`- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3`

BGH antisense:                5`- TAG AAG GCA CAG TCG AGG -3`

pmirGLO Vektor sense:       5`- ACA CGG TAA AAC CAT GAC -3`

antisense:                    5`- GTC CAA ACT CAT CAA TTG TA -3`

Um die Regulation der Zielgene auf Transkriptionsebene durch die ausgewählten mikroRNAs zu untersuchen, wurden die folgenden Primer in der Real-Time PCR verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass die Größe des PCR-Produkts zwischen 50 bis max. 200 Basenpaaren lag. Kontaminationen durch genomische DNA wurden durch die Bindung der Primer an Exon-Exon Übergänge vermieden.

BRCA1 sense:                5`- TAA GCC AGA ATC CAG AAG GC -3`

antisense:                    5`- GGG ATG ACC TTT CCA CTC CT -3`

ESR1 sense:                  5`- GCA TTC TAC AGG CCA AAT TCA -3`

antisense:                    5`- TCC TTG GCA GAT TCC ATA GC -3`

GAPDH sense:                5`- CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG -3`

antisense:                    5`- TGG CAT GGA CTG TGG TCA TG -3`

## 2.11 Plasmide und Vektoren

pcDNA 3.1 (+) Expressionvektor	Promega, Mannheim
pmirGLO Dual-Luciferase miRNA	Promega, Mannheim
Target Expression Vektor	

## 2.12 Verwendete Programme und Datenbanken

Analyse der hergestellten Primer	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Analyse der Restriktionsschnittstellen	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">http://tools.neb.com/NEBcutter2/</a>
Auswertung für ELISA	<a href="http://myassays.com">http://myassays.com</a>
ENSEMBL	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
FACSDiva Software	BD Biosciences, Heidelberg
FinchTV	<a href="http://www.geospiza.com/finchtv">http://www.geospiza.com/finchtv</a>
Glomax	Promega, Mannheim
i-control-Microplate Reader Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
Informationen zu Proteinen	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
Magellan Data Analysis Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
MikroRNA Informationen	<a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a>
MikroRNA Ziel-mRNAs (Diana)	<a href="http://diana.cslab.ece.ntua.gr/">http://diana.cslab.ece.ntua.gr/</a>
MikroRNAZiel-mRNAs (mikroRNA.org)	<a href="http://www.mikroRNA.org/">http://www.mikroRNA.org/</a>
MikroRNA Ziel-mRNAs (targetscan)	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>
MikroWin Software Version 4.37	Berthold Technologies
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3</a>
Reaplex Software	Eppendorf AG, Hamburg
SPSS Statistics 18	IBM, Armonk, USA

## 3. Methoden

### 3.1 Klonierungstechniken

Für die funktionellen Analysen der mikroRNAs wurden Expressionsplasmide erstellt, in denen die Sequenz je einer mikroRNA in den pcDNA 3.1 (+) Expressionsvektor hinein kloniert wurde.

Zusätzlich wurden für die weiteren Analysen putative miRNA Bindungsstellen der Ziel-mRNAs in den pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor kloniert.

#### 3.1.1 Hybridisierung und Auffüllen der DNA-Oligonukleotide

Für die Herstellung der Expressionsplasmide, die die Sequenz für je eine mikroRNA tragen, wurden im ersten Schritt spezifische DNA-Oligonukleotide mit definierten Restriktionsschnittstellen und 5'-Überhängen erstellt. Diese Oligonukleotide wurden im zweiten Schritt in einem Reaktionsansatz von je 50 pmol sense und antisense DNA-Oligonukleotide, 50 µL Nuklease-freiem Wasser und 5 mM NaCl für 1 min bei 70°C im Wasserbad hybridisiert und dort über Nacht langsam abgekühlt. Die Reaktion wurde elektrophoretisch mit einem MetaPhor Agarosegel überprüft und die Konzentration am NanoDrop ND-1000 gemessen.

Anschließend wurde im folgenden Reaktionsansatz mit Hilfe des Klenow-DNA-PolymeraseI-Fragments die freien 5' Überhänge aufgefüllt:

DNA-Fragment	0,1-4 µg
Reaktionspuffer (10x)	2 µL
dNTP Mix (2 mM)	0,5 µL
Klenow-Fragment	0,1-0,5 µL
ad 20 µL Nuklease-freies Wasser	

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 15 min inkubiert und die Reaktion bei 75°C für 10 min gestoppt. Die aufgefüllten DNA-Stücke wurden mit dem NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 3.1.2 Herstellung der Reporterplasmide

Für die Herstellung des Reporterplasmids mit der 3'UTR Sequenz der ESR1-mRNA wurden die sense und antisense Oligonukleotide, die die Bindestellen für die miR-107 enthalten, wie unter 3.1.1 beschrieben, hybridisiert. Dabei entstanden die Schnittstellen für NheI und XbaI an den beiden Enden der Sequenz, sodass das Auffüllen sowie der Verdau nicht mehr notwendig waren und das Insert direkt für die Ligation eingesetzt werden konnte.

Für die Isolierung der BRCA1-3'UTR wurde im ersten Schritt genomische DNA aus MCF-7 Zellen mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits nach Herstellerangaben gewonnen. Die 3'UTR-Sequenz wurde dann unter folgendem Reaktionsansatz und angegebenem PCR-Programm amplifiziert.

Reaktionsansatz

gDNA (50 ng)		1 $\mu$ L
Qiagen PCR Master Mix		10 $\mu$ L
BRCA1 sense-Primer	0,5 $\mu$ L (10 $\mu$ M)	
BRCA1 antisense-Primer	0,5 $\mu$ L (10 $\mu$ M)	
ad 20 $\mu$ L Nuklease-freies Wasser		

PCR-Programm

Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 40 Zyklen
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	1,5 min	
Elongation	72°C	5 min	
Lagerung	4°C	$\infty$	

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Fragment ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.1.3 Restriktionsverdau

Die unten aufgeführten Reaktionsansätze für den Verdau der hergestellten miRNA-Fragmente, Vektoren und 3`UTR-Inserts wurden bei 37°C für 1 Std. inkubiert. Die miRNA-Fragmente wurden direkt nach der Inkubation aufgereinigt. Die Aufreinigung der Vektoren erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel mittels NucleoSpin Gel and PCR clean-up nach Herstellerangaben.

Restriktionsansatz des pcDNA 3.1 (+) Expressionsvektors und der miR-Fragmente

miR-Fragment	15 µL	Vektor (1 µg/µL)	1 µL
EcoRI	0,5 µL	EcoRI	0,5 µL
XhoI	0,5 µL	XhoI	0,5 µL
Puffer 2 (10x)	4 µL	Puffer 2 (10x)	2 µL
BSA (10%)	4 µL	BSA (10%)	2 µL
ad 40 µL Nuklease-freies Wasser		ad 20 µL Nuklease-freies Wasser	

Restriktionsansatz des BRCA1-3`UTR-Inserts

DNA-Insert	30 µL
SacI	0,5 µL
XbaI	0,5 µL
Puffer 3 (10x)	4 µL
BSA (10%)	4 µL
ad 40 µL Nuklease-freies Wasser	

Restriktionsansatz des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Vektor

Für ESR1		Für BRCA1	
Vektor (1 µg/µL)	1 µL	Vektor (1 µg/µL)	1 µL
NheI	0,5 µL	SacI	0,5 µL
XbaI	0,5 µL	XbaI	0,5 µL
Puffer 2 (10x)	2 µL	Puffer 3 (10x)	2 µL
BSA (10%)	2 µL	BSA (10%)	2 µL
ad 20 µL Nuklease-freies Wasser		ad 20 µL Nuklease-freies Wasser	

### 3.1.4 Ligation

Für die Reaktion der Ligation ist es wichtig, dass das Insert im 5-fachen Überschuss zum Vektor vorliegt. Dies wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse Insert [ng]} = \frac{5 \times (\text{Masse Vektor [ng]} \times \text{Länge Insert [bp]})}{\text{Länge Vektor [bp]}}$$

Die Ligation wurde unter folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

#### Reaktionsansatz

Insert	10 ng
Plasmid	1:5
T4-DNA Ligase (5 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Ligase Puffer (10x)	2 $\mu$ L
ad 20 $\mu$ L Nuklease-freies Wasser	

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der DNA, so dass rekombinante DNA-Moleküle entstehen. Um eine spezifische Bindung zwischen Vektor und Insert zu gewährleisten wurde die Ligation bei 16°C über Nacht inkubiert. Zusätzlich diente ein Ansatz ohne Insert als Negativ-Kontrolle.

### 3.1.5 Hitzetransformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden pro Ansatz 30  $\mu$ L der kompetenten DH5 $\alpha$  Zellen auf Eis aufgetaut, standartmäßig mit 5  $\mu$ L aus dem Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf

Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 sec im Wasserbad. Nach Zugabe von 250 µL S.O.C-Medium wurden die Bakterien für 1 Std. bei 37°C und 160 rpm geschüttelt, danach auf LB-Ampicillin Platten (mit 100 µg/mL) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.6 Übernachtkulturen und Minipräparation von Plasmid-DNA

Die auf den Agarplatten gewachsenen Bakterien-Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 37°C und 160 rpm in einem Polypropylen-Röhrchen mit 5 ml LB-Medium (mit 100 µg/mL Ampicillin) inkubiert. Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde 1 ml aus der Übernachtkultur mit Hilfe des Nucleospin Plasmid Kits nach dem Originalprotokoll aufgereinigt. Zur Überprüfung der Ligation und Transformation wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt.

### 3.1.7 Sequenzierung

Für die Überprüfung der Klonierungen wurden Sequenzierungen durchgeführt. Diese enzymatische Reaktion nach Sanger, wird auch Didesoxymethode oder Kettenabbruch-Synthese genannt, da die Synthese durch den Einbau eines der Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP), verursacht durch die fehlende 3'-Hydroxygruppe zum Abbruch kommt. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Die so markierten Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen durch die Fluoreszenz unterschiedliche Farbspektren und können so von einem Detektor erkannt werden. Das

Elektropherogramm (die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen) gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

#### Reaktionsansatz

BigDyeTerminator v3.1 Ready Reaction Mix	5 $\mu$ L
Sense- oder Antisense-Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
BigDye Puffer (5x)	3 $\mu$ L
Plasmid-DNA	250 ng
ad 20 $\mu$ L Nuklease-freies Wasser	

#### PCR-Programm

Denaturierung	95°C	30 sec	} 25 Zyklen
Annealing	50°C	15 sec	
Elongation	60°C	4 min	

Nachdem der Sequenzierung wurden die Proben mit dem NucleoSeq Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das Eluat wurde anschließend in 30  $\mu$ l Hi-Di Formamide resuspendiert, für 5 min bei 95°C denaturiert und am Genetic Analyzer 3130 Hitachi mit dem Programm Sequencing Analysis 5.2 sequenziert.

## 3.2 Zellkultur

Das Passagieren der verschiedenen Zelllinien, die für die Experimente benötigt wurden, erfolgte bei einer Konfluenz von 80%. Die Zellen wurden hierfür mit vorgewärmten PBS gewaschen, mit zwei mL Trypsin-EDTA inkubiert und in Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in neue Flaschen mit entsprechender

Verdünnung plattiert. Das im Medium enthaltene Serum führt zur Inaktivierung des Trypsins. Die Kultivierung erfolgte bei 37° C in einer wassergesättigten Atmosphäre und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 10%. Für die Lagerung wurden die Zellen in mit 10% (v/v) DMSO versetztem Zellkulturmedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C langsam abgekühlt. Die anschließende Konservierung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Die Vitalität der Zellen wurde mittels einer Kristallviolett-Färbung überprüft und in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Venor*GeM* Kits gemäß den Herstellerangaben auf Mykoplasmen getestet.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauerzählkammer verwendet.

### 3.2.1 Hypoxie

Die Hypoxie ist definiert als die Reduzierung oder das Fehlen von Sauerstoff in Organen, Gewebe oder Zellen. Diese reduzierte Versorgung mit Sauerstoff kommt häufig in soliden Tumoren vor, da der erhöhte Verbrauch durch eine plötzlich steigende Zellteilungsrate nicht durch die bestehenden Blutgefäße gedeckt werden kann.

Um zu analysieren, inwieweit sich die Expression der mikroRNAs in Tumorzellen, die unter Hypoxie-Bedingungen wachsen, ändert, wurden die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 bei 37° C in einer wassergesättigten Atmosphäre und einem O<sub>2</sub>-Gehalt von 1% kultiviert. Nach 0h, 24h, 48h und 72h wurden die Zellen geerntet und die totale RNA mit dem mirVana PARIS Kit (Life Technologies) isoliert.

### 3.2.2 Transfektion von Zelllinien

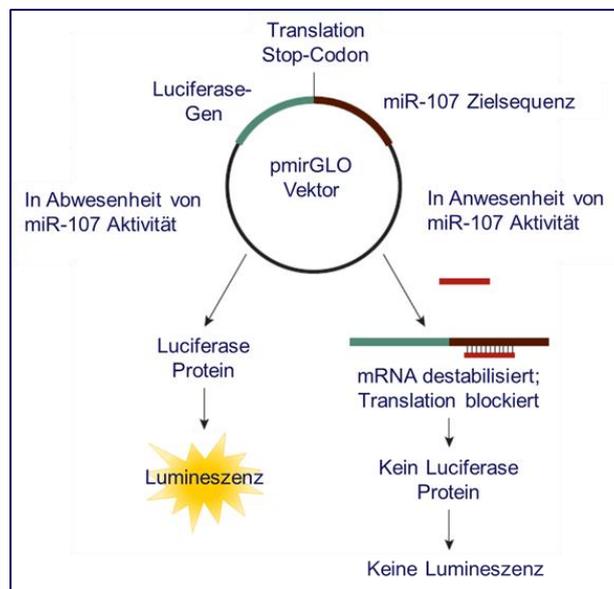
Für die Transfektion wurden eukaryotische Zellen je nach Experiment und Wachstumseigenschaften, vor der Transfektion an Tag 1 in geeigneter Zellzahl ausgesät. Für die standartmäßige Transfektion in 6-Well-Platten wurden  $2 \times 10^5$  MCF-7 oder MDA-MB-231 Zellen pro Well ausgesät, um für die Transfektion eine Konfluenz von 70-90% zu erreichen. Vierundzwanzig Stunden nach dem Aussäen wurden zunächst alle benötigten Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt. Für den Transfektionsansatz wurden 1  $\mu$ g Plasmid-DNA, 10 nM miR-Mimic (chemisch synthetisierte doppelsträngige RNA Moleküle) oder 50 nM miR-Inhibitor (chemisch synthetisierte einzelsträngige RNA Moleküle) mit 100  $\mu$ L serum-freien Medium gemischt und nach Zugabe von 2  $\mu$ L des XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent für 15 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert.

Nach 48 Std. wurden die Zellen geerntet und RNA und/oder Proteine isoliert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit der anti-miR Negative Control bzw. mit dem Leervektor. Die Überexpression bzw. Inhibierung der mikroRNAs und somit der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion wurde anschließend mittels RT-qPCR kontrolliert.

### 3.2.3 Luciferase-Assay

Das Dual-Luciferase Reporter Testsystem ist entwickelt worden, um potenzielle Zielgene der mikroRNAs, und somit deren Einfluss auf die Transkriptionsstabilität bzw. -Aktivität des Zielgens, zu ermitteln.

Das System besteht aus dem pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor, in den putative miR Bindestellen oder die komplette 3`UTR des Zielgens kloniert werden können. Die Aktivität der Luciferase aus dem Leuchtkäfer ( *Photinus pyralis* ), wird reduziert, wenn eine Bindung einer mikroRNA an das Zielgen erfolgt, und sich in der Repression des Reportergens widerspiegelt. Das Kontroll-Reportergen, der Luciferase Renilla (*Renilla reniformis*), wird im gleichen Ansatz detektiert und dient als interner Standard und der Normalisierung.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des pmirGLO-Vektors und dessen Funktionsweise.**

Hinter die Sequenz des Firefly Luciferase-Gens wurde die miR-107 Zielsequenz kloniert. In Abwesenheit der miR-107 Aktivität wird das Luciferase-Gen transkribiert und translatiert und die Lumineszenz kann detektiert werden. In Anwesenheit der miR-107 und dessen Bindung an die Zielsequenz wird die Translation des Luciferase-Proteins und dadurch die gemessene Lumineszenz verringert (modifiziert nach dem Originalprotokoll von Promega).

Für die Analysen wurden  $2 \times 10^5$  MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen verwendet und zwei Versuchsansätze durchgeführt. Für den einen Ansatz wurden die Zellen einmal mit dem klonierten Luciferase-BRCA1-3' UTR-Reporterplasmid (1 µg) zusammen mit den miR-Mimics (10 nM), miR-Inhibitoren (50 nM) oder dem Expressionsplasmid (1 µg) mit der klonierten miR-132 oder miR-146a transfiziert. Der zweite Transfektionsansatz enthielt das Reporterplasmid mit den klonierten ESR1-Bindestellen für miR-107 und dem Expressionsplasmid mit der klonierten miR-107 oder der Mimic bzw. dem Inhibitor für miR-107.

Als Kontrollen dienten die Transfektionen mit den Leervektoren (Reporter- und Expressionsplasmid) bzw. der anti-miR Negative Control.

Für die Messung wurden die Zellen 48 Std. nach der Transfektion einmal mit PBS gewaschen und mit 500 µL Passive Lysis Buffer für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20 µL des Zelllysats zu 100 µL Luciferase-Reagenz (LAR II) pipettiert, gemischt und im Luminometer GloMax20/20 gemessen. Die Messung der Renilla-Luciferase erfolgte nach Zugabe von 50 µL Stop&Glow Reagenz.

### 3.2.4 Proliferationsassay

Um den Einfluss der einzelnen mikroRNAs auf das Wachstum von Mammakarzinom Zellen zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay der sog. MTT-Test durchgeführt. Dieser Test nutzt die enzymatische Aktivität von lebenden Zellen, die die Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan katalysiert. Das Redoxpotential weist indirekt die Glykolyserate lebender Zellen nach.

Daher kann mit dieser Methode die Zahl lebender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten und somit die Zellproliferation gemessen werden. Für die Versuchsdurchführung wurden 2.000 MCF-7 oder MDA-MB-231 Zellen pro 96-Well in Triplikaten ausgesät und nach 24 Std. mit den Expressionsplasmiden, den Mimics oder Inhibitoren der miR-16, miR-107 oder miR-130a transfiziert. Eingesetzt wurden 0,03 µg des Expressionsplasmids, 10 nM miR-Mimic, 10 nM der anti-miR Negative Control oder 50 nM miR-Inhibitor in 10 µL serum-freien Medium. Nach Zugabe von 0,1 µL Transfektionsreagenz und einer Inkubation von 15 min bei RT wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben. Für die Messung verschiedener Zeitpunkte, wurden die Zellen 0, 24, 48 und 72 Std. nach der Transfektion mit 20 µL der MTT Lösung (5 mg/mL in PBS) für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und die Zellen in 150 µL MTT-Lysepuffer resuspendiert. Die Messung erfolgte an dem Mikroplattenlesegerät Sunrise bei einer Wellenlänge von 540 nm und mit einer Referenz von 650 nm. Für jede Analyse wurden drei biologische sowie technische Replikate durchgeführt.

### 3.2.5 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose

Für die weitere Charakterisierung der mikroRNAs wurde ihr Einfluss auf den programmierten Zelltod untersucht. Die Apoptose wurde mittels Camptothecin induziert. Camptothecin ist ein Hemmstoff der Topoisomerase I, der durch Bindung den Topoisomerase-I-DNA-Komplex stabilisiert und eine Re-Ligation der DNA nach deren Entwindung verhindert. Das führt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA und somit zum programmierten Zelltod.

Die Durchflusszytometrie beschreibt allgemein ein Verfahren zur Vermessung von Zellen. Dabei werden sie einzeln nacheinander durch den Messbereich eines Laserstrahls geschickt und das durch Emission entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird von einem Detektor gemessen. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe und der Komplexität der Zelle.

Für die Messung der Apoptose werden Zellen im Allgemeinen mit FITC-Annexin-V und Propidiumiodid (PI) markiert. FITC-Annexin-V ist ein fluoreszenzmarkierter Farbstoff, der an Phosphatidylserin bindet. Phosphatidylserin befindet sich in lebenden Zellen nur auf der intrazellulären Seite und mit Beginn der Apoptose auch auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran. Propidiumiodid wird für die Diskriminierung der Zellviabilität verwendet, da es lediglich die perforierte Zellmembran von toten Zellen, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen kann. Durch Verwendung dieser beiden Farbstoffe können früh-apoptotische (Annexin-V-positiv, PI-negativ), nekrotische bzw. spät-apoptotische (Annexin-V-positiv, PI-positiv) und lebende (Annexin-V-negativ, PI-negativ) Zellen unterschieden werden.

Für die Experimente wurden  $3 \times 10^5$  MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und nach 24 Std. mit den klonierten Plasmiden, den Leervektoren, den synthetischen miR-Mimics oder den miR-Inhibitoren für miR-16, miR-107 und miR-130a transfiziert. Nach weiteren 24 Std. wurden die Zellen mit  $6 \mu\text{M}$  Camptothecin für 4 Std. bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend mit frischem Medium versorgt.

Nach weiteren 24-48 Stunden wurde das Medium mit den bereits abgestorbenen Zellen und die geernteten Zellen bei 1.200 rpm für 3 min zentrifugiert. Die mit 1 mL PBS gewaschenen Zellen wurden mittels FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I gefärbt. Nach den Herstellerangaben wurden die Zellen in  $100 \mu\text{L}$  Bindepuffer resuspendiert, mit

je 5  $\mu\text{L}$  FITC Annexin V und PI für 15 min bei RT inkubiert und mit 400  $\mu\text{L}$  Puffer aufgefüllt.

Notwendig für die Kalibrierung des FACS-Canto II waren ungefärbte Zellen, sowie Färbungen mit nur einem der beiden Farbstoffe. Als Kontrolle dienten sowohl basale Zellen mit und ohne Camptothecin Behandlung, als auch transfizierte Zellen ohne Camptothecin Behandlung. Bei der Messung an dem FACS-Canto II wurden die Zellen mit 488 nm angeregt und durch Annexin-V-FITC mit einem 585/42 Filter (Longpass Spiegel mit 556 nm) sowie PI mit einem 660/20 Filter (Longpass Spiegel mit 610 nm) detektiert. Die Auswertung erfolgte mit der FACS Diva Software.

### 3.2.6 Zellmigrations- und Invasionsassay

Um zu Metastasieren müssen sich einzelne Tumorzellen vom Tumorverband ablösen, durch Basalmembranen und zelluläre Barrieren in die Blut- oder Lymphbahn wandern.

Dies setzt die Fähigkeit der Zellen zur Migration und Invasion voraus. Um zu analysieren, ob die miR-107 an diesen Prozessen beteiligt ist, wurden Migrations- und Invasionsassays durchgeführt

An Tag 1 wurden  $2 \times 10^5$  MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen pro Well auf eine 6-Well-Platte ausgesät und 24 Std. später mit der miR-Mimic oder dem miR-Inhibitor für miR-107 und der anti-miR Negativ Kontrolle transfiziert. Acht Stunden danach erfolgte ein Mediumswechsel mit phenolrot-freiem Hungermedium (0,5% FCS). An Tag 3 wurden die Zellen geerntet und in Duplikaten ausgesät. Hierfür wurden 100.000 Zellen in 400  $\mu\text{L}$  phenolrot-freiem Hungermedium in jeden Transwell-Einsatz pipettiert. Die untere Kammer enthielt 500  $\mu\text{L}$  Medium mit 10% FCS. Für die Auswertung wurden die Zellen

1 Std. mit 500 µl Dissotiationspuffer und Calcein, ein Fluoreszenzfarbstoff der lebende Zellen markiert, inkubiert. Die einzelnen Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ausgewertet wurden die Platten an dem Mikroplattenlesegerät LB940 Mithras (Berthold Technologies). Gemessen wurde die relative Fluoreszenz ohne die Transwell-Einsätze bei einer Extinktion von 485 nm und Emission von 520 nm mit einer Lampenenergie von 5000. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe von 50.000, 25.000, 10.000 und 5.000 Zellen für jede 24-Well-Platte in Triplikaten angesetzt. Diese Zellen wurden ebenfalls 1 Std. in 500 µL Dissotiationspuffer mit Calcein inkubiert und mit den gleichen Parametern gemessen. Für die Bestimmung der Anzahl an Zellen, die in den Experimenten migrierten, wurden die Mittelwerte der Standardreihe (ohne Hintergrund) gegen die Zellzahl aufgetragen. Anhand der Trendlinie bzw. der resultierenden Gleichung konnten die Zellzahlen berechnet werden.

### 3.3 Isolierung und Konzentrationsbestimmung der RNA

#### 3.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen

Für die funktionellen Analysen der mikroRNAs und die Bestimmung der mRNA-Expression wurden aus transfizierten und nicht-transfizierten Zellen die totale RNA mit dem mirVana PARIS Kit, nach den Herstellerangaben, extrahiert. Hierfür wurden die Zellen geerntet, das Pellet mit PBS gewaschen und die Zellyse mit 300 µL *Cell Disruption Buffer* aus dem Kit eingeleitet. Die anschließende Extraktion der RNA beruht auf dem Verfahren der Phenol/Chloroform Extraktion und der Aufreinigung durch einen

Filter. Die Elution erfolgte mit 80  $\mu$ L Elutionslösung. Die Konzentration der RNA wurde, vor der Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , mit dem NanoDrop ND-1000 bestimmt.

### 3.3.2 Isolierung der mikroRNAs aus Plasmaproben

Für die Quantifizierung der mikroRNAs aus den Plasmaproben der SUCCESS-B Studie wurde das NucleoSpin miRNA Plasma Kit verwendet, welches speziell für die Isolierung kleiner RNA-Fragmente aus Plasmaproben entwickelt wurde. Die RNA bindet dabei unter bestimmten Salz- und pH-Bedingungen an eine Silica-Membran, wobei die DNA-Kontaminationen durch einen rDNase Verdau entfernt wurden.

Die Extraktion der RNA erfolgte aus 300  $\mu$ L Plasma, welches vorher mit 25 fmol der cel-miR-39 versetzt wurde. Die synthetisch hergestellte miR-39 aus *C.elegans* diente als exogene Kontrolle, um ein gleichmäßiges Verarbeiten der Proben zu gewährleisten. Die RNA wurde in 30  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Die Messung der RNA erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 und die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.3 Isolierung der mikroRNAs für Microarray-Analysen

Für die Quantifizierung der mikroRNAs mit der Microarray-Methode wurde die RNA mit dem NucleoSpin miRNA Plasma Kit aus Plasmaproben von 20 Mammakarzinom Patientinnen der SUCCESS-B Studie und von 10 gesunden Frauen isoliert. 600  $\mu$ L Plasma wurden eingesetzt. Der Microarray wurde mit dem SurePrintG3 Human miRNA (8x60K) Biochip von Agilent Technologies und von der Firma CBC GmbH, Heidelberg durchgeführt. Dieser Biochip enthält 8 hochauflösende 60k Arrays (8 x 60.000 *Features*) und > 40 Replikate für jede mikroRNA pro Array. Zusätzlich sind Kontrollsonden für das

Angleichen des Rastergitters und Spike-in Kontrollen für das Markieren und Hybridisieren vorhanden. Pro Probe wurden rund 1300 humane und virale mikroRNAs, basierend auf der Sanger miRBase release 16.0 Software (April 2011), analysiert. Die Sonden, die mit dem 3'-Ende auf der Glasoberfläche des Chips verankert sind, und die Proben, die mittels der T4-RNA Ligase mit pCp-Cy3 markiert sind, wurden miteinander hybridisiert. Die Datenerfassung erfolgte mit der Agilent Feature Extraction software Version 10.7.3.1.

### 3.3.4 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung

Generell wurde jede isolierte RNA vor der Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  mit einem Spektrophotometer, dem NanoDrop ND-1000, vermessen. Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht mit einem spezifischen Muster und das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. In diesem Bereich wird die RNA-Konzentration bestimmt, indem das absorbierte Licht mittels Photodetektor gemessen wird. Je mehr Licht absorbiert wird, desto höher ist die Nukleinsäurekonzentration. Die genaue Berechnung erfolgt über das Lambert-Beersche Gesetz.

Für die Reinheit der RNA sollte das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm bei einem Wert von  $\sim 2$  liegen. Ist er niedriger, liegt eine Kontamination durch Proteine oder Phenol vor.

## 3.4 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

### 3.4.1 RT-PCR der mRNA

Bei dieser Reaktion wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA die dazu komplementäre cDNA (complementary DNA) hergestellt. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt wie andere DNA-Polymerasen einen Primer mit einem freien 3`OH-Ende zur Synthese der DNA. Um spezifisch nur mRNA zu transkribieren, werden Oligo-dT-Primer verwendet, die komplementär an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden.

Wie in dem unten aufgeführten Reaktionsansatz wurden standardmäßig 200 ng mRNA in einem 20 µL Ansatz, mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben, in cDNA umgeschrieben. Die Inkubation bei 37°C für 60 min und die Inaktivierung bei 70°C für 5 min wurde im peqStar 96 Universal Gradient PCR-Cycler (Peqlab, Erlangen) durchgeführt.

#### Reaktionsansatz

dNTPs (10 mM)	2 µL
M-MuLV Rev. Transcriptase (20 U/µL)	2 µL
Reaktionspuffer (5x)	4 µL
RiboLock RNAs Inhibitor (20 U/ µL)	1 µL
Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer	1 µL
RNA (200 ng)	4 µL
ad 20 µL Nuklease-freies Wasser	

### 3.4.2 Reverse Transkription der mikroRNAs

Da mikroRNAs in Blutproben oft in nur geringem Masse vorhanden sind und sich ihre Sequenzen nur in einer oder wenigen Basen unterscheiden, ist es wichtig, spezifische und sensitive Methoden für die Quantifizierung durchzuführen.

Jede mikroRNA wurde mit einem Stem-loop RT Primer des jeweiligen, spezifischen TaqMan mikroRNA Assays zusammen mit dem TaqMan MikroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) transkribiert. Standardmäßig wurde 2  $\mu\text{L}$  RNA eingesetzt, die mit dem NucleoSpin miRNA Plasma Kit aus den Plasmaproben extrahiert wurden. Die Reaktionsschritte im Themocycler wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### Reaktionsansatz

dNTPs (100 mM)	0,1 $\mu\text{L}$
Reverse Transcriptase (50 U/ $\mu\text{L}$ )	0,66 $\mu\text{L}$
Reverse Transcription Buffer (10x)	1 $\mu\text{L}$
RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu\text{L}$ )	0,13 $\mu\text{L}$
Nuklease-freies Wasser	2,77 $\mu\text{L}$
RT-Primer	2 $\mu\text{L}$
RNA	2 $\mu\text{L}$

### 3.5 Quantitative Real-Time PCR

Die Quantifizierung der mikroRNAs und mRNAs wurde mit der Real-Time PCR (qPCR) durchgeführt. Sie vervielfältigt Nukleinsäuren basierend auf der Methode der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Der Name leitet sich von den

Fluoreszenz-Messungen ab, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.

### 3.5.1 Quantifizierung der mRNA mittels SYBR Green

SYBR Green ist ein sensitiver, aber unspezifischer Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert. Durch das Binden an die doppelsträngige DNA steigt die Fluoreszenz des Farbstoffes. Die geringe Spezifität von SYBR Green kann man durch eine Schmelzkurvenanalyse nach abgelaufener PCR umgehen. Die Temperatur wird kontinuierlich erhöht und wenn eine für das zu analysierende PCR-Produkt spezifische Schmelztemperatur erreicht ist, denaturiert der DNA-Doppelstrang, SYBR Green wird freigesetzt und eine Abnahme der Fluoreszenz wird registriert.

Für die Quantifizierung der mRNAs wurde 1  $\mu\text{L}$  der cDNA und der Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) nach folgendem Reaktionsansatz eingesetzt.

#### Reaktionsansatz

Maxima SYBR Green/ROX Master Mix	5 $\mu\text{L}$
Sense-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{L}$
Antisense-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{L}$
cDNA	1 $\mu\text{L}$
Nuklease-freies Wasser	3 $\mu\text{L}$

Pipettiert wurde jede Probe als Triplikat auf eine 96 twin tec Real-Time PCR-Platte (Eppendorf), die anschließend mit einer Folie versiegelt und für 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert wurde. Die Reaktion wurde nach dem unten stehenden PCR-Programm im Realplex Mastercycler epgradient S (Eppendorf) durchgeführt. Die Annealing Temperatur für die verwendeten Real-Time PCR Primer lag bei 60°C.

PCR-Programm

Denaturierung	95°C	15 min		
Denaturierung	95°C	5 sec	}	40 Zyklen
Annealing	60°C	30 sec		
Elongation	72°C	30 sec		
Denaturierung	95°C	15 sec	}	Schmelzkurve
Annealing	60°C	15 sec		
ansteigende Temperatur		20 min		
Denaturierung	95°C	15 sec		

3.5.2 Quantifizierung der mikroRNAs mittels TaqMan Sonden

Für die Quantifizierung der mikroRNAs aus den Plasmaproben der SUCCESS-B-Studie wurden auf Grund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität TaqMan Sonden eingesetzt. Eine Sonde besitzt an einem Ende einen sog. Quencher und am anderen Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM). Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und

Fluorophor voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Reaktionsansatz

TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	5 µL
TaqMan mikroRNA Assays (20x)	0,5 µL
cDNA	1 µL
Nuklease-freies Wasser	3,83 µL

PCR-Programm

Denaturierung	95°C	10 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95°C	15 sec	
Annealing und Elongation	60°C	60 sec	

3.5.3 Auswertung der Real-Time PCR und relative Quantifizierung

Im Realplex Programm wurde die Ordinate logarithmisch dargestellt und ein geeigneter Schwellenwert im Bereich der exponentiellen Steigung wurde ausgewählt. Anschließend wurden die Rohdaten für die Berechnungen der relativen Expressionen und der statistischen Auswertung in Microsoft Excel bzw. SPSS Version 18 exportiert. Bei den Berechnungen handelte es sich um relative und keine absoluten Quantifizierungen, da keine Eichkurve mit bekannten RNA Mengen genutzt wurde, sondern die Proben relativ zueinander betrachtet wurden.

Die folgende Formel wurde zur Berechnung der relativen Quantifizierung der mRNA- bzw. mikroRNA-Konzentrationen genutzt:

$$\text{CT (Ziel-RNA)} - \text{CT (Referenzgen)} = \text{Delta CT}$$

Die Ergebnisse wurden mit diesen endogenen Referenzgenen deshalb abgeglichen, um Unterschiede in der Konzentration auszugleichen. Eine ideale interne Kontrolle sollte leicht zu detektieren sein, und ihre Expression sollte nicht während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung variieren.

Basierend auf den Ergebnissen des durchgeführten Microarrays wurde für die mikroRNA-Analysen die hsa-miR-1207 ausgewählt, da sie eine stabile, gleichmäßige Expression in Plasma von gesunden Frauen und Brustkrebspatientinnen zeigte.

Der Abgleich der mRNA Ergebnisse erfolgte mit GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase).

### 3.6 Proteinanalyse

#### 3.6.1 Isolierung von Proteinen

Die Isolierung von Proteinen aus transfizierten oder untransfizierten Zellkulturzellen erfolgte bei einer Konfluenz von ~80%. Nach Zentrifugation der Zellen wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 1 mL kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 300 µL RIPA-Puffer dazu pipettiert und die Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zellen bei 14.000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 3.6.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem DC Protein Assay Kit durchgeführt und bei einer Wellenlänge von 650 nm im Mikroplattenlesegerät Sunrise gemessen. Eine Standardkurve mit einer Proteinkonzentration von 0; 0,25; 0,5; 1 und 2 mg/ml wurde aufgetragen und die Geradengleichung  $y = mx + n$  wurde mit einer linearen Regressionsanalyse berechnet. Basierend auf dieser Gleichung wurde die Konzentration (x) der verschiedenen Proben mit der gemessenen Absorption (y) anhand folgender Formel berechnet:

$$x = \frac{y - n}{m}$$

Für den Western Blot wurden standardmäßig 30 µg Zellprotein-Lysat aufgetragen.

### 3.6.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

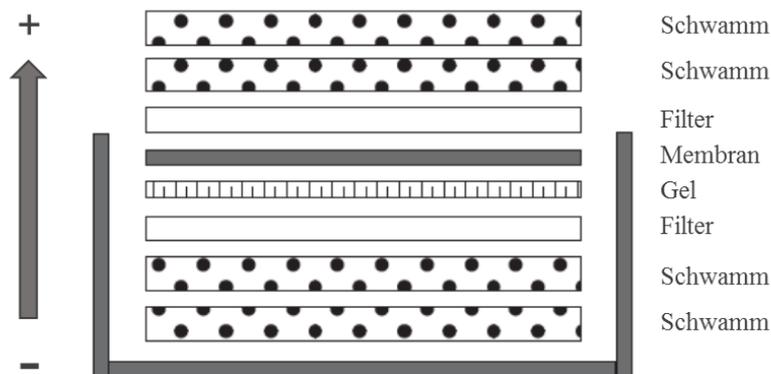
Für die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli wurden zuerst Sammel- und Trenngele nach folgender Zusammensetzung angefertigt:

<u>Sammelgel</u>		<u>Trenngel (10%)</u>	
ProtoGel 30%	670 µL	ProtoGel 30%	5 mL
1 M Tris pH 6,8	500 µL	1 M Tris pH 8,8	3,8 mL
H <sub>2</sub> O	2,7 mL	H <sub>2</sub> O	5,9 mL
10% SDS	40 µL	10% SDS	150 µL
TEMED	5 µL	TEMED	6 µL
APS	40 µL	APS	150 µL

Die polymerisierten Gele wurden in die X Cell Sure Lock Mini-Kammer eingespannt und die Kammer mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Proben wurden vor dem Beladen mit 4x SDS Probenpuffer gemischt, für 5 min bei 95°C aufgeköcht und kurz zentrifugiert. Als Längenstandard dienten 10 µL „prestained Page Ruler“ oder für größere Proteine der „prestained Page Ruler Plus“. Die Laufzeit betrug je nach Proteingröße 1-2 Std. bei 125 Volt.

### 3.6.4 Western Blot

Für den Transfer der Proteine auf eine Membran wurde das Blot Modul (XCell II) nach der Abbildung 3.1 zusammengebaut. Die verwendete PVDF-Membran (0,45µm) wurde vorher kurz in Methanol aktiviert und, sowie die Schwämme und Filterpapiere, für 15 min in Transferpuffer inkubiert.



**Abbildung 3.2: Aufbau des Western Blots.**

Dargestellt ist der schematische Aufbau bei dem Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Membran. Die Schwämme und Filter sorgen für den kontinuierlichen Kontakt zwischen Gel und Membran. Der Transfer der negativ geladenen Proteine verläuft, wie durch den Pfeil angegeben von der Kathode (-) zur Anode (+) (aus Originalprotokoll, Invitrogen).

Nach dem Zusammenbau der Kammer wurde diese mit 1x Transfer Puffer gefüllt und der Transfer der Proteine auf die Membran für 2 Std. bei 25 Volt durchgeführt. Um freie Proteinepitope auf der Membran zu sättigen, wurde sie anschließend für 1 Std. bei RT in 5% Blockierungsreagenz inkubiert.

### 3.6.5 Immundetektion

Nach dem Blocken unspezifischer Proteinbindungen, wurde die Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C in 5% Milchpulver-TBST inkubiert. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper und das Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

**Tabelle 3.1: Parameter der Primärantikörper.**

Primärantikörper	Verdünnung	Laufhöhe der Bande
Anti-BRCA1	1:1000 (5% Milch)	220 kDa
Anti-CD63	1:500 (5% Milch)	25 kDa bei Zellen (45 kDa bei Exosomen)
Anti-EpCAM	1:1000 (5% Milch)	40 kDa
Anti-ER	1:500 (5% Milch)	67 kDa
Anti-GAPDH	1:1000 (5% Milch)	35 kDa

Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBST für 10 min entfernt und die Membran mit einem 1:1500 verdünnten Sekundärantikörper (in 5% Milch und 1x TBST) inkubiert. Nach drei 15-minütigen Waschschritten mit 1x TBST wurde die Membran für 4 min mit einer Mischung aus der ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 überzogen. Die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase markierten Sekundärantikörper bewirkte die Oxidation des Luminol-Reagenz der ECL-Lösung in

Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit photosensitiven Röntgenfilmen (GE Healthcare) detektiert. Die Belichtungszeit variierte, in Abhängigkeit des jeweiligen Proteins, zwischen 10 sec und 1 Std. Die Filme wurden in dem Röntgenfilmentwickler Curix60 entwickelt.

### 3.7 Isolierung von Exosomen

#### 3.7.1 Präzipitation der Exosomen

Eine Methode zur Isolierung von Exosomen, 40-150 nm große Membranvesikel, aus Serum oder Plasmaproben, ist die Präzipitation mittels Total Exosome Precipitation Reagenz (Life Technologies). Es wurden 2 mL Plasma eingesetzt und die Exosomen nach den Protokollen des Herstellers isoliert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und als negative Kontrolle für den Western Blot verwendet. Die in dem Pellet enthaltenen Exosomen wurden in 400 µL angesetztem Exosomen-Lyse Puffer resuspendiert und lysiert.

#### 3.7.2 Isolierung der Exosomen mittels Ultrazentrifugation

Für die Isolierung der Exosomen wurden noch vorhandene Zellen sowie Zellfragmente von 2 mL Plasma in drei jeweils 10-minütigen Zentrifugationsschritten bei 300, 2000 und 10.000 g abgetrennt. Der gewonnene zellfreie Überstand wurde mit 6 mL PBS aufgefüllt, in ein Zentrifugationsröhrchen (Polycarbonate Thick Wall, Beckman Coulter) überführt und für 1 Std. bei 100.000 g mit dem Type 70.1 Ti Rotor (Beckman Coulter) in der Ultrazentrifuge (Optima LE-80K, Beckman Coulter) zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet, welches die Exosomen enthielt, wurde in 100  $\mu$ L Exosomen-Lysepuffer resuspendiert.

### 3.7.3 Isolierung von EpCAM-spezifischen Exosomen mittels Microbeads

Da epitheliale Tumorzellen das EpCAM-Protein auf ihrer Membran exprimieren, weisen somit auch die von ihnen abgeschnürten Exosomen EpCAM auf. Deshalb sollte es möglich sein, Exosomen von epithelialen Tumoren mit Hilfe von EpCAM-Antikörper gekoppelte Microbeads zu isolieren. Die folgenden zwei Methoden, die für die Isolierung zirkulierender Tumorzellen (*Circulating Tumor Cells, CTCs*) aus Blutproben entwickelt wurden, wurden für die Extraktion der EpCAM-spezifischen Exosomen getestet.

#### Method 1: MACS-Magnetic Activated Cell Sorting-System (Milteny Biotech)

Um Exosomen mit dem MACS-System zu extrahieren, wurde anstatt Vollblut Plasma verwendet. Das Plasma wurde vorher zentrifugiert, um zirkulierende Zellen zu entfernen. Das Prinzip des MACS-Systems basiert zum einen auf der Verwendung von 50 nm großen Microbeads. Das sind superparamagnetische Teilchen, die mit hochspezifischen Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen konjugiert sind. Zum anderen werden bei dem MACS-System Säulen verwendet, die eine Matrix aus ferromagnetischen Kugeln mit einer speziellen Beschichtung enthalten. Diese Kugeln verstärken das Magnetfeld um das 10.000-fache, wenn sie auf einen sogenannten magnetischen Separator gestellt werden. Für die allgemeine Durchführung werden Plasmaproben, die Exosomen mit gebundenen magnetischen MicroBeads enthalten, auf eine MACS-Säule gegeben und in einen MACS

Separator platziert. Die unmarkierten Exosomen durchlaufen die Säule, während die magnetisch markierten Exosomen zurückgehalten werden. Der Durchlauf kann als die nicht-markierte Fraktion gesammelt werden. Nach einem kurzen Waschschrift wird die Säule aus dem Separator entfernt, und die magnetisch markierten Exosomen von der Säule eluiert.

Für die Isolierung von EpCAM-Exosomen wurden 2 mL Plasma mit 50 µL CD326 (EpCAM) MicroBeads von Milteny Biotec gemischt und 2h bei 4°C inkubiert. Die Säulen (LS) wurden in das Magnetfeld (MidiMACS Separator) gestellt, mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend mit den Proben befüllt. Nach viermaligem Waschen mit TBS-Puffer wurden die Säulen zum Eluieren auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gestellt und mit 1 mL TBS eluiert. Das Eluat wurde für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und das Pellet (Exosomen + Beads) mit 100 µL Exosomen-Lysepuffer resuspendiert.

### Method 2: Cell Search (Veridex)-System

Das *Cell Search System* (Janssen Diagnostics) ist derzeit das einzige von der *FDA* zugelassene und klinisch validierte Testverfahren für die standardisierte und weitgehend automatisierte Anreicherung, Isolierung und Identifizierung von zirkulierenden Tumorzellen (*Circulating Tumor Cells, CTCs*) aus Vollblutproben. Das Prinzip der Technologie basiert ähnlich wie bei dem MACS-System auf der Verwendung von Ferrofluidreagenzien. Diese bestehen aus Partikeln mit einem magnetischen Kern, die von einer polymeren Schicht von Antikörpern mit Bindungsspezifität für das EpCAM-Antigen umgeben ist.

Um zu testen, ob man mit Hilfe der Reagenzien des *Cell Search Systems* EpCAM-positive Exosomen isolieren kann, wurde der folgende Reaktionsansatz in ein 15 mL Röhrchen pipettiert, leicht gemischt und für 15 min bei RT inkubiert.

### Reaktionsansatz

Plasma	1 mL
Dilution Puffer	1,142 mL
Capture Enhancement Reagenz	29 µL
α-EpCAM	29 µL

Anschließend wurde das Gemisch auf zwei 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt und für weitere 15 min in einem Magnetfeld inkubiert. Die magnetischen Beads sammelten sich an der dem Magneten zugewandten Seite, sodass der Überstand vorsichtig abpipettiert werden konnte. Die so gewonnenen Beads jeder Probe in 50 µL Exosomen Lysepuffer resuspendiert.

### 3.7.4 Nachweis der Exosomen

Der Nachweis der Exosomen bzw. EpCAM-positiven Exosomen erfolgte mittels Immundetektion. Es wurden 16-18 µL der Lysate, die durch die verschiedenen Methoden extrahierte Exosomen enthielten, mit 6µL Ladepuffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht und auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Für die Detektion der (EpCAM-positiven und –negativen) Exosomen wurde der Antikörper, der spezifisch für den exosomalen Marker CD63 ist, verwendet. Für die EpCAM-spezifischen Exosomen wurden drei verschiedene Antikörper verwendet, zwei die den amino-terminalen, extrazellulären Bereich des Proteins detektieren und einer für den intrazellulären Carboxy-Terminus.

### 3.8 Statistik

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit der SPSS Software, Version 18.0.

Nichtparametrische Vergleiche mit zwei unabhängigen Variablen wurden mit dem Mann-Whitney U Test berechnet. Assoziationen zwischen zwei abhängigen Variablen wurden mit dem Wilcoxon Test berechnet. Diese Tests wurden deshalb angewandt, da die gesamte RNA-Menge, sowie die mittels Real-Time PCR berechneten relativen mikroRNA-Konzentrationen in der Studie keine Normalverteilung zeigten. Die diagnostische Teststärke wurde mittels ROC (Receiver Operating Characteristic)-Kurven analysiert, indem die echt-positiven aus allen positiven (Richtig-Positiv-Rate) gegen die falsch-positiven aus allen negativen Fällen (Falsch-Positiv-Rate) mit unterschiedlichen Schwellenwerten aufgetragen wurden. Die Richtig-Positiv-Rate ist besser bekannt als Sensitivität und die Falsch-Positiv-Rate hingegen als 1-Spezifität. Die Sensitivität ist im Diagramm als Ordinate und die 1-Spezifität als Abszisse dargestellt. Bei den ROC-Kurven wurde zusätzlich der AUC (Area under Curve)-Wert berechnet. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant anerkannt. Alle p-Werte sind zweiseitig berechnet. Da es sich in den Studien um eine explorative Datenanalyse handelt, wurde keine Berichtigung für multiple Prüfungen durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

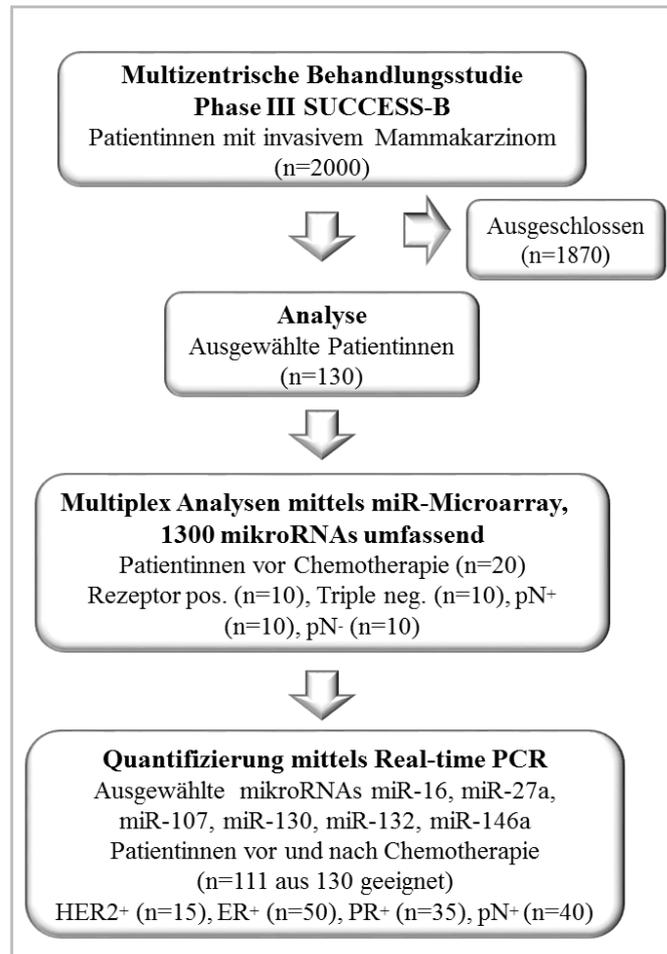
### 4.1 Expressionsprofil zirkulierender mikroRNAs im Blut von Mammakarzinom-Patientinnen

#### 4.1.1 Patientinnen

In dem ersten Teil dieser Arbeit ging es darum, die klinische Relevanz von mikroRNAs als blutbasierte Biomarker in Bezug auf die molekularen und pathologischen Eigenschaften des Mammakarzinoms sowie dem Therapieverlauf zu untersuchen.

Für die Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden 130 Patientinnen mit epithelialen, invasivem Mamakarzinom aus der SUCCESS-B-Studie ausgewählt. Dieses Kollektiv stellt eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Risikofaktoren dar, wie z.B. den Hormon-Rezeptor-Status, das Tumorstadium, den Differenzierungsgrad des Tumors und das Metastasierungsstadium der Lymphknoten. Für die Multiplex-Analysen wurden Plasmaproben von 20 Mammakarzinom-Patientinnen vor chemotherapeutischer Behandlung aus dem zusammengesetzten Kollektiv der 130 Patientinnen gewählt. Dabei wiesen jeweils 10 Patientinnen einen positiven bzw. Triple-negativen Rezeptorstatus auf. In jeder der zwei Gruppen hatten je 5 Patientinnen einen positiven bzw. negativen Befund für Lymphknotenmetastasen. Zusätzlich wurden 10 Plasmaproben von gesunden Frauen für diese Multiplex-Analysen verwendet. Aus diesen Multiplex-Analysen wurden vier mikroRNAs (miR-16, miR-27a, miR-107 und miR-130a) ausgewählt, die signifikant in den Patientinnen dereguliert waren. Neben diesen vier mikroRNAs wurden im Vorfeld zusätzlich die miR-132 und miR-146a, auf Grund ihrer vielfältigen Aufgaben in der Karzinogenese und der

beschriebenen Regulation des Tumorsuppressorgens BRCA1 durch miR-146a [137], ausgewählt. Die sechs mikroRNAs wurden anschließend durch Real-Time PCR in den postoperativen Plasmaproben der 130 Patientinnen quantifiziert. In Abbildung 4.1 ist schematisch der Ablauf der Selektion und der Analysen für die mikroRNAs dargestellt.



**Abbildung 4.1: Diagramm des ausgewählten Patientinnen Kollektivs der SUCCESS-B-Studie und der durchgeführten Analysen.**

Aus der multizentrischen SUCCESS-B-Studie wurden 130 Patientinnen ausgewählt. Für die Selektion der mikroRNAs mittels Microarray Analysen wurden 20 Plasmaproben vor Beginn der Chemotherapie verwendet. Sechs mikroRNAs wurden für die weitere Validierung mittels qPCR ausgesucht und in postoperativen Plasmaproben von 111 Patientinnen jeweils vor und nach Chemotherapie quantifiziert.

Die Quantifizierung mittels Real-Time PCR konnte mit postoperativen Plasmaproben von 111 der 130 Patientinnen durchgeführt werden. Analysiert wurde jeweils eine Probe vor und eine Probe nach Beginn der Chemotherapie. Dabei wiesen 50 Patientinnen einen positiven ER-Status, 35 einen positiven PR-Status und 15 einen positiven HER2-Status auf und 40 Patientinnen wurden positiv auf einen Lymphknotenmetastasen getestet (Abb. 4.1). Als Kontrollgruppe wurden zusätzlich 46 Plasmaproben von gesunden Frauen analysiert.

### 4.1.2 Selektion der zirkulierenden mikroRNAs basierend auf den Ergebnissen der Microarray Analysen

Für eine gezielte Auswahl an mikroRNAs für die weitere Validierung mittels Real-Time PCR wurden Multiplex Analysen mittels mikroRNA Microarrays durchgeführt. Diese Analysen und die statistische Auswertung wurde von der Firma *Comprehensive Biomarker Center* aus Heidelberg durchgeführt. Durch die Verwendung dieser Biochips ist es möglich, die Expression vieler verschiedener mikroRNAs in Blutproben zu messen. Die Biochips enthalten 1300 humane und virale mikroRNAs. Wie im obigen Abschnitt beschrieben, wurden 20 Plasmaproben von Mammakarzinom Patientinnen (Rezeptor positiv (n=10), Triple-negativ (n=10), pN<sup>+</sup> (n=10), pN<sup>-</sup> (n=10)) vor Beginn der Chemotherapie und 10 Proben von gesunden Frauen verwendet.

Das Expressionsniveau jeder einzelnen mikroRNA wurde anhand des normalisierten Median-Wertes dargestellt. Um zu analysieren, welche mikroRNAs zwischen den gesunden Frauen und den Mammakarzinom-Patientinnen differentiell reguliert waren bzw. um die Signifikanz der Vergleiche zu bestimmen, wurde die Testung multipler

Hypothesen durchgeführt. Angewendet wurde der T-test und der für kleinere Testgruppen spezifische Limma-Test.

Grundlegend ist festzustellen, dass eine Nullhypothese bei multiplen Tests trotz ihrer Richtigkeit vermehrt zurückgewiesen wird, d.h. es treten falsch-positiv (*false-positive*) getestete Werte auf. Aus diesem Grund muss bei der Signifikanzprüfung multipler Tests das Signifikanzniveau strenger und somit niedriger sein als bei der einzelnen Testung. Die „*False Discovery Rate*“ (*FDR*) findet Anwendung bei multiplen Testproblemen. Sie ist ein statistisches Verfahren, das erstmals 1995 von Yoav Benjamini und Yosi Hochberg beschrieben wurde [138]. Das Verfahren ermöglicht eine stufenweise Korrektur des Signifikanzniveaus entsprechend der möglichen Einzelvergleiche.

In Tabelle 4.1 sind die so korrigierten p-Werte, die mit dem T-Test bzw. Limma-Test berechnet wurden, für die 30 am stärksten differentiell exprimierten mikroRNAs aufgelistet. Zusätzlich sind die normalisierten Median-Werte der Gesunden und der Mammakarzinom-Patientinnen angezeigt. Der Vergleich dieser Werte der beiden Kohorten gibt an, ob die mikroRNAs hoch- oder herunterreguliert sind. Aus dieser Tabelle wurden die signifikant deregulierten mikroRNAs miR-16, miR-27a, miR-107 und miR-130a, (in Tabelle 4.1 fett markiert), für die weitere Validierung mittels Real-Time PCR ausgewählt.

**Tabelle 4.1: Differentiell am stärksten regulierte mikroRNAs zwischen gesunden Frauen und Mammakarzinom-Patientinnen.**

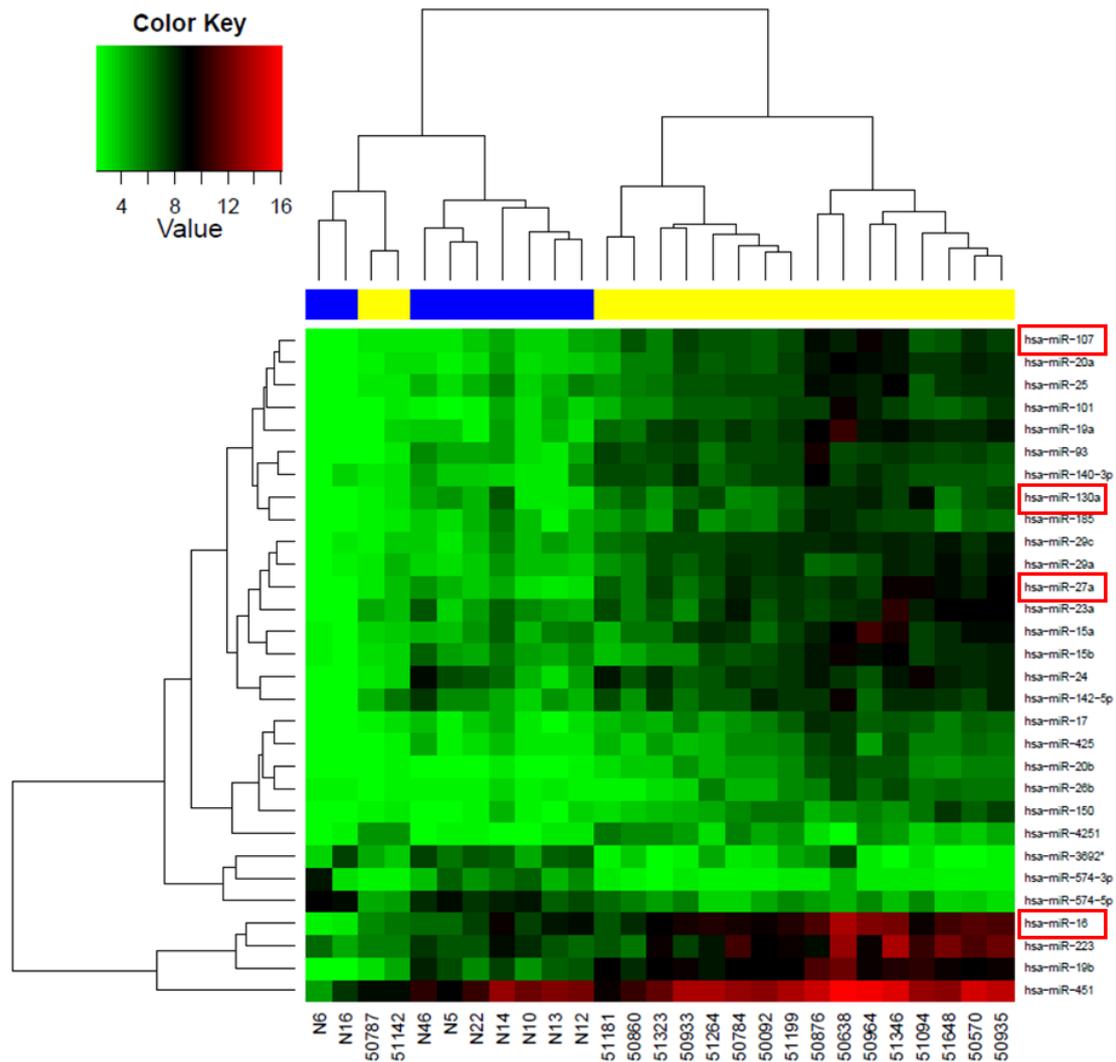
mikroRNA	Median		Korrigierter p-Wert	
	Gesund	MammaCA	T-Test	Limma-Test
hsa-miR-19a	8.4	197.0	0.0170	0.0001
<b>hsa-miR-27a</b>	<b>8.6</b>	<b>168.7</b>	<b>0.0026</b>	<b>0.0001</b>
hsa-miR-20a	9.3	149.7	0.0022	0.0001
hsa-miR-101	6.2	93.1	0.0151	0.0001
hsa-miR-29c	14.2	198.7	0.0003	0.0001
hsa-miR-574-5p	309.2	25.0	0.0064	0.0001
hsa-miR-3692*	92.9	7.9	0.0121	0.0001
<b>hsa-miR-107</b>	<b>10.2</b>	<b>111.6</b>	<b>0.0061</b>	<b>0.0001</b>
hsa-miR-140-3p	11.5	120.9	0.0026	0.0001
<b>hsa-miR-130a</b>	<b>8.6</b>	<b>90.1</b>	<b>0.0079</b>	<b>0.0017</b>
hsa-miR-29a	12.4	124.3	0.0014	0.0001
hsa-miR-15a	18.2	177.0	0.0400	0.0035
hsa-miR-26b	5.7	42.5	0.0081	0.0021
hsa-miR-17	6.9	51.1	0.0066	0.0004
hsa-miR-142-5p	20.7	149.4	0.0136	0.0004
hsa-miR-25	18.0	127.8	0.0026	0.0006
hsa-miR-223	109.5	773.5	0.0478	0.0114
hsa-miR-24	29.9	201.6	0.0432	0.0118
<b>hsa-miR-16</b>	<b>154.9</b>	<b>1038.9</b>	<b>0.0470</b>	<b>0.0030</b>
hsa-miR-20b	5.3	34.5	0.0050	0.0001
hsa-miR-23a	26.3	169.2	0.0191	0.0010
hsa-miR-93	21.8	140.3	0.0136	0.0003
hsa-miR-19b	94.7	606.2	0.0129	0.0021
hsa-miR-451	1636.5	10409.9	0.0232	0.0251
hsa-miR-574-3p	37.8	6.3	0.1391	0.0001
hsa-miR-150	5.4	32.0	0.0149	0.0006
hsa-miR-15b	25.2	144.4	0.0149	0.0138
hsa-miR-185	12.2	67.7	0.0066	0.0013
hsa-miR-425	6.9	37.7	0.0088	0.0014
hsa-miR-4251	5.6	29.6	0.0006	0.0001

Anmerkung: Die mikroRNAs, die für die weiteren Analysen ausgewählt wurden, sind fett markiert. (Statistische Auswertung durchgeführt von der Firma *Comprehensive Biomarker Center* aus Heidelberg)

Als weitere Auswertung der Expressionsdaten des Microarrays wurden hierarchische Clusteranalysen durchgeführt. Allgemein ermöglicht die Clusteranalyse, die relevanten,

differentiell exprimierten mikroRNAs aus der Gesamtheit der Expressionsdaten herauszufiltern. Dabei werden die mikroRNAs auf Grund ihrer Ähnlichkeit in eine Gruppe (*cluster*) und weiterführend in größeren Gruppen zusammengefasst. Die entstehende Baumstruktur wird in einem Dendogramm dargestellt, welches Aufschluss über die Ähnlichkeit der untersuchten Datenpunkte gibt.

Die Ergebnisse der Clusteranalyse sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Für diese Analysen wurden die 30 mikroRNAs (Tabelle 4.1) mit der höchsten Gesamtvariabilität verwendet. Für diese Darstellung wurde eine sogenannte „*Heatmap*“ generiert, eine farbliche Repräsentation der Proben und mikroRNAs, die nach ihrer Ähnlichkeit angeordnet sind. Im oberen Abschnitt der Abbildung ist das Dendogramm der Proben zu sehen. Die Farbe des horizontalen Balkens am oberen Rand zeigt die Zugehörigkeit einer bestimmten Plasmaprobe zu einer Gruppe an. (gelb: Mamakarzinom-Patientinnen, blau: gesunde Frauen). Die mikroRNAs sind rechts aufgelistet und die für die Quantifizierung mittels Real-Time PCR ausgewählten mikroRNAs sind rot umrandet. Das zugehörige Dendogramm ist auf der linken Seite dargestellt. Das Expressionsniveau der mikroRNAs in den verwendeten Blutproben ist durch die rot-grüne Farbkodierung visualisiert. Grün zeigt dabei eine schwache bzw. herunterregulierte Expression an. Der Übergang zu Rot steht für eine hochregulierte Expression.



**Abbildung 4.2:** „Heatmap“ und Dendrogramme für den Vergleich der Mammakarzinom-Patientinnen mit den gesunden Frauen.

Die Dendrogramme sind die baumähnlichen Strukturen am oberen und linken Rand und beurteilen die Ähnlichkeit zwischen mikroRNAs und zwischen Patientenproben. Die Reihen repräsentieren die rechts aufgelisteten mikroRNAs und die einzelnen Plasmaproben sind pro Spalte angezeigt. Die hoch- (rot) und herunter-regulierten (grün) Expressionsniveaus der mikroRNAs werden nach der an der Oberseite abgebildeten Farbskala dargestellt. Die Farbe des horizontalen Balkens am oberen Rand zeigt die Zugehörigkeit einer bestimmten Plasmaprobe zu einer Gruppe an (gelb: Mamakarzinom-Patientinnen, blau: gesunde Frauen). Rot umrandet sind die für die Validierung ausgewählten mikroRNAs. (Erstellt von der Firma *Comprehensive Biomarker Center* aus Heidelberg)

Als endogene Referenz-mikroRNA für die Normalisierung dieser sechs zu messenden mikroRNAs mittels Real-Time PCR wurde miR-1207, basierend auf den Microarray-Daten, ermittelt. Diese mikroRNA zeigte eine gleichmäßige, stabile Expression innerhalb der Kontrollgruppe und der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen. In Tabelle 4.2 sind die mikroRNAs zusammengefasst, die in den gemessenen Proben der 20 Patientinnen und der 10 gesunden Frauen eine gleichmäßige Expression zeigten. Angegeben ist der Median, als Maß des Expressionsniveaus, und dessen Standardabweichung (SD, *standard deviation*). Anhand des Variabilitätskoeffizienten (SD/Median) kann man die Streuung der Messwerte verschiedener Proben mit sehr unterschiedlichen Mittelwerten vergleichen. Der Quotient sollte dabei ein Drittel (0,333) nicht überschreiten, da ansonsten die Expression nicht mehr als stabil angesehen werden kann. Einige der mikroRNAs (z.B. hsa-miR-616, hsa-miR-658 und hsa-miR-16-2\*) zeigten einen niedrigeren Wert für den Variabilitätskoeffizienten, allerdings eigneten sich diese mikroRNAs auf Grund der niedrigen Werte des Medians nicht als Referenz-mikroRNA für die Quantifizierung der mikroRNAs mittels qPCR.

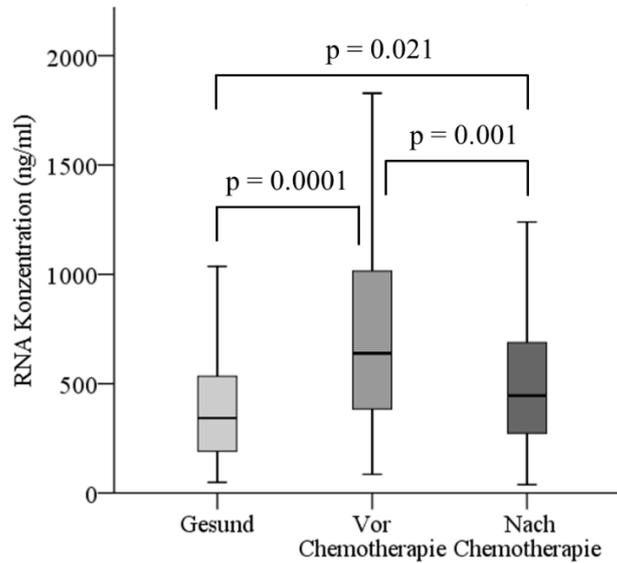
**Tabelle 4.2: Microarray Daten der stabil exprimierte mikroRNAs.**

<b>mikroRNA</b>	<b>Median</b>	<b>SD</b>	<b>SD/Median</b>
hsa-miR-616	4.64	0.16	0.03
hsa-miR-658	5.00	0.18	0.04
hsa-miR-16-2*	5.39	0.42	0.08
hsa-miR-551b*	5.16	0.84	0.16
hsa-miR-302c*	5.49	1.03	0.19
hsa-miR-3915	6.42	1.27	0.2
hsa-miR-4292	4.98	1.02	0.2
hsa-miR-3176	5.81	1.19	0.21
hsa-miR-1321	6.32	1.38	0.22
hsa-miR-30c-1*	6.08	1.34	0.22
hsa-miR-3189	5.88	1.37	0.23
hsa-miR-518c*	6.54	1.52	0.23
hsa-miR-18b	5.15	1.26	0.24
hsv1-miR-H3*	5.51	1.37	0.25
<b>hsa-miR-1207-5p</b>	<b>15624</b>	<b>4034</b>	<b>0.26</b>
hsa-miR-518e*	5.72	1.48	0.26
hsa-miR-486-3p	5.64	1.5	0.27
hsa-miR-4281	52899	15836	0.3
hsa-miR-1268	1798	495	0.28
hsa-miR-610	6.51	1.74	0.27
hsa-miR-1225-5p	24743	6931	0.28
hsa-miR-3185	8.09	2.25	0.28
hsa-miR-1285	7.45	2.18	0.29
hsa-miR-1202	25129	7626	0.3
hsa-miR-183*	5.47	1.63	0.3
hsa-miR-566	6.82	2.1	0.31
hsa-miR-518b	7.38	2.25	0.3
hsa-miR-516a-3p	5.45	1.73	0.32
hsa-miR-409-3p	8.17	2.59	0.32
hsa-miR-665	11.96	3.85	0.32
hsa-miR-4271	278.18	91.24	0.33
hsa-miR-1307	6.00	1.94	0.32
hsa-miR-17*	5.44	1.78	0.33
hsa-miR-718	477.49	155.76	0.33

(Statistische Auswertung durchgeführt von der Firma *Comprehensive Biomarker Center* aus Heidelberg)

#### 4.1.3 Quantifizierung der zirkulierenden RNA

Bevor die relativen Expressionslevel der ausgewählten mikroRNAs in den Plasmaproben der 111 Patientinnen vor und nach Chemotherapie und der 46 gesunden Frauen quantifiziert wurde, wurde zuerst die Qualität und die Quantität der extrahierten RNA spektrophotometrisch gemessen. Für die Berechnung signifikanter Unterschiede in den gemessenen RNA-Konzentrationen zwischen den Gruppen der Mammakarzinom-Patientinnen und der gesunden Frauen wurde der Mann-Whitney U Test angewendet. Die Unterschiede der Konzentrationen in den Proben der Mamakarzinom-Patientinnen vor und nach Chemotherapie wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. Die Ergebnisse sind anhand eines Boxplot-Diagramms in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Menge der Plasma-RNA war in den Proben der Patientinnen vor Chemotherapie deutlich höher als in den Proben der gesunden Frauen ( $p=0.0001$ ). Interessanterweise nahm die signifikant erhöhte RNA-Konzentration vor Chemotherapie in den Proben nach Chemotherapie ab ( $p=0.001$ ). Allerdings war sie dennoch höher als in den Proben der gesunden Frauen ( $p=0.021$ ).



**Abbildung 4.3: Quantifizierung der zirkulierenden RNA im Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Frauen.**

Der dargestellte Boxplot vergleicht die RNA-Konzentration im Plasma von gesunden Frauen (n=46) mit den Konzentrationen der Patientinnen vor und nach Chemotherapie (n=111). Die angegebenen, signifikanten p-Werte wurden mittels Mann-Whitney U bzw. Wilcoxon-Test bestimmt.

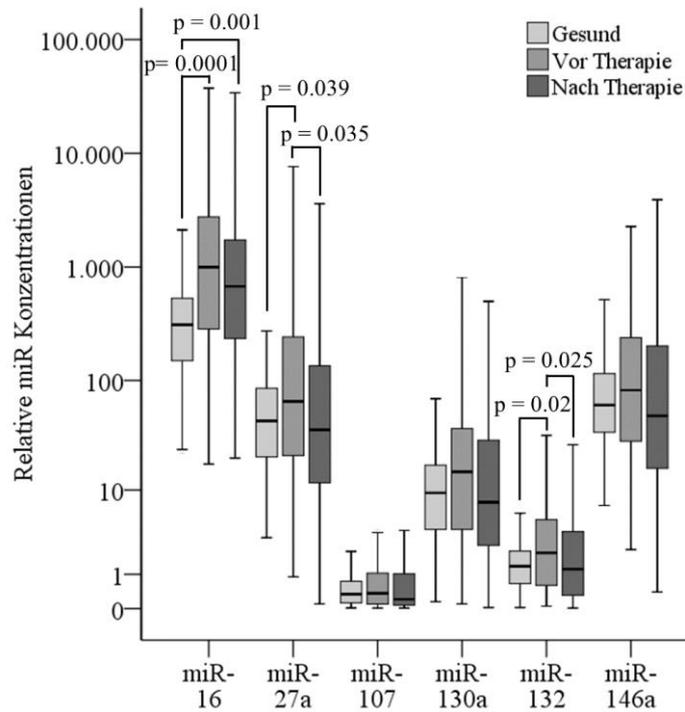
#### 4.1.4 MikroRNA-1207 als endogene Kontrolle für die Normalisierung der mikroRNA-Daten

Die Normalisierung der gemessenen mikroRNA-Daten, mit einer endogenen ReferenzmikroRNA, ist unerlässlich, um die Variabilität, die durch die einzelnen Teilschritte der Analyse bedingt ist, zu kompensieren. Eine angemessene Normalisierung minimiert somit den Effekt technischer Variationen und ist eine Voraussetzung, um aussagekräftige biologische Unterschiede zu erhalten. Obwohl die Forschung im Bereich der Quantifizierung zirkulierender mikroRNAs schon weit vorangeschritten ist, existiert keine einheitliche, endogene Kontrolle bezüglich der mikroRNA-Normalisierung.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine endogene Referenz-mikroRNA für die Normalisierung auf Grund der Ergebnisse des Microarrays (Abschnitt 4.1.1) ausgewählt. Die miR-1207 zeigte eine gut zu messende Transkriptionsmenge und einen geringen Variabilitätskoeffizienten von 0.262 (Tabelle 4.2). Die Quantifizierung der miR-1207 im Gesamt-Kollektiv bestätigte diese Ergebnisse. In den Plasmaproben der Mammakarzinom-Patientinnen wurde ein Mittelwert von 29.67 (SD=1.75) vor Chemotherapie und 29.42 (SD=1.79) nach Chemotherapie berechnet. Der Mittelwert für die Kontrollgruppe lag bei 30.51 (SD=1.46).

### 4.1.5 Quantifizierung der zirkulierenden mikroRNAs miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a mittels Real-Time PCR

Die Quantifizierung der zellfreien, zirkulierenden mikroRNAs miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a wurde unter Verwendung der TaqMan Real-Time PCR durchgeführt. Wie in Abbildung 4.4 anhand der dargestellten Boxplots zu sehen ist, waren die postoperativen Transkriptmengen der miR-16 ( $p=0.0001$ ), miR-27a ( $p=0.039$ ) und miR-132 ( $p=0.020$ ) in den Proben der Patientinnen vor Chemotherapie im Vergleich zu den Proben der gesunden Frauen signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten die Konzentrationen der miR-107, miR-130a und miR-146a keinen signifikanten Unterschied in den jeweiligen Gruppen. Eine signifikante Verringerung der Transkriptmenge der Patientinnen nach Chemotherapie konnte für miR-27a ( $p=0.035$ ) und miR-132 ( $p=0.025$ ) beobachtet werden, damit verringerte sich die Transkriptmenge auf ein ähnliches Niveau wie bei den gesunden Frauen. Das Niveau der miR-16 blieb, im Vergleich zu dem Niveau der gesunden Frauen, auch nach Chemotherapie deutlich erhöht ( $p=0.001$ ).

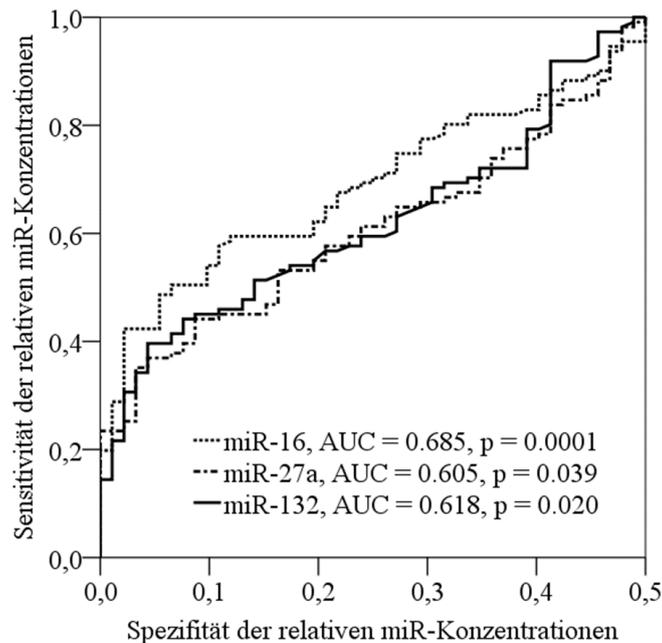


**Abbildung 4.4: Quantifizierung der relativen mikroRNA-Konzentrationen im Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Frauen.**

Die dargestellten Boxplots vergleichen die durch Real-Time PCR ermittelten relativen Plasmakonzentrationen der miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a von gesunden Frauen (n=46) mit denen von Patientinnen vor und nach Chemotherapie (n=111). Die angegebenen, signifikanten p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U- und Wilcoxon-Test bestimmt.

Für die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der mikroRNA-Konzentrationen wurden ROC (Receiver Operating Characteristic)-Analysen durchgeführt, die in Abbildung 4.5 dargestellt sind. Berechnet wurden die Werte mit den mikroRNA-Daten der gesunden Frauen und der Mammakarzinom-Patientinnen vor Chemotherapie. Im Diagramm ist die Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) als Ordinate und die Falsch-Positiv-Rate als Abszisse aufgetragen. Anhand der ROC-Kurve berechnet man die Fläche unterhalb der Kurve AUC (Area under curve). Der Wert der AUC kann zwischen 0 und

1 liegen, wobei eine mikroRNA desto sensitiver und spezifischer ist, je höher der AUC-Wert ist. Für die miR-16, miR-27a und miR-132 ergaben sich AUC-Werte von 0.685 ( $p=0.0001$ ), 0.605 ( $p=0.039$ ) und 0.618 ( $p=0.020$ ).



**Abbildung 4.5: Berechnung der Sensitivität und Spezifität der miR-16, miR-27a und miR-132.**

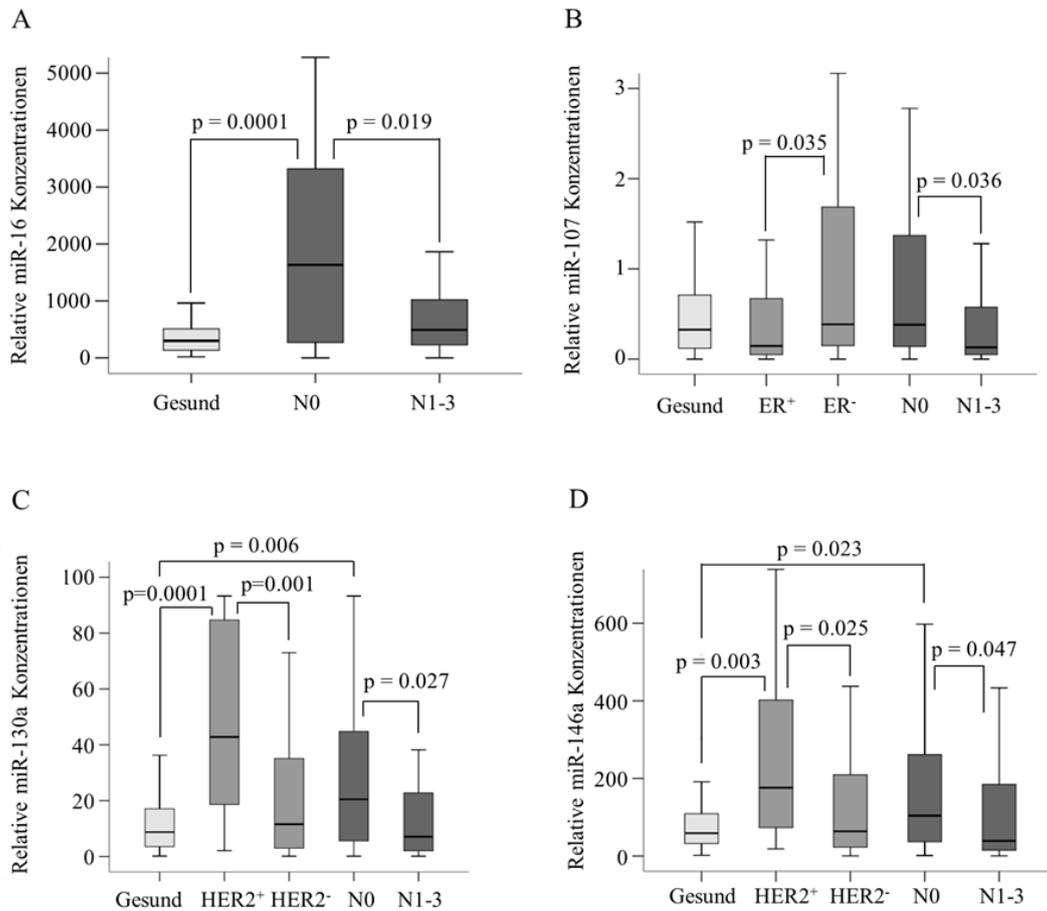
Die ROC (Receiver Operating Characteristic)-Kurve zeigt die Sensitivität und Spezifität der miR-16, miR-27a und miR-132, um zwischen gesunden Frauen und Mammakarzinom-Patientinnen vor Chemotherapie zu unterscheiden. Je höher der AUC (Area under the Curve)-Wert, desto sensitiver und spezifischer ist die mikroRNA.

Diese Werte zeigen, dass man anhand der miR-16, miR-27a und miR-132 Plasmaproben von Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Frauen signifikant unterscheiden kann.

#### 4.1.6 Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen der miR-16, miR-107, miR-130a und miR-146a und dem Lymphknoten- bzw. Rezeptorstatus

Weiterführend wurde die Signifikanz der gemessenen Expressionslevels der einzelnen mikroRNAs in umfangreichen Korrelationsanalysen mit den klinischen und pathologischen Merkmalen der Patientinnen bestimmt. Hierfür wurden die relativen Konzentrationen der zirkulierenden miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a in den postoperativen Plasmaproben der 111 Brustkrebspatientinnen vor Chemotherapie mit den klinischen und pathologischen Risikofaktoren korreliert. Da die Daten keine Normalverteilung zeigten, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U Test angewendet.

In Abbildung 4.5 sind die signifikanten Ergebnisse der Korrelationsanalysen dargestellt. Die Plasma-Konzentrationen der miR-16 (Abb. 4A,  $p=0.019$ ), miR-107 (Abb. 4B,  $p=0.036$ ), miR-130a (Abb. 4C,  $p=0.027$ ), und miR-146a (Abb. 4D,  $p=0.047$ ) zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen Patientinnen mit (N1-3) bzw. ohne (N0) Lymphknotenmetastasen. Interessanterweise waren die detektierten Transkriptmengen der mikroRNAs in Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen ähnlich zu denen in gesunden Frauen.



**Abbildung 4.6: Quantifizierung der relativen mikroRNA-Konzentrationen im Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen.**

Die Boxplots vergleichen die relativen Konzentrationen der miR-16 (A), miR-107(B), miR-130a (C) und miR-146a (D) im Plasma von gesunden Frauen (n=46) mit denen von Patientinnen mit negativem (N0, n=71) bzw. positivem (N1-3, n=40) Lymphknotenstadium. Zusätzlich sind die signifikant deregulierten Konzentrationen der miR-107 zwischen ER<sup>+</sup>- (n=50) und ER<sup>-</sup>-Status (n=61) und der miR-130a bzw. miR-146a zwischen HER2<sup>+</sup>- (n=15) und HER2<sup>-</sup>-Status (n=96) dargestellt. Die angegebenen, signifikanten p-Werte wurden mittels Mann-Whitney U Test bestimmt.

Im Gegensatz dazu zeigten miR-16 (Abb. 4A, p=0.0001), miR-130a (Abb. 4C, p=0.006) und miR-146a (Abb. 4D, p=0.023) ein signifikant höheres Expressionsniveau in den Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu den gesunden Frauen.

Zusätzlich wurde eine signifikante Differenz in den Plasmalevels der miR-107 zwischen Patientinnen mit einem positiven und negativen ER-Status (Abb. 4B,  $p=0.035$ ) detektiert. Signifikant erhöhte Transkriptlevel der miR-130a (Abb. 4C,  $p=0.001$ ) und miR-146a (Abb. 4D,  $p=0.025$ ) waren mit einem positivem HER2-Tumorstatus assoziiert.

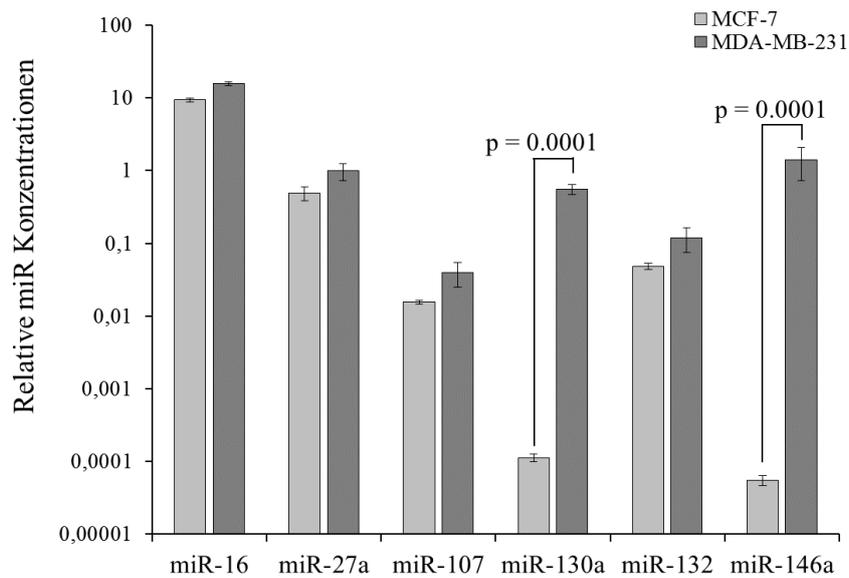
Die gesamten Ergebnisse der Korrelationsanalysen aller mikroRNAs mit den klinisch pathologischen Parametern sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Angegeben sind die Parameter der Mammakarzinom-Patientinnen, der Median, der Mittelwert und der 95% Konfidenzintervall, sowie alle ermittelten p-Werte.

## 4.2 Funktionelle Analysen der mikroRNAs

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden funktionelle Analysen durchgeführt, um molekularbiologisch zu untersuchen inwieweit die in dem SUCCESS-B-Kollektiv quantifizierten mikroRNAs einen Einfluss auf zelluläre Prozesse haben. Hierfür wurde zum einen die nicht-invasive, ER-positive Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 und zum anderen die invasive, ER-negative MDA-MB-231 Zelllinie verwendet [139]. MCF-7 Zellen zeichnen sich durch einen epithelialen und MDA-MB-231 Zellen durch einen mesenchymalen Phänotyp aus. Auf Grund ihres Expressionsmusters wurden die MCF-7 Zellen (ER+, PR+, HER2-) als luminal und die MDA-MB-231 Zellen als triple-negativ (ER-, PR-, HER2-) charakterisiert [140].

### 4.2.1 Expressionslevel der miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen

Als erstes wurde die Transkriptionsmenge der in den Plasmaproben analysierten mikroRNAs in den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 mittels Real-Time PCR gemessen. Die relativen Konzentrationen der mikroRNAs sind anhand des Balkendiagramms in Abbildung 4.6 dargestellt. Die mikroRNAs miR-16, miR-27a, miR-107 und miR-132 zeigten ein ähnliches Transkriptionsniveau in den beiden Zelllinien. Im Gegensatz dazu zeigten die mikroRNAs miR-130a und miR-146a deutliche Unterschiede. In den MDA-MB-231 Zellen waren miR-130a ( $p=0.0001$ ) und miR-146a ( $p=0.0001$ ) signifikant höher exprimiert als in den MCF-7 Zellen. Die p-Werte wurden anhand des Tukey Tests berechnet.



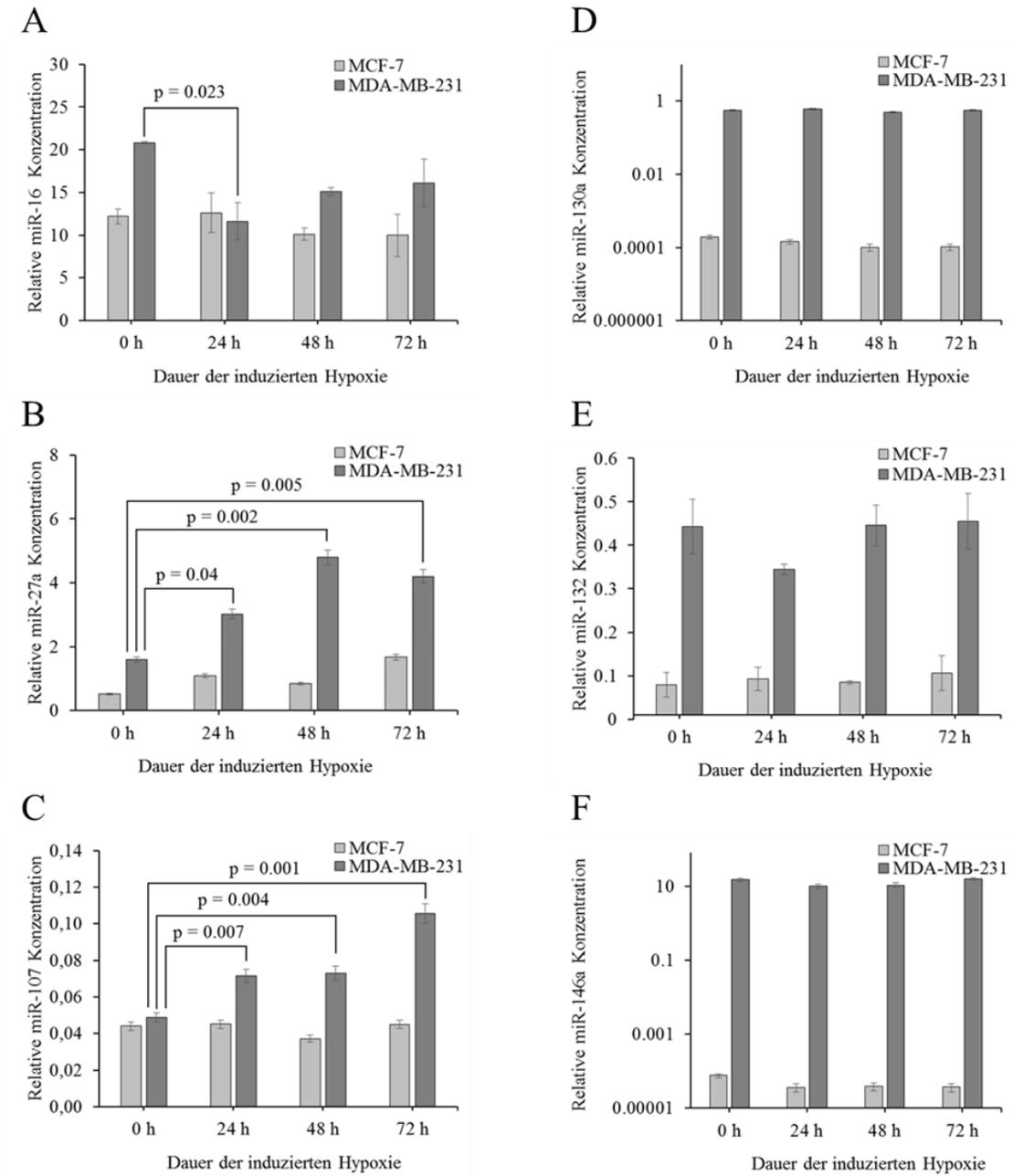
**Abbildung 4.7: Relative mikroRNA-Konzentrationen in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231.**

Quantifiziert wurden die mikroRNA-Konzentrationen mittels Real-Time PCR in drei unabhängigen Messungen. Die p-Werte wurden mit dem Tukey-Test berechnet. Signifikante Unterschiede in den mikroRNA-Konzentrationen zwischen den beiden Zelllinien sind eingetragen.

#### 4.2.2 Expressionslevel der mikroRNAs in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 unter hypoxischen Bedingungen

Der Sauerstoffmangel in Tumoren entsteht dadurch, dass die Blutgefäße den erhöhten Sauerstoffverbrauch durch eine plötzlich steigende Zellteilungsrate nicht mehr decken können. Analysiert wurde inwieweit sich die Expression der mikroRNAs in Tumorzellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, änderte. Gemessen wurden die Konzentrationen mittels Real-Time PCR. In Abbildung 4.7 (A-F) sind die relativen Konzentrationen der miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a in den MCF-7 und MDA-MB-231 Zelllinien nach 24, 48 und 72 Stunden unter hypoxischen Bedingungen dargestellt. In den MCF-7 Zellen konnte keine signifikante

Konzentrationsveränderung für keine der sechs mikroRNAs gemessen werden. Allerdings war ein Effekt in den MDA-MB-231 Zellen für die mikroRNAs miR-16, miR-27a und miR-107 zu beobachten. In der Zelllinie MDA-MB-231 war die Expression der miR-16 (A) nach 24 Stunden unter Hypoxie signifikant herunterreguliert ( $p=0.023$ ) und stieg im Verlauf von 48 und 72 Stunden wieder langsam an. Die miR-27a (B) wies in den MDA-MB-231 Zellen nach 24 Stunden ( $p=0.04$ ) eine gering und nach 48 Stunden ( $p=0.002$ ) eine deutlich, signifikante Erhöhung der Expression auf, die nach 72 Stunden Hypoxie wieder leicht sank. Allerdings blieb die Expression im Vergleich zu den Zellen, die bei normalen Sauerstoffgehalt kultiviert wurden, signifikant erhöht ( $p=0.005$ ). Die in den MDA-MB-231 Zellen gemessenen Expressionswerte der miR-107 (C) erhöhten sich nach 24 ( $p=0.007$ ), 48 ( $p=0.004$ ) und 72 ( $p=0.001$ ) Stunden und zeigten einen kontinuierlich, signifikanten Anstieg der Expression im Verlauf des Experiments. Für die Transkriptmengen der miR-130a (D), miR-132 (E) und miR-146a (F) konnten für alle Zeitpunkte keine signifikanten Veränderungen unter Hypoxie in den MDA-MB-231 gemessen werden. Im Gesamten hatte die Kultivierung der Zellen unter Sauerstoffmangel somit einen stärkeren Einfluss auf die Regulation der miR-16, miR-27a und miR-107 in den invasiveren MDA-MB-231 Zellen als auf die nicht-invasiven MCF-7 Zellen.



**Abbildung 4.8: Relative mikroRNA Konzentrationen unter hypoxischen Bedingungen in den MCF-7 und MDA-MB-231 Zelllinien.**

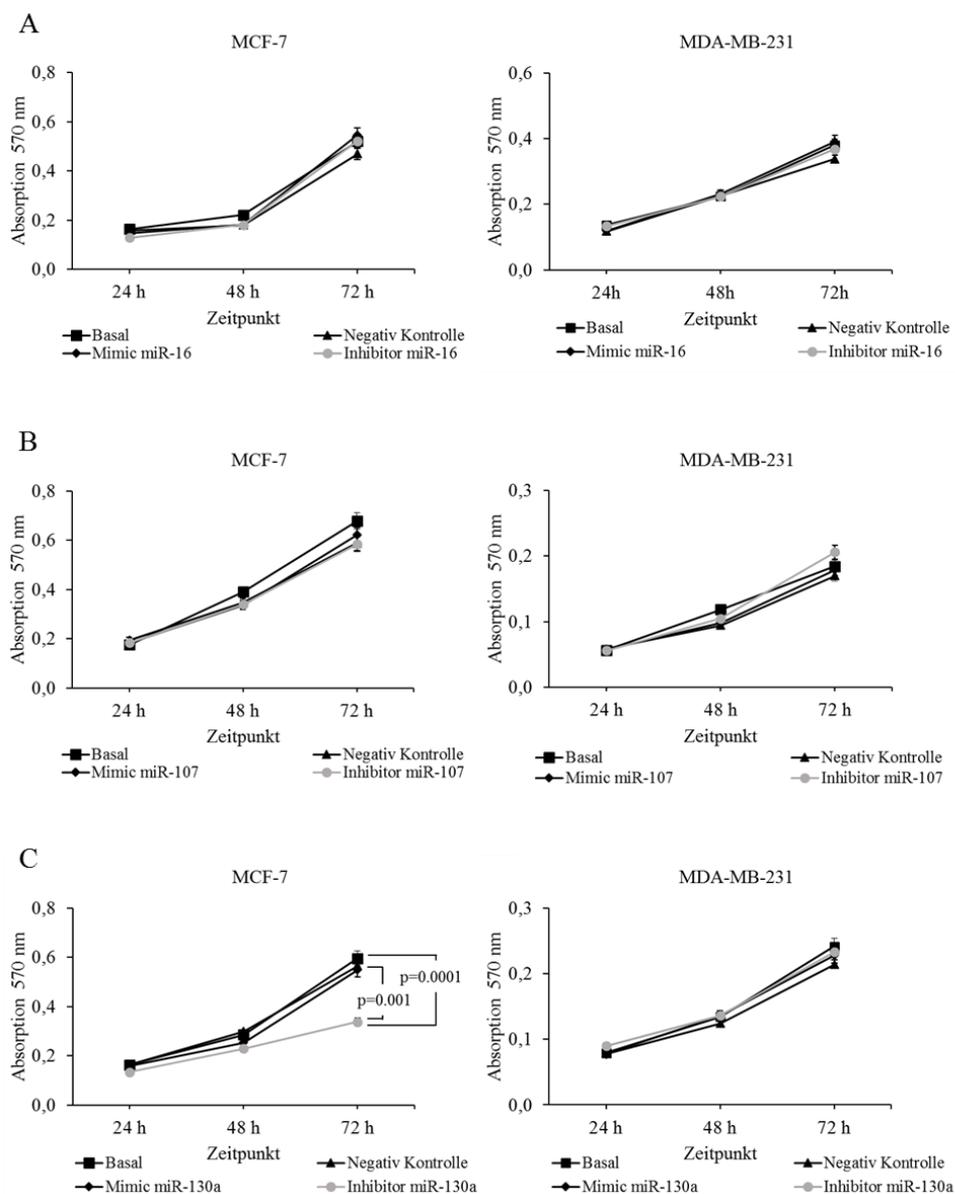
Gemessen wurden die Konzentrationen der miR-16 (A), miR-27a (B), miR-107 (C), miR-130a (D), miR-132 (E) und miR-146a (F) mittels Real-Time PCR nach 0, 24, 48 und 72 Stunden unter hypoxischen Bedingungen ( $\leq 1\%$  Sauerstoff) in den MCF-7 und MDA-MB-231 Zelllinien. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.3 Einfluss der mikroRNAs miR-16, miR-107 und miR-130a auf die Proliferation der MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen

Eine Eigenschaft von Tumoren ist unter anderem eine unkontrollierte Proliferation der Zellen. Um zu untersuchen, inwieweit mikroRNAs die Zellproliferation beeinflussen können, wurden MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen transient mit Mimics und Inhibitoren der miR-16, miR-107 und miR-130a transfiziert und die Proliferation nach 24, 48 und 72 Stunden mittels MTT (Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid)-Test gemessen. Die drei mikroRNAs wurden für diese Analysen ausgewählt, da sie eine deregulierte Expression zwischen Patientinnen mit und ohne Lymphknotenmetastasen zeigten (Abb. 4.5).

In Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse des MTT-Tests graphisch dargestellt. Als Kontrollen dienten die basalen und die mit der Negativ-Kontrolle transfizierten Zellen. Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um modifizierte und synthetisch hergestellte RNA-Oligonukleotide, ähnlich den Mimics und Inhibitoren, die allerdings keinerlei Homologie zu einem bekannten Säugetiergen aufweisen.

Beobachtet wurde, dass sowohl die nicht-invasive MCF-7 als auch die invasive MDA-MB-231 Zelllinie keine veränderte Proliferationsrate durch die Überexpression bzw. Inhibierung der miR-16 (A) oder der miR-107 (B) zeigte. Beide Zelllinien zeigten auch keinen signifikanten Unterschied der Proliferation durch die Transfektion mit der exogenen miR-130a Mimic (C). Im Gegensatz dazu konnte nur ein Effekt mit dem Inhibitor der miR-130a (C) auf die Proliferation der MCF-7 Zellen beobachtet werden.



**Abbildung 4.9: Messung der Proliferation der transfizierten und nicht-transfizierten MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen.**

Die Zellproliferation wurde mittels des kolorimetrischen MTT-Tests bestimmt. Gemessen wurde bei einer Absorption von 570 nm 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion der MCF-7 und MDA-MB-231 Zelllinien mit den Mimics und Inhibitoren der miR-16 (A), miR-107 (B) und miR-130a (C). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten gemessen wurden. Die p-Werte wurden mit dem Dunnett-Test berechnet.

Das Wachstum der Zellen, die mit diesem Inhibitor transfiziert wurden, verringerte sich signifikant, im Vergleich zu dem Wachstum der nicht-transfizierten, basalen ( $p=0.0001$ ) bzw. der Kontroll-Zellen ( $p=0.001$ ).

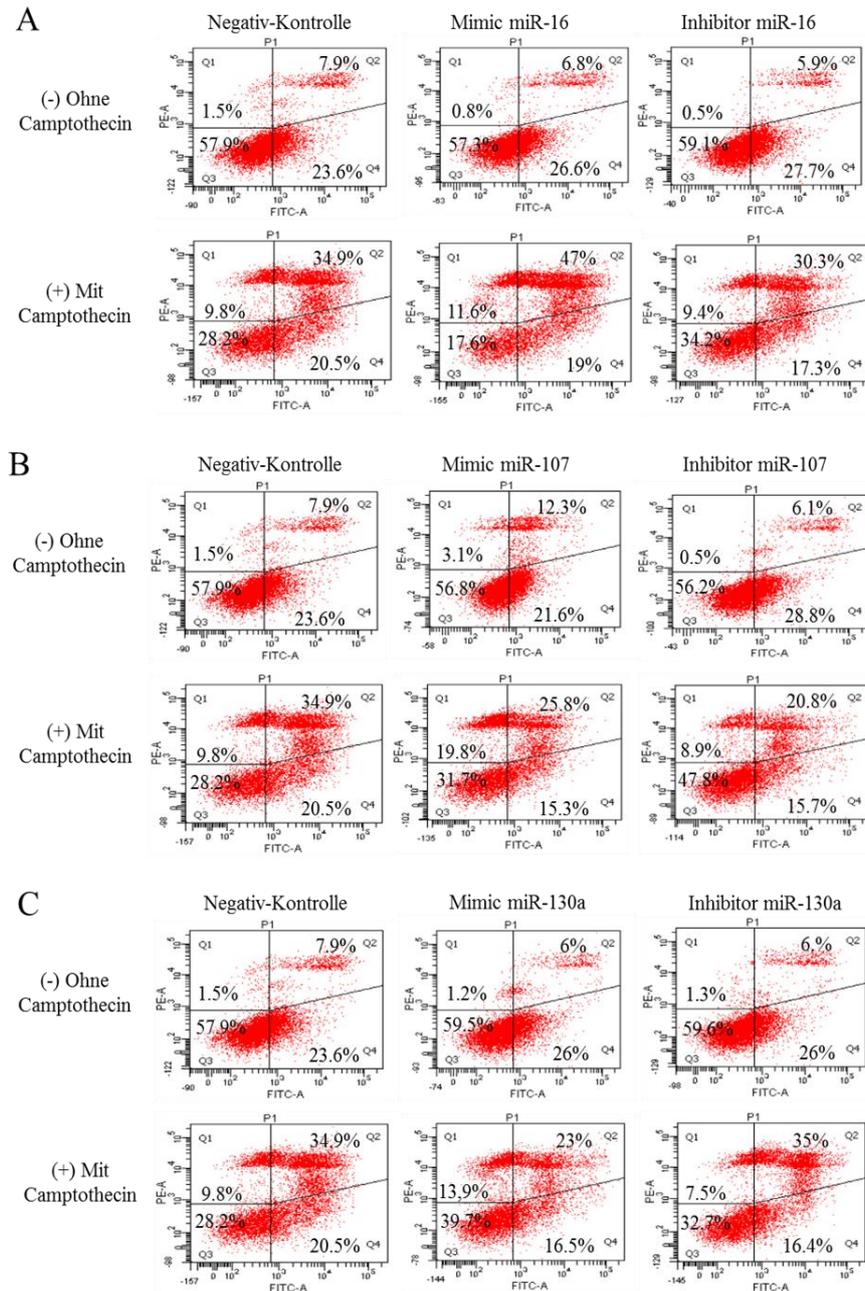
#### 4.2.4 Einfluss der mikroRNAs miR-16, miR-107 und miR-130a auf die induzierte Apoptose

Um der Frage weiter nachzugehen, inwieweit die mikroRNAs miR-16, miR-107 und miR-130a einen Einfluss auf das Zellwachstum haben, wurde neben der Proliferation zusätzlich auch ihr Einfluss auf die Apoptose untersucht. Hierfür wurde in MCF-7 Zellen, die mit den jeweiligen Mimics und Inhibitoren transfiziert wurden, die Apoptose mit Hilfe des Topoisomerase I Inhibitors Camptothecin induziert. Als Kontrollen dienten die mit der Negativ-Kontrolle transfizierten Zellen. Um zu sehen, inwieweit die Transfektion generell einen Effekt auf die Vitalität der Zellen hat, wurden ebenfalls transfizierte Zellen, in denen keine Apoptose induziert wurde, analysiert.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbungen der Zellen mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid durchgeführt. Annexin bindet an das externalisierte Membranmolekül Phosphatidylserin. Propidiumiodid durchdringt die perforierte Membran und interkaliert in die DNA. Diese Färbung dient der Diskriminierung zwischen lebenden und toten, sowie apoptotischen und nekrotischen Zellen, die mit Hilfe des Durchflusszytometers ermittelt werden können. Die repräsentativen Diagramme der durchflusszytometrischen Messungen in Abbildung 4.9 zeigen die Auftrennung der Zellen nach ihrer Vitalität in tote (Quadrant Q1), spät-apoptotische (Quadrant Q2), lebende (Quadrant Q3) und früh-apoptotische Zellen (Quadrant Q4).

Die Transfektion mit Mimics bzw. Inhibitoren der miR-16, miR-107 und miR-130a ohne eine anschließende Camptothecin-Behandlung ((-) Ohne Camptothecin) zeigte bei der zytometrischen Messung keinen Effekt auf die Zell-Vitalität. Ähnlich der Negativ-Kontrolle, bei der 57,9% lebende Zellen im Quadranten Q3 gemessen wurden, wurden für die einzelnen Transfektionsansätze 57,3%-59,6% lebende Zellen im Quadranten Q3 gemessen. Eine erfolgreiche Induktion der Apoptose, durch Camptothecin, wurde bei den mit der Negativ-Kontrolle transfizierten Zellen beobachtet. Es wurde eine Reduzierung von lebenden Zellen im Quadranten Q3 von 57,9% bei der unbehandelten Negativ-Kontrolle ((-) Ohne Camptothecin) auf 28,2% bei der mit Camptothecin ((+) Mit Camptothecin) behandelten Negativ-Kontrolle gemessen (Abb.4.9).

In Abbildung 4.9 A ist der Einfluss der miR-16 auf die Zell-Vitalität dargestellt. Bei den mit Camptothecin behandelte Zellen führte die Überexpression der miR-16 durch die Transfektion mit der Mimic zu einer geringen Anzahl an lebenden Zellen im Quadranten Q3 (17,6%) und einer hohen Anzahl von 47% an spät-apoptotischen Zellen im Quadranten Q2. Die Inhibierung der miR-16 führte verglichen mit der Negativ-Kontrolle von 28,2% zu einer höheren Zahl lebender Zellen auf 34,2% im Quadranten Q3. Der weitere Vergleich zwischen Negativ-Kontrolle und Inhibitor miR-16 zeigt eine Verringerung von 34,9% zu 30,3% von spät-apoptotischen Zellen im Quadranten Q2 und von 20,5% auf 17,3%, von früh-apoptotischen Zellen im Quadranten Q4.



**Abbildung 4.10: Durchflusszytometrische Messung der durch Camptothecin induzierten Apoptose bei transfizierten MCF-7 Zellen.**

MCF-7 Zellen wurden mit der Negativ-Kontrolle, den Mimics und Inhibitoren der miR-16 (A), miR-107 (B) und miR-130a (C) transfiziert. Die Zellfragmente im linken oberen Quadranten (Q1) sind nur für Propidiumiodid positiv. Spätapoptotische Zellen im Quadranten rechts oben (Q2) sind für Annexin und Propidiumiodid positiv. Lebende Zellen im linken unteren Quadranten (Q3) sind für Annexin und Propidiumiodid negativ. Frühapoptotische Zellen im rechten unteren Quadranten (Q4) sind Annexin-positiv. Die prozentuale Zellzahl ist angegeben.

Verglichen mit der Negativ-Kontrolle wiesen die mit der miR-107 Mimic transfizierten Zellen (Abb. 4.9 B) nur eine geringe Erhöhung lebender Zellen in Q3 von 28,2% auf 31,7% auf. Allerdings wurde eine Zunahme von 9,8% auf 19,8% toter Zellen bzw. Zellfragmente in Q1 gemessen. Die Zellen, die mit dem Inhibitor miR-107 transfiziert wurden zeigten deutlich mehr lebende Zellen (47,8% in Q3) als die Kontrolle.

Die Verteilung der Zellen, die mit der miR-130a Mimic bzw. Inhibitor transfiziert wurden, ist in Abbildung 4.9 C dargestellt. Durch die Inhibierung der miR-130a zeigten die Zellen verglichen mit den Zellen der Negativ-Kontrolle eine ähnliche Verteilung in allen vier Quadranten (Q1-Q4). Es wurde kein eindeutiger Unterschied gemessen. Allerdings führte eine Überexpression der miR-130a durch die Mimic zu einer höheren Anzahl von 39,7% lebender Zellen (Q3) und einer geringeren Anzahl von 23% spät-apoptotischen Zellen.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine Überexpression der miR-16 die Apoptose fördert und durch die Inhibierung der miR-16 die Apoptose verringert wird. Ebenfalls verringerte die Inhibierung der miR-107 deutlich die Apoptose, allerdings zeigte die Überexpression der miR-107 keinen signifikanten Effekt. Im Gegensatz zu der Apoptose-fördernden miR-16 inhibierte die Überexpression der miR-130a die Apoptose. Für die Inhibierung der miR-130a konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden.

#### 4.2.5 MiR-16, miR-107 und miR-130a verändern das Migrations- und Invasionsverhalten von MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen

Die Korrelationsanalysen in den Plasmaproben der Mammakarzinom-Patientinnen zeigten für die miR-16, miR-107 und miR-130a dass ein niedriges Expressionslevel mit einem positiven Lymphknoten-Status ( $p=0.019$ ,  $p=0.036$  bzw.  $p=0.027$ ) assoziiert ist

(Abb.4.5 B). Deshalb wurde untersucht, inwieweit die drei mikroRNAs einen Einfluss auf das Migrations- bzw. Invasionsverhalten von Mammakarzinom-Zellen haben. Es wurden Transwell Migrations- und Invasionsassays mit MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen, die jeweils mit miR-16, miR-107 und miR-130a Mimics oder Inhibitoren transfiziert wurden, durchgeführt. Hierbei wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die durch eine unbeschichtete, permeable Membran (Porengröße: 8µm) migrierten (Migration) bzw. die, die mit einer Extrazellulären Matrix beschichteten permeablen Membran durchdringen konnten (Invasion). In Abbildung 4.10 sind die prozentualen Zellzahlen und die signifikanten p-Werte dargestellt, die im Verhältnis zur Negativ-Kontrolle berechnet wurden.

Die Balkendiagramme in Abbildung 4.10 A zeigen das Migrations- bzw. Invasionsverhalten der MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen, die mit der miR-16 Mimic bzw. Inhibitor oder der Negativ-Kontrolle transfiziert wurden. Die Überexpression der miR-16 führte zu einer signifikant verringerten Migration ( $p=0.01$ ) und Invasion ( $p=0.02$ ) in den MDA-MB-231 Zellen. Allerdings wurde kein signifikanter Effekt durch die Überexpression der miR-16 bei den MCF-7 Zellen beobachtet. Die Inhibierung der miR-16 führte nur in den MCF-7 Zellen ( $p=0.01$ ) zu einer signifikanten Erhöhung der Migration, nicht aber in den MDA-MB-231 Zellen. Eine signifikante Erhöhung der Invasion durch die Inhibierung der miR-16 wurde hingegen für die MDA-MB-231 Zellen ( $p=0.002$ ), nicht aber für die MCF-7 Zellen gemessen.

Abbildung 4.10 B zeigt das Migrations- bzw. Invasionsverhalten der MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen, die mit der miR-107 Mimic bzw. Inhibitor oder der Negativ-Kontrolle transfiziert wurden. Die Transfektion mit der Mimic miR-107 führte, verglichen mit der Negativ-Kontrolle, sowohl bei den MCF-7 Zellen ( $p=0.001$ ), als auch bei den MDA-MB-

231 Zellen ( $p=0.01$ ) zu einer signifikant, verringerten Migration. Auch die Invasion wurde durch die Überexpression der miR-107 bei den MCF-7 Zellen ( $p=0.003$ ) und den MDA-MB-231 Zellen ( $p=0.01$ ) signifikant verringert. Die Migration in den MCF-7 Zellen wurde durch die Inhibierung der miR-107 signifikant erhöht ( $p=0.002$ ), für die MDA-MB-231 Zellen zeigte sich kein signifikanter Effekt. Das Invasionsverhalten der MCF-7 ( $p=0.02$ ) und der MDA-MB-231 ( $p=0.0001$ ) wurde durch die Inhibierung der endogenen miR-107, verglichen mit der Negativ-Kontrolle, deutlich verstärkt.

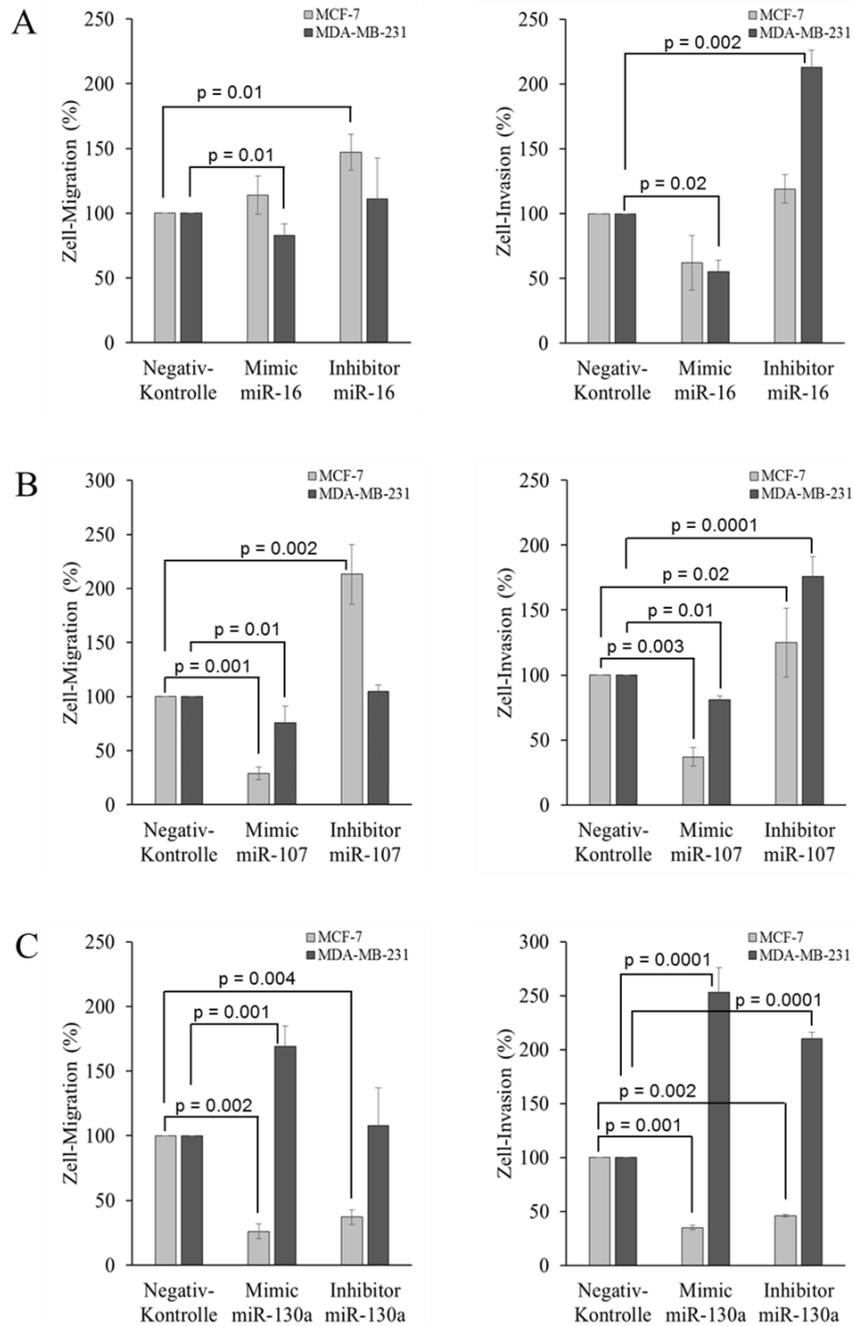
Der Einfluss der miR-130a auf das Migrations- und Invasionsverhalten der beiden Zelllinien ist in Abbildung 4.10 C dargestellt. Die Ergebnisse ergaben für die MCF-7 Zellen, dass verglichen mit der Negativ-Kontrolle, die Überexpression der miR-130a die Migration ( $p=0.002$ ) als auch die Invasion ( $p=0.001$ ) signifikant verringerte. Allerdings führte auch die Inhibierung der endogenen miR-130a in den MCF-7 Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu einer verringerten Migration ( $p=0.004$ ) und Invasion ( $p=0.002$ ). Für die MDA-MB-231 Zellen zeigte sich, dass sich durch die Überexpression der miR-130a die Migration ( $p=0.001$ ) als auch die Invasion ( $p=0.0001$ ) deutlich erhöhte. Einen Anstieg des invasiven Verhaltens zeigten MDA-MB-231 Zellen aber auch durch die Inhibierung der miR-130a ( $p=0.0001$ ) verglichen mit den Zellen, die mit der Negativ-Kontrolle transfiziert wurden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die miR-16 einen inhibierenden Effekt auf das Migrations- und Invasionsverhalten der MDA-MB-231 Zellen hatte. Für die MCF-7 Zellen wurde nur durch die Inhibierung der endogenen miR-16 eine signifikante Erhöhung der Migration nicht aber der Invasion beobachtet.

Die Ergebnisse für die miR-107 zeigten, dass sowohl das Migrations- als auch das Invasionsverhalten der MCF-7 und der MDA-MB-231 Zellen durch ein erhöhtes Level

der miR-107 gehemmt wird. Die Inhibierung der endogenen miR-107 förderte die Migration und Invasion beider Zelllinien.

Für die miR-130a zeigten die Ergebnisse, dass sowohl die Überexpression als auch die Inhibierung der miR-130a in den MCF-7 Zellen zur verringerten und in den MDA-MB-231 Zellen zur erhöhten Migration und Invasion führte. Diese Ergebnisse deuten auf einen unspezifischen Effekt der miR-130a auf das Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen hin.



**Abbildung 4.11: Der Einfluss von miR-16, miR-107 und miR-130a auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit von MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen.**

Migration und Invasion der MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen, die mit Mimic oder Inhibitor der miR-16 (A), miR-107 (B), miR-130a (C) oder der Negativ-Kontrolle transfiziert wurden. Zellen, die die Membran durchdrungen haben wurden mit Calcein-AM gefärbt und die Fluoreszenz wurde gemessen (Extinktion: 485 nm, Emission: 535 nm). Die Negativ-Kontrolle wurde als 100% festgelegt. Die p-Werte wurden mit dem Dunnett-Test berechnet.

#### 4.2.6 MiR-107 zeigte keinen Einfluss auf die Proteinexpression des Estrogenrezeptors

Da die Ergebnisse aus den Untersuchungen des SUCCESS-B-Kollektivs einen signifikanten Unterschied der miR-107 zwischen positiven und negativen ER-Status (Abb.4.5 B;  $p=0,035$ ) bei Mammakarzinom-Patientinnen zeigten, wurde untersucht, inwieweit der ER ein Zielgen der miR-107 ist. Hierfür wurde zunächst in verschiedenen miR-Datenbanken (*Diana*, *microRNA.org* und *TargetsCan*) recherchiert, ob miR-107 potenzielle Bindestellen in der 3'UTR des ER aufweist. In Abbildung 4.11 A sind beispielhaft zwei Bindestellen in der 3' UTR des ER für die miR-107 abgebildet, die in der *microRNA.org* Datenbank gefunden wurden. Anschließend wurden Transfektionsexperimente mit der ER-positiven Zelllinie MCF-7 durchgeführt. Analysiert wurden diese Experimente sowohl auf der ER-mRNA- als auch auf der ER-Protein-Ebene. Hierfür wurde, wie in Abbildung 4.11 B dargestellt, die relative ER-mRNA Expression mittels Real-Time PCR gemessen. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Alle transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu den basalen Zellen eine niedrigere Expression der ER mRNA. Allerdings handelte es sich um einen allgemeinen Effekt, der durch die Transfektion hervorgerufen wurde. Die Überexpression der miR-107, also die Transfektion mit der miR-107 Mimic bzw. mit dem Expressionsplasmid, das für die miR-107 kodiert, führte zu keiner signifikanten Inhibierung der mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollen (Leervektor bzw. Negativ-Kontrolle). Die Inhibierung der miR-107 zeigte ebenfalls keine Veränderung in der Expression der mRNA (Abb. 4.11 B).

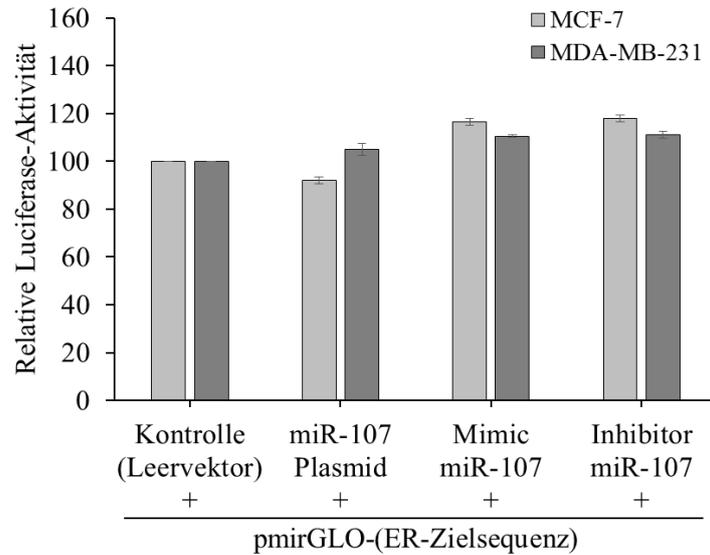


zeigten keinen Unterschied in der detektierten ER-Proteinmenge (Abb.4.11 C, Spur: Mimic miR-107 und Inhibitor miR-107). Durch die GAPDH Ladekontrolle, die eine gleichmäßige Bandenstärke aller Proben aufwies, wurde sichergestellt, dass die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden. Von diesen Ergebnissen kann man nicht eindeutig ableiten, ob miR-107 die Proteinexpression reprimieren kann. Um eine Aussage über die Regulation des ERs durch miR-107 treffen zu können war es notwendig weitere Experimente durchzuführen.

### 4.2.7 Reguliert miR-107 die Expression des Estrogenrezeptors?

Um diese Frage zu beantworten und eine Aussage über die Regulation des ER durch miR-107 treffen zu können, wurden zusätzlich Luciferase-Experimente durchgeführt. Bei dieser experimentellen Methode kann der Einfluss von mikroRNAs auf ihre Ziel-mRNA untersucht werden. Hierfür stellt man Luciferase-Reportergen-Konstrukte her, indem man die putativen mikroRNA Bindestellen der Ziel-mRNA direkt 3' nach dem Reporter gen (Luciferase des Leuchtkäfers) in den Vektor kloniert. Das Binden der mikroRNA an die klonierte Ziel-mRNA führt zur Destabilisierung oder zur Blockierung der Translation der Luciferase. Die Proteinbiosynthese der Leuchtkäfer Luciferase wird somit verringert oder inhibiert und das eingesetzte Substrat der Luciferase (LARII) kann nicht mehr oder nur im verringertem Maße abgebaut werden. Die Luciferase-Aktivität, die anhand der Lumineszenz gemessen wird, nimmt ab. Als interne Kontrolle wird zusätzlich die Aktivität der Renilla-Luciferase gemessen, die für die Normalisierung der Daten notwendig ist.

Die Ergebnisse der Luciferase-Experimente sind in Abbildung 4.12 dargestellt. Berechnet wurden die prozentualen Veränderungen der normalisierten Messwerte (Verhältnis Luciferase-Aktivität zu Renilla-Aktivität) anhand der Kontrolle, die auf 100% festgesetzt wurde. Die MCF-7 Zellen, die mit dem miR-107 Expressionsplasmid transfiziert wurden, wiesen eine leicht verringerte Luciferase-Aktivität (92%) im Vergleich zu der Kontrolle auf. Eine Erhöhung der Luciferase-Aktivität wurde sowohl für die MCF-7 Zellen, die mit der Mimic oder dem Inhibitor der miR-107 transfiziert wurden, gemessen. In der Zelllinie MDA-MB-231 wurde in allen Ansätzen eine leicht erhöhte Luciferase-Aktivität im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet. Eine Regulation des ERs durch miR-107 sollte sich bei diesen Experimenten in einer signifikanten Verringerung der Luciferase-Aktivität widerspiegeln. Allerdings ergaben die Messwerte, wie in Abbildung 4.12 dargestellt, keine signifikante Veränderung der Luciferase-Aktivität in beiden Zelllinien, die mit dem Expressionsplasmid oder der miR-107 Mimic bzw. Inhibitor transfiziert wurden. Anhand dieser Ergebnisse konnte kein Einfluss von miR-107 auf den Estrogenrezeptor nachgewiesen werden.



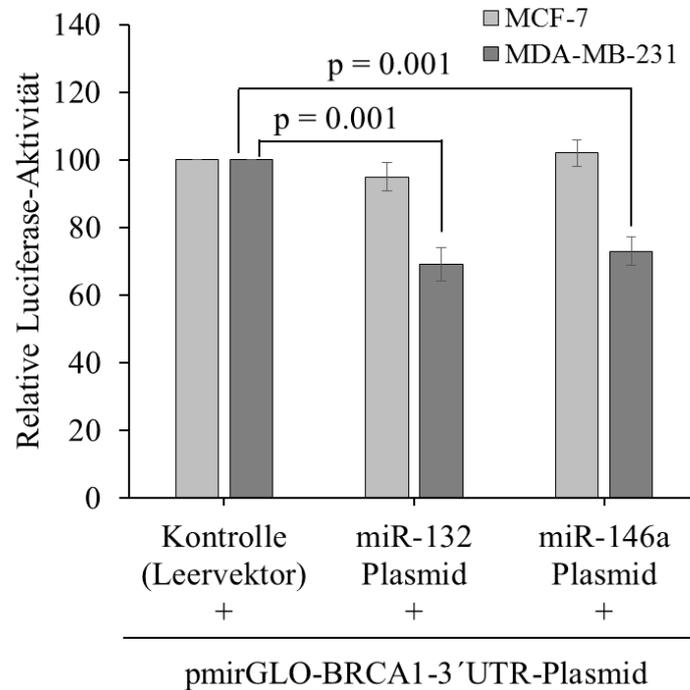
**Abbildung 4.13: Einfluss von miR-107 auf die relative Luciferase-Aktivität.**

Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die normalisierte Luciferase-Aktivität (Firefly-Luciferase-Aktivität/Renilla Luciferase-Aktivität), die in den transfizierten MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen gemessen wurde. Die Zellen wurden mit dem Reporterplasmid und dem Leervektor, dem Expressionsplasmid, das für miR-107 kodiert, der miR-107 Mimic oder Inhibitor transfiziert. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Die Daten wurden von Doppel-Messwerten aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

#### 4.2.8 Können die mikroRNAs miR-132 und miR-146a die Expression des Tumorsuppressorgens BRCA1 regulieren?

Neben den durchgeführten Luciferase-Analysen mit miR-107 und dem Reporterplasmid für ER wurde zusätzlich untersucht, inwieweit die mikroRNAs miR-132 und miR-146a das Tumorsuppressorgen BRCA1 regulieren können. Hierfür wurde die gesamte 3'UTR des BRCA1-Gens in den pmirGLO-Vektor kloniert. MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen wurden mit dem Luciferase-Reportergen-Konstrukt, das die BRCA1-3'UTR enthält, und dem jeweiligen Expressionsplasmid, das für miR-132 bzw. miR-146a kodiert, transfiziert. Die Messwerte ergaben, wie in Abbildung 4.13 dargestellt, eine signifikante

Verringerung der Luciferase-Aktivität in den MDA-MB-231 Zellen, die mit dem Reporterplasmid für BRCA1 und dem miR-132 ( $p=0.001$ ) oder dem miR-146a ( $p=0.001$ ) Expressionsplasmid transfiziert wurden sind.



**Abbildung 4.14: Einfluss von miR-132 und miR-146a auf die relative Luciferase-Aktivität.** Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die normalisierte Luciferase-Aktivität (Firefly-Luciferase-Aktivität/Renilla Luciferase-Aktivität), die in den transfizierten MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen gemessen wurde. Die Zellen wurden mit dem BRCA1-Reporterplasmid und dem Leervektor oder dem Expressionsplasmid, das für miR-132 bzw. miR-146a kodiert, transfiziert. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Die p-Werte wurden mit dem Dunnett-Test berechnet.

Im Vergleich zu der Kontrolle wurden nur 69% bzw. 73% Luciferase-Aktivität für miR-132 bzw. miR-146a gemessen.

Im Gegensatz dazu konnte diese signifikante Verringerung der relativen Luciferase-Aktivität nicht in den MCF-7 Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf

hin, das sowohl miR-132 also auch miR-146a die Expression von BRCA1 in den invasiven MDA-MB-231 Zellen herunterregulieren können.

Neben dem Luciferase-Assay, wurden ebenfalls Transfektionsexperimente mit den jeweiligen Mimics und Inhibitoren der miR-132 und miR-146a durchgeführt, um die Regulierung von BRCA1 durch diese mikroRNAs mittels Immundetektion auf Proteinebene zu analysieren. Allerdings konnten diese Experimente nicht ausgewertet werden, da alle ausgetesteten BRCA1-Antikörper keine ausreichende Spezifität zeigten.

### 4.3 Extraktion von Exosomen aus Plasma und die Separation tumor-spezifischer Exosomen

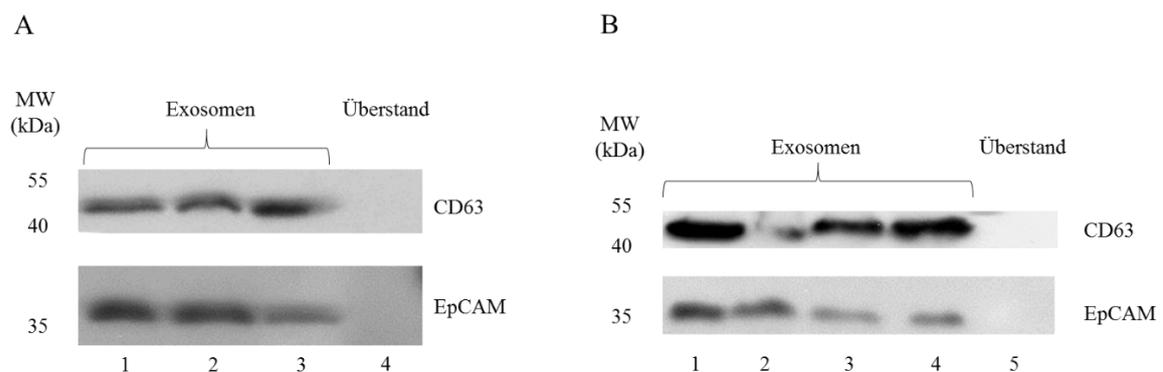
Im dritten Teil dieser Arbeit ging es um die Isolierung und Detektion tumor-spezifischer Exosomen aus Plasmaproben von Mammakarzinom-Patientinnen. Exosomen sind seit einiger Zeit in den Fokus intensiver Forschung gerückt, da gezeigt wurde, dass sie neben Proteinen auch mRNAs und mikroRNAs enthalten.

In einigen Untersuchungen wurden bereits signifikante Korrelationen zwischen der Konzentration der mikroRNAs, die aus der Gesamtheit der Exosomen isoliert wurden, und den klinisch-pathologischen Risikofaktoren bei Mammakarzinom-Patientinnen nachgewiesen. Jedoch fraktionierten diese Studien nie die Gesamtheit der Exosomen in „Wildtyp“ (Wt), also Exosomen, die nicht von Tumorzellen stammen und tumor-spezifische Exosomen. Um die mikroRNA-Konzentration aus Exosomen zu bestimmen, die von Tumorzellen stammen, ist es notwendig eine geeignete Methode für die Fraktionierung in tumor-spezifische und Wt Exosomen aus Blutproben zu entwickeln. Für die Anreicherung bzw. Isolierung epithelialer, zirkulierender Tumorzellen (*CTCs*)

aus Blut existieren bereits Methoden, die das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM als Tumor-assoziiertes Antigen nutzen. Da die von den Tumorzellen aktiv ausgeschleusten Exosomen ebenfalls EpCAM auf ihrer Oberfläche exprimieren, sollte es möglich sein, EpCAM als tumor-spezifischen Exosomenmarker zu verwenden.

### 4.3.1 Nachweis des exosomal en EpCAM Proteins

Im ersten Schritt wurde die Gesamtheit der Exosomen aus Plasmaproben von Mammakarzinom-Patientinnen isoliert und mittels Western Blot analysiert. Hierfür wurden zwei Methoden getestet, die Isolierung der Exosomen mit Hilfe eines Präzipitationsreagenz (Life Technologies) und die Isolierung der Exosomen durch Ultrazentrifugation.



**Abbildung 4.15: Immundetektion isolierter Exosomen aus Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen.**

Nachweis der Gesamt-Exosomen die mittels Präzipitationsreagenz (A) oder mittels Ultrazentrifugation (B) aus Plasmaproben von Mammakarzinom-Patientinnen isoliert wurden. Mittels Western Blot wurde das Transmembranprotein CD63 und das epitheliale Oberflächenprotein EpCAM detektiert (Spur: A1-3 bzw. B1-4). Die negative Kontrolle bildete der Exosomen-freie Überstand (Spur A4 bzw. B5), mit dem kein Signal durch den CD63 bzw. EpCAM Antikörper erzeugt wurde.

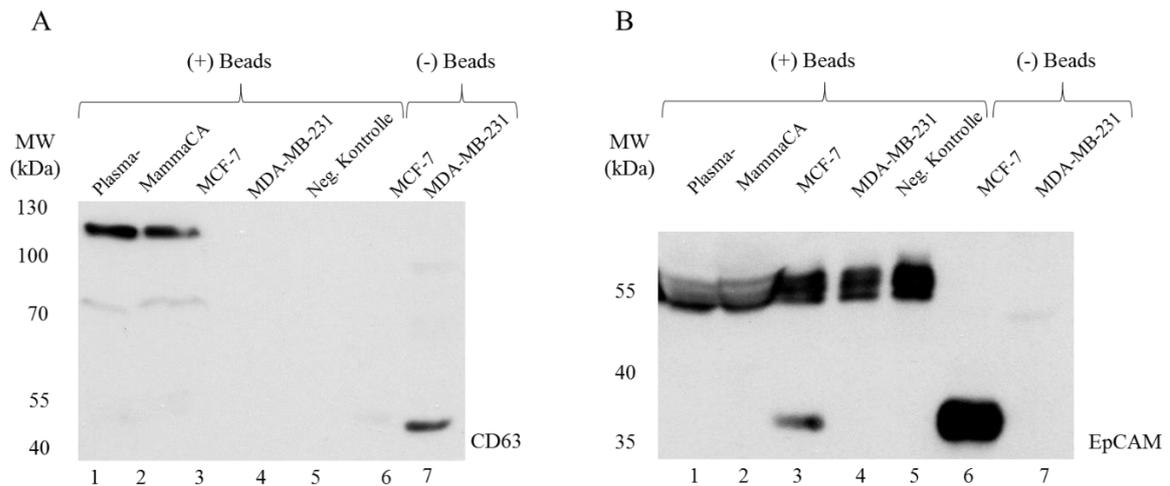
Das Vorhandensein aller Exosomen bzw. der EpCAM-positiven (tumor-spezifischen) Exosomen wurden mittels Western Blot-Analyse durch den Antikörper gegen den exosomalen Marker CD63 bzw. den epithelialen Marker EpCAM nachgewiesen und in Abbildung 4.14 dargestellt. Man sieht in den Spuren, in denen die Exosomenlysate aufgetragen wurden (Spur: A1-3 bzw. B1-4) ein Signal für CD63 und EpCAM sowohl für die Methode der Präzipitierung (A), als auch für die Extraktion mittels Ultrazentrifugation (B). Die Negativ-Kontrolle, bestehend aus dem Überstand des Exosomen-Pellets, die kein Signal für beide Antikörper (Spur A4 bzw. B5). Dies zeigt, dass die Detektion spezifisch war und dass das gesamte Exosomen-Pellet EpCAM-positive (tumor-spezifische) Exosomen enthielt.

### 4.3.2 EpCAM-basierte Extraktion und Separation tumor-spezifischer Exosomen

Da im ersten Schritt ein positives Signal für EpCAM in den Exosomen-Pellet nachgewiesen wurde, wurde weiter getestet, ob die epithelialen (tumor-spezifischen) Exosomen mit Hilfe von EpCAM-basierten Methoden isoliert werden können. Systeme, die für die Isolierung zirkulierender Tumorzellen (*Circulating Tumor Cells, CTCs*) mittels EpCAM-Antikörper gekoppelter Microbeads aus Blutproben entwickelt wurden, wurden für die Extraktion der Exosomen getestet. Zum einen wurden das *MACS-System* und zum anderen die Reagenzien des *CellSearch Systems* verwendet.

In Abbildung 4.15 sind die Ergebnisse der Experimente für die immunzytochemischen Analysen der isolierten Exosomen dargestellt. Für das Transmembranprotein CD63 (A) wurde ein starkes Signal zwischen 100 und 130 kDa detektiert, wenn die Plasmaproben mit den Beads des *CellSearch Systems* inkubiert wurden (Spur 1-2 A). Die normalerweise

zu detektierende Größe für CD63 liegt, wie in Spur 7A für das Proteinlysate von MDA-MB-231 Zellen gezeigt wurde, zwischen 40 und 55 kDa. Eine Erklärung für diese Größendiskrepanz könnte sein, dass die Exosomen durch das Aufkochen der Lysate nicht von den Beads getrennt wurden und dadurch ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel aufweisen. Die mit den Beads inkubierten Zelllysate von MCF-7 (Spur 3A) und MDA-MB-231 (Spur 4A), sowie die Negativ-Kontrolle (Spur 5A), die nur Beads und Lysepuffer enthält, zeigten kein Signal für CD63. Das Detektionsmuster für EpCAM (B) zeigte ein starkes Signal im Bereich von 55 kDa für alle Proben, die mit den Beads inkubiert wurden (Spur 1-5 B). Da auch die Negativ Kontrolle (Spur 5B) ein Signal zeigte, muss es sich um eine unspezifische Antikörperbindung handeln.



**Abbildung 4.16: Immundetektion EpCAM-spezifischer Exosomen, die mittels der Beads des CellSearch-Systems aus Plasmaproben von Mammakarzinom-Patientinnen isoliert wurden.** Exosomen wurden mittels EpCAM-Antikörper gekoppelter Microbeads (Veridex-System) isoliert und immunzytochemisch für CD63 (A) und EpCAM (B) analysiert. Aufgetragen wurden die Lysate der Plasmaproben (Spur: 1-2), der Zelllinien MCF-7 (Spur 3) und MDA-MB-231 (Spur 4), die mit den Beads inkubiert wurden. Als Negativ-Kontrolle dienten die in Lysepuffer resuspendierten Beads (Spur 5). Als weitere Kontrollen dienten die Proteinlysate der Zelllinien MCF-7 (Spur 6) und MDA-MB-231 (Spur 7), die nicht mit den Beads inkubiert wurden.

Ein positives Signal auf der für das EpCAM-Protein spezifischen Höhe zwischen 35-40 kDa wurde für die Proteinlysate von MCF-7 Zellen, die mit und ohne Beads inkubiert wurden sind (Spur 3B und 6 B), detektiert. An die Beads konnte somit das aus den MCF-7 Zellen isolierte EpCAM Protein binden und detektiert werden. Das Proteinlysate ohne Beads der MCF-7 Zellen diente als Positiv-Kontrolle für den Antikörper. Das Signal für das CD63 Protein, welches nur in den Plasmaproben zu sehen war, weist auf eine erfolgreiche Bindung der Exosomen an die EpCAM gekoppelten Beads hin.

Die Anwendung des MACS-Systems zur EpCAM-basierten Isolierung von Exosomen zeigte leider kein positives Ergebnis. Durch die immunzytochemischen Analysen konnte, auch durch die Verwendung größerer Plasmavolumina, kein Signal für CD63 oder EpCAM detektiert werden.

Im Gegensatz dazu zeigte die Verwendung der Reagenzien des Veridex-Systems, dass es möglich ist, dieses für die Isolierung EpCAM-spezifischer Zellen bestehende System, auch für die Isolierung von Exosomen zu verwenden. Durch das positive CD63 Signal der Plasmaproben konnte ein indirekter Nachweis von EpCAM-spezifischen Exosomen gezeigt werden.

## 5. Diskussion

Bei einer heterogenen Erkrankung, wie die des Mammakarzinoms, dessen Subtypen sich durch unterschiedliche klinische und biologische Eigenschaften auszeichnen, ist eine genaue Klassifizierung für die Wahl der richtigen Therapie entscheidend. Für eine optimale, individuelle Behandlung ist daher die Suche nach molekularen Markern zur genauen Klassifizierung des Tumors äußerst wichtig [4].

In den letzten Jahren wurde vermehrt auf dem Gebiet der mikroRNAs geforscht. Ihre Entdeckung erweiterte das Verständnis für den Mechanismus der Regulation der Genexpression und es zeigte sich, dass sie an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse, wie z.B. Apoptose, hämatopoetische Differenzierung, Metabolismus, neurale Entwicklung, Tumorentwicklung und Metastasierung, beteiligt sind [57]. Ihre nachgewiesene Stabilität im Blut [106], ihre vielfältigen Aufgaben in der Karzinogenese und die Erkenntnis, dass man anhand molekularer mikroRNA-Signaturen zwischen verschiedenen Brustkrebs-Subtypen unterscheiden kann [94], unterstreichen das Potenzial von mikroRNAs als Blut-basierte Marker in der Krebsdiagnostik [90, 95, 96]. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung von zirkulierenden mikroRNAs im Blut von Brustkrebspatientinnen vor und nach chemotherapeutischer Behandlung.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden sechs mikroRNAs, miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a und die miR-1207 als endogene Kontrolle, für die Quantifizierung der relativen Konzentrationen in den Plasmaproben von Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Frauen mittels Real-Time PCR, ausgewählt. Das Ziel dieser Quantifizierung war es Unterschiede der relativen mikroRNA-Konzentrationen zwischen postoperativen Mammakarzinom-Patientinnen

und gesunden Frauen zu evaluieren. Anhand von Korrelationsanalysen wurde ermittelt inwieweit die unterschiedlichen Konzentrationen der zirkulierenden mikroRNAs mit den verschiedenen Subtypen des heterogenen Mammakarzinoms assoziiert sind. Ebenfalls wurde die Wirkung der adjuvanten Chemotherapie auf die mikroRNA-Konzentrationen untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die einzelnen mikroRNAs anhand von funktionellen Analysen bezüglich ihrer Eigenschaften als *OnkomiR* bzw. *Tumorsuppressor-miR* untersucht.

### 5.1 Die Auswahl der Referenz-mikroRNA als endogene Kontrolle

Basierend auf der *miRBase*-Datenbank ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) wurden aktuell 2588 humane, reife mikroRNAs identifiziert. Auf Grund der hohen Anzahl an mikroRNAs ist es schwierig eine Auswahl von mikroRNAs zu treffen, die sich für die klinischen und molekularbiologischen Analysen bei Plasmaproben von Mammakarzinom-Patientinnen eignen. Die Durchführung eines Microarrays, ermöglichte es in kürzester Zeit die Expression vieler verschiedener mikroRNAs in einer repräsentativen Auswahl von Blutproben zu messen und signifikant deregulierte mikroRNAs zwischen Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Frauen zu identifizieren.

Die weiterführende Evaluation der zirkulierenden mikroRNAs wurde mittels quantitativer Real-Time PCR durchgeführt. Die Messung der Expressionsprofile von zirkulierenden mikroRNAs mittels quantitativer Real-Time PCR ist auf Grund der hohen Sensitivität, Spezifität, der guten Reproduzierbarkeit und der Kosteneffizienz derzeit die

am häufigsten verwendete Methode [141-143]. Um zuverlässige Real-Time PCR Daten zu erzeugen, müssen Varianzen, die während der Probenvorbereitung bis zur Amplifikations-Reaktion auftreten können, durch eine Normalisierung korrigiert werden [144]. Die Genauigkeit der Real-Time PCR-basierten mikroRNA-Expressionsanalyse hängt von der Normalisierung durch die Verwendung einer geeigneten Referenz-mikroRNA ab [145]. Im Idealfall sollte eine geeignete Referenz, unabhängig von Krankheitsstatus oder andere klinischen Variablen stabil und gleichmäßig exprimiert sein. Aktuell gibt es keinen Konsens über die Verwendung einer standardisierten, einheitlichen Referenz für die Normalisierung zirkulierender mikroRNAs. Als häufig verwendete Referenzen sind sog. snoRNAs (*small nucleolar ribonucleic acid*) wie z.B. RNU43, RNU44, RNU48 oder snRNAs (*small nuclear ribonucleic acid*) wie z.B. RNU6 zu nennen [146]. Allerdings zeigten aktuelle Forschungsberichte, dass sich diese auf Grund ihrer variablen Expression, der geringen Stabilität im Blut und der Korrelation mit der Tumorpathologie und Prognose nicht als Referenzen eignen und ein weiterer Nachteil ist, dass sie nicht zur Familie der mikroRNAs gehören [147, 148]. Auch die miR-16 wird häufig für die Normalisierung von mikroRNA-Daten verwendet, da sie in diesen Studien ein stabiles Expressionsniveau in den zu untersuchenden Proben aufwies bzw. nur geringe Varianzen auftraten [149-151]. Doch wurden auch für die miR-16 gegenteilige Ergebnisse publiziert, die eine differentielle Expression der miR-16 in verschiedenen Krebsarten wie Leukämie [152], Prostatakarzinom [153], Lungenkrebs [154] oder im Serum von Brustkrebspatientinnen mit Knochenmetastasen [111] beschreiben. Die Verwendung von miR-16 als eine interne Kontrolle zur Normalisierung der mikroRNA-Quantifizierung in klinischen Proben ist also widersprüchlich. Überdies zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine signifikant hochregulierte Expression der miR-16 im

Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen und eine Korrelation mit dem Lymphknoten-Status.

Die Auswahl der richtigen Referenz-mikroRNA ist daher der entscheidende Schritt für eine genaue und zuverlässige Bestimmung des mikroRNA-Expressionsniveaus [155]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die miR-1207, basierend auf den Ergebnissen des Microarrays, als geeignete mikroRNA für die Normalisierung ausgewählt. Literaturrecherchen unterstützten die Wahl der miR-1207 als Referenz, da zu diesem Zeitpunkt keine deregulierte Expression der miR-1207 beim Mammakarzinom bekannt war bzw. beschrieben wurde.

In allen für den Microarray verwendeten Plasmaproben wurde eine konstante Konzentration der miR-1207 gemessen, die sich in einem niedrigen Wert des Variabilitätskoeffizienten widerspiegelte. Die Auswahl der miR-1207 als endogene Kontrolle wurde durch die Ergebnisse der Real-Time PCR Analysen bestätigt. In den Plasmaproben wurde eine gleichmäßige Expression der miR-1207 zwischen gesunden Frauen und Mammakarzinom-Patientinnen vor und nach Chemotherapie gemessen.

Die Wahl der Referenz für die Normalisierung von Real-Time PCR mikroRNA-Daten ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Sowohl die Literaturrecherchen als auch die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Auswahl der Referenz kritisch ist und für einzelne Studien individuell durchgeführt werden muss.

## 5.2 Differentielle Plasmakonzentrationen der zirkulierenden, zellfreien miR-16, miR-27a und miR-132 bei Mammakarzinom-Patientinnen

Basierend auf den, mittels Microarray, erstellten Expressionsprofilen der zirkulierenden mikroRNAs wurden die miR-16, miR-27a, miR-107 und miR-130a für die weitere Validierungsstudien ausgewählt. In den Multiplex-Analysen wurden für den Vergleich zwischen Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Frauen signifikant unterschiedliche Konzentrationen detektiert, was sich in einer hohen Gesamtvariabilität dieser mikroRNAs zeigte. Des Weiteren wurde die miR-132 und miR-146a auf Grund ihrer Rolle bei Brustkrebs ausgewählt. Für die miR-146a wurde beschrieben, dass sie die Expression des Tumorsuppressorgens BRCA1 reguliert und eine Überexpression der miR-132 führte zur Inhibierung der Proliferation und zur verminderten Kolonien-Bildung von Brustkrebszellen [137, 156].

Die Quantifizierungen der mikroRNAs mittels Real-Time PCR ergaben einen Anstieg der miR-16, miR-27a und miR-132 Konzentrationen im Plasma von postoperativen Mammakarzinom-Patientinnen vor Chemotherapie im Vergleich zu gesunden Frauen. Diese signifikante Erhöhung der zirkulierenden mikroRNAs weist auf ihren tumorspezifischen Anstieg und auf ihr diagnostisches Potential hin. Interessanterweise sank die erhöhte Konzentration der miR-27a und miR-132 in den Proben nach der Chemotherapie auf ein ähnliches Level wie bei den gesunden Frauen, und ein signifikanter Unterschied vor und nach Chemotherapie konnte detektiert werden. Auch die gemessene Menge der Gesamt-RNA in den Proben der Patientinnen vor Chemotherapie war deutlich höher als in den Proben der gesunden Frauen. Die RNA-Konzentration nahm nach Chemotherapie signifikant ab, sie war dennoch höher als in den Proben der gesunden Frauen. Erwartet

wurde, dass die RNA-Konzentration nach der Behandlung ansteigen sollte. Chemotherapeutische Behandlungen üben einen toxischen Effekt auf Zellen aus, sodass durch die Inhibierung des Zellwachstums bzw. Zellteilung die Zellen in Apoptose gehen und ihre RNA an die Umgebung abgeben. Die erhöhte RNA-Konzentration in den postoperativen Proben vor Chemotherapie könnte den RNA-Spiegel vor dem operativen Eingriff reflektieren. Es wurde gezeigt, dass für den Vergleich zwischen prä- und postoperativen Proben ähnliche RNA-Konzentrationen vor und vier Wochen nach der Operation gemessen wurden, sodass der RNA-Spiegel sich nicht signifikant nach der Operation des primären Brusttumor verringerte [150].

Aus der Gruppe der selektierten mikroRNAs wurden, soweit bekannt, bisher nur miR-16 und miR-146a im Serum oder Plasma von Brustkrebspatientinnen in anderen Studien quantifiziert. Die Quantifizierung der zirkulierenden miR-16 wurde, wie schon beschrieben, oft als Kontrolle für die Normalisierung verwendet [150, 151]. In der vorliegenden Arbeit wurde aber deutlich gezeigt, dass die Expression der miR-16 signifikante Unterschiede zwischen gesunden Frauen und Mammakarzinom-Patientinnen aufwies. Weiterführend konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit negativem und positivem Lymphknoten-Status anhand des miR-16 Expressionslevels unterschieden werden können. In Lymphknoten-negativen Patientinnen war die Konzentration der miR-16 signifikant erhöht. Die funktionellen Analysen unterstützen dieses Ergebnis, da ein inhibierender Effekt durch eine erhöhte miR-16 Konzentration auf das Invasionsverhalten der MDA-MB-231 Zellen beobachtet wurde. Auch für andere Tumorarten, wie z.B. Gliomazellen und Tumorzellen der Hypophyse, wurde eine Inhibierung der Invasion durch die Überexpression der miR-16 beschrieben [157, 158]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass miR-16 die induzierte Apoptose bei

Brustkrebszellen fördert. Dieses Ergebnis wurde auch in einer anderen Studie belegt [159]. Die Beobachtung der erhöhten miR-16 Expression in den gesamten Mammakarzinom-Patientinnen und in der Subgruppe der Lymphknoten-negativen Patientinnen (bzw. die niedrigere Expression in den Lymphknoten-positiven) weist darauf hin, dass sich die Expression der miR-16 im Verlauf der Tumorprogression verändert und mit zunehmender Malignität abnimmt. Eine Abnahme der miR-16 Konzentrationen bei zunehmender Malignität wurde für Gliomazellen beschrieben [160]. Weiterführende Quantifizierungen der miR-16 bei Patientinnen mit benigner Erkrankung und Patientinnen mit Metastasen sind erforderlich, um einen Unterschied zwischen verschiedenen Krankheitsstadien und der miR-16 Konzentration zu überprüfen.

Das in dieser Arbeit detektierte signifikant hohe Plasmalevel der miR-27a korreliert auch mit den diagnostischen und prognostischen Parameter der Mammakarzinom-Patientinnen. Eine andere Studie belegt dieses Ergebnis im Tumorgewebe von invasivem Brustkrebs und einer Korrelation mit einer signifikant kürzeren krankheitsfreien Überlebenszeit (*disease-free survival time*) und Gesamtüberleben (*overall survival time*) [161]. Durch die Identifizierung des Zielgens ZBTB10 (*zinc finger and BTB domain containing 10*), ein Repressor des Transkriptionsfaktors SP1 (*Specificity protein 1*), wurden die onkogenen Eigenschaften von miR-27a beschrieben [162]. Die Repression von ZBTB10 durch miR-27a führt zur Überexpression von Sp1, was das Zellwachstum und die Angiogenese fördert. Die Suppression von miR-27a und die induzierte Expression des Gens ZBTB10 führte *in vitro* und *in vivo* zur Hemmung des Tumorwachstums bei Brustkrebs [163]. Die beschriebene Funktion als *OnkomiR* unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gemessene hohe miR-27a Konzentration in den Plasmaproben der Patientinnen. Die Tatsache, dass die Konzentration signifikant nach

der Chemotherapie abnahm, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklärt werden. In einer Studie wurde gezeigt, dass die Überexpression der miR-27a durch die Inhibierung des RKI-(*Raf Kinase Inhibitory Protein*) Proteins die EMT, charakterisiert durch den Verlust von E-cadherin und einem Zugewinn an Vimentin bzw. N-cadherin, auslöst [164]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte indirekt ein Einfluss der miR-27a auf EMT für Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Durch die Induktion von Hypoxie (Sauerstoffmangel, der EMT in Zellen auslösen kann) wurde ein signifikanter Anstieg der miR-27a Konzentration in MDA-MB-231 Zellen gemessen.

### 5.3 Die Plasmakonzentrationen der miR-107, miR-130a und miR-146a ist mit dem Rezeptorstatus assoziiert

Der Hormonrezeptorstatus ist eine der wichtigsten prädiktiven Faktoren bei Brustkrebs und ausschlaggebend für eine endokrine Therapie [19]. Da das Screening von im Plasma zirkulierenden mikroRNAs wertvolle nicht-invasive Informationen über den molekularen Subtyp von Brustkrebs liefern könnte, wurde im weiteren Vorgehen dieser Arbeit untersucht, inwieweit die deregulierten Expressionslevel der zirkulierenden miR-16, miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a mit dem Rezeptorstatus assoziiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden für miR-130a und miR-146a wurden bei HER2-positiven Mammakarzinom-Patientinnen deutlich höhere Plasmakonzentrationen detektiert als bei HER2-negativen Patientinnen. Lowery et al. zeigte im Tumorgewebe, eine Korrelation zwischen der deregulierten miR-130a Expression und positivem HER2-Status im frühen Stadium des Mammakarzinoms [165]. Deshalb könnte sich diese

mikroRNA für eine Unterscheidung zwischen HER2-positiven und -negativen Mammakarzinomen eignen. Eine Unterscheidung ist wichtig, da HER2-negative Karzinome resistent gegenüber den HER2-gerichteten Therapieansätzen sind. Insbesondere triple-negative Tumoren haben eine schlechtere Prognose als Patientinnen mit einem HER2-positiven Mammakarzinom [166]. Allerdings zeigte sich ein schnelleres Wachstum bei HER2-positiven als bei HER2-negativen Mammatumoren [167]. Die Inhibierung der miR-130a führte bei hier durchgeführten Arbeit zu einer verminderten Proliferation der MCF-7 Zellen, was auf einen potentiellen Einfluss auf das Wachstum von Brustkrebs hinweist. Allerdings ist unklar warum kein Effekt durch eine Überexpression bzw. in MDA-MB-231 Zellen zu beobachten war.

Die miR-130a Expression wird direkt durch das Onkogen c-Myc reguliert. Die zahlreichen Amplifikationen von c-Myc bei Krebserkrankungen könnten deshalb zu einer erhöhten Expression von miR-130a führen und dies könnte auch die Inhibierung der Apoptose von Krebszellen bewirken [168].

Für miR-146a ist bisher keine Korrelation zwischen dem Expressionslevel und dem HER2-Status bei Mammakarzinom beschrieben. Allerdings wurde gezeigt, dass miR-146a höher in triple-negativen als in Rezeptor-positiven Brustkrebstumoren exprimiert ist [169]. Dies spiegelt auch die in dieser Studie gemessene signifikant höhere Expression in triple-negativen MDA-MB-231 Zellen im Vergleich zu den luminalen MCF-7 Zellen wider. Eine Erklärung für die niedrige Expression der miR-146a in den ER-positiven MCF-7 Zellen könnte das Zusammenspiel zwischen Estrogen, ER und NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) sein. Estrogen inhibiert, durch seine Bindung an den ER, die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Erhöhung des I $\kappa$ B $\alpha$ - (inhibitorisches  $\kappa$ B-Protein alpha) Levels, [170]. Promotoranalysen haben gezeigt, dass

die Expression von miR-146a durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B induziert wird [171].

Auf Grund der hohen Expression von miR-146a in triple-negativen MDA-MB-231 Zellen, die eine niedrige Expression von BRCA1 aufweisen, wurde in dieser Arbeit die potentielle Regulation von BRCA1 durch miR-146a und wie auch durch miR-132 untersucht. MiR-132 wurde zusätzlich analysiert, da BRCA1 in zahlreichen Datenbanken (*Diana*, *PicTar*, *microRNA.org* und *TargetScan.org*) als potentielles Zielgen der miR-132 beschrieben wurde. Die Ergebnisse der funktionellen Analysen bestätigten die vermutete Regulation von BRCA1 sowohl durch miR-146a als auch durch miR-132. Eine Herunterregulierung der BRCA1 Expression durch miR-146a wurde bereits durch Garcia et al. beschrieben [137]. Ein Einfluss von miR-132 auf die BRCA1 Expression ist bisher noch nicht bekannt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte anhand des Luciferase-Assays der Nachweis der Regulation von BRCA1 durch die beiden mikroRNAs nur in den MDA-MB-231 Zellen und nicht in den MCF-7 Zellen nachgewiesen werden. Neben dem unterschiedlichen Subtyp der beiden Zelllinien [140], exprimieren MDA-MB-231 Zellen, im Gegensatz zu MCF-7, mutiertes p53 [172, 173] und weisen Gen-Varianten in der BRCA1-Sequenz auf [174]. Die Publikation von Sandhu et al. zeigte, dass eine Überexpression von miR-146a in basal-ähnlichen Brustkrebszelllinien das tumorigene Potenzial in Verbindung mit veränderten p53-Status erhöht [175]. Möglicherweise hat p53 einen Einfluss auf die Bindung/Regulierung von BRCA1 durch miR-146a (exogen). Weitere Experimente sind notwendig, um dieses interessante Zusammenspiel zwischen BRCA1, p53 und miR-146a bzw. miR-132 zu erklären.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen der Plasmaproben in Bezug auf den ER zeigten eine verringerte miR-107 Expression bei Patientinnen mit ER-positiven

Karzinom im Vergleich zu Patientinnen mit ER-negativen Karzinom. Die signifikante Assoziation von miR-107 und dem ER bei Plasmaproben unterstreicht, dass das veränderte mikroRNA-Expressionslevel die ER-positiven und ER-negativen Subtypen des Mammakarzinoms unterscheiden kann. In der ER-positiven MCF-7 Zelllinie konnte ebenfalls ein etwas geringeres miR-107 Level als in der ER-negativen MDA-MB-231 Zelllinie gemessen werden, allerdings war der Unterschied nicht signifikant. Die Detektion des geringeren miR-107-Levels in der Subpopulation von ER-positiven Patientinnen wird durch eine frühere Studie unterstützt. Entdeckt wurde eine hemmende Wirkung von Estrogen auf das intrazelluläre Niveau von miR-107 und dessen Herunterregulierung in Estrogen behandelten MCF-7-Zellen [176]. Diese und die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass Estrogen die Genexpression von miR-107 negativ regulieren kann. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine mögliche Interaktion zwischen miR-107 und ER untersucht. Allerdings konnte in der hier vorliegenden Studie keine direkte Regulation von ER durch miR-107, weder auf RNA noch auf Proteinebene, nachgewiesen werden.

Neben der Assoziation von miR-107 mit dem ER-Status konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Unterschied in dem Transkriptlevel von miR-107 zwischen Patientinnen mit positiven bzw. negativen Lymphknoten-Status detektiert werden. Patientinnen, bei denen Lymphknoten-Metastasen festgestellt wurden, hatten auch ein niedriges miR-107-Level. Diese Beobachtung wurde auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten, funktionellen Analysen bestätigt. Die zeigten, dass eine hohe Expression von miR-107 die Migration und Invasion der Zellen inhibiert. Umgekehrt wurde durch eine niedrige Expression bzw. Inhibierung der miR-107 die Migration und Invasion gefördert. Diese Ergebnisse werden durch die Entdeckungen in anderen Tumorarten unterstützt. Eine erhöhte miR-107

Expression inhibierte signifikant die Invasion von Glioma Stammzellen und reduzierte die Expression der Metalloproteinase-12 [177]. Auch in HeLa Zellen führte die miR-107 Überexpression zu einer signifikanten Reduktion des Migrations- und Invasionspotentials der Zellen [178]. Jedoch berichtete eine Studie für Brustkrebs, dass die negative Regulation der Cyclin-abhängigen Kinase 8 (CDK8) durch miR-107 die Proliferation und Migration von MDA-MB-231 Zellen inhibiert [179]. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit belegen deutlich die Rolle von miR-107 in Bezug auf die Migration und Invasion und erklären das hohe detektierte Transkriptlevel bei Patientinnen mit negativem Lymphknoten-Status.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Plasma der Mammakarzinom-Patientinnen detektierten, quantitativen Änderungen der Transkriptlevel der hier analysierten mikroRNAs miR-16 miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132, miR-146a eine klinische Relevanz zeigen. Ihre klinische Relevanz spiegelt sich in den signifikanten Korrelationen zwischen den mikroRNA-Konzentrationen und dem Lymphknotenstatus, dem Rezeptorstatus oder der chemotherapeutischen Behandlung wider. Auch die hier durchgeführten funktionellen Analysen der mikroRNAs miR-16 miR-27a, miR-107, miR-130a, miR-132 und miR-146a haben gezeigt, dass sie als potenzielle Blut-basierte Biomarker eine Rolle in der Entwicklung und Progression des Mammakarzinoms spielen könnten und die klinische Anwendung dieser "flüssigen Biopsien" könnte daher für das Verständnis dieser molekularen Mechanismen beitragen.

## 5.4 Detektion tumor-spezifischer Exosomen

Im dritten Teil dieser Arbeit ging es um die Isolierung tumor-spezifischer Exosomen. Exosomen sind seit einiger Zeit in den Fokus intensiver Forschung gerückt, da gezeigt wurde, dass sie neben Proteinen auch mRNAs und mikroRNAs enthalten. Diese Moleküle können durch die Exosomen in andere Zellen transportiert werden und in den Empfängerzellen funktionell aktiv sein. Dieser sogenannter horizontale Transfer kann vermutlich zu einer Transformation der Empfängerzellen führen [110].

Da Exosomen nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von gesunden Zellen und Blutzellen abgegeben werden, ist es notwendig Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen tumor-spezifische Exosomen aus Blutproben zu isolieren.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist über EpCAM-gekoppelte Beads Exosomen aus Plasmaproben von Mammakarzinom-Patientinnen zu isolieren. Eine EpCAM-basierte Isolierung von Exosomen wurde bereits für das Ovarialkarzinom gezeigt. Dabei wies das mikroRNA-Expressionsprofil von Exosomen, die über den Tumormarker EpCAM isoliert wurden, eine hohe Korrelation mit dem des Primärtumors auf [134].

Die Quantifizierung tumor-spezifischer, exosomaler mikroRNAs könnte spezifische Informationen über die Funktion der Exosomen liefern und mögliche Tumor-inhibierende als auch -fördernde Eigenschaften der Exosomen könnten identifiziert werden. Diese Informationen würden wichtige Einblicke in die Funktionsweisen sowohl speziell der exosomalen mikroRNAs als auch der Exosomen während der Tumorgenese liefern.

Für die Validierung von EpCAM als tumor-spezifischen Exosomen-Marker sind weitere Schritte notwendig. Zum einen wäre hierfür der nächste Schritt die Spezifität von EpCAM im Vergleich zu Exosomen, die aus gesunden Proben isoliert wurden, zu prüfen.

## 5.5 Fazit und Ausblick

Einerseits macht die Tatsache, dass einzelne mikroRNAs an zahlreiche Gene binden, ihre Expression regulieren und sowohl als *OnkomiRs* und/oder *Tumorsuppressor-miRs* fungieren können, das Forschungsgebiet der mikroRNAs sehr interessant. Andererseits stellt aber die komplexe Wirkungsweise der mikroRNAs auch eine große Herausforderung, in Hinblick auf die Erforschung ihres Potentials als neuer Tumormarker, dar. Somit ist eine detaillierte Charakterisierung der mikroRNAs notwendig, um ihre Funktionen zu verstehen und die gewonnenen Informationen sinnvoll und gezielt einzusetzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Quantifizierung zellfreier, zirkulierender mikroRNAs im Plasma von Mammakarzinom-Patientinnen eignet, neue Tumormarker zu etablieren. Gezeigt werden konnte, dass man anhand der Quantifizierung im Plasma und unterstützend durch die funktionellen Analysen der mikroRNAs, wichtige Informationen über die Biologie des Mammakarzinoms sowie über den Verlauf der Chemotherapie bekommen kann.

Die Verwendung von Blut-basierten Biomarkern bietet zudem den Vorteil, dass sie durch den nicht-invasiven Eingriff im Gegensatz zu den invasiven Gewebebiopsien öfter und regelmäßiger entnommen werden können. Anhand der quantifizierten, zirkulierenden mikroRNAs und ihres veränderten Expressionsprofils, könnte das Ansprechen der Behandlung bzw. der Verlauf kontrolliert werden.

Auf Grund der ähnlichen Behandlungsstrategien, trotz der heterogenen Biologie des Mammakarzinoms, und des Mangels an klinisch nützlichen prädiktiven Biomarkern kommt es häufig zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Notwendig für eine

sinnvolle Therapieentscheidung und für die Vermeidung der Resistenzentwicklung wäre eine individualisierte Analyse durch geeignete Biomarker. Die Detektion von mikroRNAs im Plasma könnte Informationen über die genetische Heterogenität des Mammakarzinoms und veränderte Signalwege liefern. Dadurch wäre eine bessere Anpassung der Therapie für die Patientinnen möglich und potentielle Resistenzen gegenüber verwendeter Medikamente könnten vermieden werden. MikroRNAs als Blut-basierte Marker eignen sich somit nicht nur für diagnostische, sondern auch prognostische und prädiktive Analysen.

Für die klinische Relevanz und die potentielle routinemäßige Anwendung in der klinischen Diagnostik ist es zukünftig essentiell standardisierte Protokolle für die Verarbeitung des Probenmaterials festzulegen. Das umfasst u.a. die Probenentnahme, die Art des Röhrchens (Heparin, EDTA oder Serum) und der Kanüle, die Zeit von der Entnahme bis zur Weiterverarbeitung, die genaue Methode der Weiterverarbeitung und die Lagerbedingungen. Die Beeinflussung der Proben durch Hämolyse sollte sowohl visuell als auch genauer durch geeignete Marker kontrolliert werden. Für die RNA-Isolation, die Reverse Transkription und die anschließende Real-Time PCR sollten ebenfalls einheitliche Normen (z.B. einheitliche Volumina, gleiche Reagenzien und Geräte etc.) gelten, um möglichst vergleichbare Daten zu erhalten. Die Auswertung der Daten ist einer der wichtigsten Punkte. Hierfür muss eine einheitliche Normalisierung entwickelt werden, um den Vergleich der Daten zu ermöglichen.

Zudem ist es für die klinische Relevanz notwendig weitere Studien mit größeren Patientenkohorten und unterschiedlichen Krankheitsstadien durchzuführen, um ihre diagnostische und prognostische Rolle zu untermauern.

## Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
2. Weigelt, B. and J.S. Reis-Filho, *Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?* Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(12): p. 718-30.
3. Weigelt, B., F.C. Geyer, and J.S. Reis-Filho, *Histological types of breast cancer: how special are they?* Mol Oncol, 2010. **4**(3): p. 192-208.
4. Dawson, S.J., et al., *A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications*. EMBO J, 2013. **32**(5): p. 617-28.
5. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
6. Sinn, H.P., B. Helmchen, and C.H. Wittekind, *[TNM classification of breast cancer: changes and comments on the 7th edition]*. Pathologe, 2010. **31**(5): p. 361-6.
7. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.
8. Perou, C.M., et al., *Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9212-7.
9. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
10. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
11. Cheang, M.C., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(10): p. 736-50.
12. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Ann Oncol, 2011. **22**(8): p. 1736-47.
13. Konecny, G., et al., *Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(2): p. 142-53.
14. Fan, C., et al., *Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(6): p. 560-9.
15. Hu, Z., et al., *The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 96.
16. Sorlie, T., et al., *Gene expression profiles do not consistently predict the clinical treatment response in locally advanced breast cancer*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(11): p. 2914-8.

17. Sotiriou, C., et al., *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10393-8.
18. Voduc, K.D., et al., *Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse*. J Clin Oncol, 2010. **28**(10): p. 1684-91.
19. Strehl, J.D., et al., *Invasive Breast Cancer: Recognition of Molecular Subtypes*. Breast Care (Basel), 2011. **6**(4): p. 258-264.
20. Foulkes, W.D., et al., *The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 830-5.
21. Goldhirsch, A., et al., *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013*. Ann Oncol, 2013. **24**(9): p. 2206-23.
22. van der Groep, P., E. van der Wall, and P.J. van Diest, *Pathology of hereditary breast cancer*. Cell Oncol (Dordr), 2011. **34**(2): p. 71-88.
23. Hall, J.M., et al., *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. Science, 1990. **250**(4988): p. 1684-9.
24. Hodgson, S.V., P.J. Morrison, and M. Irving, *Breast cancer genetics: unsolved questions and open perspectives in an expanding clinical practice*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2004. **129C**(1): p. 56-64.
25. Welch, P.L., K.N. Owens, and M.C. King, *Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2*. Trends Genet, 2000. **16**(2): p. 69-74.
26. Scully, R., et al., *Association of the BRCA1 gene product with Rad51 in meiotic and mitotic cells*. European Journal of Cell Biology, 1997. **72**: p. 9-9.
27. Deng, C.X., *BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(5): p. 1416-1426.
28. Hashizume, R., et al., *The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(18): p. 14537-14540.
29. Bochar, D.A., et al., *BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: Linking chromatin remodeling to breast cancer*. Cell, 2000. **102**(2): p. 257-265.
30. Foulkes, W.D., et al., *Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(19): p. 1482-5.
31. Lakhani, S.R., et al., *Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(14): p. 5175-5180.
32. Kriege, M., et al., *Distant disease-free interval, site of first relapse and post-relapse survival in BRCA1- and BRCA2-associated compared to sporadic breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **111**(2): p. 303-11.
33. Lumachi, F., et al., *Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer*. Curr Med Chem, 2013. **20**(5): p. 596-604.
34. Prat, A., et al., *Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(8).
35. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med, 2007. **357**(1): p. 39-51.

36. Anders, C. and L.A. Carey, *Understanding and treating triple-negative breast cancer*. Oncology (Williston Park), 2008. **22**(11): p. 1233-9; discussion 1239-40, 1243.
37. Nielsen, T.O., et al., *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5367-74.
38. Carey, L.A., et al., *TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(21): p. 2615-23.
39. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
40. Senkus, E., et al., *Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2013. **24 Suppl 6**: p. vi7-23.
41. Mordente, A., et al., *Anthracyclines and mitochondria*. Adv Exp Med Biol, 2012. **942**: p. 385-419.
42. Piccart-Gebhart, M.J., *Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer*. N Engl J Med, 2006. **354**(20): p. 2177-9.
43. Cella, D., et al., *Measuring the side effects of taxane therapy in oncology: the functional assesment of cancer therapy-taxane (FACT-taxane)*. Cancer, 2003. **98**(4): p. 822-31.
44. Langlands, F.E., et al., *Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation*. Br J Radiol, 2013. **86**(1023): p. 20120601.
45. *Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. An overview of the randomized trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*. N Engl J Med, 1995. **333**(22): p. 1444-55.
46. Eifel, P., et al., *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(13): p. 979-89.
47. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
48. Marino, N., et al., *Breast cancer metastasis: issues for the personalization of its prevention and treatment*. Am J Pathol, 2013. **183**(4): p. 1084-95.
49. Uhr, J.W. and K. Pantel, *Controversies in clinical cancer dormancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(30): p. 12396-400.
50. Zielinska, H.A., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: a role for insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 3?* Breast Cancer (Dove Med Press), 2015. **7**: p. 9-19.
51. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
52. Tsuji, T., S. Ibaragi, and G.F. Hu, *Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis*. Cancer Res, 2009. **69**(18): p. 7135-9.
53. Langley, R.R. and I.J. Fidler, *The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs*. International Journal of Cancer, 2011. **128**(11): p. 2527-2535.
54. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.

55. Kim, V.N., *Small RNAs: classification, biogenesis, and function*. Mol Cells, 2005. **19**(1): p. 1-15.
56. Lim, L.P., et al., *Vertebrate microRNA genes*. Science, 2003. **299**(5612): p. 1540.
57. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 597-610.
58. Croce, C.M., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(10): p. 704-14.
59. Song, G. and L. Wang, *MiR-433 and miR-127 arise from independent overlapping primary transcripts encoded by the miR-433-127 locus*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3574.
60. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
61. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. Genes Dev, 2002. **16**(6): p. 720-8.
62. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
63. Bushati, N. and S.M. Cohen, *microRNA functions*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 175-205.
64. Rana, T.M., *Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 23-36.
65. Du, T. and P.D. Zamore, *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. Development, 2005. **132**(21): p. 4645-52.
66. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 83-6.
67. Singh, C.P., J. Singh, and J. Nagaraju, *A baculovirus-encoded MicroRNA (miRNA) suppresses its host miRNA biogenesis by regulating the exportin-5 cofactor Ran*. J Virol, 2012. **86**(15): p. 7867-79.
68. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
69. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
70. Hock, J. and G. Meister, *The Argonaute protein family*. Genome Biol, 2008. **9**(2): p. 210.
71. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
72. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
73. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
74. Zhao, Y. and D. Srivastava, *A developmental view of microRNA function*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(4): p. 189-97.
75. Chen, K.X., et al., *Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology*. Carcinogenesis, 2008. **29**(7): p. 1306-1311.
76. Borel, C. and S.E. Antonarakis, *Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences*. Mammalian Genome, 2008. **19**(7-8): p. 503-509.

77. George, G.P. and R.D. Mittal, *MicroRNAs: Potential biomarkers in cancer*. Indian J Clin Biochem, 2010. **25**(1): p. 4-14.
78. Portnoy, V., et al., *Small RNA and transcriptional upregulation*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011. **2**(5): p. 748-60.
79. Place, R.F., et al., *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1608-13.
80. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
81. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-269.
82. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Research, 2005. **65**(16): p. 7065-7070.
83. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
84. Calin, G.A., et al., *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11755-60.
85. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
86. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(5): p. 502-11.
87. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(3): p. 143-59.
88. Zhang, B.H., et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Developmental Biology, 2007. **302**(1): p. 1-12.
89. Baffa, R., et al., *MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets*. J Pathol, 2009. **219**(2): p. 214-21.
90. Ruan, K., X. Fang, and G. Ouyang, *MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer*. Cancer Lett, 2009. **285**(2): p. 116-26.
91. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
92. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 189-98.
93. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
94. Blenkiron, C., et al., *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. Genome Biol, 2007. **8**(10): p. R214.
95. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
96. Calin, G.A., et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **353**(17): p. 1793-801.

97. Mandel, P. and P. Metais, \**Les Acides Nucleiques Du Plasma Sanguin Chez L'homme*. Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales, 1948. **142**(3-4): p. 241-243.
98. Lawrie, C.H., et al., *Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma*. British Journal of Haematology, 2008. **141**(5): p. 672-675.
99. Kosaka, N., H. Iguchi, and T. Ochiya, *Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Science, 2010. **101**(10): p. 2087-2092.
100. Schwarzenbach, H., et al., *Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2014. **11**(3): p. 145-156.
101. Cortez, M.A., et al., *MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2011. **8**(8): p. 467-477.
102. Pegtel, D.M., et al., *Functional delivery of viral miRNAs via exosomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(14): p. 6328-6333.
103. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
104. Fleischhacker, M. and B. Schmidt, *Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-a survey*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1775**(1): p. 181-232.
105. Schwarzenbach, H., D.S.B. Hoon, and K. Pantel, *Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients*. Nature Reviews Cancer, 2011. **11**(6): p. 426-437.
106. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Research, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
107. Chim, S.S.C., et al., *Detection and characterization of placental MicroRNAs in maternal plasma*. Clinical Chemistry, 2008. **54**(3): p. 482-490.
108. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(30): p. 10513-10518.
109. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nature Cell Biology, 2008. **10**(12): p. 1470-U209.
110. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(6): p. 654-U72.
111. Schwarzenbach, H., et al., *Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(3): p. 145-56.
112. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins (vol 13, pg 423, 2011)*. Nature Cell Biology, 2015. **17**(1): p. 104-104.
113. Turchinovich, A., et al., *Characterization of extracellular circulating microRNA*. Nucleic Acids Research, 2011. **39**(16): p. 7223-7233.
114. Duffy, M.J., *Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review*. European Journal of Internal Medicine, 2007. **18**(3): p. 175-184.

115. Roulston, J.E., *Limitations of Tumor-Markers in Screening*. British Journal of Surgery, 1990. **77**(9): p. 961-962.
116. Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(8): p. 581-593.
117. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(16): p. 2667-88.
118. Trams, E.G., et al., *Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of microvesicles*. Biochim Biophys Acta, 1981. **645**(1): p. 63-70.
119. Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl, *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes*. J Cell Biol, 1983. **97**(2): p. 329-39.
120. Pan, B.T., et al., *Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes*. J Cell Biol, 1985. **101**(3): p. 942-8.
121. Thery, C., *Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications*. F1000 Biol Rep, 2011. **3**: p. 15.
122. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. EMBO J, 2011. **30**(17): p. 3481-500.
123. Maxfield, F.R. and T.E. McGraw, *Endocytic recycling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(2): p. 121-32.
124. Raiborg, C., et al., *Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes*. Nature Cell Biology, 2002. **4**(5): p. 394-398.
125. Sachse, M., et al., *Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes*. Molecular Biology of the Cell, 2002. **13**(4): p. 1313-1328.
126. Hanson, P.I. and A. Cashikar, *Multivesicular Body Morphogenesis*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, Vol 28, 2012. **28**: p. 337-362.
127. Maxfield, F.R. and D.J. Yamashiro, *Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis*. Adv Exp Med Biol, 1987. **225**: p. 189-98.
128. van Niel, G., et al., *The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis*. Dev Cell, 2011. **21**(4): p. 708-21.
129. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.
130. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
131. Chaput, N. and C. Thery, *Exosomes: immune properties and potential clinical implementations*. Seminars in Immunopathology, 2011. **33**(5): p. 419-440.
132. Bergsmedh, A., et al., *Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6407-11.
133. Garcia-Olmo, D., et al., *Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis"*. Blood, 2000. **95**(2): p. 724-5.
134. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer (vol 110, pg 13, 2008)*. Gynecologic Oncology, 2010. **116**(1): p. 153-153.
135. Koga, K., et al., *Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes*. Anticancer Research, 2005. **25**(6A): p. 3703-3707.

136. Ciravolo, V., et al., *Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy*. Journal of Cellular Physiology, 2012. **227**(2): p. 658-667.
137. Garcia, A.I., et al., *Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(5): p. 279-90.
138. Benjamini, Y.H., Y. , *Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing*. J. R. Statist. Soc. B, 1995.
139. Nagaraja, G.M., et al., *Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics*. Oncogene, 2006. **25**(16): p. 2328-38.
140. Kao, J., et al., *Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6146.
141. Song, J., et al., *Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(4): p. 897-904.
142. Jin, X.F., et al., *Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases*. Cell Mol Neurobiol, 2013. **33**(5): p. 601-13.
143. Kang, K., et al., *Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling*. J Anim Sci Biotechnol, 2012. **3**(1): p. 4.
144. Peltier, H.J. and G.J. Latham, *Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues*. RNA, 2008. **14**(5): p. 844-52.
145. Bae, I.S., et al., *Identification of Reference Genes for Relative Quantification of Circulating MicroRNAs in Bovine Serum*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0122554.
146. Reid, G., M.B. Kirschner, and N. van Zandwijk, *Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers*. Crit Rev Oncol Hematol, 2011. **80**(2): p. 193-208.
147. Gee, H.E., et al., *The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis*. British Journal of Cancer, 2011. **104**(7): p. 1168-1177.
148. Xiang, M., et al., *U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **454**(1): p. 210-4.
149. Heneghan, H.M., et al., *Circulating microRNAs as Novel Minimally Invasive Biomarkers for Breast Cancer*. Annals of Surgery, 2010. **251**(3): p. 499-505.
150. Roth, C., et al., *Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer*. Breast Cancer Research, 2010. **12**(6).
151. Davoren, P.A., et al., *Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer*. BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 76.
152. Calin, G.A., et al., *MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(13): p. 5166-5171.

153. Leite, K.R.M., et al., *MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer-from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis*. Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations, 2013. **31**(6): p. 796-801.
154. Bandi, N., et al., *miR-15a and miR-16 Are Implicated in Cell Cycle Regulation in a Rb-Dependent Manner and Are Frequently Deleted or Down-regulated in Non-Small Cell Lung Cancer*. Cancer Research, 2009. **69**(13): p. 5553-5559.
155. McDermott, A.M., M.J. Kerin, and N. Miller, *Identification and Validation of miRNAs as Endogenous Controls for RQ-PCR in Blood Specimens for Breast Cancer Studies*. Plos One, 2013. **8**(12).
156. Li, S., et al., *MicroRNA-132 is frequently down-regulated in ductal carcinoma in situ (DCIS) of breast and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation*. Pathology Research and Practice, 2013. **209**(3): p. 179-183.
157. Li, X.D., et al., *MiR-16-1 Plays a Role in Reducing Migration and Invasion of Glioma Cells*. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 2013. **296**(3): p. 427-432.
158. Wang, R.J. and H.Q. Liang, *MiR-132, miR-15a and miR-16 synergistically inhibit pituitary tumor cell proliferation, invasion and migration by targeting Sox5*. Cancer Letters, 2015. **356**(2): p. 568-578.
159. Mobarra, N., et al., *Overexpression of microRNA-16 declines cellular growth, proliferation and induces apoptosis in human breast cancer cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2015.
160. Yang, T.Q., et al., *MicroRNA-16 inhibits glioma cell growth and invasion through suppression of BCL2 and the nuclear factor-kappaB1/MMP9 signaling pathway*. Cancer Sci, 2014. **105**(3): p. 265-71.
161. Tang, W., et al., *MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51702.
162. Mertens-Talcott, S.U., et al., *The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G(2)-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells*. Cancer Research, 2007. **67**(22): p. 11001-11011.
163. Mertens-Talcott, S.U., et al., *Betulinic Acid Decreases ER-Negative Breast Cancer Cell Growth In Vitro and In Vivo: Role of Sp Transcription Factors and MicroRNA-27a:ZBTB10*. Molecular Carcinogenesis, 2013. **52**(8): p. 591-602.
164. Li, J., et al., *miR-27a regulates cisplatin resistance and metastasis by targeting RKIP in human lung adenocarcinoma cells*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 193.
165. Lowery, A.J., et al., *MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(3): p. R27.
166. Damasceno, M., *Bevacizumab for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer*. Curr Opin Oncol, 2011. **23 Suppl**: p. S3-9.
167. Colozza, M., et al., *Bringing molecular prognosis and prediction to the clinic*. Clin Breast Cancer, 2005. **6**(1): p. 61-76.
168. Yang, F., et al., *Retinoic acid-induced HOXA5 expression is co-regulated by HuR and miR-130a*. Cell Signal, 2013. **25**(6): p. 1476-85.

169. Medimegh, I., et al., *MicroRNAs expression in triple negative vs non triple negative breast cancer in Tunisia: interaction with clinical outcome*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111877.
170. Xing, D.Q., et al., *Estrogen Modulates NF kappa B Signaling by Enhancing I kappa B alpha Levels and Blocking p65 Binding at the Promoters of Inflammatory Genes via Estrogen Receptor-beta*. Plos One, 2012. **7**(6).
171. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
172. Hui, L., et al., *Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D*. Oncogene, 2006. **25**(55): p. 7305-7310.
173. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. Cancer Cell, 2006. **10**(6): p. 515-527.
174. Elstrodt, F., et al., *BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 41-5.
175. Sandhu, R., et al., *Overexpression of miR-146a in basal-like breast cancer cells confers enhanced tumorigenic potential in association with altered p53 status*. Carcinogenesis, 2014. **35**(11): p. 2567-75.
176. Cicatiello, L., et al., *Estrogen receptor alpha controls a gene network in luminal-like breast cancer cells comprising multiple transcription factors and microRNAs*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2113-30.
177. Chen, L., et al., *MicroRNA-107 inhibits U87 glioma stem cells growth and invasion*. Cell Mol Neurobiol, 2013. **33**(5): p. 651-7.
178. Zhou, C., et al., *miR-107 activates ATR/Chk1 pathway and suppress cervical cancer invasion by targeting MCL1*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111860.
179. Li, X.Y., et al., *MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer*. Int J Clin Exp Med, 2014. **7**(1): p. 32-40.

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. Heidi Schwarzenbach für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, für ihre engagierte Betreuung, die wissenschaftlichen Denkanstöße und hilfreichen Anregungen während der Anfertigung meiner Dissertation.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel, dem Direktor des Instituts für Tumorbiologie, möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich diese Arbeit an seinem Institut in einem hervorragenden Arbeitsumfeld anfertigen konnte, sowie für seine fachkundige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Christian Lohr danke ich für seine Bereitschaft als Vertreter der biologischen Fakultät meine Dissertation zu begutachten.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Janni und Frau Dr. Brigitte Rack danke für die Zusammenarbeit im Rahmen der SUCCESS-B-Studie und der Bereitstellung der Blutproben und der klinischen Daten.

Herrn Prof. Dr. Volkmar Müller und Frau Dr. Karin Milde-Langosch danke ich für die Überlassung der Blutproben und der klinischen Daten der Mammakarzinom-Patientinnen der Gynäkologie des UKEs.

Ein großer Dank geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Tumorbiologie und insbesondere an meine Arbeitsgruppe. Danke für eure Hilfsbereitschaft, die fachliche und moralische Unterstützung während der gesamten Zeit und euer Kollegialität.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immer unterstützt und mir Kraft gegeben haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid.



