

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:

# **Die zelluläre Funktion von mikroRNA-1 auf das Zellwachstum von Ovarialkarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr.med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2017

vorgelegt von:

Daria Viviane Hettenbach

geb. am 18.04.1990

in: Singen am Hohentwiel

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Mustea

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Eichbaum

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum J05.38/39, im DZ 7, Sauerbruchstraße

Tag der Disputation: 9. Mai 2018

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Matthias B. Stope, Daria Hettenbach, Anne Kaul, Madeleine Paditz, Karoline Diesing, Martin Burchardt, Marek Zygmunt, Alexander Mustea and Dominique Koensgen

„The Tumor Suppressor MicroRNA-1 Possesses Exhibits Restricted Inhibition of Proliferation of Ovarian Cancer Cells“

ANTICANCER RESEARCH 36:3329-3334 (2016).

Abstract

# I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis .....	IV
II. Abkürzungsverzeichnis .....	VI
III. Abbildungsverzeichnis .....	VIII
IV. Tabellenverzeichnis .....	IX
1. Einleitung .....	1
1.1 Klinik, Diagnose und Therapie des OC.....	1
1.2 Tumorbilogie des OC .....	4
1.3 miRNA .....	4
1.4 Zielsetzung .....	6
2. Material.....	7
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	7
2.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen.....	11
2.3 Zellen .....	13
2.4 Vektorlinearisierung .....	13
2.5 Primer .....	14
2.6 Enzyme und Kits .....	14
2.7 Vektoren .....	15
2.8 Software .....	15
3. Methoden .....	16
3.1 Zellbiologische Methoden.....	16
3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen .....	16
3.1.2 Kultivierung und Normalpassage von Zellen.....	16
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels CASY TT Cell Counter .....	17
3.1.4 Transfektion .....	17
3.1.5 Migrationsassay .....	18
3.2 Molekularbiologische Methoden .....	19

3.2.1 RNA Isolierung.....	19
3.2.2 Messung der RNA-Konzentration .....	19
3.2.3 miR-1-Detektion mittels qRT-PCR.....	19
3.3 Statistische Auswertung.....	20
4. Ergebnisse .....	21
4.1 Transiente Überexpression von miR-1 in OC-Zellen hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten.....	21
4.2 Generierung und Charakterisierung stabil miR-1 überexprimierender OC-Zellen .....	22
4.3 Stabile Überexpression von miR-1 in OC-Zellen hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten.....	24
4.4 Stabile Überexpression von miR-1 in OC-Zellen hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten .....	27
5. Diskussion .....	29
6. Zusammenfassung .....	35
7. Literaturverzeichnis .....	36
Eidesstattliche Erklärung .....	42
Lebenslauf.....	43
Danksagung.....	44

## II. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
B-Raf	B-Rapidly accelerated fibrosarcoma
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
bspw.	bspw.
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA – 125	Cancer Antigen – 125
cDNA	complementary DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CTNNB1	Catenin beta 1
DEPC	Diethyldicarbonat
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EGF	Epidermal Growth Factor
ERBB2	Human epidermal growth factor receptor 2
FBS	Fötales Rinderserum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HGF	Hepatocyte Growth Factor
K-ras	K-Rat sarcoma
l	Liter
M	Molar
m	Milli
min	Minute
miR-1	mikroRNA-1

## Abkürzungsverzeichnis

---

miRNA	mikroRNA
mRNA	messengerRNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT-Assay	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nm	Nanometer
OC	Ovarialkarzinom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
p.miR-1	p.Superior.puro-miR-1
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RAN-GTP	Ras-related nuclear protein – Guanosintriphosphat
RISC	RNA-induzierender-silencing-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-Buffer	Reverse Transkriptase – Buffer
SD	Standardabweichung
sek	Sekunde
TNM	Tumor Nodus Metastase
u.a.	u.a.
U/min	Umdrehungen/Minute
Wnt	Wingless and Int-1

### III. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Biosynthese der miRNA <sup>26</sup> .....	5
Abb.2: Vektor: pSuperior.puro .....	15
Abb.3: Transiente Überexpression von miR-1 .....	21
Abb.4: Detektion der Überexpression von miR-1 mittels qRT-PCR .....	23
Abb.5: Stabile Überexpression von miR-1 .....	26
Abb.6: Migrationsassay .....	28



## **IV. Tabellenverzeichnis**

Tab.1: Ovarialtumore <sup>2,7</sup> .....	1
Tab.2: FIGO Klassifikationssystem <sup>2</sup> .....	3
Tab.3: Transfektionsprotokoll .....	18
Tab.4: Pipettierschema cDNA-Synthese – reverse Trankription der miRNA .....	19
Tab.5: qRT-PCR Protokoll.....	20
Tab.6: Titration der minimal-letalen Konzentration.....	22

# 1. Einleitung

## 1.1 Klinik, Diagnose und Therapie des OC

Das OC gehört momentan weltweit zu den am weitesten verbreiteten Krebserkrankungen der Frau und führt in Europa unter den gynäkologischen Malignomen am häufigsten zum Tode<sup>1,2</sup>. Da im Frühstadium selten spezifische Symptome auf die Erkrankung hindeuten, ist es schwer das OC frühzeitig zu diagnostizieren, was die in einem fortgeschrittenen Tumorstadium schlechte 5-Jahres-Überlebensrate von nur etwa 30% erklärt<sup>2,3,4</sup>. Erst im fortgeschrittenen Tumorstadium treten Symptome auf wie bspw. diffuse, abdominelle Schmerzen, eine Zunahme des Bauchumfangs, veränderte Stuhlgewohnheiten oder eine unklare Gewichtsabnahme<sup>5</sup>. Die Ätiopathogenese des OC ist bisher noch nicht befriedigend geklärt, wobei eine positive Familienanamnese, eine Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2, Nulliparität, eine frühzeitige Menarche und eine späte Menopause Risikofaktoren, an einem OC zu erkranken, darstellen<sup>2,6</sup>. Entsprechend der drei Gewebekomponenten können primäre Ovarialtumore in Epitheliale-, Keimstrang-Stroma- und Keimzelltumoren unterteilt werden, wobei anhand ihres biologischen Verhaltens eine Unterscheidung in benigne Tumore, Borderline-Tumore und maligne Tumore vorgenommen wird<sup>2,7</sup>.

**Tab.1: Ovarialtumore<sup>2,7</sup>**

	Epitheliale Tumoren	Keimzell-tumoren	Keimstrang-Stroma-Tumoren	Sonstige Tumoren	Sekundäre Tumoren
Histogenese	Müller-Epithel	Keimzellen	Stroma – und Keimstrang-abkömmlinge		
Häufigkeit	65 %	15 %	10 %	5 %	5 %
Typen	Seriös Muzinös Endometrioid Klarzellig Brennertumor Nicht klassifizierbar	Teratom Dysgerminom Dottersacktumor Chorionkarzinom Embryonalzellkarzinom	Fibrom Granulosazell-Tumoren Thekazell-tumoren Sertolizell-Tumoren Leydigzell-Tumoren	Kleinzelliges Karzinom	Magen Kolon Mamma Lunge Kontralaterales Ovar

Momentan gibt es keine Untersuchungsmethode, die ein generelles Screening des OC rechtfertigen würde<sup>5</sup>. Um eine Beurteilung einer Raumforderung im Bereich der Adnexen vornehmen zu können, bedarf es einer multidisziplinären Annäherung, basierend auf einer Anamnese, körperlichen Untersuchung, Laboruntersuchungen und bildgebenden Verfahren, wie bspw. der abdominellen bzw. transvaginalen Sonographie und ggf. des CT und MRT<sup>2,5,8</sup>. Generell sollte auf eine präoperative Biopsie verzichtet werden, da dieses invasive Verfahren durch Verschleppung maligner Zelle in das umliegende Gewebe die Prognose verschlechtern könnte<sup>2,9</sup>. Zu den üblicherweise zu bestimmenden Serummarkern bei Verdacht auf ein OC gehört u.a. der Tumor Serummarker CA-125<sup>2,10,11</sup>. CA-125 weist bei Patientinnen, die sich bereits in der Postmenopause befinden, eine hohe Sensitivität und Spezifität auf, jedoch zeigt es bei prämenopausalen Frauen eine geringe Spezifität, da CA-125 bspw. auch im Rahmen einer Endometriose erhöht sein kann<sup>2,11,12</sup>.

Das Staging des OC kann neben der TNM-Klassifikation, die sich auf die Tumorausdehnung, den Lymphknotenbefall und das Vorhandensein von Fernmetastasen bezieht, mit Hilfe des FIGO-Klassifikationssystem erfolgen und wird wie in Tab.2 vorgenommen<sup>2</sup>.

Der übliche Behandlungsplan des OC sieht eine zytoreduktive Operation vor, an die sich im fortgeschrittenen Stadium meist eine kombinierte Chemotherapie aus Platinderivaten und Taxanen anschließt<sup>13,14</sup>. Ein Großteil aller Patientinnen spricht auf diese Behandlung primär sehr gut an, jedoch kommt es in 70% der Fälle innerhalb von 6 - 24 Monaten zu einem Rezidiv und erklärt damit u.a. die schlechte 5-Jahre-Überlebensrate im fortgeschrittenen Stadium<sup>14,15</sup>.

**Tab.2: FIGO Klassifikationssystem<sup>2</sup>**

Stage I		Tumor auf die Ovarien beschränkt
IA		auf ein Ovar beschränkt, Kapsel intakt, Ovarialoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
IB		auf ein Ovar beschränkt, Kapsel intakt, Ovarialoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
IC		Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien
	IC1	iatrogene Kapselruptur
	IC2	präoperative Kapselruptur oder Tumor auf der Ovarialoberfläche
	IC3	maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar
Stage II		Tumor auf einem oder beiden Ovarien mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
IIA		Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben
IIB		Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
Stage III		Tumor auf einem oder beiden Ovarien mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
IIIA		retroperitoneale Lymphknotenmetastasen und/oder mikroskopische Metastasen außerhalb des kleinen Beckens
	IIIA1	ausschließlich retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
	IIIA2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
IIIB		makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und die Milz ein
IIIC		makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und die Milz ein
Stage IV		Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
IVA		Pleuraerguß mit positiver Zytologie
IVB		Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen zu außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

### 1.2 Tumorbilogie des OC

Das OC zeichnet sich durch seine Heterogenität aus, wobei sich die verschiedenen Karzinome sowohl in ihrem Verhalten als auch in ihrer Pathogenese stark voneinander unterscheiden<sup>16</sup>. Basierend auf ihrer Morphologie und Molekularpathologie lassen sich Typ-I-Karzinome und Typ-II-Karzinome voneinander unterscheiden<sup>16,17</sup>. Zu den Typ-I-Karzinomen zählen u.a. die gut differenzierten serösen, muzinösen, klarzelligigen und die endometrioiden Karzinome. Diese präsentieren sich oft schon in einem frühen Stadium, wobei die serösen Karzinome häufig eine KRAS-, ERBB2 - und BRAF-Mutation und nur selten eine p53-Mutation aufweisen<sup>16,17</sup>. Die gut differenzierten endometrioiden Karzinome zeigen u.a. Aberrationen im Wnt-Signalweg sowie somatische Mutationen von CTNNB1, PTEN und PIK3CA<sup>16,17,18</sup>. Den Typ-II-Karzinomen, die meist in einem weit fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert werden, werden u.a. die niedrig differenzierten serösen und endometrioiden Karzinome zugeteilt, die im Gegensatz zu den Typ-I-Karzinomen in 80% der Fälle eine p53-Mutation aufweisen<sup>16,17</sup>.

Über die Ursprungszellen und den Entstehungsmechanismus des OC sind in der Vergangenheit zahlreiche Theorien aufgestellt und diskutiert worden<sup>16</sup>. Sie besagen u.a., dass seröse Karzinome von Zellen des Fimbrienende der Tuba uterina abstammen, wohingegen die Entstehungstheorie der endometrioiden und klarzelligigen Karzinome vermutet, dass versprengtes Endometriumgewebe in der Tube im Rahmen der Endometriose die Ursprungszellen bilden<sup>16</sup>. Die muzinösen Karzinome stammen vermutlich von Transitionalzellen, die sich an der Kontaktstelle zwischen Fimbrien der Tuba uterina und dem Peritoneum befinden, ab<sup>16</sup>.

### 1.3 miRNA

miRNAs sind endogene, einzelsträngige, nichtkodierende RNAs, bestehend aus etwa 20-22 Nukleotiden, die in zentrale biologische Prozesse wie Zellwachstum und Differenzierung eingebunden sind<sup>19</sup>. Ihre Gene befinden sich sowohl innerhalb nichtkodierender DNA-Sequenzen, wie auch in proteinkodierenden Abschnitten der Gene<sup>20</sup>.

miRNAs werden von der Polymerase II transkribiert, gekappt und polyadenyliert, und es entsteht ein langes primäres Transkript, die pri-miRNA<sup>21</sup>. Dieses wird im Zellkern mit dem Drosha/DGCR8 Heterodimer Komplex zurechtgeschnitten, und es entsteht das Vorläufertranskript, die pre-miRNA<sup>22</sup>. Im nächsten Schritt binden Exportin 5 (XPO5) und sein katalytischer Partner Ran-GTP an die pre-miRNA und induzieren den Export der pre-miRNA vom Zellkern in das Zytosol<sup>23</sup>. Dort wird sie von der RNase III Dicer erkannt und in eine reife, aus Nukleotiden bestehende miRNA prozessiert<sup>22,24,25</sup>. Der miRNA-

Doppelstrang schließt sich daraufhin dem RISC an und es bleibt ein reifes, einzelsträngiges RNA Molekül zurück, während dessen der komplementäre Strang abgebaut wird<sup>24,25</sup>.

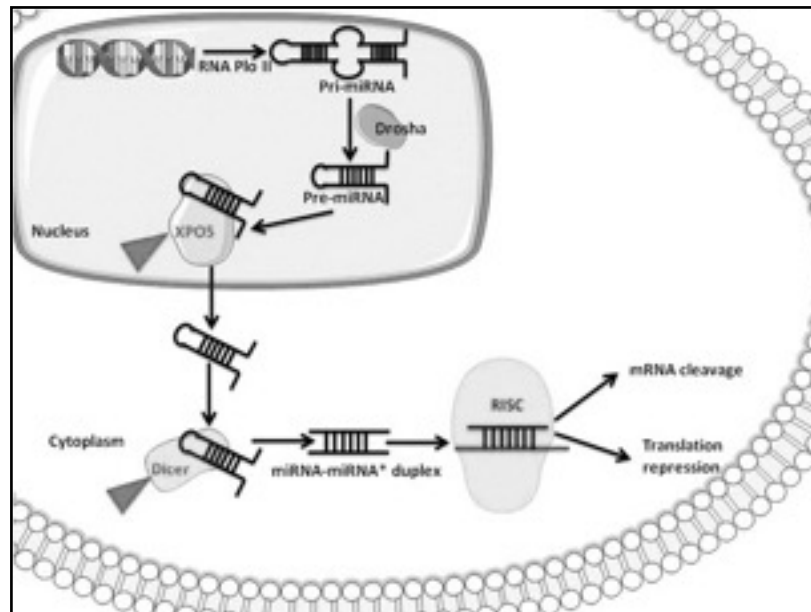


Abb.1: Biosynthese der miRNA<sup>26</sup>

miRNAs stellen Regulatoren der Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene dar, indem sie mit den Ziel-mRNAs unvollständige Basenpaarungen eingehen und auf deren Stabilität und Translation wirken können<sup>27</sup>. Abhängig davon, welche Aufgabe eine mRNA besitzt, und abhängig vom miRNA-Level, können diese somit sowohl tumorsuppressiv als auch onkogen wirken<sup>25,27</sup>. Eine einzelne miRNA kann bis zu 100 verschiedene mRNA binden und ggf. deren Abbau induzieren und somit in die Expression von Protein-kodierenden Genen eingreifen<sup>25</sup>. Schätzungsweise existieren über 1000 verschiedene miRNAs, die über 60% des menschlichen Genoms kontrollieren<sup>27</sup>. Studien belegen, dass ihre Dysregulation u.a. für schwere neurodegenerative Erkrankungen<sup>28</sup> und Stoffwechselerkrankungen<sup>29</sup> verantwortlich sein kann. Außerdem wird den miRNAs eine entscheidende Rolle im Rahmen der Entstehung von Tumorerkrankungen zugeschrieben, da miRNAs Prozesse wie Zellwachstum<sup>30,31</sup>, Migration<sup>31,32</sup> und Apoptose<sup>30,33</sup> kontrollieren und induzieren können. In der Vergangenheit zeigten Studien, dass die miRNA miR-1 tumorsuppressive Eigenschaften besitzt<sup>34-41</sup>, die Funktionalität von miR-1 im OC ist noch nicht experimentell untersucht worden.

### 1.4 Zielsetzung

Das OC ist auf dem Gebiet der onkologischen Gynäkologie das am häufigsten zum Tode führende Malignom<sup>1,2</sup>. Bemühungen, das OC frühzeitig zu diagnostizieren und neue Therapiestrategien zu entwickeln, um die Sterblichkeitsrate zu senken, waren in der Vergangenheit weitgehend erfolglos, da die molekularen und zellulären Grundlagen des OC noch recht unverstanden sind<sup>2,16</sup>.

miRNAs, kurze, einzelsträngige, nichtkodierende RNA's, werden in der Tumorgenese entscheidende Rollen zugesprochen<sup>19,30-33</sup>. Die Funktionalität von miR-1 wurde bereits in soliden Tumoren beschrieben, jedoch ist ihre Bedeutung im OC bisher noch nicht experimentell untersucht worden<sup>34-41</sup>.

Inhalt dieser Arbeit ist es miR-1 in etablierten OC-Linien zunächst transient und anschließend stabil überzuexprimieren und das Zellwachstum zu beobachten. Die molekulare Analyse und Kontrolle der Überexpression erfolgt mittels qRT-PCR. Weiterhin wird der Einfluss von miR-1 auf das Migrationsverhalten der OC-Zellen mit dem Zeiss Axio Observer untersucht.

## 2. Material

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### Allgemeine Geräte

Gerät / Verbrauchsmaterial	Hersteller
Accu jet pro	BRAND GmbH (Wertheim, Deutschland)
Analysewaage MC1 Analytic AC 210P	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Autoklav VX-150	Systemec GmbH LaborSystemtechnik (Wettenberg, Deutschland)
Becherglas: 250ml, 1000ml  3000ml	VWR (Radnor, PA, USA) Vitlab GmbH (Grossostheim, Deutschland)
Erlenmeyerkolben: 250ml, 300ml, 500ml	DURAN Group GmbH (Wertheim/ Main, Deutschland)
Flockeneisbereiter RF 0399 A	Manitowoc Deutschland GmbH (Herborn, Deutschland)
Gestelle und Racks: Acrylglasgestell 2x12 Acrylglasgestell 4x12 Acrylglasgestell 6x12 neoRack-Röhrchen-Gestell 4x4 neoRack-Röhrchen-Gestell 7x7	neoLab (Heidelberg, Deutschland)  Thermo Scientific Nalgene Labware (Waltham, MA, USA)
Handtuchpapier Zick-Zack Handtücher	Heemann OHG (Falkensee, Deutschland)
Indikatorband für Dampfsterilisation	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Klebeband Scotch Crystal Clear	3M Deutschland GmbH (Neuss, Deutschland)
Kosmetiktücher fusselfarm	Abena (Abenraa, Dänemark)
Kühlsysteme: 4°C Laborkühlschrank medline LKv 3910  -20°C MDF-U333 -80°C MDF-U53V -80°C Tiefkälte-Lagerschrank Kryotec KLS 6086-2	Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland) Sanyo (Moriguchi, Japan) Kryotec-Kryosafe GmbH (Hamburg, Deutschland)
-140°C Ultra-Low Temperature Freezer ULT10140-9-M22	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)



## Material

Laborglasflaschen: 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml, 2000ml	DURAN Group GmbH (Wertheim/Main, Deutschland)
Messzylinder: 100ml  10ml, 25ml, 50ml, 500ml, 1000ml, 2000ml	BRAND GMBH + CO KG (Wertheim, Deutschland) Isolab Laborgeräte GmbH (Wertheim, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik (Lancing, Groß-Britannien)
Parafilm „M“ Laboratory Film	Bemis (Neenah, WI, USA)
Pinzette	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Pipetten: 0,1 - 2,5µl, 0,5 - 10µl, 2 - 20µl, 20 - 200µl, 100 - 1000µl, 0,5 - 5ml Mehrkanalpipette 30 - 300µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen: 10µl SurPhob  200µl 1000µl 5000µl	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland) Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage PCB	KERN & Sohn (Balingen-Frommern, Deutschland)
Reaktionsgefäße: 0,2ml (8er SoftStrips)  0,5ml, 1,0ml, 2,0ml	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland) Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Schüttelinkubator: KS-15 CONTROL	Edmund Bühler GmbH (Hechingen, Deutschland)
Schutzhandschuhe: Peha-soft nitrile  Nitrile Risk-CHEMO-protectLab (Cytostatika Handschuhe)	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland) HANSA-TRADING HTH GmbH & Co. KG (Hamburg, Deutschland)
Serologische Pipetten: 1ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Tischabzug Scala	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG (Wangen, Deutschland)
Thermomixer 5437	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vernichtungsbeutel mit Tischständer	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

## Material

Zentrifugen: 5810 R 5415 R VWR Mini Star  Rotilabo-Mini-Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland) VWR (Radnor, PA, USA) Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen: 15ml, 50ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Vortex Mixer: peqTWIN	Peqlab (Erlangen)
Sterilbank: HERA safe	Heraeus Instruments (Hanau)

## Zellkultur-Materialien

Gerät / Material	Hersteller
CASY Model TT Cell counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CO <sub>2</sub> Inkubator MCO-18 AIC	Sanyo (Moriguchi, Japan)
Inkubationsbad 1003	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Kryo-Aufbewahrungsbox mit Deckel	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Einfrierröhrchen: Cryo.s™ 2ml	Greiner Bio-One GmbH, (Frickhausen)
Kryo-Einfriergerät: Mr. Frosty	NALGENE Labware/ Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mikroskop: Nikon TMS 302370  Zeiss Axio Observer	Nikon Corporation (Chiyoda, Japan) Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Multiwell 24-Well (für Zeiss-Mikroskop)	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Sicherheitswerkbank: HERAsafe KS9	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Stegeinsatz für Kryoboxen	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

## Material

---

TC-Flasche T25, T75, T175 TC-Platte 6-Well, 24-Well TC-Schale 3,5cm, 6cm, 10cm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
--	--------------------------------------

## qRT-PCR

Gerät / Material	Hersteller
BZO Seal Film: Adhesive Optical Film	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Nanophotometer Pearl	Implen GmbH (München, Deutschland)
peqSTAR 96X Universal	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
PCR 96-Well TW-MT-Platte, weiß	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
PCR SingleCap 8er SoftStrips 0,2ml farblos	Biozym Scientific GmbH (Wien Österreich)
Reinstwassersystem Synergy	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
T3000 Thermocycler biometra	Analyticjena (Göttingen, Deutschland)

### 2.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

#### Allgemein

Chemikalie	Hersteller
Ethanol vergällt 96%	Universitätsapotheke der EMAU Greifswald
Ethanol unvergällt	TH. GEYER (Renningen, Deutschland)
Händedesinfektion sensiva	Schülke GmbH (Norderstedt, Deutschland)

#### Zellkultur-Materialien

Chemikalie	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth Karlsruhe (Deutschland)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Geneticin (G418) Sulfat	Santa Cruz Biotechnology inc. (Dallas, TX, USA)
Gentamycin	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Hoechst 33258	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Insulin	Novo Nordisk (Bagsværd, Dänemark)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Phosphate-buffered Saline (PBS) -Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Puromycin dihydrochloride from <i>Streptomyces alboniger</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypsin/EDTA Solution (10x) 0,5%/0,2%	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)

## Material

---

Zellkulturmedien: MCDB  Medium 199 MEM (Earle´s) DMEM/F12  RPMI1640	tebu-bio Nordic Countries (Roskilde, Dänemark) Biochrom AG (Berlin, Deutschland) Gibco Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA) Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
--	--

## qRT-PCR

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DEPC-H <sub>2</sub> O	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
dNTP	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Ethanol 75%, unvergällt	TH. GEYER (Renningen, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
RiboLock	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
SensiMix SYBR Hi-ROX	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)
Trifast	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)

### 2.3 Zellen

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium</b>	<b>Zusätze</b>	<b>Hersteller</b>
OVCAR-3	RPMI1640	10% FBS 0,125% Gentamycin 0,1% Insulin	Cell Lines Service (Eppenheim, Deutschland)
SK-OV-3	DMEM / F12	5% FBS 0,125% Gentamycin	Cell Lines Service (Eppenheim, Deutschland)
TOV-112D	MCDB105 + Medium 199	15% FBS 0,125% Gentamycin	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
TOV-21G	MCDB105 + Medium 199	15% FBS 0,125% Gentamycin	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

### 2.4 Vektorlinearisierung

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
10x FastDigest® Green Buffer	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Agarose NEEQ Ultr-Qualität	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung 10mg/mL	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
10x TRIS- Borat -EDTA (TBE)-Puffer	500mM Tris 500mM Borsäure 0,1% EDTA
1x TAE-Puffer	0,1% 10x TBE

### 2.5 Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
miR-1-SLOOP	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGACATACAT	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
U6-SLOOP	GTCATCCTTGCGCAGG	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Universal-miR Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
miR-1 Forward	GCCCGCTGGAATGTAAAGAAGTATG	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
U6 Forward	CGCTTCGGCAGCACATATAAC	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
U6 Reverse	AGGGGCCATGCTAATCTTCT	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

### 2.6 Enzyme und Kits

Kit	Hersteller
SuperScript Reverse Transkriptase	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoSpin Gel and PCR Cleanup	Macherey Nagel (Düren, Deutschland)
ScaI	Thermo Fischer Scientific (Carlsbad, CA, USA)





# 3. Methoden

## 3.1 Zellbiologische Methoden

### 3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Vorbereitung der Kryokonservierung wurden die Zellen mit 2ml Trypsin pro Kultivierungsflasche gelöst und in 1ml FBS + 9ml PBS resuspendiert. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 130U/min (TOV-112D, TOV-21G) bzw. 300U/min (OV-3, SK-OV-3) wurden die Zellen pelletiert. Das Sediment wurde mit 3ml Einfriermedium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer ermittelt. Pro Kryovial wurden  $3 \times 10^6$  Zellen mit 1ml Einfriermedium versetzt und zunächst in einem von Isopropanol umgebenen Behälter bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt. Anschließend erfolgte die permanente Lagerung der niedrigen Passagen bei  $-140^{\circ}\text{C}$ . Um das Auftauen der Zellen zu ermöglichen, wurde das Vollmedium zunächst auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Die Zellen in den Kryovials wurden für 30sek in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt und anschließend mit dem zuvor erwärmten Medium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen (50ml) überführt. Daraufhin wurde die Zellsuspension für 5min bei 130U/min (TOV-112D, TOV-21G) bzw. 300U/min (OV-3, SK-OV-3) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 1ml Vollmedium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen in eine Kultivierungsflasche überführt, in die zuvor 10ml des Vollmediums vorgelegt worden waren. Daraufhin wurden die Zellen in einem Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%-igem  $\text{CO}_2$  und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Bei Subkonfluenz erfolgte die Umsetzung der Zellen und Versetzung mit frischem Vollmedium.

### 3.1.2 Kultivierung und Normalpassage von Zellen

Die Passagierung der Zellen erfolgte zweimal pro Woche, sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten. Dafür wurde das Zellmedium aus den Kultivierungsflaschen abdekantiert und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen, um überstehenden Detritus zu entfernen. Um die Zellen von ihrer Oberfläche zu lösen, wurden die Kultivierungsflaschen mit 2ml 2xTrypsin versetzt und für ca. 5min im Brutschrank inkubiert. Damit sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden ablösen, wurden die Zellen mit 10ml Stopplösung (1ml FBS+9ml PBS) abgespült und die gesamten 12ml Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (50ml) überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 300U/min (OV-3, SK-OV-3) bzw. 130U/min (TOV-112D, TOV-21G) pelletiert und das Sediment in einer entsprechenden Menge an Vollmedium resuspendiert und in

bestimmter Anteil in eine neue Kultivierungsflasche überführt, in die zuvor 10ml Vollmediums vorgelegt worden waren. Das Umsetzen erfolgte bei OVCAR-3 im Verhältnis von 1:3 bzw. 1:5, bei SK-OV-3 im Verhältnis von 1:3 bzw. 1:4 und bei TOV-112D und TOV-21G im Verhältnis von 1:6 bzw. 1:8. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 1-24 verwendet.

### 3.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels CASY TT Cell Counter

Vor der Zellzahlbestimmung wurde das Medium aus dem 6-Well bzw. 24-Well abdekantiert. Daraufhin wurde das Well mit 500µl PBS gespült und nach Hinzugabe von 500µl (6-Well) bzw. 200µl (24-Well) 2xTrypsin für 3-5min im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um die Zellen von ihrer Oberfläche zu lösen. Im Anschluss wurden die gelösten Zellen in ein Eppendorfgefäß (2ml) überführt. Der Boden des Wells wurde nochmals mit 1ml (6-Well) bzw. 800µl (24-Well) PBS gespült und ebenfalls in das Eppendorfgefäß gegeben. Unmittelbar vor der Zellzahlbestimmung wurde der CASY TT Cell Counter auf die jeweilige Zelllinie geeicht, da sich die unterschiedlichen OC-Zellen in ihrer Form und Größe unterschieden. Der CASY TT Cell Counter erlaubte die Differenzierung zwischen Zelltrümmern, toten Zellen, vitalen Einzelzellen und Zellaggregaten. Um die Messung durchführen zu können, wurden 100µl Zellsuspension in 10ml Casyton verdünnt. Daraufhin konnte auf das Gesamtvolumen der Zellsuspension bezogen die absolute Zellzahl der Probe ermittelt werden.

### 3.1.4 Transfektion

Die Transfektion ermöglicht fremdes genetisches Material in Zellen einzuführen, dies kann sowohl transient als auch stabil durchgeführt werden. Im Vergleich zur transienten Transfektion liegt bei der stabilen Transfektion die Fremd-DNA nicht extrachromosomal vor, sondern wird fest in das Genom der Zelle integriert. In einem ersten Schritt wurde der Vektor mit Hilfe des Enzym *ScaI* linearisiert, damit das lineare Plasmid mit der miR-1-Sequenz in das Genom integriert werden konnte. Die transiente Transfektion wurde im 6-Well Maßstab, die stabile Transfektion im 24-Well Maßstab durchgeführt. Am Vortag erfolgte die Aussaat der Zellen, wobei die auszusäende Zellzahl sowohl von der Größe des Wells als auch von der geplanten Inkubationsdauer abhängig war. Bei der transienten Transfektion wurden für OVCAR-3 und TOV-112D 300.000 Zellen/Well, für SK-OV-3 200.000 Zellen/Well und für TOV-21G 250.000 Zellen/Well ausgesät. Für die stabile Transfektion wurden für alle Zelllinien 10.000 Zellen/Well ausgesät. Es wurde die Trägersubstanz Lipofectamine 2000 verwendet. Das Verhältnis von DNA zu Lipofectamine 2000 betrug 1:1,5 (DNA : Lipofectamine 2000). Pro Well wurden 1,5µg DNA eingesetzt. Die

Kontrollansätze erhielten den Leervektor p.Superior.puro, die überexprimierende Zellansätze den Vektor p.miR-1. Um im Rahmen der stabilen Transfektion eine stabile Überexpression von miR-1 zu erreichen, erfolgte am folgenden Tag ein Mediumswechsel und die Zellen erhielten Puromycinhaltiges Medium, um eine Selektion derjenigen Zellen zu ermöglichen, die den Vektor bereits in ihr Genom eingebaut hatten.

**Tab.3: Transfektionsprotokoll**

6-Well/24-Well			
	DNA	Lipofectamine 2000	Medium ohne Zusatz
Ansatz A	1,5µg		0,5ml/0,25ml
Ansatz B		2,25µl	0,5ml/0,25ml
5min Inkubation, RT			
Mischen von Ansatz A und Ansatz B			
20min Inkubation, RT			
1ml/0,5ml pro Well			

Die Messung der Zellzahl für die Erstellung einer Wachstumskinetik erfolgte alle 24h für einen Zeitraum von 120h, bei den stabil überexprimierenden Zellen erfolgte die Beobachtung des Wachstumsverhaltens über einen Zeitraum von 480h. Die Probennahme erfolgte jeweils nach 48h, 72h und 96h, analysiert wurden diese mittels qRT-PCR.

### 3.1.5 Migrationsassay

Die Zellmotilität wurde mittels Scratch Assay über einen Zeitraum von 72h mit dem Zeiss Axio Observer beobachtet. Mit der Methode des live cell imaging, mit der sich Zeitrafferaufnahmen bewegender und teilender Zellen anfertigen lassen, wurden die Zellansätze zunächst in einem 24-Well mit ca. 30.000 Zellen/Well ausgesät und bei 37° und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am folgenden Tag, nachdem eine Konfluenz von ca. 80% erreicht worden war, wurde mit einer sterilen 200µl Pipettenspitze über dem einschichtigen Zellrasen eine zellfreie Fläche geschaffen, woraufhin die Motilität beobachtet und ausgewertet werden konnte. Die erste Aufnahme erfolgte zu Beginn des Experiments, die Abschlussaufnahme nach 72h. Die Auswertung erfolgte mit Zeiss ZEN pro 2012 und Microsoft Excel 2010.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 RNA Isolierung

Das Präparieren von miR-1 erfolgte mit Hilfe der Einschnitt-Flüssigphasen-Separation durch das Reagenz peqGOLD TriFast™ (PepLab), das gemäß der Angaben des Herstellers verwendet wurde. Das entstandene RNA-Pellet wurde in 25µl DEPC-Wasser gelöst und nach 5-minütiger Inkubation auf Eis bei 60°C auf dem Thermomixer erhitzt. Zur Vorbereitung auf die nachfolgende Messung der RNA Konzentration wurde die RNA anschließenden nochmals für 5min auf Eis inkubiert.

#### 3.2.2 Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte mittels photometrischer Messung durch das Nanophotometer Pearl, gemessen wurde mit einem Probevolumen von 1µl gegen das Lösungsmittel als Leerwert. Die Reinheit der Proben wurde anhand des Quotienten Absorption 260nm / Absorption 280nm bestimmt, welcher  $\geq 1,8$  betragen sollte. Somit konnten Kontaminationen, wie z.B. durch Proteine oder Phenolreste ausgeschlossen werden.

#### 3.2.3 miR-1-Detektion mittels qRT-PCR

Das reverse Transkription von RNA in cDNA ist der essentielle Schritt für die darauf folgend durchzuführende qRT-PCR, da die Polymerase der PCR lediglich DNA und nicht RNA als Substrat verwendet. In einem ersten Schritt erfolgte die Denaturation der RNA. Die reverse Transkription der miRNA erfolgte nach dem in Tab.4 abgebildetem Schema.

**Tab.4: Pipettierschema cDNA-Synthese – reverse Trankription der miRNA**

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
1µg RNA (100ng/µl)	0,7µl DEPC-H <sub>2</sub> O 1,5µl RT-Buffer 1,0µl miR-1 SLOOP 1,0µl miRNA-21 SLOOP 1,0µl U6 SLOOP 1,0µl 0,25mM dNTP 0,2µl SuperScript RT 2000U/µl 0,05µl RiboLock 40U/µl	
= 1 Ansatz	= Mastermix, Zugabe von 6,5µl pro Ansatz	= Deaktivierung der reversen Transkriptase
	30min bei 16°C 30min bei 42°C	5min bei 85°C

Nach Abschluss der Umschreibung wurde die synthetisierte cDNA mit 12,5µl Millipore H<sub>2</sub>O pro Ansatz zu einem Endvolumen von 20µl verdünnt und bei -20°C gelagert. Die qRT-PCR dient der Vervielfältigung einer definierten DNA-Sequenz. In drei aufeinanderfolgenden Phasen, welche mehrmals durchlaufen wurden, wurde die vorliegende DNA-Sequenz (Template) in jedem Zyklus verdoppelt. Zu Beginn der Reaktion wurde die dsDNA denaturiert (95°C). Somit war die DNA-Polymerase in der Lage, sich an die einzelsträngige DNA anzulagern und diese zu amplifizieren. Es folgte die Hybridisierung des spezifischen Primer an die Einzelstränge (Annealingphase). Der dritte Schritt bestand in der Elongationsphase, in welcher die Polymerase, ausgehend vom Primer, die komplementäre DNA in 5'-3'-Richtung vervollständigte. Da nun wieder dsDNA vorlag, wurden die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation in weiteren 44 Zyklen wiederholt, wodurch eine exponentielle Zunahme der DNA stattfand. Die Zunahme wurde durch den Verbrauch der zur Verfügung stehenden Reaktionsprodukte begrenzt und erreichte einen Sättigungsbereich. Das Besondere der qRT-PCR ist die Möglichkeit, die Amplifizierung in Echtzeit zu beobachten, da sich ein interkalierender SYBR-Green Farbstoff an die dsDNA anlagert. Das Fluoreszenzsignal stieg proportional zu der Menge der PCR-Produkte an. miR-1 wurde in der qRT-PCR auf die RNA U6 als Referenz und Ladungskontrolle normiert.

**Tab.5: qRT-PCR Protokoll**

	miR-1
cDNA (20µl Gesamtansatz)	2µ
Initiale Denaturierung	95°C, 5min
Denaturierung Annealing Elongation	95°C, 10sek 60°C, 20sek 72°C, 10sek } 45 Zyklen
Denaturierung	95°C, 10sek
Schmelzkurvenanalyse	65°C – 95°C, in 0,5°C - Schritten

### 3.3 Statistische Auswertung

Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert ± Standardabweichung, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0), nach Durchführung von mindestens drei unabhängigen Versuchen pro Experiment. Für die Auswertung mit Microsoft Excel 2010 wurde der Student's t-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Transiente Überexpression von miR-1 in OC-Zellen hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten

Um antiproliferative Effekte von miR-1 in OC-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem miR-1 kodierenden Vektor pmiR-1 transfiziert und das Zellwachstum über einen Zeitraum von 144h ermittelt (Abb.2).

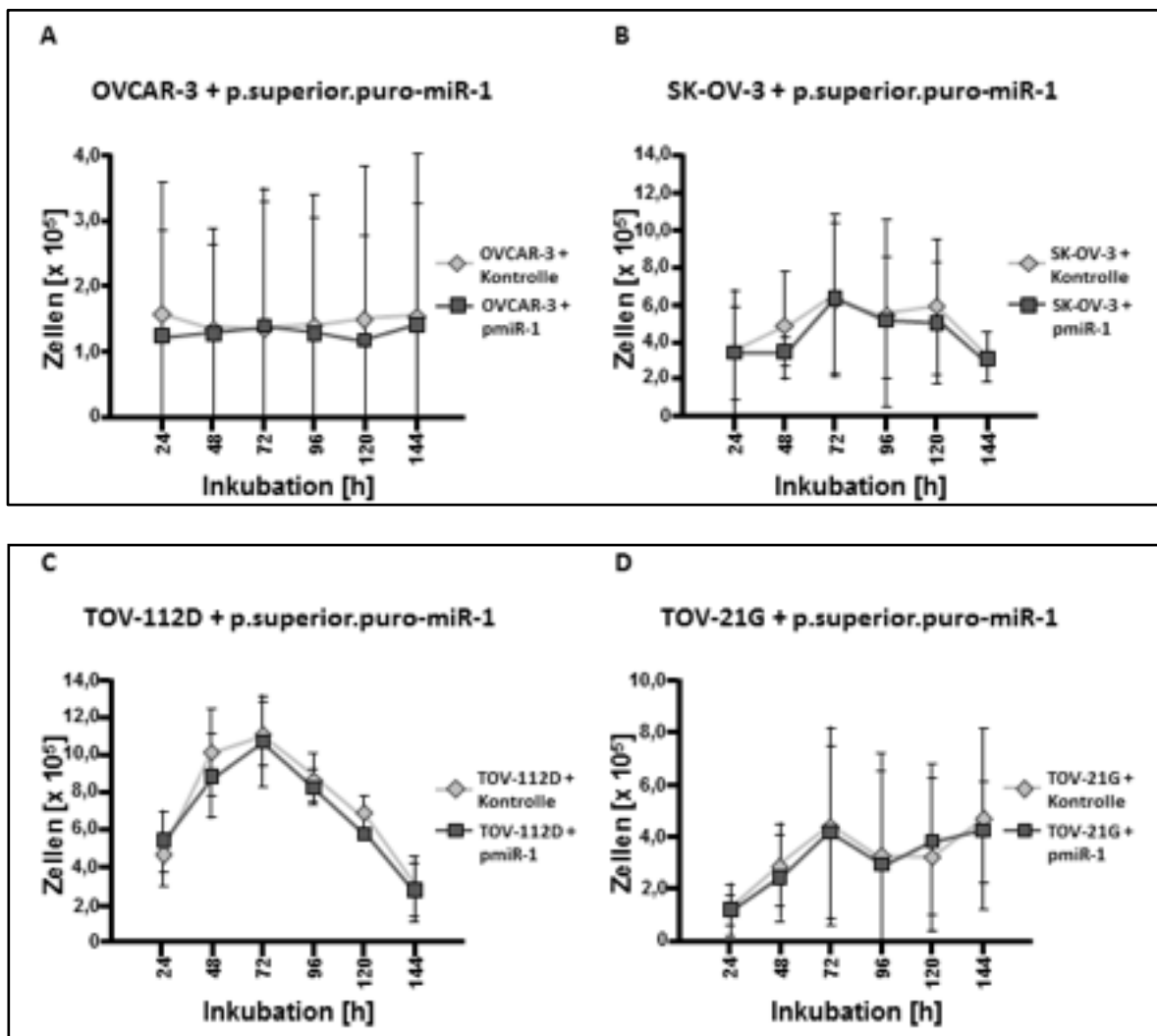


Abb.3: Transiente Überexpression von miR-1

Wachstumskinetik nach transienter Überexpression von miR-1 in Ovarialkarzinomzellen im 24-Stunden Maßstab über einen Zeitraum von 144 h. OVCAR-3 (A), SK-OV-3 (B), TOV-112D (C) und TOV-21G (D) wurden mit p.miR-1 transient transfiziert und über 144h inkubiert. Das Zellwachstum wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels CASY analysiert und festgehalten. Die Ergebnisse aus mindestens 5 unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert  $\pm$  SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*).

Das Wachstumsverhalten der transient miR-1 überexprimierenden Zellen unterschied sich nicht von dem der Kontrollzellen, in die ein Leervektor eingebracht wurde. OVCAR-3 (Abb.2A) und SK-OV-3 (Abb.2B) zeigten keine oder nur sehr geringe Proliferation. Das Wachstum von TOV-112D (Abb.2C) nahm zunächst zu, ging jedoch ab dem dritten Inkubationstag wieder zurück. TOV-21G Zellen (Abb.2D) hingegen zeigten eine geringe Proliferation über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die äußerst geringe Proliferation in allen Ansätzen ließ vermuten, dass die Zellen durch die Transfektionsbedingungen erheblichem Stress ausgesetzt worden waren. Da zudem der Beobachtungszeitraum bei transient transfizierten Zellen vergleichsweise kurz ist, sollten die Versuche in nachfolgenden Experimenten mit stabilen Zelllinien durchgeführt werden, die miR-1 dauerhaft überexprimieren.

## 4.2 Generierung und Charakterisierung stabil miR-1 überexprimierender

### OC-Zellen

Bei der transienten Transfektion wird der Vektor nicht in das Genom der Zelle integriert. Stabile Zelllinien dagegen werden durch ein im Vektor kodiertes Resistenzgen daraufhin selektioniert, dass das Plasmid in das Genom inseriert wird und somit stabil an die Tochterzellen weitergegeben werden kann. Die Kontrollzellen enthielten einen Leervektor, der lediglich die Resistenz gegenüber Puromycin trug, aber kein miR-1 exprimierte. Die Sensitivität der Zellen gegenüber dem Antibiotikum Puromycin wurde durch Titration festgestellt, um eine möglichst geringe aber letale Konzentration des Antibiotikums einzusetzen. Hierfür wurden die Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Puromycin inkubiert und das Zellwachstum über einen Zeitraum von 120h ermittelt. Die Titration ergab für die Zellen von OVCAR-3 eine minimal-letale Konzentration von 0,15µg/ml und für die anderen drei Zelllinien eine Konzentration von 0,3µg/ml (Tab.6).

**Tab.6: Titration der minimal-letalen Konzentration**

Zellen	OVCAR-3	SK-OV-3	TOV-112D	TOV-21G
Konzentration	0,15 µg/ml	0,3 µg/ml	0,3 µg/ml	0,3 µg/ml

Zur Detektion einer stabilen Überexpression von miR-1 wurde die miRNA-Konzentration mittels qRT-PCR zu drei Zeitpunkten bestimmt (Abb.3). In allen stabilen Zelllinien konnten erhöhte intrazelluläre miR-1 Konzentrationen nachgewiesen werden. OVCAR-3 (Abb.3A) zeigte ein 20 bis 30-fach erhöhte miR-1 Expression im Vergleich zu den

Kontrollzellen. Die miR-1 Levels in SK-OV-3 (Abb.3B) stiegen auf das 500-fache an. Die Überexpression der Zellen von TOV-112D (Abb.3C) reichte von 20 bis auf das 80-fache und TOV-21G (Abb.3D) exprimierte miR-1 60 bis 100-fach höher als die entsprechenden Kontrollzellen.

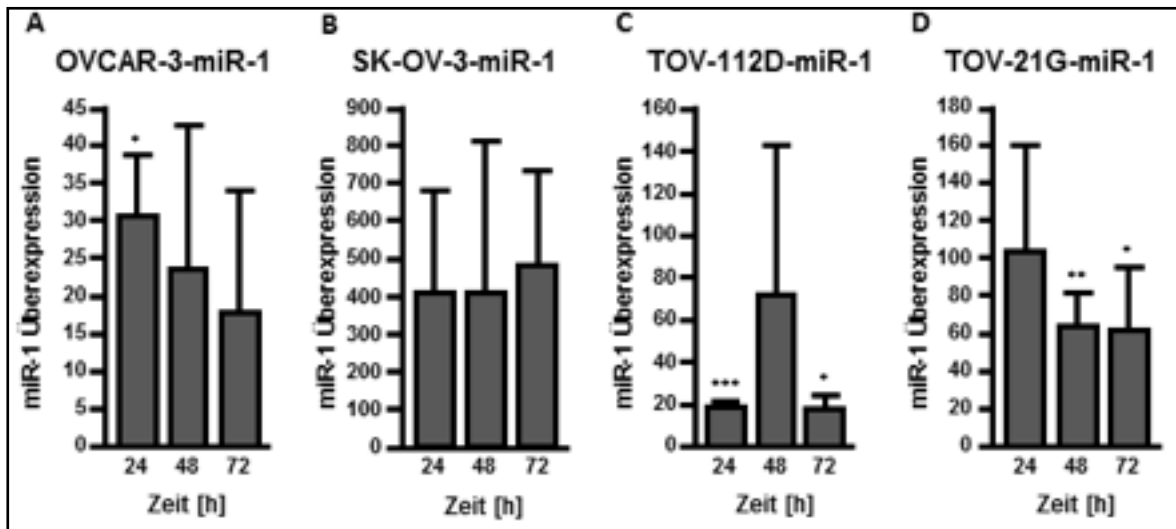


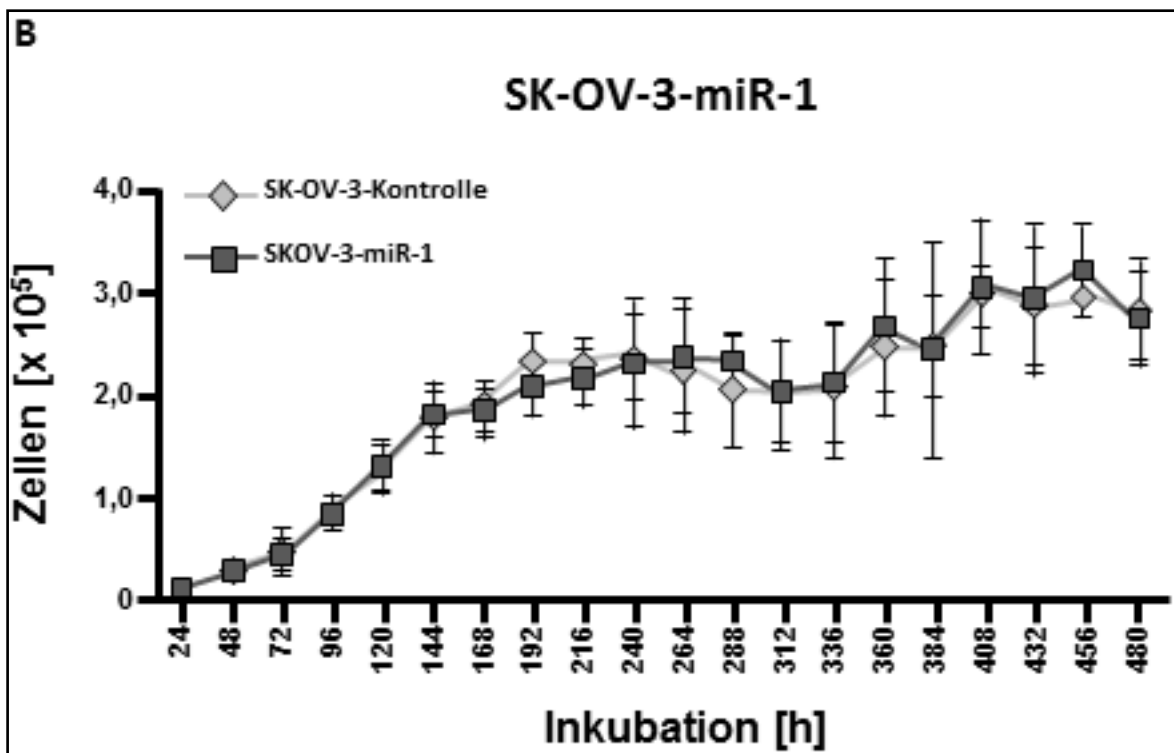
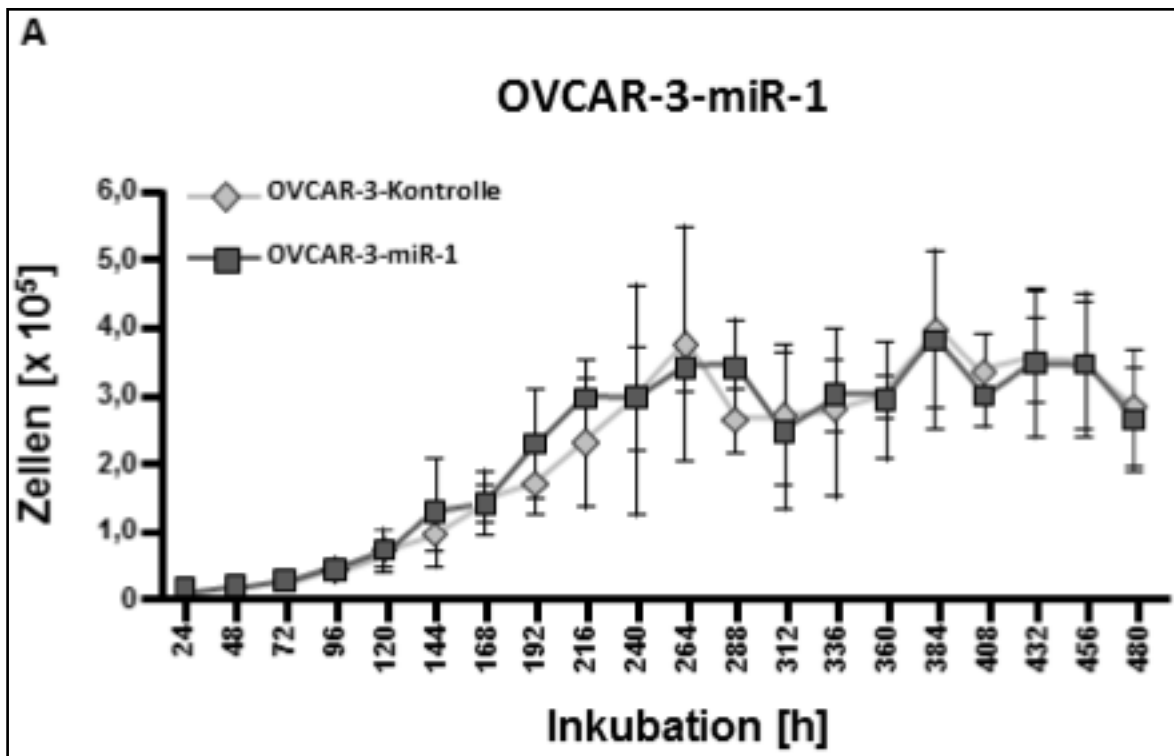
Abb.4: Detektion der Überexpression von miR-1 mittels qRT-PCR

Detektion der stabilen Überexpression von miR-1 in den Zelllinien OVCAR-3 (A), SK-OV-3 (B), TOV-112D (C) und TOV-21G (D). Die miR-1 Überexpression wurde mittels qRT-PCR zu drei Zeitpunkten bestimmt. Es wurde ein RNA spezifischer Primer verwendet. Die Ergebnisse aus mindesten 5 unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert  $\pm$ SD der relativen miR-1-Expression dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*).



### **4.3 Stabile Überexpression von miR-1 in OC-Zellen hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten**

Die transiente Transfektion der OC-Zelllinien mit miR-1 erschien ungeeignet, um den Einfluss der miRNA auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit Zellen, die miR-1 stabil überexprimierten, wiederholt. Das Zellwachstum wurde über einen deutlich längeren Zeitraum von 480h analysiert und die lebend Zellzahl mittels CASY ermittelt. Aufgrund der langen Inkubation wurden nur 10.000 Zellen/Well ausgesät, was in einer reduzierten Wachstumsrate resultierte. Das Wachstumsverhalten aller vier stabilen Zelllinien unterschied sich nicht von dem der kontroll-transfizierten Zellen, in die ein Leervektor eingebracht wurde. Während des gesamten Zeitraums konnte kein signifikanter Unterschied zwischen miR-1-überexprimierenden und Kontrollzellen festgestellt werden. Das gleichartige Zellwachstum betraf sogar Schwankungen im Laufe der 480-stündigen Inkubationen. Diese Schwankungen der Zellzahl korrelierten nicht mit dem Mediumswechsel, der bei allen Zellansätzen drei bis vier Mal durchgeführt worden war. So zeigten bspw. OVCAR-3 (Abb. 4A) und SK-OV-3 (Abb.4B) eine Abnahme der Zellzahl nach 264h, die nach 312h wieder anzusteigen begann. Das Zellwachstum von TOV-112D (Abb.4C) nahm ebenfalls nach 264h kurzzeitig ab, stieg jedoch nach 288h wieder an. Die Zellzahl von TOV-21G (Abb.4D) nahm über den gesamten Zeitraum zu. Nach 480h erreichten alle Zellen die stationäre Phase.



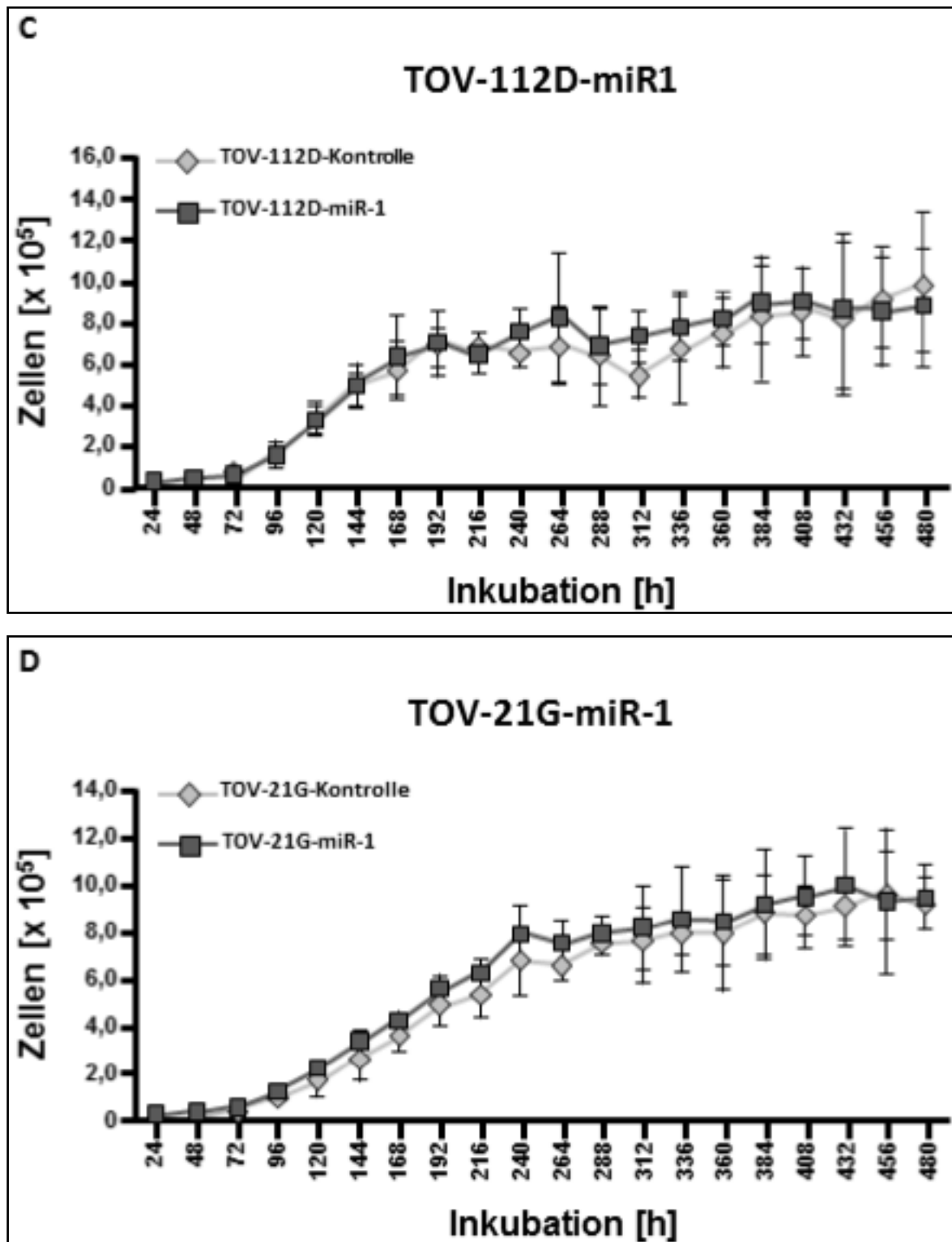


Abb.5: Stabile Überexpression von miR-1

Wachstumskinetik nach stabiler Überexpression von miR-1 in OC-Zellen im 24-Stunden Maßstab über einen Zeitraum von 480h. OVCAR-3 (A), SK-OV-3 (B), TOV-112D (C) und TOV-21G (D) wurden mit p.miR-1 stabil transfiziert und über einen Zeitraum von 480h inkubiert. Das Zellwachstum wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels CASY analysiert und festgehalten. Die Ergebnisse aus mindestens 5 unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert  $\pm$ SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*).

### **4.4 Stabile Überexpression von miR-1 in OC-Zellen hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten**

Zellmotilität ist ein Charakteristikum von lebenden Zellen und wichtiger Bestandteil der Progression maligner Zellen. Um den nach Literaturmeinung hemmenden Einfluss von miR-1 auf die Zellbeweglichkeit zu untersuchen, wurden die stabilen Zelllinien im Scratch Assay über einen Zeitraum von 72h analysiert. In allen Ansätzen zeigte sich, dass es bei der Zellmigration keinen signifikanten Unterschied zwischen stabil miR-1 überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen (Abb.5) gab. Bei OVCAR-3 (Abb.5A) und SK-OV-3 (Abb.5B) migrierten die stabilen miR-1-Zelllinien während der ersten 60h zwar langsamer in die zellfreie Fläche als die Kontrollzellen, nach 72h war jedoch bei beiden Zelllinien 100% des Migrationsareal bewachsen. Bei TOV-112D-miR-1 (Abb.5C) zeigt sich, verglichen mit den Kontrollzellen, kein Unterschied in der Zellbewegung, die Migrationsanalysen waren nahezu identisch. Die TOV-21G-miR-1 Ansätze zeigten im Vergleich zu den Kontrollansätzen (Abb.5D) nach 72h keine vollständige Migration des Migrationsareals. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

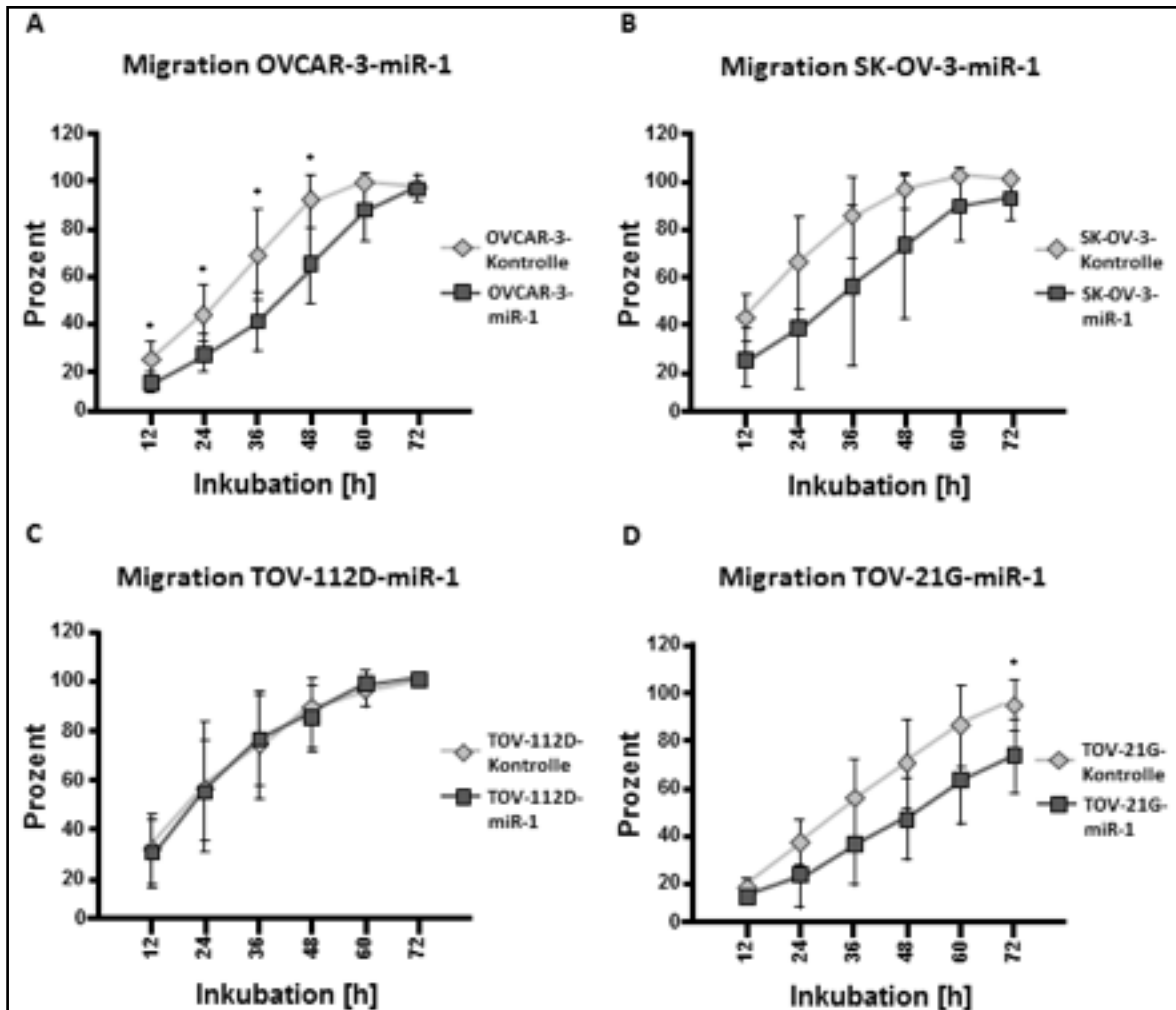


Abb.6: Migrationsassay

Migrationsverhalten nach stabiler Überexpression von miR-1 in OC-Zellen im 12-Stunden-Maßstab über einen Zeitraum von 72h. OVCAR-3 (A), SK-OV-3 (B), TOV-112D (C) und TOV-21G (D) wurden im Scratch-Assay analysiert. Die Ergebnisse aus mindestens 7 unabhängigen Versuchen wurden als Mittelwert  $\pm$  SD der besiedelten Fläche dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

### 5. Diskussion

Trotz intensiver Forschungstätigkeiten gibt es noch heute keine befriedigenden diagnostischen und therapeutischen Verfahren, die das OC frühzeitig zu diagnostizieren und kurieren vermögen<sup>42</sup>. Obwohl die Therapie des fortgeschrittenen OC radikale Stagingoperationen und adjuvante Kombinationschemotherapeutika, u.a. Paclitaxel und Carboplatin, vorsieht, ist die Prognose weiterhin schlecht<sup>5,43</sup>.

Die Entstehung von Tumoren wird maßgeblich mit der Änderung der Aktivität von Tumorsuppressoren und Onkogenen in Verbindung gebracht<sup>16,44-45</sup>. miR-1 wird gemäß Literatur in soliden Tumoren mit tumorsuppressiven Eigenschaften beschrieben, und viele Studien zeigen, dass miR-1 im Vergleich zu gesundem Gewebe in entartetem Gewebe herunterreguliert ist. Beispiele dafür stellen u.a. Karzinome von Kopf-Hals-Region<sup>34,39</sup>, Prostata<sup>35</sup>, Niere<sup>36</sup>, Blase<sup>37</sup>, Lunge<sup>40</sup>, Knochen<sup>38</sup>, Darm<sup>46</sup> und Endometrium<sup>41</sup> dar. In all diesen soliden Tumoren führt eine erhöhte Expression von miR-1 zu einer Hemmung des Zellwachstums. Des Weiteren führt die Überexpression von miR-1 in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zu einer Hemmung der Invasion und der Migration, außerdem zur Aktivierung des Zell-Zyklus-Arrest und der Apoptose<sup>34,39</sup>. Ähnliche Ergebnisse nach Überexpression von miR-1 zeigen sich bei Karzinomen der Harnblase, der Lunge und dem Osteosarkom, bei denen die Zellbeweglichkeit durch miR-1 gehemmt und Apoptose eingeleitet wird<sup>37-38,40</sup>.

In einer Studie zum Magenkarzinom wurden die tumorsuppressiven Eigenschaften von miR-1 entkräftet, da Untersuchungen zeigten, dass trotz einer Überexpression von miR-1 eine höhere Tendenz zu Lebermetastasen bestand und höhere miR-1-Spiegel im Gewebe mit einer schlechteren Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung standen<sup>47</sup>.

Zur Funktionalität von miR-1 im OC liegen bisher noch keine experimentellen Untersuchungen vor. Angesichts einer ersten Studie unserer Arbeitsgruppe mit Patientenproben aus dem OC vermuteten wir, dass eine erhöhte Expression von miR-1 mit einem Tumorprogress in Verbindung stehen könnte<sup>48</sup>. Die Messung der Patientenproben ergab höhere miR-1-Spiegel in OC-Rezidiven im Vergleich zu den OC-Proben der Erstdiagnose<sup>48</sup>. Möglicherweise erfüllt miR-1 nicht in jeder malignen Tumorerkrankung tumorsuppressive Eigenschaften und muss für jede Tumorentität isoliert betrachtet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde miR-1 in Zelllinien transient und stabil überexprimiert und mögliche Effekte auf Wachstums- und Migrationsverhalten genauer

beleuchtet. Die transiente Überexpression von miR-1 in OC-Zellen zeigte sehr variable und somit keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die miR-1 überexprimierenden OC-Zellen wiesen kaum oder überhaupt kein Zellwachstum auf. Die transiente Transfektion schien einen erheblichen Stressfaktor für die einzelne Zelle darzustellen und deren Physiologie stark zu beeinflussen, dies spiegelt sich vermutlich in den Ergebnissen wieder.

Da diese Methode nicht geeignet war, den Einfluss von miR-1 auf OC-Zellen zu untersuchen, wurden stabil miR-1 überexprimierende Zellen hergestellt und in den folgenden Versuchen eingesetzt. Bei der stabilen Transfektion wurde die für miR-1 codierende Sequenz stabil in das Genom der Zelle integriert und bei jeder Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben. Im Zusammenhang mit der transienten Transfektion ging das entsprechende genetische Material innerhalb weniger Tage wieder verloren. Der Vektor, den wir für die Generierung der stabilen Zelllinien verwendeten, enthielt eine resistenzcodierende Sequenz gegen das Antibiotikum Puromycin und gewährleistete eine zuverlässige Selektion der Zellen, die den Vektor mit dem entsprechenden genetischen Material zuvor in ihr Genom integriert hatten. Das Wachstumsverhalten konnte nun über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Die Wachstumskinetiken aller Zelllinien, sowohl in den Kontrollzellen, als auch in den transfizierten Zellen, wiesen keinen Unterschied im Wachstumsverhalten der Zellen auf. Die Ergebnisse wurden dadurch gestützt, dass mittels qRT-PCR eine starke Überexpression von miR-1 in den transfizierten Zellen detektiert wurde und unterstützt die These, dass der miR-1-Regelkreis im OC nicht mehr funktionstüchtig ist und miR-1 nicht das Zellwachstum inhibiert.

Für die Messung des Zellwachstums stehen unterschiedliche Methoden auf Basis unterschiedlicher Messprinzipien zur Verfügung. Das MTT-Assay ist ein Messverfahren, das auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalz, mit welchem die Zellen zuvor angefärbt und bis zu 4h inkubiert werden, zu Formazan beruht und somit die metabolische Aktivität einer Zelle nutzt, um indirekt auf die Lebendzellzahl zu schließen<sup>49</sup>. Durch kolorimetrische Messung bei 550nm mittels eines Multiwell-Spektrophotometer kann der Farbstoff quantifiziert werden<sup>49</sup>. Ein Proliferationsassay, das auf der metabolischen Aktivität von Zellen beruht, kann ein falsch niedriges Ergebnis erzeugen, wenn miR-1 die mRNA eines metabolisch aktives Enzym hemmt und somit gleichzeitig dessen Aktivität senkt. Die absinkende Aktivität des Enzyms würde eine Abnahme des Zellwachstums suggerieren, obwohl die Zellen möglicherweise proliferieren. Diese Problematik würde dazu führen, dass das Ergebnis des Proliferationsassay verfälscht würde. miR-1 wird von einem bicistronischem Gen kodiert und somit von einem bicistronischen Vorläufertranskript abgeleitet, welches neben der Sequenz von miR-1 auch die Sequenz der miRNA-133

enthält<sup>50</sup>. miRNA-133 wird mit dem Energiestoffwechsel in Verbindung gebracht, wobei sie bspw. die insulinabhängige Glukoseaufnahme in Kardiomyozyten senkt<sup>51</sup>. Da miR-1 und miRNA-133 auf einem bicistronischen Gen<sup>50</sup> kodiert sind, und somit gemeinsam reguliert werden, könnte dies bedeuten, dass miR-1 ebenfalls am Energiestoffwechsel beteiligt ist<sup>52</sup>. Als potentieller Regulator des Energiestoffwechsels kann dies auch die hohen Expressionsraten in Muskelzellen erklären<sup>50</sup>. Aufgrund des Umstandes, dass miR-1 möglicherweise eng in die Regulation des Metabolismus mit eingebunden ist, kam dieses Messprinzip in dieser Arbeit somit nicht zum Einsatz.

In zwei unabhängigen Studien wurde die mögliche Funktion von miR-1 auf miRNA-1 exprimierende Karzinomzellen der Mamma in Bezug auf Voranschreiten und die Prognose der Erkrankung untersucht<sup>53,54</sup>. Die erste Studie zeigte auf, dass miR-1 in Mammakarzinomzellen herunterreguliert war und deren Überexpression die Proliferation und Beweglichkeit der Zellen herabsetzte und dagegen die Apoptose förderte<sup>53</sup>. Die zweite Studie wies nach, dass eine erhöhte Expression von miR-1 vor allem mit einem Fortschreiten der Krankheit, einem höheren T-Wert, positiven Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasierung und einer höheren Rezidivneigung assoziiert war<sup>54</sup>. Zusammenfassend stellte sie miR-1 als einen negativen Prognosefaktor für das Mammakarzinom dar<sup>54</sup>. Die Betrachtung der Nachweismethode zeigt, dass sich die erste Studie der MTT-Assay bediente, während dessen die letztere Studie miR-1 mittels Gewebemikroarray und In-situ-hybridisierung nachwies<sup>53,54</sup>.

Die genannte Problematik bestand bei der Verwendung des CASY Cell Counter nicht, denn dessen Messprinzip ermöglicht die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen und somit die direkte Bestimmung der Lebendzellzahl einer Zellsuspension bezogen auf das Gesamtvolumen, während der mögliche störende Einfluss von miR-1 auf den Stoffwechsel umgangen wird.

Die qRT-PCR ist die gängige Methode, miRNAs nachzuweisen<sup>55</sup> und zeigte in unseren Experimenten eine starke Überexpression von miR-1 in den miR-1 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die PCR ist ein schnelles und sehr sensitives Verfahren, das es ermöglicht, definierte DNA exponentiell zu vervielfältigen und basiert auf den Grundlagen der enzymatischen Replikation von Nukleinsäuren<sup>55,56</sup>. Die hohe Sensitivität des auf qRT-PCR basierenden Messverfahrens erklärt die hohen SD in Abb.2.

In dieser Arbeit konnten die tumorsuppressiven Eigenschaften von miR-1 in OC-Zellen noch nicht bestätigt werden. In der Vergangenheit zeigten Studien, dass tumorsuppressiv wirkende miRNAs die Migration und Invasion von Zellen hemmen können. So inhibiert



eine Überexpression von miRNA-145 in Gewebeproben und Zelllinien des Multiplen Myeloms die Migration und Invasion dieser malignen Zellen<sup>57</sup>. In einer weiteren Studie inhibierte die Überexpression von miRNA-205 die Invasion in den Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231<sup>58</sup>. Auch miRNA-1 zeigte in experimentellen Untersuchungen zu Urothelkarzinomen der Blase, Lungenkarzinomen und Osteosarkomen nicht nur eine Hemmung des Zellwachstums, sondern auch der Migration und der Invasion der malignen Zellen<sup>37-38,40</sup>.

Zur Funktionalität von miR-1 bezüglich ihres Einfluss auf die Fortbewegungsfähigkeit von OC-Zellen liegen noch keine experimentellen Studien vor. Aus diesem Grund verwendeten wir die stabil miR-1 überexprimierende OC-Zellen und überprüften die mögliche zelluläre Funktion von miR-1 in einem Scratch-Assay. Aufgrund der Erfahrung des vorangegangenen Experiments, dass die transiente Transfektion einen zu großen Stressfaktor für die Zellen darstellen könnte, führten wir dieses Experiment von Beginn an mit den stabilen Zelllinien durch.

Das in vitro Scratch Assay ist das gängige Verfahren, um die Zellmigration zu erfassen, die ein komplexes Phänomen darstellt und in die zahlreiche zelluläre Prozesse involviert sind<sup>59</sup>. Nach der Verletzung der Integrität des Zellrasens mit einer Pipettenspitze sezernieren die Zellen als Reaktion auf die Unterbrechung des Zell-Zell-Kontakts Wachstumsfaktoren und stimulieren damit sowohl das Zellwachstum also auch die Migration der Zellen<sup>59-60</sup>. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren wie bspw. EGF und HGF nicht nur die Zellen zur Proliferation anregen, sondern die Zellen auch stimulieren zu migrieren<sup>61</sup>.

Wir wählten eine Inkubationsdauer von 72h, damit die freie Fläche vollständig besiedelt werden konnte. Da sowohl der Kontrollansatz von OVCAR-3 (Abb.4A) als auch von SKOV-3 (Abb.4B) die Fläche zunächst schneller zu migrieren schien, erweckte dies zunächst den Eindruck, dass eine erhöhte Expression von miR-1 die Migration inhibiere. Jedoch hatten die miR-1 überexprimierenden Ansätze nach 72h ebenfalls die gesamte Fläche besiedelt. Auch in diesem Experiment konnten die tumorsuppressiven Eigenschaften von miR-1 nicht nachgewiesen werden.

Neben technischen Unzulänglichkeiten der Auswertung des mikroskopisch erfassten Zellrasens spielen auch auf zellulärer Ebene Faktoren eine Rolle, die eine verlässliche Beurteilung des Scratch Assay erschweren<sup>62</sup>. So können bspw. wachstumsgehemmte Zellen nach Übergang in die Seneszenz oder die Beschädigung der zellulären Umgebung durch den Scratch die Migration behindern<sup>62</sup>. Die Sezernierung der Wachstumsfaktoren führt nicht nur dazu, dass die Zellen die freie Fläche migrieren, sondern sie stimulieren auch die Zellteilung, wodurch die freie Fläche ebenfalls besiedelt wird<sup>59,60</sup>. Insbesondere da miR-1 in

den eingesetzten Zellsystemen keine Inhibition der Proliferation bewirkt, darf dieses Ereignis nicht vernachlässigt werden.

Obwohl die zugrundeliegende Maschinerie noch nicht verstanden wird, weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass miR-1 in OC-Zelllinien ihre Funktion als Tumorsuppressor verloren hat. Die eingesetzte Methode zum Nachweis von miRNA ermöglichte nur die Detektion reifer miR-1<sup>63</sup>. Daher kann der Verlust der Funktion von miR-1 nicht durch ein fehlerhaftes Processing der miRNA selbst verursacht sein. Es liegt daher nahe, dass durch miR-1 gesteuerte Signale und Effektorkaskaden in OC-Zellen nicht voll funktionsfähig sind. Offen und zu untersuchen bleibt, an welcher Schnittstelle des nachgeschalteten Signalwegs möglicherweise ein Defekt eingetreten ist. Dies könnte einen potenten und gezielten Angriffspunkt für Chemotherapeutika oder andere zielgerichtete Therapeutika darstellen und die therapeutischen Aussichten des OC verbessern. Eine zielgerichtete Therapie, die auf das miR-1-Molekül selbst abzielt, erwies sich als nutzlos, da, wie in dieser Arbeit gezeigt, miR-1 keinen direkten Effekt auf das Wachstums- und Migrationsverhalten der OC-Zellen zeigt.

Neben den unzureichenden Therapieoptionen, die uns für die Behandlung des OC zur Verfügung stehen, kommt hinzu, dass die Möglichkeiten einer frühzeitigen Diagnosestellung ebenfalls limitiert sind<sup>2-4</sup>. Dies liegt u.a. daran, dass das OC oft symptomlos beginnt und verläuft<sup>2-4</sup> und uns heute noch keine gängige Methode eines generellen Screenings des OC zu Verfügung steht<sup>5</sup>. Dies macht es umso wichtiger, messbare Parameter in der Tumordiagnostik und im Tumorverlauf zu etablieren, die auf das OC hindeuten können. In dieser Hinsicht gab es in der Vergangenheit zahlreiche Versuche, einen informativen, im Blut detektierbaren Biomarker zu finden, und miRNAs rückten aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften immer mehr in den Fokus der Wissenschaft<sup>64</sup>. miRNAs befinden sich allgegenwärtig in Blut und dessen Bestandteilen, u.a. in Erythrozyten, Thrombozyten und im Blutplasma<sup>65</sup>, aber auch im Urin und anderen Körperflüssigkeiten sind miRNAs detektierbar<sup>64</sup>. miRNAs zeichnen sich im Plasma dadurch aus, dass sie sehr stabil, unabhängig von niedrigen und hohen pH-Werten, zu hohen Temperaturen und langen Lagerungszeiten sind<sup>64-65</sup>. Vermutlich wirken miRNAs ihrer eigenen Degradation dadurch vor, dass sie in kleine Vesikeln verpackt sind oder sich mit dem RNA-Bindeprotein Argonaute2 zusammenlagern<sup>66</sup>.

Neue Technologien ermöglichen inzwischen, die Beziehung zwischen miRNAs und malignen Tumoren zu erforschen, indem das gesamte Expressionsprofil der nichtkodierenden miRNAs untersucht wird<sup>25</sup>. In einer Studie mit Patienten mit

Kolonkarzinom konnten spezifische miRNA-Expressionsprofile aufgezeigt werden. Sie differenzierten, ob es sich bei den Malignomen um kolorektale Rezidive in Lymphknoten und Leber oder um eine Kolorektale Metastasierung bei Primärtumor in der Leber handelte<sup>68</sup>.

Im Rahmen einer ersten Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass die Höhe des Expressionsniveaus von miR-1 in etablierten OC-Zelllinien mit den Wachstumsraten der Karzinomzellen korrelierte<sup>48</sup>. Des Weiteren wiesen OC-Rezidive aus Patientenproben höhere miR-1-Konzentrationen auf als die von Primärkarzinomen der Patientenproben<sup>48</sup>. In Zukunft kann miR-1 im Rahmen der OC-Diagnostik als Marker für den Tumorprogress im OC eine entscheidende Rolle spielen.

Obwohl die tumorsuppressiven Eigenschaften von miR-1 in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnten und miR-1 nicht direkt als therapeutische Option in Frage kommt, so bleibt die Frage, an welcher Schnittstelle im nachgeschalteten Signalweg ein Defekt eingetreten ist, um in Zukunft gezielter gegen das OC intervenieren zu können. Auch die Aussicht die gewonnenen Zellkulturdaten aus dieser Arbeit in Folgeversuchen mit Patientenproben zu untermauern, wäre für das Verständnis der zellulären Maschinerie des OC von Bedeutung.

### 6. Zusammenfassung

Das OC ist trotz intensiver Forschungstätigkeiten auch heute noch schwierig rechtzeitig zu diagnostizieren und im Anschluss an die Diagnose nicht befriedigend zu therapieren<sup>42</sup>.

miRNAs, einzelsträngige, nicht kodierende Ribonukleinsäuren und Regulatoren der Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene<sup>27</sup>, werden maßgeblich mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht<sup>30-33</sup>. miR-1 wurde in der Vergangenheit wiederholt als Tumorsuppressor charakterisiert<sup>34-41</sup>, jedoch gab es bisher noch keine experimentelle Studie zur möglichen Funktionalität von miR-1 im OC.

Während die transiente Überexpression von miR-1 in einem ersten Versuch kein reproduzierbares Ergebnis lieferte und somit noch keine Aussage bezüglich der Funktion von miR-1 im OC zuließ, wurden stabil miR-1 überexprimierende Zelllinien generiert.

Hier konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von miR-1 nicht mit geringem Zellwachstum korreliert. Darüber hinaus wurde in folgenden Versuchen die Zellmotilität der miR-1 überexprimierenden OC-Zellen mittels Scratch Assays überprüft. Es zeigte sich auch hier keine Inhibition der Migrationsfähigkeit der Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass miR-1 ihre Funktion als Tumorsuppressor im OC verloren hat. Der Grund dafür liegt womöglich in einer nachgeschalteten Signalkaskade, deren Dysregulation es zu klären gilt. Dies könnte dazu beitragen, die molekulare Maschinerie des OC zu verstehen und neue Therapieoptionen des OC zu entwickeln.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136: E359-386, 2015.
2. Foti PV, Attinà G, Spadola S, Caltabiano R, Farina R, Palmucci S, Zarbo G, Zarbo R, D'Arrigo M, Milone P, Ettorre GC: MR imaging of ovarian masses: classification and differential diagnosis. *Insights Imaging* 7: 21-41, 2016.
3. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: Cancer Statistics 2010. *CA Cancer J Clin* 60: 277-300, 2010.
4. Banno K, Yanokura M, Iida M, Adachi M, Nakamura K, Nogami Y, Umene K, Masuda K, Kisu I, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E and Aoki D: Application of microRNA in diagnosis and treatment of ovarian cancer. *Biomed Res Int* 2014: 232817, 2014.
5. Burges A, Schmalfeldt B: Ovarian Cancer: Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl Int* 108: 635-641, 2011.
6. Holschneider CH, Berek JS: Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 19: 3-10, 2000.
7. Böcker W: WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics. *Verh Dtsch Ges Pathol* 86: 116-119, 2002.
8. Kinkel K, Lu Y, Mehdizade A, Pelte MF, Hricak H: Indeterminate ovarian mass at US: incremental value of second imaging test for characterization—meta-analysis and Bayesian analysis. *Radiology* 236: 85-94, 2005.
9. Suh-Burgmann E, Kinney W: The Value of Ultrasound Monitoring of Adnexal Masses for Early Detection of Ovarian Cancer. *Front Oncol* 10;6:25, 2016.
10. Holcomb K, Vucetic Z, Miller MC, Knapp RC: Human epididymis protein 4 offers superior specificity in the differentiation of benign and malignant adnexal masses in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 205: 358.e 1-6, 2011
11. Bandiera E, Romani C, Specchia C, Zanotti L, Galli C, Ruggeri G, Tognon G, Bignotti E, Tassi RA, Odicino F, Caimi L, Sartori E, Santin AD, Pecorelli S, Ravaggi A: Serum human epididymis protein 4 and risk for ovarian malignancy algorithm as new diagnostic and prognostic tools for epithelial ovarian cancer management. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 2496-2506, 2011.
12. Malkasian GD Jr, Knapp RC, Lavin PT, Zurawski VR Jr, Podratz KC, Stanhope CR, Mortel R, Berek JS, Bast RC Jr, Ritts RE: Preoperative evaluation of serum CA 125 levels in premenopausal and postmenopausal patients with pelvic masses:

- discrimination of benign from malignant disease. *Am J Obstet Gynecol* 159: 341-346, 1988.
13. Covens A, Carey M, Bryson P, Verma S, Fung Kee Fung M, Johnston M: Systematic review of first-line chemotherapy for newly diagnosed postoperative patients with stage II, III, or IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 85: 71-80, 2002.
  14. Koussounadis A, Langdon SP, Um I, Kay C, Francis KE, Harrison DJ, Smith VA: Dynamic modulation of phosphoprotein expression in ovarian cancer xenograft models. *BMC Cancer* 16: 205, 2016
  15. Moss C, Kaye SB: Ovarian cancer: progress and continuing controversies in management. *Eur J Cancer* 38: 1701-1707, 2002.
  16. Kurman RJ, Shih IeM: The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* 34: 433-443, 2010.
  17. Shih IeM, Kurman RJ: Ovarian tumorigenesis; a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 164: 1511-1518, 2004.
  18. Cho KR, Shih IeM: Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* 4: 287-313, 2009.
  19. Jansson MD, Lund AH: MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* 6: 590-610, 2012.
  20. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A: Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902-1910, 2004.
  21. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060, 2004.
  22. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN: The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18: 3016-3027, 2004.
  23. Kim VN: MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 14: 156-159, 2004.
  24. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297, 2004.
  25. Acunzo M, Romano G, Wernicke D and Croce CM: MicroRNA and cancer - A brief overview. *Adv Biol Regul* 57: 1-9, 2015.
  26. Guo Y<sup>1</sup>, Sun J<sup>1</sup>, Lai D<sup>2</sup>: Role of microRNAs in premature ovarian insufficiency. *Reprod Biol Endocrinol*: 12;15(1):38, 2017.
  27. Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233, 2009.
  28. Jin P, Alisch RS, Warren ST: RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* 6: 1048-1053, 2004.

29. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M: A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432: 226-230, 2004.
30. Hwang HW, Mendell JT: MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 94: 776-780, 2006.
31. Kojima S, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nohata N, Fuse M, Ichikawa T, Naya Y, Nakagawa M and Seki N: Tumor suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. *Br J Cancer* 106: 405-13, 2012.
32. Baranwal S, Alahari SK: miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer* 126: 1283-1290, 2010.
33. Jovanovic M, Hengartner MO: miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* 25: 6176-6187, 2006.
34. Nohata N, Sone Y, Hanazawa T, Fuse M, Kikkawa N, Yoshino H, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Okamoto Y and Seki N: miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2: 29-42, 2011.
35. Kojima S, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nohata N, Fuse M, Ichikawa T, Naya Y, Nakagawa M and Seki N: Tumor suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. *Br J Cancer* 106: 405-413, 2012.
36. Kawakami K, Enokida H, Chiyomaru T, Tatarano S, Yoshino H, Kagara I, Gotanda T, Tachiwada T, Nishiyama K, Nohata N, Seki N and Nakagawa M: The functional significance of miR-1 and miR-133a in renal cell carcinoma. *EJC* 48: 827-836, 2012.
37. Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K, Tatarano S, Nishiyama K, Nohata N, Seki N and Nakagawa M: The tumor-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Br J Cancer* 104: 808-818, 2011.
38. Novello C, Pazzaglia L, Cingolani C, Conti A, Quattrini I, Manara MC, Tognon M, Picci P and Benassi MS: miRNA expression profile in human osteosarcoma: Role of miR-1 and miR-133b in proliferation and cell cycle control. *Int J Oncol* 42: 667-675, 2012.
39. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Sakurai D, Sasaki K, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y and Seki N: Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-1/miR-133a in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 39: 1099-1107, 2011.

40. Nasser MW, Datta J, Nuovo G, Kutay H, Motiwala T, Majumder S, Wang B, Suster S, Jacob ST and Ghoshal K: Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem* 283: 33394–33405, 2008.
41. Yamamoto N, Nishikawa R, Chiyomaru T, Goto Y, Fukumoto I, Usui H, Mitsuhashi A, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M and Seki N: The tumor-suppressive microRNA-1/133a cluster targets PDE7A and inhibits cancer cell migration and invasion in endometrial cancer. *Int J Oncol* 47: 325-334, 2015.
42. Bukowska B, Rogalska A, Marczak A: New potential chemotherapy for ovarian cancer - Combined therapy with WP 631 and epothilone B. *Life Sci* S0024-3205(16)30145-X, 2016.
43. Covens A, Carey M, Bryson P, Verma S, Fung Kee Fung M, Johnston M: Systematic review of first-line chemotherapy for newly diagnosed postoperative patients with stage II, III, or IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 85: 71-80, 2002.
44. Pagliarone S, Frattone L, Pirocchi V, Della Salda L, Palmieri C: Altered expression of p53, but not Rb, is involved in canine prostatic carcinogenesis. *Res Vet Sci* 105: 195-199, 2016.
45. Mok SC, Bell DA, Knapp RC, Fishbaugh PM, Welch WR, Muto MG, Berkowitz RS, Tsao SW: Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. *Cancer Res* 53: 1489-1492, 1993.
46. Migliore C, Martin V, Leoni VP, Restivo A, Atzori L, Petrelli A, Isella C, Zorcolo L, Sarotto I, Casula G, Comoglio PM, Columbano A and Giordano S: MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 18: 737–747, 2012.
47. Huang D, Wang H, Liu R, Li H, Ge S, Bai M, Deng T, Yao G and Ba Y: miRNA27a is a biomarker for predicting chemosensitivity and prognosis in metastatic or recurrent gastric cancer. *J Cell Biochem* 115: 549–556, 2014.
48. Stope MB, Delogu S, Diesing K and Klinkmann G: Expression pattern of the microRNA miR-1 in ovarian cancer cell lines and tumor tissue samples implies a loss of miR-1's tumor suppressor properties. *RNA Dis* 1: e348, 2014.
49. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
50. Chen J, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ: The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38: 228–233, 2006.



51. Chen B, Li H, Zeng X, Yang P, Liu X, Zhao X and Liang S: Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *J Transl Med* 10: 228, 2012.
52. Cordes K, Srivastava D: MicroRNA Regulation of Cardiovascular Development. *Circ Res* 104: 724-732, 2009.
53. Liu R, Li J, Lai Y, Liao Y, Liu R, Qiu W: Has-miR-1 suppresses breast cancer development by down-regulating K-ras and long non-coding RNA MALAT1. *Int J Biol Macromol*: 81:491-497, 2015.
54. Minemura H, Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Nakagawa S, Ebata A, Watanabe M, Ishida T, Sasano H, Suzuki T: Abnormal expression of miR-1 in breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci*: 106(11): 1642-1650, 2015.
55. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM: Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26: 301-334, 1991.
56. Staněk L: Polymerase chain reaction: basic principles and applications in molecular pathology. *Cesk Patol* 49: 119-121, 2013.
57. Zhang Q, Yan W, Bai Y, Xu H, Fu C, Zheng W, Zhu Y, Ma J: Synthetic miR-145 mimic inhibits multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 33: 448-456, 2015.
58. Wu H, Mo YY: Target miR-205 in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets* 13: 1439-1448, 2009.
59. Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ: A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol* 4:21, 2004.
60. Wong MK, Gotlieb AI: The reorganization of microfilaments, centrosomes, and microtubules during in vitro small wound reendothelialization. *J Cell Biol* 107: 1777-1783, 1988.
61. Islam MR, Yamagami K, Yoshii Y, Yamauchi N: Growth factor induced proliferation, migration, and lumen formation of rat endometrial epithelial cells in vitro. *J Reprod Dev*, 2016.
62. Cormier N, Yeo A, Fiorentino E, Paxson J: Optimization of the Wound Scratch Assay to Detect Changes in Murine Mesenchymal Stromal Cell Migration After Damage by Soluble Cigarette Smoke Extract. *J Vis Exp* 106: e53414, 2015.
63. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ: Real-time quantification of microRNAs by stem-loop qRT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33: e179, 2005.

64. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K: Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 11: 145-156, 2014.
65. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10513-10518, 2008.
66. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M: Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 5003-5008, 2011.
67. Drusco A, Nuovo GJ, Zanesi N, Di Leva G, Pichiorri F, Volinia S, Fernandez C, Antenucci A, Costinean S, Bottoni A, Rosito IA, Liu CG, Burch A, Acunzo M, Pekarsky Y, Alder H, Ciardi A, Croce CM: MicroRNA profiles discriminate among colon cancer metastasis. *PLoS One* 9: e96670, 2014.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ort, Datum:

Unterschrift:

# Lebenslauf



## Persönliche Daten

**Name:** Hettenbach  
**Vorname:** Daria  
**Geburtsdatum:** 18.04.1990  
**Geburtsort:** Singen (Hohentwiel)  
**Adresse:** [REDACTED]  
**Telefon:** [REDACTED]  
**E-Mail:** [REDACTED]  
**Familienstand:** ledig

## Studium und Ausbildung

11/2014- heute	Doktorandin, Gynäkologisches Forschungslabor, Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsmedizin Greifswald
05/2017	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2015	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2015	Teilnahme an der Charité Mayo Conference in Berlin (Posterpräsentation)
09/2012	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2010- 05/2017	Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
08/2009- 08/2010	Freiwilliges soziales Jahr in Camphill Village Copake/New York/USA
06/2009	Allgemeine Hochschulreife
09/2000- 06/2009	Nellenburg-Gymnasium Stockach

Ort, Datum:

Unterschrift:

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Mustea, stellvertretender Direktor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, danke ich für die Zustimmung, Hilfe und die Möglichkeit, meine Arbeit im molekular-gynäkologischen Forschungslabor durchführen zu dürfen.

Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. Zygmunt, Direktor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, für die große Unterstützung, dass ich für diese Zeit Teil des molekular-gynäkologischen Forschungslabors sein durfte.

Herrn Prof. Dr. med. Burchhardt danke ich für die großartige Zusammenarbeit mit dem molekular-urologischen Forschungslabor, die zu einem großen Anteil an dem komplikationslosen Gelingen meiner Arbeit beitrug.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. rer. nat. Stope für seine uneingeschränkte Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit, besonders bei der Durchsicht meiner Arbeit, außerdem für die tolle, freundschaftliche Atmosphäre, die meinen Laboralltag abwechslungsreich und interessant gestaltete und mich stets motivierte, meine Arbeit erfolgreich zu beenden.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Karoline Diesing bedanken, die mich mit viel Geduld in das Laborgeschehen eingearbeitet hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des molekular-gynäkologischen und molekular-urologischen Forschungslabors für ihre Unterstützung und das freundschaftliche Miteinander während meiner Zeit als Doktorandin.