

**Die microRNA-30e als
Entscheidungsträger in strahlungsinduzierten
Signalwegen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alina Reese
aus Göttingen

Düsseldorf, Oktober 2020

aus dem Labor für Molekulare Radioonkologie
der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Reiner U. Jänicke
2. Prof. Dr. Sebastian Wesselborg

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 2021

Anmerkungen

Die MALDI-MS-Analysen wurden von Dr. Anja Stefanski (Molecular Proteomics Laboratory, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und Dr. Ana Velic (Proteome Center Tübingen, Universität Tübingen) durchgeführt. Die durchflusszytometrische Zellsortierung der CRISPR/CAS9-Klone erfolgte durch Dipl. Ing. Katharina Raba der Core Flow Cytometry Facility, angesiedelt am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Zusammenfassung

Das Auftreten einer DNA-Schädigung in einer Zelle aktiviert eine komplexe Signalkaskade, in deren Zentrum der Tumorsuppressor p53 steht. So ist die Zelle durch diesen Transkriptionsfaktor in der Lage die Reparatur der DNA oder, falls die Schädigung zu massiv sein sollte, einen permanenten Zellzyklusarrest (Seneszenz) oder ihre Eliminierung durch den programmierten Zelltod zu veranlassen. Neben unzähligen Zielproteinen gehören zum p53-Regelnetzwerk auch microRNAs (miRNAs), die als nicht-kodierende RNAs auf zahlreichen Ebenen der DNA-Schädigungsantwort eingreifen. Im Fokus der vorliegenden Forschungsarbeit steht die miR-30e, deren Hochregulation spezifisch in der strahlungsinduzierten p53/p21-abhängigen Seneszenz, nicht aber in p53-defizienten apoptotischen Zellen kürzlich von unserem Labor nachgewiesen wurde. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der miR-30e in strahlungsinduzierten Signalwegen näher zu charakterisieren und ihre Ziel-mRNAs zu identifizieren. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass p53 den miR-30e-Promotor transkriptionell induziert und die miRNA damit als direktes Zielgen eingestuft werden kann. In DNA-Schädigungsantworten übte die Überexpression von miR-30e in HCT116 Wildtyp-Zellen einen anti-apoptotischen sowie pro-seneszenten Einfluss auf das Zellschicksal aus. Auf molekularer Ebene war dies zum einen auf die verminderte Expression der pro-apoptotischen Procaspase-3 und damit verbunden mit einer deutlich verringerten Caspase-3-Aktivierung zurückzuführen. Zum anderen war unter diesen Bedingungen eine Hochregulation von p21 zu beobachten. Die verstärkte p21-Expression nach Bestrahlung wurde dabei sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene festgestellt. Der Anstieg der p21-Expression beruht dabei nicht auf einer miR-30e-abhängigen Stabilisierung der p21 mRNA, sondern auf der transkriptionellen Aktivierung des p21-Promotors. In weiteren Untersuchungen konnte die durch miR-30e-induzierbare Promotorregion auf 600 bp eingegrenzt werden. Da eine Interaktion von miR-30e mit genomischer DNA nicht bekannt ist, ist ein indirekter Regulationsmechanismus als sehr wahrscheinlich anzusehen. Dieser könnte z.B. auf einer miR-30e-vermittelten Repression inhibitorischer Transkriptionsfaktoren beruhen. Während sich massenspektrometrische Analysen zur Identifizierung solcher Transkriptionsfaktoren sowohl in Kernextrakten als auch in Immunpräzipitaten als zu insensitiv erwiesen, konnte durch einen ELISA-ähnlichen Transkriptionsfaktor-Aktivitätstest MEF2D als Ziel-mRNA von miR-30e identifiziert werden. So demonstrierten RNA-Interferenzstudien, dass MEF2D die Seneszenzinduktion nach Bestrahlung verringert. MEF2D scheint dementsprechend ein vielversprechender Kandidat für eine miR-30e-induzierte p21-Expression zu sein. Eine weitere Charakterisierung konnte aus

zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr durchgeführt werden. Letztendlich gelang es aber mit Hilfe der CRISPR/CAS9-Technik spezifische miR-30e-*Knockdown*-HCT116 Zellklone zu generieren und diese auch initial zu charakterisieren. Diese Zellen werden in Zukunft für die weitere Eruiierung von miR-30e-Funktionen und der Identifizierung und Verifizierung von direkten Ziel-mRNAs und den dadurch beeinflussten Signalwegen von großer Bedeutung sein. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass miR-30e ein wichtiger Regulator des p53-p21-Signalwegs ist und das Zellschicksal nach Bestrahlung moduliert, indem verstärkt Seneszenz ausgelöst wird.

Abstract

Following DNA damage, cellular signaling pathways become initiated to maintain genomic integrity including DNA repair, apoptosis and senescence. Key regulator in all these pathways is the tumor suppressor p53 controlling a complex signaling network which includes, among others, microRNAs. Recently, miR-30e was identified by our laboratory to be specifically upregulated in p53-proficient HCT116 wildtype cells that upon exposure to ionizing radiation (IR) are driven into senescence. In apoptotic p53-deficient cells, however, IR failed to increase miR-30e expression. The present study investigated the function of miR-30e in radiation-induced signaling pathways, particularly with regard to the identification of underlying molecular mechanisms and target mRNAs.

Here, it was shown that p53 enhanced miR-30e promotor activity, thereby confirming miR-30e as a direct transcriptional target of p53. Overexpression of miR-30e demonstrated its capability to modulate DNA damage-induced cell fate decisions in HCT116 wildtype-cells. On the one hand, miR-30e displays an anti-apoptotic activity by downregulating procaspase-3 expression, thereby preventing cell death in response to IR. On the other hand, and most importantly, miR-30e accelerates induction of senescence by increasing p21 expression. As p21 upregulation was observed at protein and mRNA level, a translational effect was excluded. Further, as miR-30e binds neither directly to p21 mRNA nor affects its stability, it appears that this miR activates p21 expression at the transcriptional level. Indeed, miR-30e enhances p21-promotor activity without requiring p53. More precisely, the presence of a 600 bp region of the p21-promotor was identified to be required for miR-30e to induce p21 expression. However, miRNAs primarily repress gene expression by inhibiting translation or mediating mRNA decay. In light of this, miR-30e most likely controls p21 upregulation indirectly by regulating a yet unknown transcription factor. Although massspectrometric analyses were too insensitive to allow detection of transcriptions factors in nuclear extracts or DNA-pulldown samples, utilizing an ELISA-like transcription factor activity test, MEF2D was identified as a target of miR-30e. RNA interference studies using siRNAs directed against MEF2D revealed a reduced onset of senescence after irradiation. Therefore, MEF2D might be involved in miR-30e-dependent upregulation of p21, and consequently in the induction of senescence. Unfortunately, constraints did not allow the investigation of a direct involvement of MEF2D in these processes. However, using the CRISPR/CAS9-system, HCT116 miR-30e-knockdown cell lines were generated. These cell lines can be used in the future for a more detailed characterization of their properties particularly with regard to their p53-dependent cell fate decisions, as well as for the identification and validation of miR-30e targets.

In summary, the present study clearly highlights the importance of miR-30e-mediated regulation of the p53-p21-pathway with regard to directing cell fate, upon irradiation, towards senescence.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 DNA-Schadensantwort	1
1.2 Apoptose	2
1.3 Seneszenz	5
1.4 Der Tumorsuppressor p53	7
1.4.1 p53 als Transkriptionsfaktor	8
1.4.2 Regulation von p53	9
1.4.3 p53-abhängige Apoptoseinduktion	11
1.5 Der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor p21 ^{WAF1/CIP1}	11
1.5.1 Regulation von p21	12
1.6 miRNAs	13
1.6.1 Historischer Überblick	13
1.6.2 Genomische Organisation von miRNAs	14
1.6.3 miRNA Biogenese	14
1.6.4 miRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation	17
1.6.5 miRNAs als Effektoren in p53-abhängigen Signalwegen	19
1.6.6 miR-30 Familie	20
1.6.6.1 miR-30e	21
1.7 Zielsetzung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Zelllinien	23
2.1.3 Zellkultur	24
2.1.4 miRNA-Mimiks	24
2.1.5 miRNA-Inhibitor	24
2.1.6 siRNA	25
2.1.7 CRISPR/CAS9	25
2.1.8 Antikörper	26
2.1.9 TaqMan-Sonden	27
2.1.10 Oligonukleotide	28
2.1.11 Bakterienstamm	29

2.1.12 Plasmid-DNA.....	29
2.1.13 Enzyme	30
2.1.14 Größenstandards	30
2.1.15 Kits.....	31
2.1.16 Weitere Materialien	31
2.1.17 Geräte	32
2.1.18 Software.....	33
2.1.19 Datenbanken.....	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	34
2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	34
2.2.3 Applikation von ionisierender Röntgenstrahlung.....	34
2.2.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	34
2.2.5 Herstellung von Zellextrakten	36
2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	37
2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.2.8 Western Blot	38
2.2.9 Fluorometrischer Substrattest zur Messung der Caspase-3-Aktivität.....	39
2.2.10 LDH-Zytotoxizitätstest	40
2.2.11 Kolorimetrischer Nachweis der SA- β -Gal-Aktivität.....	41
2.2.12 Quantitative Detektion der SA- β -Gal -Aktivität.....	42
2.2.13 Luciferase-Reportergen-Test.....	43
2.2.14 Klonierung.....	44
2.2.15 Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen mittels DNA- <i>Pulldown</i>	52
2.2.16 Transkriptionsfaktor-Aktivitätstest.....	56
2.2.17 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression (qRT-PCR).....	58
2.2.18 p21 mRNA-Stabilitätstest	60
2.2.19 Relative Quantifizierung der miRNA-Expression (qRT-PCR).....	61
2.2.20 CRISPR/CAS9	63
2.2.21 Statistik	69
3. Ergebnisse	70
3.1 miR-30e wird in Abhängigkeit von p53 nach ionisierender Strahlung verstärkt exprimiert	70
3.2 miR-30e schützt HCT116 Wildtyp-Zellen vor strahlungsinduzierter Apoptose.....	72
3.3 miR-30e verstärkt die Seneszenzinduktion nach Strahlenexposition	74

3.4	miR-30e führt zu einer Hochregulation von p21 in DNA-geschädigten Zellen.....	76
3.5	Die p21-Regulation von miR-30e erfolgt auf transkriptioneller Ebene und ist unabhängig von p53.....	79
3.6	Identifizierung miR-30e-regulierter Transkriptionsfaktoren.....	82
3.6.1	Massenspektrometrische Identifizierung miR-30e-regulierter Transkriptionsfaktoren	82
3.6.2	Der Transkriptionsfaktor MEF2D ist ein Zielprotein von miR-30e	85
3.7	Generierung von HCT116 miR-30e-KD-Zellen durch Anwendung des CRISPR/CAS9-Verfahrens	91
4.	Diskussion.....	101
4.1	Die Expression von miR-30e wird auf transkriptioneller Ebene von p53 induziert.....	101
4.2	miR-30e reguliert die Expression der Procaspase-3 und schützt HCT116 Wildtyp-Zellen vor dem strahlungsinduzierten Zelltod.....	102
4.3	Die miR-30e-abhängige Seneszenzinduktion erfolgt durch Hochregulation von p21	103
4.4	miR-30e reguliert die Expression von p21 auf transkriptioneller Ebene unabhängig von p53.....	103
4.5	miR-30e steigert die Aktivität der Transkriptionsfaktoren CEBP α und MEF2D....	106
4.6	Generierung und funktionelle Charakterisierung von miR-30e- <i>Knockdown</i> -Zellen mit Hilfe des CRISPR/CAS9-Verfahrens	107
4.7	Fazit	109
5.	Literaturverzeichnis.....	111
6.	Anhang	128
6.1	Publikationen.....	128
6.2	Eidesstattliche Versicherung	129
6.3	Danksagung	130

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strahlungsinduzierte DNA-Schadensantwort.....	2
Abb. 2: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg	5
Abb. 3: Schematische Darstellung des Zellzyklusarrests nach DNA-Schädigung.....	6
Abb. 4: Schematische Darstellung einer pri-miRNA	15
Abb. 5: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese.....	17
Abb. 6: Schematische Darstellung eines Luciferase-Reportergen-Konstrukts.	43
Abb. 7: Herstellung der p21-Promotorfragmente	50
Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der mRNA-Halbwertszeit-Bestimmung.....	61
Abb. 9: Ablauf der Genomeditierung durch Verwendung des CRISPR/CAS9- Verfahrens.....	65
Abb. 10: miR-30e und miR-30c werden zusammen nach Bestrahlung p53-abhängig hochreguliert	71
Abb. 11: miR-30e reduziert den Zelltod und die DEVDase-Aktivität nach Strahlenexposition	73
Abb. 12: miR-30e verstärkt die Seneszenzinduktion in bestrahlten HCT116 Wildtyp- Zellen.....	75
Abb. 13: miR-30e erhöht die strahlungsinduzierte p21-Expression.....	77
Abb. 14: miR-30e hat keinen Effekt auf die p21 mRNA Stabilität.....	78
Abb. 15: miR-30e induziert den p21-Promotor.....	80
Abb. 16: miR-30e benötigt eine 600 bp-Sequenz zur Induktion des p21-Promotors	81
Abb. 17: Spezifische Anreicherung von p53 am p21-Promotor nach strahlungsinduzierter Stabilisierung in HCT116 Wildtyp-Zellen	83
Abb. 18: miR-30e erhöht die Aktivität der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und MEF2.	87
Abb. 19: miR-30e erhöht die Aktivität der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und MEF2.	88
Abb. 20: <i>Knockdown</i> von C/EBP α und MEF2C mittels siRNA.	89
Abb. 21: miR-30 erhöht die MEF2D-Proteinexpression.	90
Abb. 22: Design der crRNAs gegen miR-30e.	92
Abb. 23: Sequenzierung des <i>MIR30E</i> -Genlokus der Klone #8, #29, #50.....	94
Abb. 24: miR-30e ist in Klon #8 spezifisch herunterreguliert.....	96
Abb. 25: Seneszenzinduktion in HCT116 Wildtyp-Zellen und Klon #8 nach Strahlenexposition	97
Abb. 26: Klon #8 zeigt eine verminderte Seneszenzinduktion bei unveränderter p21- Expression.....	99
Abb. 27: Einfluss des miR-30e- <i>Knockdowns</i> auf die Caspase-3-Aktivität sowie den Zelltod.....	100

Abb. 28: Schematische Darstellung des pro-seneszenten sowie anti-apoptischen Potentials der miR-30e in strahlungsinduzierten Signalwegen.	110
---	-----

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Sequenzen der miR-30-Familie.	20
Tab. 2: Ausgewählte Chemikalien.....	23
Tab. 3: Zelllinien	23
Tab. 4: Zellkultur	24
Tab. 5: miRIDIAN microRNA Mimics	24
Tab. 6: miRCury LNA miRNA Power Inhibitor	24
Tab. 7: ON-TARGETplus siRNA SMART pool	25
Tab. 8: CRISPR/CAS9.....	25
Tab. 9: crRNA.....	25
Tab. 10: Primärantikörper	26
Tab. 11: Sekundärantikörper	26
Tab. 12: TaqMan mRNA-Sonden	27
Tab. 13: TaqMan miRNA-Sonden.....	27
Tab. 14: Oligonukleotide	28
Tab. 15: Bakterienstamm.....	29
Tab. 16: Plasmid-DNA.....	29
Tab. 17: Enzyme	30
Tab. 18: Größenstandards.....	30
Tab. 19: Kits	31
Tab. 20: Weitere Materialien.....	31
Tab. 21: Geräte	32
Tab. 22: Software	33
Tab. 23: Datenbanken	33
Tab. 24: Transfektionsschema.....	35
Tab. 25: Eingesetzte Menge der DNA-Plasmide.....	36
Tab. 26: MS-Analyse der <i>Pulldown</i> -Proben	85
Tab. 27: Übersicht CRISPR/CAS9-Klone.....	93

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
ActD	Actinomycin D
AEG-1	<i>astrocyte elevated gene-1</i>
AGO	Argonautprotein
AP-4	<i>activating enhancer-binding protein-4</i>
APAF-1	<i>apoptotic peptidase-activating factor 1</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and RAD3 related</i>
BAX	<i>BCL-2-associated X protein</i>
BAFA1	Bafilomycin A1
BBC3	<i>BCL-2 binding component 3</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
BH3	BCL-2-Homologiedomäne 3
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BIM	<i>BCL-2-like protein 11</i>
B-MYB	<i>MYB-related protein B</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
C ₁₂ -FDG	Di-β-D-Galactopyranosid
Cap	7-Methylguanosin-Kappe
CAS	<i>CRISPR-associated</i>
Caspasen	Cysteinyl-abhängige Aspartat-Proteasen
CCR4-NOT	<i>C-C motif receptor 4-NOT</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDP/cut	<i>CCAAT displacement protein/cut</i>
CEBP	<i>CCAAT/Enhancer-Binding protein</i>

CHK2	<i>checkpoint kinase 2</i>
CKI	CDK-Inhibitor
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR-RNA
CSDC2	<i>cold-shock domain-containing protein C2</i>
DCP2	<i>decapping protein 2</i>
DD	<i>death domain</i>
DDX41	<i>DEAD-box helicase 41</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E12/E47	<i>E2A immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47</i>
E2F	<i>E2 factor</i>
eiF4	<i>eukaryotic translation initiation factor 4</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK1/2	<i>mitogen-activated protein kinase 1/2</i>
FADD	<i>fas-associated death domain protein</i>
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G ₁ -Phase	<i>gap 1-Phase</i>
G ₂ -Phase	<i>gap 2-Phase</i>
GATA3	<i>GATA-binding factor 3</i>
Gy	Grey
h	Stunden
HDAC1	Histon-Deacetylase 1
HDM2	<i>human double minute 2</i>
HDMX	<i>human double minute X protein</i>
HIF1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>
HOX5A	Homeobox 5A
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC70	<i>heat shock cognate 70</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
HuR	<i>human antigen R</i>
IL-10	Interleukin-10
IR	ionisierende Röntgenstrahlung

IRS1	Insulinrezeptorsubstrat 1
JAK	<i>janus kinase</i>
Kb	Kilobasen
KD	<i>Knockdown</i>
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere
MAX	<i>MYC-associated factor X</i>
MCL-1	<i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i>
min	Minuten
miRNA	microRNA
MIZ-1	<i>MYC-interacting zinc finger protein-1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MYOD	<i>myoblast determination protein 1</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	<i>nuclear transcription factor κB</i>
NFYC	<i>nuclear transcription factor Y subunit γ</i>
NHEJ	<i>nonhomologous end joining</i>
nt	Nukleotide
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PAN2-PAN3	<i>poly-A-nuclease 2/3</i>
PARP	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMAIP	<i>phorbol 12-myristate 13 acetate-induced protein-1</i>
Pol II	RNA Polymerase II
pre-miRNA	<i>precursor-miRNA</i>
pri-miRNA	<i>primary-miRNA</i>
PSM	<i>peptide spectrum match</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PuroR	Puromycin-Resistenz
PVDF	Polyvinylidenfluorid

qRT-PCR	<i>quantitative Real Time-PCR</i>
Ran-GTP	<i>ras-related nuclear protein-guanosine triphosphate</i>
RB	Retinoblastom-Protein
RBM47	<i>RNA binding motif protein 47</i>
RBP38	<i>RNA binding protein 38</i>
RE	relative Einheiten
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLC	<i>RISC Loading Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPL26	<i>60S ribosomal protein L26</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.	siehe
SASP	Seneszenz-assoziiertes-sekretorisches Phänotyp
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SDS-Page	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRT1	Sirtuin 1
SMAD	<i>mothers against decapentaplegic homolog</i>
snRNA	<i>small noncoding RNA</i>
S-Phase	Synthese-Phase
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TBX2	<i>T-box transcription factor 2</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptoren
TNRC6	<i>trinucleotide repeat-containing gene 6</i>
TOPO	Topoisomerase
TP53	Tumorsuppressor Protein 53
tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRBP	<i>trans-activating responsive RNA-binding protein</i>
TSS	<i>transcription start site</i>
TWIST1	<i>twist-related protein 1</i>
UBC9	<i>ubiquitin carrier protein 9</i>
USP22	Ubiquitin-spezifische Peptidase 22
UTR	untranslatierte Region

V	Volt
WISP39	<i>WAF1/CIP1 stabilizing protein 39</i>
x g	<i>G-force</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid
XRCC	<i>X-ray repair cross complementing protein</i>
XRN1P	5'-3' Exoribonuklease 1
z.B.	zum Beispiel
ZNF76	Zinkfingerprotein 76

1. Einleitung

1.1 DNA-Schadensantwort

Jeden Tag entstehen in einer Zelle bis zu $1 \cdot 10^5$ DNA-Schädigungen (Lindahl & Barnes, 2000). Diese können endogenen Ursprungs sein, wie beispielsweise durch reaktive Sauerstoffspezies, die im physiologischen Metabolismus anfallen, oder während der DNA Replikation auftreten. Aber auch exogene Faktoren wie ionisierende und ultraviolette Strahlung, die aberrante Aktivierung von Onkogenen oder der Einsatz von Chemotherapeutika in der Klinik sind als Auslöser zu nennen (Bartek et al., 2007; Ciccia & Elledge, 2010). Um zu verhindern, dass fehlerhafte DNA nach Duplikation an Tochterzellen weitergegeben wird und um die genomische Integrität aufrechtzuerhalten, stehen der Zelle eine Reihe an Mechanismen zur Verfügung, die als DNA-Schadensantwort zusammengefasst werden (J. Wade Harper & Elledge, 2007). Diese ermöglichen die Reparatur des Schadens oder, wenn dieser irreparabel ist, die Einleitung terminaler Zellschicksale wie z.B. Apoptose oder Seneszenz. Apoptotische Zellen werden durch Phagozytose aus dem Organismus entfernt, ohne eine Immunantwort auszulösen. Demgegenüber stellt Seneszenz einen permanenten Zellzyklusarrest dar und ist mit dem Verbleib der Zelle im Organismus verbunden. Senescente Zellen sind jedoch metabolisch aktiv und sezernieren verschiedene Chemokine, Wachstumsfaktoren und Zytokine, die Immunzellen anlocken können (Kerr et al., 1972; Campisi, 2001; Coppé et al., 2010). Welches Zellschicksal eintritt, hängt neben der Ursache und Schwere des DNA-Schadens auch vom Zelltyp ab (K. H. Vousden & Prives, 2009; Childs et al., 2014). Ionisierende Strahlung verursacht vorwiegend Doppelstrangbrüche im Genom. Werden diese von der Zelle erkannt, führt dies zur Rekrutierung und anschließender Autoaktivierung der Serin/Threonin-Kinase ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) (Abb. 1) (Shiloh, 2006). Bei schwereren DNA-Schädigungen kann ATM die Kinase CHK2 (*checkpoint kinase 2*) aktivieren, welche durch eine Überlappung der Substrate die ATM-induzierte Signalkaskade verstärkt (Matsuoka et al., 2000; X. Xu et al., 2002; Ahn et al., 2002; Buscemi et al., 2004; Zannini et al., 2014). Auch die ATM-vermittelte Phosphorylierung des Histons H2AX löst einen positiven Rückkopplungsmechanismus aus (Rogakou et al., 1998; Lou et al., 2006). Sowohl ATM als auch CHK2 phosphorylieren schließlich den Tumorsuppressor p53 und schützen ihn so vor einem proteasomalen Abbau, sodass p53 nach einer DNA-Schädigung in der Zelle akkumuliert (Banin et al., 1998; Hirao et al., 2000). Aber auch DNA-Schädigungen in Form von Einzelstrangbrüchen oder Onkogen-induzierter Stress bewirken letztendlich eine Stabilisierung von p53 (Meek, 2009). In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor bestimmt p53 durch die Aktivierung seiner

Zielgene das Zellschicksal und leitet einen Zellzyklusarrest, die DNA-Reparatur, Apoptose oder Seneszenz ein (K. H. Vousden & Prives, 2009).

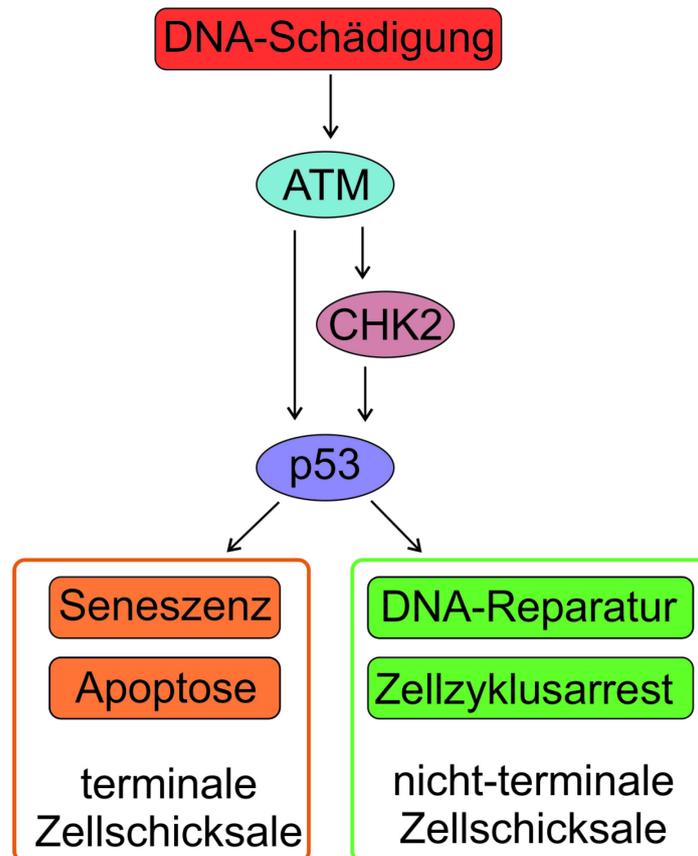


Abb. 1: Strahlungsinduzierte DNA-Schadensantwort. Ionisierende Strahlung verursacht Doppelstrangbrüche der genomischen DNA, was zur Rekrutierung und anschließenden Aktivierung der ATM-Kinase führt. Nachfolgend phosphorylieren ATM sowie die nachgeschaltete CHK2-Kinase p53 und bewirken dessen zelluläre Stabilisierung. Durch die transkriptionelle Aktivierung seiner Zielgene induziert p53 je nach Schwere des DNA-Schadens dessen Reparatur, Seneszenz oder Apoptose. (modifiziert nach Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). ATM, *ataxia-telangiectasia mutated*; CHK2, *checkpoint kinase 2*.

Eine erfolgreiche Reparatur von DNA-Schäden ist für die Zelle von zentraler Bedeutung, da aus diesen Mutationen und genomische Alterationen hervorgehen können, die eng mit der Tumorgenese verbunden sind. Zudem erhöht eine genomische Instabilität die Wahrscheinlichkeit, dass weitere Mutationen entstehen können (Hoeijmakers, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2 Apoptose

Durch programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt, können schadhafte oder nicht mehr benötigte Zellen kontrolliert entsorgt werden (Kerr et al., 1972). Morphologisch ist die Apoptose durch ein Schrumpfen der Zelle sowie deren Abrundung charakterisiert. Zudem ist die Abschnürung von Vesikeln aus der Zellmembran (*blebbing*) zu beobachten

(Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Coleman et al., 2001). Im Anschluss tritt typischerweise die Auflösung des Zellkerns auf, das Chromatin kondensiert und die genomische DNA wird internukleosomal fragmentiert (Wyllie, 1980; Zamzami & Kroemer, 1999). Letztendlich zerfällt die Zelle in kleine apoptotische Körper (*apoptotic bodies*), die durch Phagozyten entfernt werden (Platt et al., 1998; Savill & Fadok, 2000). Die Integrität der Zellmembran wird über den gesamten Prozess hinweg aufrechterhalten, sodass eine Freisetzung des Zellinhalts in die Umgebung und eine daraus resultierende Entzündungsreaktion verhindert wird (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Häcker, 2000).

Hauptverantwortlich für die Exekution der Apoptose sind Caspasen (Cysteiny-l-abhängige Aspartat-Proteasen) (Cohen, 1997), die durch die endoproteolytische Spaltung ihrer Substrate für nahezu alle morphologischen und biochemischen Veränderungen in apoptotischen Zellen verantwortlich sind (Janicke et al., 1998; U. Fischer et al., 2003). Caspasen erkennen ihre Substrate anhand einer Tetrapeptidsequenz und spalten diese immer C-terminal eines Aspartat-Rests (Timmer & Salvesen, 2007). Im apoptotischen Kontext wird zwischen Initiator- (Caspase-2, -8, -9, -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) unterschieden (Y. Shi, 2002; McIlwain et al., 2013). Caspasen werden als inaktive Zymogene, sogenannte Procaspasen, synthetisiert und erst durch proteolytische Spaltung durch andere Caspasen aktiviert (Stennicke & Salvesen, 1998). Dieser Prozess wird als Caspasen-Kaskade bezeichnet. Nach einem pro-apoptotischen Stimulus werden die am Anfang der Caspasen-Kaskade stehenden Initiatorcaspasen durch das Prinzip der räumlichen Nähe (*proximity-induced activation*) in ihren aktiven Zustand überführt. Adapterproteine ermöglichen dabei ihre Dimerisierung, was eine Autoaktivierung und Selbstprozessierung auslöst (Boatright & Salvesen, 2003; Yigong Shi, 2004). Die nachgeschalteten Effektorcaspasen dagegen liegen als Dimere vor und werden ausschließlich durch Initiatorcaspasen gespalten und aktiviert (Boatright & Salvesen, 2003; Yigong Shi, 2004).

Apoptose kann über einen intrinsischen oder extrinsischen Signalweg eingeleitet werden (Abb. 2). In beiden Fällen erfolgt die Aktivierung von Effektorcaspasen und es tritt schlussendlich der Zelltod ein. Der extrinsische Signalweg wird durch Todesrezeptoren aus der Superfamilie der Tumornekrosefaktorrezeptoren (TNFR) und ihre Liganden vermittelt (Ashkenazi & Dixit, 1998). Im apoptotischen Kontext sind hier der Ligand Fas/CD95L mit dem dazugehörigen Rezeptor FASR/CD95 sowie TRAIL (*T*NF-*r*elated *a*poptosis-*i*nducing *l*igand) mit seinen zwei Rezeptoren (TRAIL-R1, TRAIL-R2) hervorzuheben (Schulze-Osthoff et al., 1998). Diese Todesrezeptoren besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindedomäne, eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Todesdomäne (*d*eath *d*omain, DD). Die Ligandenbindung an den Rezeptor bewirkt dessen Tetramerisierung und die Rekrutierung der Adapterproteine FADD (*f*as-

associated death domain protein) an die Todesdomäne. An diese binden wiederum Procaspase-8 und -10 und bilden den DISC (*death inducing signaling complex*), wodurch ihre autokatalytische Aktivierung erfolgt. Anschließend werden die Effektorcaspase-3 und -7 aktiviert (Boatright & Salvesen, 2003).

Der intrinsische Apoptoseweg wird durch eine Vielzahl an Signalen, darunter irreparable DNA-Schäden, Nährstoffmangel oder Hypoxie, induziert und über die Mitochondrien vermittelt (Altman & Rathmell, 2012; Roos & Kaina, 2013; Sandoel & Hengartner, 2014). Im Zentrum stehen die BCL-2-Familienproteine BAK (*BCL-2 homologous antagonist/killer*) und BAX (*BCL-2-associated X protein*), die im inaktiven Zustand als Monomere vorliegen. Während BAK mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist, befindet sich BAX im Zytosol (Wolter et al., 1997). Nach einem proapoptischen Stimulus wird auch BAX an die Mitochondrien rekrutiert und beide Proteine bilden Homooligomere. Es entsteht eine Pore in der äußeren Mitochondrienmembran, sodass diese für zahlreiche Substanzen u.a. Cytochrom C aus dem Intermembranraum permeabel wird (Cosentino & Garcia-Saez, 2017). Im Zytosol bindet das freigesetzte Cytochrom C an das Adapterprotein APAF-1 (*apoptotic peptidase-activating factor 1*). Anschließend oligomerisiert APAF-1 unter Hydrolyse von dATP zu ATP zu einem radartigen Heptamer, dem Apoptosom. Die Procaspase-9 wird in den Proteinkomplex rekrutiert, autokatalytisch aktiviert und spaltet im nächsten Schritt die Effektorcaspasen (Bratton & Salvesen, 2010).

Die Aktivität der Effektoren BAK und BAX wird durch weitere Proteine der BCL-2-Familie kontrolliert. So verhindern anti-apoptische BCL-2-Proteine (u.a. BCL-2, BCL-XL, MCL-1) in einer nicht geschädigten Zelle die Aktivierung von BAK und BAX (Czabotar et al., 2014). Nach einer Schädigung werden hingegen die pro-apoptischen BH3 (*BCL-2 Homologiedomäne 3*)-*only*-Proteine (BID, BIM, NOXA, PUMA u.v.m.) hochreguliert, welche BAX und BAK direkt aktivieren oder die Repression durch anti-apoptische BCL-2-Proteine aufheben (Westphal et al., 2014; Willis et al., 2007). Anschließend kann die Oligomerisierung von BAK und BAX und damit verbunden die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran erfolgen. Das pro-apoptische BCL-2-Protein BID (*BH3 interacting-domain death agonist*) nimmt eine Sonderstellung innerhalb der Familie ein, da es als Bindeglied zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg fungiert. Nach der Aktivierung des extrinsischen Signalwegs kann Caspase-8 die Spaltung von BID in seine aktive Form tBID (*truncated BID*) vermitteln und bewirkt dessen Translokation zu den Mitochondrien, um dort den intrinsischen Signalweg zu induzieren und so die Caspasen-Kaskade zu verstärken (H. Li et al., 1998).

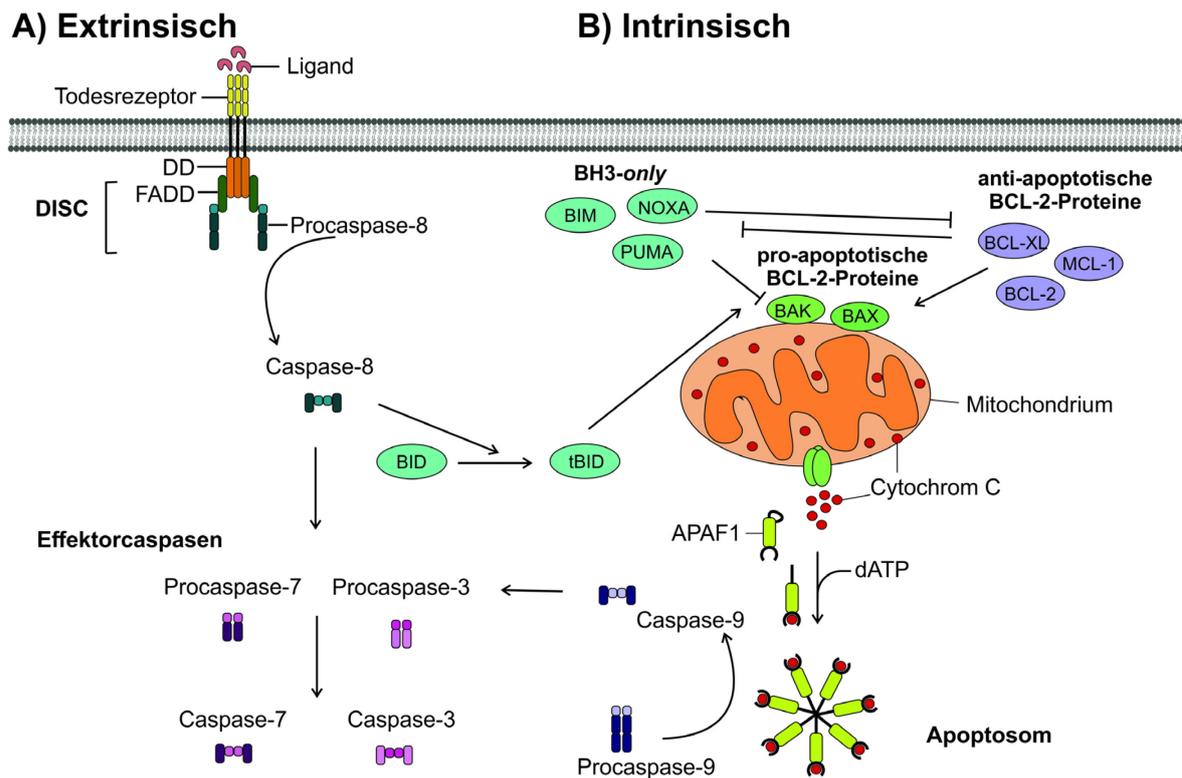


Abb. 2: Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg. (A) Der extrinsische Signalweg wird über die Bindung eines Liganden an einen Todesrezeptor ausgelöst. Das Adapterprotein FADD wird an die intrazelluläre Todesdomäne des Rezeptors rekrutiert. Die Bindung von Procaspase-8 an FADD bildet den DISC und verursacht die Autoaktivierung der Initiatorcaspase-8, welche nachfolgend die Effektorcaspase-3 und -7 aktiviert. Durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung von BID kann eine Verknüpfung mit dem intrinsischen Signalweg erfolgen. (B) Die Induktion des intrinsischen Signalwegs bedarf der Aktivierung der Proteine BAX und BAK. Diese erfolgt durch die pro-apoptischen BCL-2-Proteine (BIM, NOXA, PUMA), während anti-apoptische BCL-2-Proteine (BCL-2, BCL-XL, MCL-1) dem entgegenwirken. Überwiegt der pro-apoptische Stimulus, bilden BAX und BAK durch Homooligomerisierung eine Pore in der äußeren Mitochondrienmembran und induzieren so die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol. Cytochrom C ermöglicht die Assemblierung des Apoptosoms, welches aus dem Adapterprotein APAF-1 und der Procaspase-9 gebildet wird. In dem Multiproteinkomplex findet die autokatalytische Aktivierung von Caspase-9 statt, gefolgt von der Spaltung der Effektorcaspasen. (modifiziert nach McIlwain et al., 2013). APAF-1, *apoptotic protease activating factor 1*; BCL-2, *B-cell lymphoma 2*; BCL-XL, *B-cell lymphoma extra large*; BID, *BH3-interacting domain death agonist*; BIM, *BCL-2-like protein 11*; DD, Todesdomäne; FADD, *fas-associated protein with death domain*; MCL-1, *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*; PUMA, *p53 upregulated modulator of apoptosis*.

1.3 Seneszenz

Seneszenz ist ein irreversibler Zellzyklusarrest, der in teilungsfähigen Zellen u.a. als Reaktion auf DNA-Schäden, oxidativen Stress oder Onkogenaktivierung ausgelöst wird (Ben-Porath & Weinberg, 2005). Hauptmerkmal seneszenten Zellen ist, dass diese auch nach der Stimulation mit Wachstumssignalen nicht wieder in den Zellzyklus eintreten und häufig eine Resistenz gegenüber der Einleitung von Apoptose entwickeln (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Seneszenz wurde zum ersten Mal in primären, nicht malignen Fibroblasten beobachtet, welche in der Zellkultur nur ein begrenztes replikatives Potential besitzen (Hayflick & Moorhead, 1961). Ursächlich hierfür ist die bei jeder Zellteilung

erfolgende Verkürzung der Telomere, die ab einer kritischen Telomerlänge eine DNA-Schadensantwort induziert und so Seneszenz einleitet (Harley et al., 1990; Bodnar et al., 1998). Diese Form wird daher als replikative Seneszenz bezeichnet. Weitere Formen sind die Onkogen- und die Schädigungs-induzierte Seneszenz.

Die Einleitung der Seneszenz erfolgt hauptsächlich durch den p53-p21- sowie den p16-RB (Retinoblastomprotein)-Signalweg (Abb. 3) (Kuilman et al., 2010). Sowohl p21 als auch p16 inhibieren Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs), die im Verlauf des Zellzyklus phasenspezifisch aktiviert werden und über die Phosphorylierung von Substratproteinen den Übergang in die nachfolgende Phase regulieren (David O. Morgan, 1995; Elledge, 1996; J. W. Harper, 1997; D. O. Morgan et al., 1998). Die Aktivierung der CDKs erfolgt durch die Assoziation mit Cyclinen sowie durch Phosphorylierungen. Antagonistische CDK-Inhibitoren (CKIs) wie p21 und p16 hemmen u.a. den RB/ E2F (E2 factor)-Signalweg, welcher den Übergang von der G₁ (gap 1)- in die S (Synthese)-Phase kontrolliert. Dabei unterbinden CKIs eine Phosphorylierung von RB durch CDKs und damit verbunden die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F, wodurch ein G₁-Arrest auftritt (Helin et al., 1993; Lees et al., 1993; Weinberg, 1995; Harrington et al., 1998). Der vermittelte Zellzyklusarrest kann entweder temporär oder permanent (Seneszenz) sein.

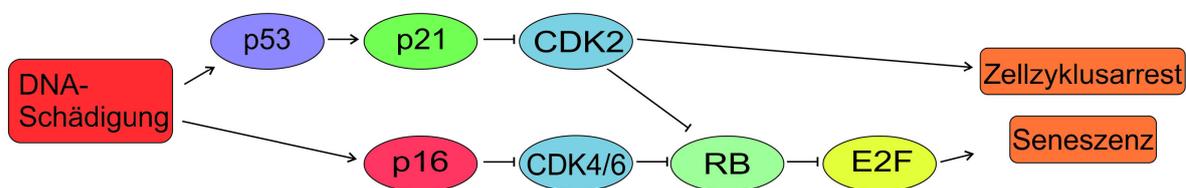


Abb. 3: Schematische Darstellung des Zellzyklusarrests nach DNA-Schädigung. Eine Schädigung der DNA führt zur Aktivierung von p53 oder p16. p53 induziert die Expression des p21-Proteins, das wie auch p16, CDKs inaktiviert, die für die Progression des Zellzyklus benötigt werden. Die Hemmung der CDKs verhindert eine Phosphorylierung und damit verbunden die Inaktivierung von RB. Hypophosphoryliertes RB inhibiert Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, die den Übergang von der G₁- in die S-Phase steuern. Die Inaktivierung der CDKs löst je nach Schwere des DNA-Schadens und des Zelltyps die Einleitung eines temporären Zellzyklusarrests oder Seneszenz aus. (modifiziert nach Childs et al., 2015). RB, Retinoblastomprotein; E2F, E2 factor; CDK; cyclin-dependent kinase.

Zur Identifizierung seneszenten Zellen sollten unterschiedliche Kriterien herangezogen werden, da kein Kriterium exklusiv nur in seneszenten Zellen zu beobachten ist und deshalb für sich alleine stehend auch nicht als eindeutiger Nachweis angesehen werden kann. Ein gleichzeitiges Vorliegen mehrerer Seneszenz-assoziiierter Veränderungen macht einen seneszenten Status hingegen sehr wahrscheinlich. Erschwerend kommt hinzu, dass Seneszenz einen dynamischen Prozess darstellt, sodass sich der seneszente Phänotyp im zeitlichen Verlauf nach der Induktion verändert

(Herranz & Gil, 2018). Zusätzlich erhöht eine zellspezifische Komponente die Heterogenität (Sharpless & Sherr, 2015). Ein Merkmal, welches ausschließlich bei kultivierten, adhärenen Zellen beobachtet werden kann, ist ein stark vergrößerter Zellumfang sowie eine abgeflachte Form. Dies kann durch das Auftreten von Mikronuklei sowie verstärkter Vakuolisierung begleitet werden (Kuilman et al., 2010). Für seneszente Zellen ist die Zunahme der lysosomalen Masse und damit auch die Aktivität der dort befindlichen β -Galaktosidase-Aktivität charakteristisch (Kurz et al., 2000). Diese Erhöhung wird daher als Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal) bezeichnet und ihre Bestimmung häufig als Seneszenznachweis verwendet (Dimri et al., 1995; Debacq-Chainiaux et al., 2009). Da Seneszenz einen permanenten Zellzyklusarrest darstellt und dementsprechend keine Proliferation stattfindet, kann auch die Messung der DNA-Syntheserate als Hinweis dienen (Hernandez-Segura et al., 2018). Auf molekularer Ebene können ein verstärktes Vorkommen von p53, p21, p16 oder hypophosphoryliertem RB auf einen seneszenten Status hinweisen (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

Seneszenz kann grundsätzlich als ein wichtiger Mechanismus der Tumorsuppression angesehen werden. Durch den terminalen Zellzyklusarrest einer schadhafte Zelle wird eine potentielle maligne Transformation verhindert. Eine Besonderheit seneszenter Zellen stellt die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen in ihre Umgebung dar, was als Seneszenz-assoziiertes-sekretorisches Phänotyp (SASP) bezeichnet wird. Die Zusammensetzung des SASPs variiert dabei je nach Zelltyp, Dauer und Form der Seneszenz (Coppé et al., 2010). Durch die Ausbildung des SASPs kann der seneszente Status einer Zelle manifestiert oder auch parakrin in benachbarten Zellen Seneszenz induziert werden. So gehen Fibroblasten, die mit seneszenten Zellen kokultiviert werden, ebenfalls in die Seneszenz (Acosta et al., 2013). Darüber hinaus lockt die Sekretion des SASPs Immunzellen an, welche die Zelle anschließend eliminieren (Xue et al., 2007; Kang et al., 2011). Seneszente Zellen verbleiben daher normalerweise nur kurzzeitig im Organismus. Gelingt es dem Immunsystem jedoch nicht diese zu entfernen, können chronisch seneszente Zellen ein pro-tumorigenes Mikromilieu erzeugen (Sun et al., 2018). So stimulieren einzelne Faktoren des SASPs das Wachstum und die Metastasierung von pre-malignen Zellen, indem sie die Angiogenese und die epitheliale-mesenchymale Transition fördern (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Childs et al., 2014; Sun et al., 2018).

1.4 Der Tumorsuppressor p53

Im Zentrum der DNA-Schadensantwort steht der Tumorsuppressor p53, der daher auch als „*guardian of the genome*“ bezeichnet wird (Lane, 1992). Das Protein p53 wurde nach seiner Entdeckung 1979 zunächst fälschlicherweise als Onkogen eingestuft (Lane &

Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979). Es zeigte sich jedoch, dass das *TP53*-Gen, welches für p53 kodiert, kein transformierendes Potential besitzt, sondern es sich vielmehr um einen Tumorsuppressor handelt (Levine et al., 1991), der durch die Vermittlung u.a. von Apoptose, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur der neoplastischen Transformation entgegen wirkt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass gerade *TP53* in etwa 50% aller Tumore mutiert ist, was meist zu einem Verlust seiner Funktion führt (Vogelstein et al., 2000). Bemerkenswerterweise betreffen 95% aller *TP53*-Mutationen die Region des Proteins, die zur Interaktion mit DNA dient, und unterstreichen so die Bedeutsamkeit der transkriptionellen Regulation für seine Funktion als Tumorsuppressor (Karen H. Vousden & Lu, 2002).

1.4.1 p53 als Transkriptionsfaktor

Wie für Transkriptionsfaktoren charakteristisch, bindet p53 sequenzspezifisch an DNA und reguliert so die Transkription seiner Zielgene (Fields & Jang, 1990; Kern et al., 1991; Farmer et al., 1992; Bargonetti et al., 1992). p53 erkennt die DNA-Sequenz RRRRCWWGYYY-RRRCWWGYYY (R: Purin, C: Cytosin, W: Adenin/Thymin, G: Guanin, Y: Pyrimidin). Die beiden Teilmotive der Konsensussequenz sind dabei durch 0-13 beliebige Basenpaare unterbrochen und werden von p53 als Tetramer gebunden (Wafik S. El-Deiry et al., 1992; McLure & Lee, 1998; B. Wang et al., 2009). Die Tetramerisierung führt zudem dazu, dass die nukleäre Exportsequenz von p53 maskiert wird, sodass p53 am Ort der Genregulation, dem Zellkern, verweilt (Stommel et al., 1999). Das klassische Modell der p53-vermittelten Genaktivierung besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Zunächst wird p53 nach einem Stimulus stabilisiert und akkumuliert im Zellkern. Dort bindet p53 an die Promotorsequenz seiner Zielgene und aktiviert -oder in selteneren Fällen reprimiert- die Transkription (J. P. Kruse & Gu, 2009). In der jüngsten Vergangenheit wurden in einer Studie alle bisher beschriebenen p53-Zielgene zusammengefasst. Es wurden spezieübergreifend 349 Gene erfasst, wobei Hochdurchsatz-Studien an dieser Stelle nicht berücksichtigt wurden. Von den 349 Zielgenen wurden 246 durch p53 aktiviert, 91 reprimiert und für die übrigen 9 Gene sowohl eine positive als auch eine negative Regulation festgestellt (M. Fischer, 2017). Die direkte Genrepression durch p53 ist jedoch nicht unumstritten. Mechanistisch soll diese vorwiegend auf dem Vorhandensein inhibitorisch wirkender Konsensussequenzen in den Promotoren der Zielgene beruhen, was jedoch bisher nicht eindeutig bestätigt werden konnte (Laptenko & Prives, 2006; Sullivan et al., 2018). Vielmehr vermitteln p53 nachgeschaltete Effektoren wie p21 die reprimierende Wirkung (vgl. Kapitel 1.5) (K. H. Vousden & Prives, 2009). Darüber hinaus werden auch miRNAs (microRNA) in Abhängigkeit von p53 exprimiert und können eine inhibitorische Genregulation vornehmen

(vgl. Kapitel 1.6.5). Zudem wurde gezeigt, dass p53 an Promotorregionen bindet, die Konsensussequenzen für andere Transkriptionsfaktoren wie SP1, NF-Y (*nuclear transcription factor Y*) oder SMAD (*mothers against decapentaplegic homolog*) enthalten, und deren Aktivierung blockiert (Sullivan et al., 2018).

1.4.2 Regulation von p53

In nichtgeschädigten Zellen liegt das p53-Protein bedingt durch einen kontinuierlichen, proteasomalen Abbau nur in geringen Mengen vor (Brooks & Gu, 2006). Erst nachdem eine Schädigung der DNA erkannt wurde, steigt die zelluläre Konzentration an. Als wichtigster negativer Regulator von p53 ist HDM2 (*human double minute 2*) zu nennen. HDM2 ist eine E3 Ubiquitin-Protein-Ligase, welche p53 ubiquitiniert und so die p53-abhängige Gentranskription unterbindet (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Eine Monoubiquitinierung führt dabei zum Export von p53 aus dem Zellkern (Shmueli & Oren, 2004; Carter et al., 2007), während eine Polyubiquitinierung die Degradation durch das Proteasom zur Folge hat (M. Li et al., 2003). HDM2 und p53 unterliegen einem autoregulatorischem Rückkopplungsmechanismus, der sowohl den Abbau und die Aktivität von p53 als auch die Expression von HDM2 koordiniert (X. Wu et al., 1993). Der zentrale Schritt der DNA-Schädigungsantwort ist die Stabilisierung und Aktivierung von p53, welcher vorwiegend durch die Kinasen ATM und ATR (*ataxia-telangiectasia and RAD3 related*) im Rahmen der DNA-Schadensantwort bewirkt wird. Dies geschieht zum einen durch die Phosphorylierung von p53, wodurch die HDM2-vermittelte Ubiquitinierung und damit dessen proteasomaler Abbau unterbunden wird. Zum anderen stellt auch HDM2 selbst ein Substrat der Kinasen dar. Die Phosphorylierung von HDM2 verhindert ebenfalls die Phosphorylierung von p53 (Appella & Anderson, 2001; Cheng et al., 2009). Nicht nur HDM2, sondern auch sein Homolog HDMX (*human double minute X homolog*), früher als HDM4 bekannt, ist ein negativer Regulator von p53. HDMX bindet an p53 und hemmt so dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor, besitzt aber keine intrinsische E3 Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität (Shvarts et al., 1996; Linares et al., 2003). Die Funktionen von HDM2 und HDMX in Bezug auf die p53-Regulierung sind daher nicht redundant. Jedoch erhöht die Bildung von HDM2-HDMX-Heterodimeren die E3 Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität von HDM2 und ermöglicht somit eine effizientere Degradierung von p53 (Tanimura et al., 1999; Linares et al., 2003). Interessanterweise ubiquitiniert HDM2 nicht nur p53, sondern auch HDMX (Pan & Chen, 2003; de Graaf et al., 2003). Nach Aktivierung der DNA-Schädigungsantwort, bewirkt HDM2 so die Degradierung von HDMX, welche für die vollständige Aktivierung von p53 notwendig ist (Kawai et al., 2003; Chen et al., 2005). Es ist daher nachvollziehbar, dass HDM2 und auch HDMX in vielen Tumoren, welche p53-Wildtyp-Allee besitzen, verstärkt exprimiert werden, sodass die

Stabilisierung von p53 verhindert wird (Wade et al., 2013). Die Ubiquitinierung durch HDM2 sowie die Phosphorylierung durch ATM/CHK2 stellen nur einen Bruchteil der etwa 50 verschiedenen posttranslationalen Modifikationen dar, die p53 erfahren kann (Meek & Anderson, 2009). Diese umfassen neben den bereits genannten Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen zudem Acetylierungen, Sumoylierungen, Neddylierungen, Glykosylierung und Methylierungen (J.-P. Kruse & Gu, 2008). Diese beeinflussen die Lokalisation, Stabilität und Aktivität von p53 (Bode & Dong, 2004). Es wird angenommen, dass die einzelnen Modifikationen untereinander einen kooperativen Effekt besitzen und ihre Gesamtheit die Auswirkungen auf die Aktivität von p53 bestimmt (Meek & Anderson, 2009; Gu & Zhu, 2012).

Die Transkriptionsfaktoren Proto-Onkogen c-MYC und HOXA5 (Homeobox A5) regulieren p53 auf transkriptioneller Ebene. In Brustkrebszellen korreliert der Verlust von HOXA5 mit einer verringerten p53-Expression und stellt einen wichtigen Schritt der Tumorgenese dar (Reisman et al., 1993; Raman et al., 2000). Auch p53 selbst sowie sein Homolog p73 kann an seinen eigenen Promotor binden und so einen positiven Rückkopplungsmechanismus auslösen (S. Wang & El-Deiry, 2006). Eine transkriptionelle Regulation des p53-Promotors wurde ebenfalls durch das RNA-bindende Protein (RBP) RBM47 (RNA binding motif protein 47), welches für die Ausprägung der DNA-Schädigungsinduzierten Seneszenz benötigt wird, beschrieben (Radine et al., 2020). Andere RBPs regulieren p53 auf post-transkriptioneller Ebene. HuR (human antigen R) bindet nach der Behandlung mit kurzweiliger ultravioletter Strahlung an die 3' untranslatierte Region (UTR) der p53 mRNA (messenger RNA) und bewirkt eine gesteigerte Translationsrate (Mazan-Mamczarz et al., 2003). Ähnliches wurde für RPL26 (60S ribosomal protein L26) beschrieben, welches die Beladung der p53 mRNA mit Ribosomen erhöht (Takagi et al., 2005). RBP38 (RNA binding protein 38) hingegen hemmt die Translation von p53, indem es die Dissoziation des Translationsinitiationsfaktors eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) von der mRNA verursacht (J. Zhang et al., 2011). Die erste miRNA-vermittelte Regulation von p53 wurde für miR-125b und später auch für miR-125a beobachtet (Le et al., 2009; Y. Zhang et al., 2009). Den beiden miRNAs wird eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von Stammzellen zugeschrieben (S. Guo et al., 2010; Ooi et al., 2010; Wojtowitz et al., 2016). Auch miR-504 reprimiert die Expression von p53 und fördert so die Tumorgenese (W. Hu et al., 2010). Darüber hinaus werden viele andere Komponenten p53-abhängiger Signalwege wie HDM2 oder ATM durch miRNAs reguliert und wirken sich daher indirekt auf die zelluläre p53-Konzentration aus (H. Hu et al., 2010; Hermeking, 2012).

1.4.3 p53-abhängige Apoptoseinduktion

Die p53-abhängige Apoptoseinduktion stellt einen wichtigen Mechanismus der Tumorsuppression dar. p53 greift dabei sowohl in den intrinsischen als auch in den extrinsischen Signalweg ein. Die Kontrolle der Mitochondrien-vermittelten Apoptose erfolgt zum einen auf transkriptioneller Ebene, indem p53 die Transkription der pro-apoptotischen BCL-2-Familienmitglieder BCL-2, PUMA und PMAIP aktiviert (Miyashita et al., 1994; Oda et al., 2000; Nakano & Vousden, 2001). Gleichzeitig bewirkt p53 die microRNA-vermittelte Repression des anti-apoptotischen BCL-2 (Bommer et al., 2007). Auf diesem Weg kann p53 das Gleichgewicht in Richtung Apoptose verschieben. Darüber hinaus ist p53 auch an der Bildung des Apoptosoms beteiligt, da *APAF-1* ebenfalls ein Zielgen von p53 darstellt (Moroni et al., 2001; Robles et al., 2001). Zum anderen wurde die Translokation von p53 an die äußere Mitochondrienmembran nach dem Auftreten einer DNA-Schädigung beobachtet (Moll et al., 2005). Dort kann es die anti-apoptotischen Proteine BCL-XL und BCL-2 binden, was zur Freisetzung von BAK und BAX führt und ihre Homooligomerisierung ermöglicht (Mihara et al., 2003). Dem gegenüber stehen aber Untersuchungen, die zeigen, dass mitochondriales p53 nicht per se mit einer Zelltodinduktion verbunden ist (Essmann et al., 2005). Auch eine Interaktion von p53 mit BAK und der daraus resultierenden Verdrängung von MCL-1 wird diskutiert (Leu et al., 2004). Beides ermöglicht die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und aktiviert den intrinsischen Signalweg. Die Expression der Todesrezeptoren FAS/CD95 und TRAIL-R2 wird in der DNA-Schadensantwort p53-abhängig ebenfalls auf transkriptioneller Ebene hochreguliert (Muller et al., 1998; G. S. Wu et al., 1999). Jedoch erfolgte die Induktion gewebespezifisch, sodass die Bedeutung von p53 für den extrinsischen Apoptoseweg nicht eindeutig geklärt ist (Bouvard et al., 2000; Burns et al., 2001).

1.5 Der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor p21^{WAF1/CIP1}

Wie bereits beschrieben, ist p21 ein bedeutender Effektor p53-abhängiger Signalwege, der die Zelle infolge einer DNA-Schädigung in einen temporären oder permanenten Zellzyklusarrest treibt (W. S. el-Deiry et al., 1994; Brown et al., 1997). p21 gehört zur Familie der Cip/Kip-CKIs, welche sowohl mit CDKs als auch mit Cyclinen interagieren (Sherr & Roberts, 1995). Im Zellkern bindet p21 an CDK/Cyclin-Komplexe und inhibiert diese. Durch die Interaktion mit Cyclin E/CDK2, Cyclin D/CDK4 und Cyclin D/CDK6 vermittelt p21 einen Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus, während die Hemmung von Cyclin B1/CDK1, Cyclin A/CDK1 und Cyclin A/CDK2 einen G₂-Arrest auslöst (Waldman et al., 1995; Bunz et al., 1998; Y. S. Jung et al., 2010). Um den Zellzyklus zu arretieren, interagiert p21 auch direkt mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren. So bindet p21 RB-

unabhängig an E2F und hemmt dessen transkriptionelle Aktivität (Delavaine & La Thangue, 1999). Zudem verhindert p21 die Komplexbildung von c-MYC und MAX (*MYC-associated factor X*) sodass die c-MYC-abhängige Genexpression reprimiert wird. Viele Zielgene von c-MYC fördern die Proliferation, darunter CDK2 und CDK4 (Kitaura et al., 2000). Eine inhibierende Wirkung wurde auch auf den Transkriptionsfaktor STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) beobachtet, der eine Vielzahl an proliferationsfördernden Zielgenen aktiviert. Da p21 selbst auf transkriptioneller Ebene von STAT3 reguliert wird, liegt hier vermutlich ein negativer Rückkopplungsmechanismus vor (Coqueret & Gascan, 2000). Die zytostatische Funktion von p21 wird darüber hinaus auch durch die Bindung an PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), einem Kofaktor für diverse DNA-Polymerasen, vermittelt (Flores-Rozas et al., 1994; Waga et al., 1994). Während die DNA-Replikation durch die Bindung von p21 an PCNA blockiert wird, findet die Reparatur von DNA-Schäden weiterhin statt (R. Li et al., 1994). Die transkriptionellen Koaktivatoren p300 und CREB-Bindeprotein werden hingegen durch eine Interaktion mit p21 stimuliert (Perkins, 2002). Diese haben, wie auch p21, eine tumorsupprimierende Funktion (Kung et al., 2000). Im Zytoplasma hingegen besitzt p21 ein anti-apoptotisches Potential, indem es die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 9 und damit die Exekution der Apoptose hemmt (Suzuki et al., 1999; Sohn et al., 2006). Des Weiteren verhindert p21 die Spaltung und Aktivierung der Procaspase-8 und -10 durch den Todesrezeptor TRAIL-1 und somit die Einleitung des extrinsischen Signalwegs (S.-Q. Xu & El-Deiry, 2000).

1.5.1 Regulation von p21

p53 ist der transkriptionelle Hauptaktivator von p21 und bewirkt einen starken Anstieg der Expression, z.B. nach einer DNA-Schädigung (W. S. el-Deiry et al., 1994). p21 wird durch das Gen *CDKN1A* kodiert. Der p21-Promotor enthält zwei Bindungsstellen für p53, die sich -2,3 kb und -1,4 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts (TSS) befinden (W. S. el-Deiry et al., 1993; Resnick-Silverman et al., 1998). Dabei bindet p53 mit einer zehnfach höheren Affinität an das proximale als an das distale Promotorelement (Kaeser & Iggo, 2004). Weitere Transkriptionsfaktoren, die zu einer Hochregulation von p21 führen, sind u. a. SP1, SP3, AP2, MYOD, STAT1, STAT3, STAT5, C/EBP α und C/EBP β (Gartel & Tyner, 1999). In der Literatur wird darüber hinaus oftmals eine transkriptionelle Repression durch c-MYC angeführt. Jedoch ist nicht klar, ob diese direkt durch die Bindung von c-MYC an den p21-Promotor oder indirekt durch die inhibierende Interaktion mit SP1 und SP3 erfolgt (Gartel & Radhakrishnan, 2005).

Auf posttranskriptioneller Ebene regulieren RBPs und miRNAs die Expression von p21. Eine Möglichkeit stellt dabei die RBP-abhängige Modulation der p21-Stabilität dar.

Das RBP HuR erhöht bspw. die Halbwertszeit der p21-mRNA (W. Wang et al., 2000), während AUF-1 (*AU-binding factor 1*) diese verringert (Lal et al., 2004). Darüber hinaus hemmen RBPs wie DDX41 (*DEAD-box helicase 41*) oder Musashi-1 die Proteintranslation von p21 (X. Liu et al., 2014; Peters et al., 2017). miR-20a, miR-22, miR106b und miR-663 bewirken ebenfalls eine Repression von p21 (Ivanovska et al., 2008; Tsuchiya et al., 2011; C. Yi et al., 2012; Sokolova et al., 2015).

Als vorwiegend auftretende posttranslationale Modifikationen sind Serin- und Threoninphosphorylierungen zu nennen, welche die Lokalisation des Proteins in der Zelle, die Bindungsaffinität zu Interaktionspartnern (z.B. CDKs oder PCNA) und seine Stabilität beeinflussen (Gartel & Radhakrishnan, 2005; Child & Mann, 2006). Das p21-Protein unterliegt einem kontinuierlichen proteosomalen Abbau, was sich in einer kurzen Halbwertszeit von 20-60 min widerspiegelt (Abbas & Dutta, 2009). Auf diese Weise wird unter physiologischen Bedingungen das Voranschreiten des Zellzyklus ermöglicht. Erst als zelluläre Antwort auf einen DNA-Schaden steigen die p21-Mengen in Abhängigkeit von p53 an. Zusätzlich bedarf dies der Stabilisierung des p21-Proteins durch WISP39 (*WAF1/CIP1 stabilizing protein 39*), welches gemeinsam mit HSP90 (*heat shock protein 90*) an p21 bindet und so seine Degradation verhindert. Die Beobachtung, dass nach der Inhibition von WISP39 keine strahlungsinduzierte Hochregulation von p21 erfolgen kann, unterstreicht, dass dazu die alleinige Aktivierung der Transkription durch p53 nicht ausreichend ist (Jascur et al., 2005).

1.6 miRNAs

1.6.1 Historischer Überblick

miRNAs sind kurze etwa 22 nt lange nicht-proteinkodierende RNA-Moleküle, die hauptsächlich auf post-transkriptioneller Ebene die Genexpression regulieren. Die erste miRNA, lin-4, wurde im Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt und kontrolliert dessen Larvenentwicklung (R. C. Lee et al., 1993). Es wurde beobachtet, dass lin-4 durch Watson-Crick-Basenpaarung an eine Region in der 3'-UTR der lin-14 mRNA bindet und dadurch die Translation hemmt (R. C. Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993; Y. Lee et al., 2003). Wie sich zeigte, ist die miRNA-vermittelte Genexpression ein zwischen den Spezies hochkonserviertes Konzept, welches auch im Menschen grundlegende Prozesse und Signalwege steuert (Bartel, 2004).

Im humanen Genom sind schätzungsweise mehr als 2000 miRNAs kodiert (Hammond, 2015). Da eine miRNA über eine Vielzahl an Ziel-mRNAs verfügt, geht man davon aus, dass sie etwa 30% des Genoms regulieren können, wodurch ihr großes regulatorisches Potential betont wird (Lewis et al., 2005; M. Li et al., 2009). So sind

miRNAs z.B. neben entwicklungsbiologischen Prozessen auch an der Zellproliferation, -differenzierung oder der Apoptose beteiligt (Y. Cai et al., 2009). Aberrante miRNA-Expressionsmuster werden daher wenig überraschend mit diversen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht, darunter kardiovaskuläre Erkrankungen, Multiple Sklerose oder Diabetes Typ II (Y. Li & Kowdley, 2012). Die veränderte Expression von miRNAs kann für verschiedene Krebsarten als Tumormarker verwendet werden und korreliert oftmals mit dem Stadium der Erkrankung oder der Prognose (Calin & Croce, 2006). Dabei fungieren miRNAs sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene (M. Li et al., 2009).

1.6.2 Genomische Organisation von miRNAs

miRNA-Gene sind auf allen Chromosomen mit Ausnahme des Y-Chromosoms zu finden. Sie können zwischen Genen (*intergenic*) sowie in Introns (*intronic*) oder vergleichsweise selten auch in Exons (*exonic*) von proteinkodierenden Genen oder *long non-coding* RNAs lokalisiert sein (Olena & Patton, 2010). Die Expression von *intra-genic* miRNAs wird über einen eigenen Promotor induziert (Yoontae Lee et al., 2004). Auch *intronic* miRNAs können über eine eigenständige transkriptionelle Regulation verfügen (Ozsolak et al., 2008; X. Wang et al., 2009; Monteys et al., 2010), werden jedoch häufiger mit ihrem parentalen Gen kotranskribiert (Baskerville & Bartel, 2005). Ist letzteres der Fall, korreliert dementsprechend die Expression der miRNA und mRNA. Zudem können miRNAs als einzelne Gene (monocistronisch) oder in Form von Genclustern (polycistronisch) vorliegen. Gencluster bestehen aus mehreren miRNAs, die eine maximale Entfernung von bis zu 10 kB aufweisen und eine transkriptionelle Einheit, die pri-miRNA (*primary-miRNA*), bilden (Lau et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2001).

1.6.3 miRNA Biogenese

Die miRNA Biogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der den Weg ausgehend von der miRNA Transkription zur reifen, funktionell aktiven miRNA umfasst (Abb. 5). Im Nukleus werden miRNAs meist von der RNA Polymerase II (Pol II) in eine vorläufige pri-miRNA transkribiert (Yoontae Lee et al., 2004). Nur in Ausnahmefällen erfolgt die Transkription auch durch die RNA Polymerase III (Borchert et al., 2006). Die pri-miRNA verfügt, wie auch mRNAs, über eine 7-Methylguanosin-Kappe (Cap) am 5'-Ende sowie einen Poly-Adenin-Schwanz am 3'-Ende (X. Cai et al., 2004). Sie kann in eine Haarnadelstruktur, den imperfekt gepaarten Stamm sowie die einzelsträngigen basalen Segmente am 5'- und 3'-Ende unterteilt werden (Abb. 4). Die Sequenz der späteren reifen miRNAs befindet sich dabei im Stamm der pri-miRNA und wird durch zwei nukleolytische Spaltungen freigesetzt (Ha & Kim, 2014).

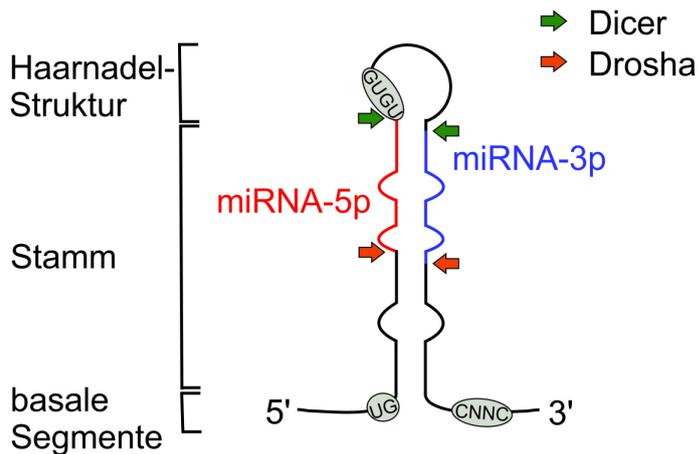


Abb. 4: Schematische Darstellung einer pri-miRNA. Die Regionen der reifen miRNAs, entsprechend ihrer Orientierung miRNA-5p (rot) und miRNA-3p (violett), sind farblich hervorgehoben. Die Pfeile geben die Prozessierungsstellen durch die Endonukleasen Dicer (grün) und Drosha (orange) an. In grau sind Sequenz-Motive hinterlegt, welche zur Erkennung durch den Drosha/Dicer-Komplex beitragen. (adaptiert von Ha & Kim, 2014).

Noch im Zellkern erfolgt der erste Prozessierungsschritt durch den Mikroprozessor-Komplex, der aus der RNase-Typ III Endonuklease Drosha und dem RNA-bindenden Protein DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) gebildet wird (Han et al., 2004; Gregory et al., 2004). Voraussetzung für die effiziente Spaltung ist das Vorhandensein der einzelsträngigen basalen Segmente, sowie eine Mindestgröße der Haarnadelstruktur (>10 Nukleotide) (Zeng & Cullen, 2005). Darüber hinaus wurden Sequenz-Motive in diesen Bereichen identifiziert, die für eine optimale Prozessierung benötigt werden (Abb. 4) (Han et al., 2006; Auyeung et al., 2013). Der Mikroprozessor-Komplex schneidet die pri-miRNA im Bereich des unteren Stamms (Abb. 4), sodass die pre-miRNA (*precursor-miRNA*) mit einer Größe von nun 60-70 Nukleotiden entsteht (Y. Lee et al., 2003). Bei der Spaltung wird ein 2 nt-Überhang am 3'-Ende der pre-miRNA generiert, welcher als Erkennungsmerkmal für den Export aus dem Zellkern sowie den anschließenden zweiten Prozessierungsschritt dient (H. Zhang et al., 2002; Zeng & Cullen, 2004; Lund et al., 2004; Tian et al., 2014). Die pre-miRNA wird aktiv von Exportin-5, welches mit Ran-GTP (*ras-related nuclear protein-guanosine triphosphate*) assoziiert vorliegt, ins Zytoplasma transportiert (R. Yi et al., 2003; Lund et al., 2004). Im nächsten Schritt schneidet die RNase-Typ III Endonuklease Dicer in einem Komplex mit TRBP (*trans-activating responsive RNA-binding protein*) im oberen Teil des miRNA-Stamms und entfernt so die Haarnadelstruktur. Durch deren Abspaltung entsteht ein miRNA-miRNA-Duplex, welcher das letzte Intermediat der Biogenese darstellt. Die beiden Einzelstränge des Duplex entsprechen jeweils einer reifen miRNA und werden gemäß ihrer Orientierung als miRNA-5p bzw. miRNA-3p bezeichnet. Obwohl beide Stränge in gleicher Menge synthetisiert werden, unterscheidet sich ihre Konzentration in der Zelle. In der Regel liegt einer der beiden Stränge in einer größeren Anzahl vor und wird daher als Hauptprodukt (*guide strand*, miRNA) bezeichnet. Der andere Strang, welcher als Nebenprodukt (*passenger strand*, miRNA*) gebildet wird, wird degradiert (Guo & Lu, 2010). Gewöhnlich wird derjenige Strang zum Hauptprodukt ausgewählt, welcher die größere

thermodynamische Instabilität am 5'-Ende aufweist (Khvorova et al., 2003). Weiterhin begünstigt ein Überschuss an Purinen am 5'-Ende sowie einem Uridin an Position 1 die Wahrscheinlichkeit einer Selektion (Hu et al., 2009). Grundsätzlich können jedoch beide Stränge funktionell aktiv sein (Guo & Lu, 2010). Das Verhältnis zwischen den beiden Strängen kann sich zudem in Abhängigkeit von der Umgebung, dem Entwicklungsstadium oder dem Zelltyp verschieben (Ro et al., 2007; Landgraf et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass noch weitere, bisher unbekannte Kriterien bei der Auswahl des aktiven miRNA-Strangs eine Rolle spielen. Der mRNA-miRNA-Duplex wird in den Multiproteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) inkorporiert, dessen Kernkomponente ein Argonautprotein (AGO) darstellt (J. Martinez et al., 2002). Für die Beladung des RISC-Komplexes mit der miRNA wird in *Drosophila melanogaster* der sogenannte *RISC Loading Complex* (RLC) benötigt (Q. Liu et al., 2003). In Säugetieren könnte diese Funktion von Dicer und TRBP übernommen und die miRNA nach der Prozessierung direkt auf AGO übertragen werden (Chendrimada et al., 2005; MacRae et al., 2008; H. W. Wang et al., 2009). Dieser Mechanismus scheint jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. In Dicer-defizienten, embryonalen Stammzellen der Maus ist zwar die Prozessierung von unreifen miRNAs deutlich eingeschränkt, eine Beladung des RISC mit RNA-Molekülen konnte jedoch weiterhin stattfinden (Murchison et al., 2005; Kanellopoulou et al., 2005; Kim et al., 2016). Die Assemblierung der miRNA mit dem RISC erfolgt unter ATP-Hydrolyse und wird durch die Chaperone HSC70 (*heat shock cognate 70*) und HSP90 (*heat shock protein 90*) vermittelt (Iwasaki et al., 2010). Im Anschluss wird der Duplex entwunden, der Nebenstrang aus dem Komplex entlassen und degradiert (Kawamata et al., 2009; Guo & Lu, 2010). Der gereifte RISC enthält eine nun einzelsträngige miRNA, sodass eine sequenzspezifische Interaktion mit den Ziel-mRNAs erfolgen kann.

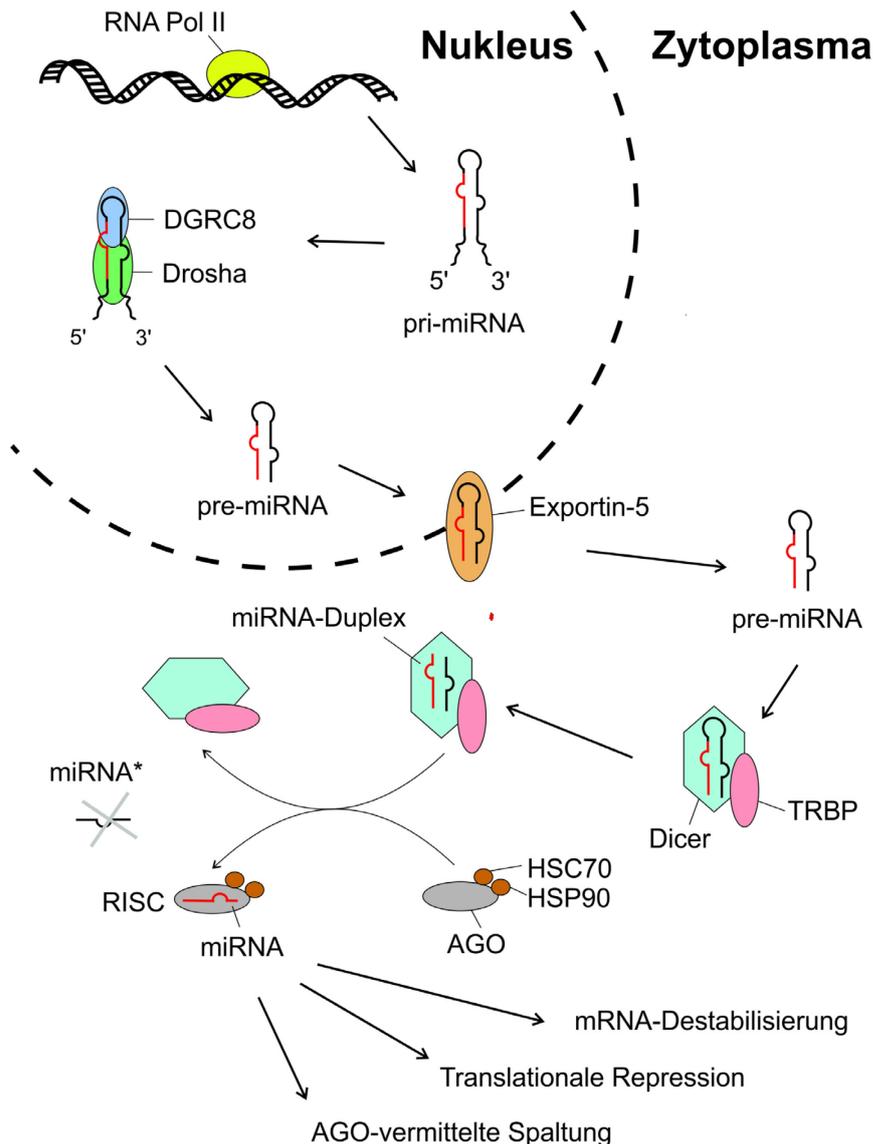


Abb. 5: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese. miRNAs werden durch die RNA-Polymerase II in die vorläufige pri-miRNA transkribiert. Im Zellkern erfolgt die Spaltung der pri-miRNA durch den Droscha/DGCR8-Komplex, sodass die pre-miRNA entsteht. Diese wird anschließend von Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert. Dort prozessiert der Dicer/TRBP-Komplex die pre-miRNA und ein miRNA-Duplex wird freigesetzt. Dieser wird in den Multiproteinkomplex RISC, dessen Kernkomponente ein Argonautprotein darstellt, inkorporiert. Der Duplex wird entwunden und nur ein miRNA-Strang verbleibt im RISC (*guide strand*), während der andere degradiert wird (*passanger strand*). Der aktive RISC-Komplex induziert entweder die AGO-vermittelte Spaltung der Ziel-mRNA, die Repression der Translation oder ihre Destabilisierung. (modifiziert nach Treiber et al., 2019). AGO, Argonautprotein; DGCR8, *DiGeorge syndrome critical region 8*; HSC70, *heat shock cognate 70*; HSP90, *heat shock protein 90*; RISC, *RNA-induced silencing complex*; RNA-Pol II, RNA-Polymerase II; TRBP, *transactivating response RNA-binding protein*.

1.6.4 miRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation

Die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch miRNAs basiert auf einer (partiellen) Sequenzkomplementarität mit der Ziel-mRNA. Der Grad der Übereinstimmung entscheidet dabei über den Mechanismus der Hemmung. Eine vollständige Komplementarität führt zur AGO-vermittelten endonukleolytischen Spaltung und anschließender Degradation der mRNA (Meister et al., 2004). Dies ist jedoch vorwiegend

in Pflanzenzellen zu beobachten (Rhoades et al., 2002; Llave et al., 2002; Voinnet, 2009). In Säugerzellen hingegen liegt in der Regel eine partiell komplementäre Basenpaarung vor, die zwischen der 3'-UTR der mRNA und den Nukleotiden 2-8 am 5'-Ende der miRNA, der *Seed*-Sequenz, ausgebildet wird. In diesem Fall erfolgt die Regulation entweder durch die Repression der Translation oder durch die miRNA-vermittelte Destabilisierung der mRNA. Die Struktur des miRNA-mRNA-Duplexes, z.B. die Anzahl der Basenpaarungen und deren Position, beeinflusst die Entscheidung auf welchem Weg die Regulation stattfindet (Alemán et al., 2007; Grimson et al., 2007). Zudem scheint die miRNA-abhängige Genregulation auch eine zeitliche Dynamik zu besitzen. In der frühen Phase tritt vorwiegend translationale Repression auf, während in der späteren Phase die Destabilisierung dominiert (Eichhorn et al., 2014).

Ausgangspunkt für miRNA-vermittelte Destabilisierung der Ziel-mRNA stellt die Entfernung des Poly-A-Schwanzes durch die Deadenylase-Komplexe PAN2-PAN3 (*poly-A-nuclease 2/3*) sowie CCR4-NOT (*C-C motif receptor 4-NOT*) dar. Diese werden durch das Adapterprotein TNRC6 (*trinucleotide repeat-containing gene 6*), welches an den RISC gebunden ist, rekrutiert. Im Anschluss findet die Hydrolyse der 5'-Cap-Struktur der mRNA durch DCP2 (*decapping protein 2*) statt und führt letztendlich zur Spaltung durch die Exoribonuklease XRN1P (5'-3' Exoribonuklease 1) (Parker & Song, 2004; Giraldez et al., 2006; L. Wu et al., 2006). Der Mechanismus der translationalen Hemmung ist hingegen noch nicht vollständig entschlüsselt. Gerade die Frage, zu welchem Zeitpunkt der Translation (z.B. Initiation oder Elongation) die miRNA-abhängige Regulation stattfindet, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigten, dass nach Durchführung einer Sucrose-Polysomen-Gradientensedimentation miRNA und mRNA in der gleichen Fraktion wie die aktiven Ribosomen vorliegen, was auf eine Hemmung nach Beginn der Translation hindeutete (Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006). Konträr dazu wiesen andere Forschungsgruppen nach, dass in Anwesenheit der miRNA die ribosomale Beladung der Ziel-mRNA vermindert war und schlossen daraus auf eine Repression vor dem Start der Translation (Pillai et al., 2005; Ding & Grosshans, 2009). Nach derzeitigem Konsens hemmen miRNAs die Initiation der 5'-Cap-abhängigen Translation (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Mathonnet et al., 2007). Voraussetzung hierfür ist die Bindung des eIF4F-Proteinkomplexes an die 5'-Cap-Struktur der mRNA. Dieser entwindet nachfolgend die Sekundärstruktur der mRNA und rekrutiert die ribosomale Untereinheit 43S (Jackson et al., 2010). Der genaue Mechanismus, wie die Assemblierung des eIF4F-Proteinkomplexes durch den RISC verhindert wird, ist bisher jedoch nicht geklärt, da viele gegensätzliche Beobachtungen beschrieben wurden (Fabian & Sonenberg, 2012; Wilczynska & Bushell, 2015). Es wird vermutet, dass auch hier der CCR4-NOT-Komplex eine Rolle spielt, da gezeigt werden konnte, dass dieser -unabhängig von seiner

Deadenylase-Funktion- eine translationale Repression vermitteln kann (Cooke et al., 2010). Charakteristisch für die translationale Repression einer mRNA ist die Detektion einer verringerten Proteinexpression bei einer unveränderten Anzahl an mRNA-Kopien. Nach heutigem Erkenntnisstand erfolgen nur 10 - 26% der miRNA-vermittelten Regulation durch eine Hemmung der Translation, während die Destabilisierung der mRNA den Hauptmechanismus darstellt (H. Guo et al., 2010; Eichhorn et al., 2014; Jonas & Izaurralde, 2015). miRNAs sind dementsprechend in der Regel negative Regulatoren der Genexpression. Obwohl es auch Hinweise gibt, dass miRNAs die Translation von Ziel-mRNAs steigern können, handelt es sich dabei um Einzelfälle und ein universeller molekularer Mechanismus wurde bisher nicht beschrieben (Dragomir et al., 2018).

1.6.5 miRNAs als Effektoren in p53-abhängigen Signalwegen

Neben proteinkodierenden Genen aktiviert der Transkriptionsfaktor p53 auch die Expression verschiedener miRNAs. Dementsprechend stellen diese ein weiteres regulatorisches Werkzeug dar und liefern einen funktionellen Mechanismus für die bisher kaum verstandene p53-vermittelte Repression von Zielgenen. Eine p53-abhängige Induktion wurde zum ersten Mal für die miR-34-Familie beschrieben, wobei die Funktion der miR-34a am besten charakterisiert ist (Tarasov et al., 2007; T. C. Chang et al., 2007). Zu den Ziel-mRNAs der miR-34a gehören unter anderem CDK4/6, Cyclin E2, und E2F, mittels derer miR-34a eine Arretierung des Zellzyklus auslöst (Bommer et al., 2007; Welch et al., 2007). Die Repression des anti-apoptotischen BCL-2-Proteins durch miR-34a sensitiviert die Zellen gegenüber einem apoptotischen Stimulus (Bommer et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007). Auch wurde die Einleitung von zellulärer Seneszenz nach miR-34a-Überexpression beobachtet (He et al., 2007; Tazawa et al., 2007). Darüber hinaus tragen miRNAs auch zur Aktivität von p53 bei, indem sie negative Regulatoren von p53 inhibieren und so einen positiven Rückkopplungsmechanismus auslösen. miR-34a hemmt beispielsweise HDMX und stabilisiert damit p53 (Okada et al., 2014). Zusätzlich inhibiert miR-34a die SIRT1 (Sirtuin 1)-vermittelte Deacetylierung von p53, welche eine verminderte transkriptionelle Aktivität von p53 zur Folge hat (Yamakuchi et al., 2008). Neben miR-34a wurden noch weitere miRNAs identifiziert, deren Expression in Abhängigkeit von p53 aktiviert wird. Zum Beispiel leiten miR-107, miR-192, miR-205 und miR-215 einen Zellzyklusarrest ein, während miR-22 diesen durch die Repression von p21 verhindert (Braun et al., 2008; Georges et al., 2008; Böhlig et al., 2010; Tsuchiya et al., 2011; Liao et al., 2014). Für miR-16 wurde eine pro-apoptotische Funktion beschrieben, die durch die Repression von Survivin zustande kommt (Q. Ma et al., 2013). Die bisherigen Untersuchungen legen nahe, dass miRNAs essentielle Funktionen in p53-abhängigen Signalwegen innehaben und durch deren Feinabstimmung das Zellschicksal

beeinflussen. Auch wenn seit der Entdeckung der miRNAs bereits viele Erkenntnisse gewonnen werden konnten, sind die genauen Funktionen vieler miRNAs noch unklar.

Aus diesem Grund wurde im Labor für Molekulare Radioonkologie ein *Microarray* durchgeführt, mit dem Ziel miRNAs zu identifizieren, die in der p53-abhängigen, strahlungsinduzierten Seneszenz verstärkt exprimiert werden. Dafür wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT116 verwendet, deren Zellschicksal nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung (IR) von der Anwesenheit von p53 abhängt. Während bestrahlte p53-profiziente HCT116 Wildtyp-Zellen Seneszenz einleiten, geht ihr p53-defizientes Derivat (HCT116 p53^{-/-}) in die Apoptose (Sohn et al., 2006). Durch den Vergleich der miRNA Expressionsprofile beider Zelllinien war es möglich, gezielt solche miRNAs zu identifizieren, die p53-abhängig spezifisch in bestrahlten und dadurch seneszenten Zellen hochreguliert waren. Zu diesen gehörte auch miR-30e, deren Funktion im Zuge dieser Arbeit weiterführend charakterisiert werden soll.

1.6.6 miR-30 Familie

Die miR-30-Familie umfasst die fünf Mitglieder miR-30a-e, wobei miR-30c an zwei verschiedenen Orten im Genom kodiert ist (miR-30c1 und miR-30c2) (S. J. Yang et al., 2017). Mitglieder einer miRNA-Familie zeichnen typischerweise hohe Homologien untereinander aus (Tab. 1). Obwohl die *Seed*-Sequenzen der reifen miRNAs identisch sind (in blau hervorgehoben), überlappen sich die Spektren ihrer Ziel-mRNAs nur partiell (S. J. Yang et al., 2017; L. Mao et al., 2018). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Komplementarität zwischen der *Seed*-Region (Nukleotide 2-7) und der Ziel-mRNA eine Mindestanforderung zur Erkennung darstellt und darüber hinaus eine Spezifizierung über die Nukleotide 12-16 erfolgen kann (Brennecke et al., 2005; Grimson et al., 2007; Schirle et al., 2014; Chipman & Pasquinelli, 2019).

Tab. 1: Sequenzen der miR-30-Familie. Konservierte Nukleotide sind in fetten Buchstaben, die *Seed*-Sequenz in blau hervorgehoben.

	Sequenz der reifen miRNA
miR-30a-5p	UG UAAACA UCCUCGACUGGAAG
miR-30b-5p	UG UAAACA UCCUACACUCAGCU
miR-30c-5p	UG UAAACA UCCUACACUCUCAGC
miR-30d-5p	UG UAAACA UCCCCGACUGGAAG
miR-30e-5p	UG UAAACA UCCUUGACUGGAAG

1.6.6.1 miR-30e

Die genomische Sequenz von *MIR30E* ist im Intron des *NFYC* (*nuclear transcription factor Y subunit γ*)-Gens lokalisiert, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Da sich dort ebenfalls *MIR30C* befindet, wird angenommen, dass diese ein Gencluster bilden (L. Mao et al., 2018). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass *MIR30C* unabhängig von *MIR30E* über einen eigenen Promotor reguliert wird (Bockhorn et al., 2013). Die Expression von miR-30e ist in auffällig vielen Tumorerkrankungen vermindert, darunter Leberkrebs, Brustkrebs, chronische myeloische Leukämie, kolorektales Karzinom, Kopf-Hals-Tumore oder Lungenkrebs (F. Wu et al., 2009; Wong et al., 2012; Hershkovitz-Rokah et al., 2015; Lin et al., 2016; Bhattacharya et al., 2016; Y. Wang et al., 2016; Laudato et al., 2017; S. Zhang et al., 2019). Darüber hinaus dient das verringerte Vorkommen von miR-30e im Blutserum von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom als Biomarker für die Erkrankung (Bhattacharya et al., 2016). Bei Patienten mit Brustkrebs korreliert die Abnahme von miR-30e sogar mit der Progression (Lin et al., 2016).

In tumorinduzierenden Bruststammzellen hemmt miR-30e über die Regulation von UBC9 (*ubiquitin carrier protein 9*) auf der einen Seite die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und forciert auf der anderen Seite die Induktion von Apoptose (Yu et al., 2010). Auch das Tumorwachstum kann durch die Überexpression von miR-30e verringert werden, wie Versuche mit Brustkrebs-Xenograft-Modellen belegen. miR-30e inhibiert das *Insulinrezeptorsubstrat 1* (IRS1) und greift so unter anderem in Proteinkinase B, ERK1/2 (*mitogen-activated protein kinase 1/2*)- und HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*)-gesteuerte Signalwege ein. Auf diese Weise kann zudem die Sensitivität von Brustkrebszellen gegenüber der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel erhöht werden (M.-M. Liu et al., 2017). Weiterhin hemmt miR-30e den JAK (*janus kinase*) / STAT3-Signalweg, welcher in vielen Tumoren konstitutiv aktiviert ist und die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen fördert (J. Mao et al., 2017). Über die negative Regulation von SNAIL1 moduliert miR-30e zudem den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition, indem es die Invasion und Migration von Krebszellen verhindert (D. Wang et al., 2017). In diesem Kontext sind auch die Ziel-mRNAs AEG-1 (*astrocyte elevated gene-1*) sowie Ubiquitin-spezifische Peptidase 22 (USP22) zu nennen, deren Hemmung ebenfalls eine Invasion und Metastasierung unterbindet (S. Zhang et al., 2019) (Y. X. Ma et al., 2018). Zusammengefasst belegen die Untersuchungen die Bedeutung der miR-30e für die Tumorgenese und unterstreichen ihr tumorsupprimierendes Potential.

1.7 Zielsetzung

miRNAs stellen eine bedeutsame Komponente p53-abhängiger Signalwege dar und beeinflussen durch die posttranskriptionelle Regulation ihrer Ziel-mRNAs das Zellschicksal. Um ein besseres Verständnis zu erlangen, wie das p53-Signalnetzwerk durch miRNAs gesteuert wird, steht die miR-30e im Fokus dieser Arbeit. Ein *Microarray*, der im Vorfeld dieser Arbeit im Labor für Molekulare Radioonkologie durchgeführt wurde, ergab, dass die Expression von miR-30e in der strahlungsinduzierten Seneszenz p53-abhängig verstärkt wird.

In dieser Dissertation sollte die Rolle der miR-30e als Entscheidungsträger in strahlungsinduzierten Signalwegen untersucht werden. Zum einen sollte die p53-abhängige Expression von miR-30e verifiziert und der Mechanismus der Regulation entschlüsselt werden. Da es sich bei p53 um einen Transkriptionsfaktor handelt, ist es denkbar, dass miR-30e unter der direkten Kontrolle von p53 steht. Zum anderen sollte eine funktionelle Charakterisierung der miR-30e in DNA-Schädigungssignalwegen erfolgen und analysiert werden, wie und in welchem Ausmaß sich die Expression von miR-30e auf die unterschiedlichen Zellschicksalsprogramme (Seneszenz und Apoptose) auswirkt. Ziel der Analysen war die Identifizierung von miR-30e-abhängigen Ziel-mRNAs, um die molekularen Mechanismen ihrer Funktion aufzuklären. Von besonderem Interesse sind dabei solche Proteine, die an der Induktion und Manifestierung der Seneszenz nach Strahlenexposition beteiligt sind. Zur Validierung der Ergebnisse sollten zudem mit Hilfe des CRISPR/CAS9-Systems miR-30e-defiziente HCT116-Zellen generiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt) und VWR (Radnor, USA) bezogen.

Tab. 2: Ausgewählte Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
HD Green DNA-Dye	Intas
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid)	Sigma-Aldrich (Merck)
Bafilomycin A1	Applichem
Ac-DEVD-AMC	Biomol
TaqMan Universaler Master-Mix für PCR, keine AmpErase UNG	Thermo Fisher Scientific
Streptavidin-Agarose	Trilink Biotechnologies
Actinomycin D	Sigma-Aldrich (Merck)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
C ₁₂ -FDG	Marker Gene Technologies
30% Acrylamide/Bis Solution (29:1)	Bio-Rad

2.1.2 Zelllinien

Tab. 3: Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Bezugsquelle
HCT116 Wildtyp	Humane Kolonkarzinomzelllinie	B. Vogelstein (Baltimore, MD, USA)
HCT116 p53 ^{-/-}	Humane Kolonkarzinomzelllinie defizient für p53-Expression	B. Vogelstein (Baltimore, MD, USA)
HCT116 miR-30e Klon #8, #29, #50	Humane Kolonkarzinomzelllinie miR-30e- <i>Knockdown</i>	s. Kapitel 2.2.20

2. Material und Methoden

2.1.3 Zellkultur

Tab. 4: Zellkultur

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dharmafect 1	Dharmacon Horizon Discovery
Dharmafect Duo	Dharmacon Horizon Discovery
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
McCoy 5A	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
Optimem	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
PBS	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
Penicillin/Streptomycin	Merck Millipore
Puromycin	Sigma-Aldrich (Merck)
siRNA-Puffer (5x)	Dharmacon Horizon Discovery
Trypsin/EDTA	Biochrom

2.1.4 miRNA-Mimiks

Tab. 5: miRIDIAN microRNA Mimics

	Artikelnummer	Bezugsquelle
Negative Control #1	CN-001000-01	Dharmacon Horizon Discovery
miR-30e-5p	C-300661-07	Dharmacon Horizon Discovery

2.1.5 miRNA-Inhibitor

Tab. 6: miRCury LNA miRNA Power Inhibitor

Ziel-miRNA	Artikelnummer	Bezugsquelle
miR-30e-5p	339130 Y104101285-DCA	Qiagen

2. Material und Methoden

2.1.6 siRNA

Tab. 7: ON-TARGETplus siRNA SMART pool

Ziel-mRNA	Artikelnummer	Bezugsquelle
Negativkontrolle	D-001810-10	Dharmacon Horizon Discovery
TP53	L-003329-00	Dharmacon Horizon Discovery
CEBP α	L-006422-00	Dharmacon Horizon Discovery
MEF2C	L-009455-00	Dharmacon Horizon Discovery
MEF2D	L-009884-00	Dharmacon Horizon Discovery

2.1.7 CRISPR/CAS9

Tab. 8: CRISPR/CAS9

Bezeichnung	Artikelnummer	Bezugsquelle
hCMV-mKATE2-CAS9 Expressionsplasmid	U-004100	Dharmacon Horizon Discovery
hCMV-PuroR-CAS9 Expressionsplasmid	U-005100	Dharmacon Horizon Discovery
tracrRNA	U-002005	Dharmacon Horizon Discovery

Tab. 9: crRNA

	Zielsequenz	Bezugsquelle
crRNA 1	5'-CTACTGGTAAACATCCTTGAC-3'	Dharmacon Horizon Discovery
crRNA 2	5'-ATCCTTGACTGGAAGCTGTA-3'	Dharmacon Horizon Discovery
crRNA 3	5'-CACCTTACAGCTTCCAGTCA-3'	Dharmacon Horizon Discovery
crRNA 4	5'-GGAAGCTGTAAGGTGTTTCAG-3'	Dharmacon Horizon Discovery
crRNA 5	5'-TGTTTCAGAGGAGCTTTCAGT-3'	Dharmacon Horizon Discovery

2. Material und Methoden

2.1.8 Antikörper

Tab. 10: Primärantikörper

Antigen	Klon	Spezies	Verdünnung	Artikelnummer	Bezugsquelle
β-Actin	AC-74	Maus	1:5.000	A 5316	Sigma-Aldrich (Merck)
p21 ^{WAF1/CIP1}	SX-118	Maus	1:500	556430	BD Pharmingen
CEBPα	EP708Y	Kaninchen	1:1.000	ab40761	Abcam
CEBPα	D-5	Maus	1:250	sc-365318	Santa Cruz
Caspase-3	polyklonal	Ziege	1:2.000	AF-605-NA	R&D Systems
MEF2C	F-10	Maus	1:500	sc-365862	Santa Cruz
MEF2C	polyklonal	Kaninchen	0,4 µg/ml	HPA005533	Sigma-Aldrich (Merck)
MEF2D	polyklonal	Kaninchen	0,4 µg/ml	HPA004807	Sigma-Aldrich (Merck)
p53 (Ab-6)	DO-1	Maus	1:1.000	OP43	Calbiochem

Tab. 11: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Reaktivität	Verdünnung	Artikelnummer	Bezugsquelle
IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG	Maus	1:15.000	926-32210	LI-COR Biosciences
IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG	Maus	1:30.000	926-68070	LI-COR Bioscience
IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG	Kaninchen	1:15.000	926-32211	LI-COR Bioscience
IRDye 680CW Goat anti-Rabbit IgG	Kaninchen	1:30.000	926-68071	LI-COR Bioscience
IRDye 800CW Donkey anti-Goat IgG	Ziege	1:15.000	26-32214	LI-COR Bioscience

2.1.9 TaqMan-Sonden

Tab. 12: TaqMan mRNA-Sonden

Zielgen	ID/Artikelnummer	Bezugsquelle
<i>CDKN1A</i>	Hs99999142_m1	ThermoFisher Scientific
<i>MEF2C</i>	Hs00231149_m1	ThermoFisher Scientific
<i>NFYC</i>	Hs00360261_m1	ThermoFisher Scientific
<i>ACTB</i>	4352935E	ThermoFisher Scientific

Tab. 13: TaqMan miRNA-Sonden

Zielgen	ID	Bezugsquelle
<i>MIR30E(-5p)</i>	002223	Thermo Fisher Scientific
<i>MIR30E(-3p)</i>	000422	Thermo Fisher Scientific
<i>MIR30C(-5p)</i>	000419	Thermo Fisher Scientific
<i>RNU6B</i>	001093	Thermo Fisher Scientific

2.1.10 Oligonukleotide

Tab. 14: Oligonukleotide (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)

Anwendung	Orientierung	Sequenz
<i>Pulldown</i> -Sonde p53-BS	vorwärts	5'-Biotin-CTAGGCAGCTTCTGCAGCCAC-3'
	rückwärts	5'-AGTACCTACTAAGTGTCTAGTAC-3'
<i>Pulldown</i> -Sonde 600 bp-Promotor	vorwärts	5'-Biotin-TGACCTAGTGAGGGATCAGTG-3'
	rückwärts	5'-GAGGCCAGATCTTGATATCCTC-3'
Sequenzierung <i>MIR30E</i> -Genlocus	vorwärts	5'-TGTAATTCTGACCCTGCATG-3'
	rückwärts	5'-CAAAGCCGGTGCGTAGCTG-3'
miR-30e-Promotor	vorwärts	5'- TTAGCTAGCTCTTAACTATACATAATATGTTGG G-3'
	rückwärts	5'- TTAAAGCTTGTAGCAAAGACTGCCCAGAAAG- 3'
miR-30c-Promotor	vorwärts	5'-TTACTCGAGCAGGCTGCCACGGTCGTCC-3'
	rückwärts	5'- TTAAAGCTTCACTACAGCATGGTTATAGCCCA C-3'
p21-Promotor	vorwärts	5'-TTAGGTACCTATCTCCATCAAGGCTTCTGC- 3'
	rückwärts	5'-TTAGCTAGC- TCTGAGTGCCTCGGTGCCTCG-3'
p21-Promotor- fragment 6	vorwärts	5'-AGTCCTGTGTTCCAACCTATAG-3'
	rückwärts	5'-AGCCACCAGCCTCTTCTATG-3'
p21-Promotor- fragment 7	vorwärts	5'-ATGTATTAATGTCATCCTCCTG-3'
	rückwärts	5'-ATGACTATAGTTGGAACACAGG-3'
p21-Promotor- fragment 8	vorwärts	5'-ATGTATTAATGTCATCCTCCTG-3'
	rückwärts	5'-AGCCACCAGCCTCTTCTATG-3'

2.1.11 Bakterienstamm

Tab. 15: Bakterienstamm

Bezeichnung	Stamm	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH5 α	DH5 α	(F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r κ ⁻ , κ ⁺) <i>phoA sup</i> E44 λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>)

2.1.12 Plasmid-DNA

Tab. 16: Plasmid-DNA

Bezeichnung	Artikelnummer	Bezugsquelle
pcDNA3	-	F. Essmann (Graupner et al., 2009)
pcDNA3-FLAG-TP53	-	F. Essmann (Graupner et al., 2009)
pGL4.10[<i>luc2</i>]	E6651	Promega
pGL4.74[<i>hRluc</i> /TK]	E6921	Promega
pGL4.10[<i>luc2</i>] p21-Promotor	-	s. Kapitel 2.2.14.3
pGL4.10[<i>luc2</i>] p21-Promotor Fragment 1-8	-	s. Kapitel 2.2.14.11
[pGL4.10[<i>luc2</i>] miR-30e-Promotor	-	s. Kapitel 2.2.14.2
pGL4.10[<i>luc2</i>] miR-30c-Promotor	-	s. Kapitel 2.2.14.2

2. Material und Methoden

2.1.13 Enzyme

Tab. 17: Enzyme

Zielgen	Artikelnummer	Bezugsquelle
FastDigest Acc65I	FD0604	Thermo Fisher Scientific
FastDigest HindIII	FD0504	Thermo Fisher Scientific
FastDigest PaeI	FD0604	Thermo Fisher Scientific
FastDigest SacI	FD1133	Thermo Fisher Scientific
FastDigest Swal	FD1244	Thermo Fisher Scientific
FastDigest VspI	FD1244	Thermo Fisher Scientific
FastDigest XhoI	FD0695	Thermo Fisher Scientific
HindIII-HF	R0104	New England Biolabs
Klenow Fragment	EP0051	Thermo Fisher Scientific
KpnI-HF	R3142	New England Biolabs
LA <i>Taq</i> DNA-Polymerase	RR002A	Takara
NheI-HF	R3131	New England Biolabs
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	M7741	Promega
<i>Phusion</i> High-Fidelity DNA-Polymerase	M0530	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	M202	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	EP0401	Thermo Fisher Scientific

2.1.14 Größenstandards

Tab. 18: Größenstandards

Bezeichnung	Artikelnummer	Bezugsquelle
PageRuler Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Fisher Scientific
SmartLadder (0,2-1 kbp)	MW-1700	Eurogentec

2. Material und Methoden

2.1.15 Kits

Tab. 19: Kits

Bezeichnung	Artikelnummer	Bezugsquelle
Cytotoxicity Detection Kit	11644793001	Roche
DNeasy Blood and Tissue Kit	69506	Qiagen
Dual-Glo Luciferase Assay	E2980	Promega
GenElute HP Plasma Maxi Kit	NA0310-1KT	Sigma Aldrich (Merck)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Applied Biosystems
miRNeasy Mini Kit	217004	Qiagen
Nuclear Extraction Kit	SK-0001	Signosis
Promoter-Binding TF Profiling Array II	FA-2002	Signosis
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	E0554S	New England Biolabs
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	12263	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen
RNeasy Mini Kit	74106	Qiagen
TaqMan MicroRNA Reverse Transkription Kit	4366597	Applied Biosystems
Topo TA Cloning Kit für die Sequenzierung	450030	Thermo Fisher Scientific

2.1.16 Weitere Materialien

Tab. 20: Weitere Materialien

Gerätebezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
PVDF-Membran Immobilon-FL	IPF00010	Merck Millipore
Flowmi Cell Strainers (40 µM)	BAH136800040	Sigma Aldrich (Merck)

2. Material und Methoden

2.1.17 Geräte

Tab. 21: Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller	Anwendung
HeraSafe	ThermoFisher Scientific	Sterilarbeitsbank
HeraCell 240	Thermo Fisher Scientific	Zellkulturinkubator
MiniProtean III	Bio-Rad	Blot-Apparatur
Certomat BS-1	Sartorius AG	Bakterieninkubator
Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, GE Healthcare	UV/Vis-Spektrometer
40-1214	PeqLab Biotechnologie	Agarosegel-Elektrophoresekammer
Gulmay Medical RS225	X-Strahl	Bestrahlungsgerät
BD LSR Fortessa	BD Bioscience	Durchflusszytometer
Axio Observer A1, AxioCam	Carl Zeiss Microscopy	Mikroskop mit Kamera
Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy	Lichtmikroskop
Odyssey Imager	Li-COR	Fluoreszenz-Scanner
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems	Real Time PCR-Thermocycler
Centro LB 960	Berthold	Luminometer
GlowMax Multi	Promega	Luminometer
Infinite M200	Tecan	Mikroplattenleser
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific	NanoDrop-Spektralphotometer
TProfessional Standard Gradient Thermocycler	Biometra	Thermocycler
5417R	Eppendorf	Tischzentrifuge
Multifuge 3SR Plus	Heraeus	Zentrifuge
Orion 555A	Thermo Fisher Scientific	pH-Meter
Competence CPA423S	Sartorius AG	Präzisionswaage
CP124S	Sartorius AG	Analysenwaage
Modell 40-1214	Peglab	Agarose-Gelelektrophorese

2. Material und Methoden

2.1.18 Software

Tab. 22: Software

Name	Verwendung
7300 Systems Sequence Detections Software 1.4	Messung und Analyse der qRT-PCR
BD FACS Diva Software 6.2	Durchflusszytometrische Messung
BioEdit	Erstellung von DNA-Sequenzvergleichen
CorelDRAW X8	Erstellung von Abbildungen
Endnote X9	Literaturverwaltung
Flowing Software 2.5.1	Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen
GIMP 2	Bearbeitung von Bilddateien
GraphPad Prism 8	Erstellung von Diagrammen
i-control 1.5	Steuerung des Mikroplattenleser M200
Microsoft Office Professional Plus 2010	Erstellung von Manuskripten/Präsentation/Abbildungen/Postern
MicroWin2000 3.	Steuerung des Luminometers Centro LB960
Odyssey V3.0	Einscannen der Western Blot

2.1.19 Datenbanken

Tab. 23: Datenbanken

Datenbank	Verwendung	Internetadresse	Quelle
JASPAR	Vorhersage von p53-Konsensussequenzen	http://jaspar.genereg.net/	(Fornes et al., 2019)
TargetScan 7.2	Vorhersage von miRNA-Ziel-mRNAs	http://www.targetscan.org	(Agarwal et al., 2015)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 Wildtyp und ihr p53-defizientes Derivat (HCT116 p53^{-/-}) wurden in McCoy's 5A Nährmedium kultiviert, welches mit fetalem Kälberserum (FCS) (10% (v/v)), Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) versetzt war. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂-Sättigung im Zellinkubator. Alle sechs Monate wurde eine neue Charge Zellen aufgetaut, um einer Akkumulation von Mutationen vorzubeugen. Die Kultivierung der HCT116 miR-30-KD-Zellen, die mittels des CRISPR/CAS9-Verfahrens generiert wurden, fand unter denselben Bedingungen statt.

2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Für die Kryokonservierung wurden 1·10⁶ Zellen in McCoy's 5A Nährmedium mit zusätzlichen 10% FCS und 10% Dimethylsulfoxid überführt und über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter langsam auf -80 °C abgekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Zur Reaktivierung wurden die eingefrorenen Zellen möglichst schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche transferiert.

2.2.3 Applikation von ionisierender Röntgenstrahlung

Die Zellen wurden in der gewünschten Zellzahl ausgesät und gegebenenfalls zuvor transient transfiziert. Mit Hilfe des Gulmay Medical RS225 wurden die Zellen ionisierender Röntgenstrahlung ausgesetzt, wodurch Doppelstrangbrüche der DNA erzeugt wurden. Die üblicherweise verwendete Dosis betrug 20 Gray (Gy) (175 V, 15 mA, 19 min 48 s).

2.2.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Mit Hilfe der transienten Transfektion können Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Die hier verwendete Methode der kationischen Lipofektion beruht auf der Komplexbildung von Liposomen mit Nukleinsäuren, welche dann durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Diese Art der Transfektion kann sowohl für RNA-Moleküle als auch für Plasmid-DNA angewendet werden.

2.2.4.1 Transfektion mit RNA-Molekülen

Zur Einbringung von RNA-Molekülen (siRNAs, miRNA-Mimiks oder miRNA-Inhibitoren, Tab. 5-7) in eukaryotische Zellen wurde das Transfektionsreagenz Dharmafect 1 verwendet. Die entsprechenden Volumina siRNA-Puffer (1 x), Optimem sowie die der RNA-Moleküle wurden miteinander vermischt (Lösung 1, Tab. 24). In einem zweiten

2. Material und Methoden

Reaktionsgefäß wurde Lösung 2 angesetzt, welche das Transfektionsreagenz sowie Optimem enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurde Lösung 2 zu Lösung 1 gegeben und weitere 20 min inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde durch die Zugabe des Antibiotika-freien Nährmediums komplementiert und auf die Zellen gegeben. Die Aufteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erfolgte 8 - 24 h nach der Transfektion.

Tab. 24: Transfektionsschema

	12er Mikro- titerplatte	6er Mikro- titerplatte	6 cm Schale	10 cm Schale	14,5 cm Schale
Lösung 1					
RNA-Moleküle					
<ul style="list-style-type: none"> • 20 µM miRNA-Mimik • 20 µM miRNA-Inhibitor • 20 µM siRNA • 20 µM siRNA & miRNA-Mimik 	2,5 µl	5 µl	10 µl	20 µl	60 µl
	0,67 µl	1,33 µl	2,66 µl	10,64 µl	31 µl
	5 µl	10 µl	20 µl	40 µl	120 µl
	je 2,5 µl	je 5 µl	je 10 µl	je 20 µl	je 60 µl
Optimem (FCS-frei)	50 µl	100 µl	200 µl	400 µl	1200 µl
1x siRNA-Puffer	ad 50 µl	ad 100 µl	ad 200 µl	ad 400 µl	ad 1200 µl
Lösung 2					
Optimem (FCS-frei)	98 µl	196 µl	392 µl	784 µl	2352 µl
Dharmafect 1	2 µl	4 µl	8 µl	16 µl	48 µl
McCoy's 5A (10% FCS)	800 µl	1600 µl	3200 µl	6400 µl	19200 µl

2.2.4.2 Transiente Transfektion mit DNA-Plasmiden

Je nach Fragestellung wurden am Tag vor der Transfektion entweder $2 \cdot 10^5$ Zellen je Vertiefung einer 12er Mikrotiterplatte ausgesät oder bereits miRNA-Mimik-transfizierte Zellen auf dieser verteilt. Für die Transfektion wurde die entsprechende Menge an Plasmid-DNA in Optimem-Medium verdünnt, sodass insgesamt ein Volumen von 100 μ l vorlag. Im Falle einer gleichzeitigen Einbringung mehrerer DNA-Plasmide wurde ein gemeinsamer Ansatz hergestellt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 2 μ l Dharmafect Duo zu 98 μ l Optimem gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Vermischung der beiden Ansätze und eine erneute 20-minütige Inkubation. Zu einem Transfektionsansatz wurden 800 μ l Penicillin/Streptomycin-freies McCoy's 5A-Medium (10% FCS) hinzugefügt und auf die Zellen gegeben. Die eingesetzten Mengen an Plasmid-DNA sind Tab. 25 zu entnehmen.

Tab. 25: Eingesetzte Menge der DNA-Plasmide

Plasmid	Eingesetzte Menge/Probe
pGL4.10[<i>luc2</i>], pGL4.10[<i>luc2</i>] p21-Promotor, pGL4.10[<i>luc2</i>] p21-Promotor Fragment 1-8, pGL4.10[<i>luc2</i>] miR-30e-Promotor, pGL4.10[<i>luc2</i>] miR-30c-Promotor	250 ng
pGL4.74[<i>hRluc</i> /TK]	1,25 ng
pcDNA3, pcDNA3- <i>FLAG-TP53</i>	62,5 ng

2.2.5 Herstellung von Zellextrakten

Je nach Umfang des Experiments wurden $4 \cdot 10^5$ Zellen in einer 6er Mikrotiterplatte oder $1 \cdot 10^6$ Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und am Folgetag mit miRNA-Mimiks und/oder siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden 24 h später auf die verschiedenen gewünschten Bedingungen aufgeteilt und gegebenenfalls bestrahlt. Die Ablösung der adhären Zellen nach Ende der Inkubationszeit erfolgte mit Hilfe eines Zellschabers. Die Zellen wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei $5.000 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt lysiert oder in flüssigem

2. Material und Methoden

Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zwischengelagert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte in 60 µl NP-40-Lysepuffer je 1·10⁶ Zellen über einen Zeitraum von 30 min bei regelmäßiger Durchmischung auf Eis. Ein nachfolgender Zentrifugationsschritt für 30 min bei 17.000 x g und 4 °C sedimentierte die Zelltrümmer. Der Überstand, welcher das Zellextrakt enthielt, wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

NP-40-Lysepuffer

50 mM	Tris/HCl pH 7,4
150 mM	Natriumchlorid
1% (v/v)	Nonidet P-40 (NP-40)

Frisch zugefügt wurden:

1 mM	Dithiothreitol (DTT)
1 mM	Natriumorthovanadat
1 mM	Natrium-Pyrophosphat
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
10 µg/ml	Pepstatin
10 µg/ml	Leupeptin
10 µg/ml	Aprotinin

2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe erfolgte nach dem Bradford-Verfahren. Die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an aromatische und basische Aminosäurereste von Proteinen bewirkt eine Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm. Anhand der gemessenen Extinktion lässt sich daher der Gesamtproteingehalt in der Probe ermitteln. Für die Messung wurden 2 µl des Zellextrakts mit 1 ml Bradford-Reagenz (1x) in einer Küvette vermischt und die Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer bestimmt. Als Leerwert wurden 2 µl NP-40-Lysepuffer anstelle des Zellextrakts verwendet. Zur Kalibrierung wurde ein Bovines Serumalbumin (BSA)-Standard verwendet.

2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Geschwindigkeit, mit der sich ein Protein im elektrischen Feld bewegt, hängt von seiner Ladung, Größe und seiner Struktur ab. Die Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung eines Proteingemisches basierend auf den Molekulargewichten. Das Detergenz SDS denaturiert die Proteine vollständig und erzeugt durch seine Anlagerung ein konstantes Masse/Ladungs-

2. Material und Methoden

Verhältnis (1,4 g SDS/1 g Protein). Pro Probe wurden 30 µg Proteinextrakt mit SDS-Probenpuffer (5x) versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. In der diskontinuierlichen SDS-PAGE wurden die Proben zunächst im Sammelgel (3,75%ig) konzentriert und anschließend im Trenngel (10 bzw. 12,5%ig) ihrem Molekulargewicht gemäß separiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel. Zusätzlich zu den Proben wurde ein vorgefärbter Proteingrößenstandard (Tab. 18) verwendet.

SDS-Probenpuffer (5x)

62,5 mM	Tris (pH 7,4)
2% (w/v)	SDS
3% (v/v)	β-Mercaptoethanol
10%	Glycerol
Spatelspitze	Bromphenolblau

3,75%iges Sammelgel

3,75% (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 29:1)
125 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
0,1% (w/v)	SDS
0,0075% (w/v)	APS
0,0075% (v/v)	TEMED

10 bzw. 12,5%iges Trenngel

10-12,5% (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 29:1)
375 mM	Tris/HCl (pH 8,8)
0,1% (w/v)	SDS
0,075% (w/v)	APS
0,05% (v/v)	TEMED

SDS-PAGE Elektrodenpuffer

192 mM	Glycin
25 mM	Tris (pH 7,4)
1% (w/v)	SDS

2.2.8 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran in

2. Material und Methoden

Methanol aktiviert und gemeinsam mit den Polyacrylamidgelen im Western Blot Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte mittels des Tank-Blot-Verfahrens bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA für eine Dauer von 2,5 h. Im Anschluss bewirkte eine zweistündige Inkubation der Membran in Blockierlösung (5% (w/v) BSA, 0,2% (v/v) Tween-20 in PBS) die Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen. Die Primärantikörper wurden in den entsprechenden Verdünnungen (Tab. 10) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere Waschstschritte mit PBS-Tween 20 (0,2% (v/v)) durchgeführt und anschließend der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper appliziert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT und unter Lichtausschluss. Nach erneutem, mehrmaligem Waschen in PBS-Tween 20 wurde die Membran lichtgeschützt getrocknet und die Detektion der Fluoreszenzsignale mit Hilfe des LI-COR Odyssey Infrared Imaging Systems vorgenommen.

Western Blot Transferpuffer

192 mM	Glycin
25 mM	Tris

Primärantikörper

5% (w/v)	BSA
0,2% (v/v)	Tween 20
0,1%	Natriumazid
x µl	Primärantikörper (Tab. 10)
in PBS	

Sekundärantikörper

5% (w/v)	BSA
0,2% (v/v)	Tween 20
0,02% (w/v)	SDS
x µl	Sekundärantikörper (Tab. 11)
in PBS	

2.2.9 Fluorometrischer Substrattest zur Messung der Caspase-3-Aktivität

Für den enzymatischen Nachweis der apoptotischen Caspase-3-Aktivität wurde das synthetische Peptidsubstrat Ac-DEVD-AMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin) verwendet. Die proteolytische Spaltung des Substrats durch Caspase-3 führt zur spektrometrisch-messbaren Freisetzung des Fluorochroms Aminomethylcoumarin, wobei die ermittelte Signalstärke direkt proportional zur Caspase-3-

2. Material und Methoden

Aktivität ist. Die Detektion erfolgte in Zellextrakten, die mit NP-40-Puffer generiert (vgl. Kapitel 2.2.5) und deren Proteinkonzentration anschließend mittels Bradford-Verfahren bestimmt wurde (vgl. Kapitel 2.2.6). Für den Substrattest wurden pro Probe 50 µg Protein in einem Volumen von 50 µl in einer schwarzen 96er Mikrotiterplatte vorgelegt und die Reaktion durch die Zugabe von 150 µl Substratpuffer gestartet. Die Entstehung des Aminomethylcoumarins wurde über eine Dauer von 5 h in Abständen von 10 min bei einer Exzitationswellenlänge von 346 nm und einer Emissionswellenlänge von 442 nm im Fluorometer gemessen. Die Analyse der gemessenen Aktivitäten wurde im linearen Bereich durchgeführt.

Substratpuffer

50 mM	HEPES (pH 7,3)
100 mM	Natriumchlorid
10% (w/v)	Saccharose
0,1% (w/v)	CHAPS

Frisch zugefügt wurden:

50 µM	DTT
66 µM	Ac-DEVD-AMC

2.2.10 LDH-Zytotoxizitätstest

Der Lactatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätstest ist eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung des Zelltodes. Das zytoplasmatische Enzym LDH wird konstant in einer Zelle exprimiert. Eine Schädigung der Zelle führt charakteristischerweise zu einem Verlust der Membranintegrität, weshalb das Enzym in den Zellkulturüberstand gelangt. Mit Hilfe des Zytotoxizitätstests kann die Freisetzung und damit auch der Zelltod quantifiziert werden. Die LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Umwandlung von NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$. Im nächsten Schritt dient das entstandene $\text{NADH}+\text{H}^+$ als Elektronendonator für die eigentliche Nachweisreaktion. Die Zugabe des Enzyms Diaphorase resultiert in der Reduktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu 1,3,5-Triphenylformazan, dessen Entstehung spektrometrisch detektiert werden kann. Die Menge an gebildetem Formazan ist dabei proportional zur LDH-Aktivität.

Für den LDH-Zytotoxizitätstest wurden $2 \cdot 10^5$ HCT116 Wildtyp-Zellen in einer 12er Mikrotiterplatte ausgesät und am Folgetag mit miRNA-Mimiks transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf 96er Mikrotiterplatten verteilt und für jede Bedingung Duplikate angelegt. Es folgte die Behandlung mit ionisierender Strahlung. 72 h später

wurden von jeder Probe 100 µl des Zellüberstands luftblasen- und zellfrei abgenommen und in eine neue 96er Mikrotiterplatte überführt. Als Kontrolle fungierte zellfreies Nährmedium, um die unspezifische Hintergrundextinktion zu berücksichtigen. Die Quantifizierung der LDH-Aktivität erfolgte mit Hilfe des *Cytotoxicity detection Kits* (Tab. 19). Dazu wurden 100 µl Reaktionsmix, welcher sich aus *catalyst* und *dye solution* im Verhältnis 1:46 zusammensetzte, zu 100 µl Zellüberstand pipettiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm über einen Gesamtzeitraum von 30 min jeweils alle drei Minuten bestimmt.

2.2.11 Kolorimetrischer Nachweis der SA-β-Gal-Aktivität

Ein charakteristisches Merkmal seneszenten Zellen ist die Zunahme der lysosomalen Masse und damit auch der lysosomalen β-Galaktosidase (Kurz et al., 2000; B. Y. Lee et al., 2006). Sie wird daher auch als SA-β-Gal bezeichnet und ihre Aktivität häufig als Biomarker für die zelluläre Seneszenz herangezogen. Zur kolorimetrischen Bestimmung wird das chromogene Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal) verwendet, bei dessen Spaltung der unlösliche, blaue Farbstoff 5-Brom-4-chlorindigos gebildet wird. Da auch nicht-seneszente Zellen eine lysosomale β-Galaktosidase-Aktivität aufweisen, wird der Aktivitätsnachweis bei einem suboptimalen pH-Wert von 6,0 durchgeführt. Dies hat eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge, sodass in seneszenten Zellen auf Grund ihrer erhöhten SA-β-Gal-Menge eine frühere Anfärbung erfolgt. Es wurden $4 \cdot 10^5$ HCT116 Wildtyp-Zellen in einer 6er Mikrotiterplatte ausgesät und am darauffolgenden Tag mit miR-Mimiks transfiziert. Die Aufteilung der Zellen auf die verschiedenen Versuchsbedingungen erfolgte 24 h nach der Transfektion. Im Anschluss wurden diese entweder ionisierender Strahlung (20 Gy) ausgesetzt oder blieben unbehandelt (Kontrollen). Die histochemische Färbung fand an Tag 3 nach der Bestrahlung statt. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und die adhärennten Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen, ohne diese abzulösen. Pro Vertiefung wurden 750 µl Fixier-Puffer zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten mit PBS. Anschließend wurden 750 µl der X-Gal-Färbelösung appliziert. Die Färbung fand über Nacht bei 37 °C und unter Lichtausschluss statt. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS gestoppt. Die Auswertung erfolgte durch Fotodokumentation am Mikroskop.

Fixier-Puffer

2% (v/v)	Formaldehyd
0,2% (v/v)	Gluteraldehyd in PBS

X-Gal-Färbelösung

40 mM	Zitronensäure/Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer (pH 6,0)
5 mM	Kaliumhexacyanidoferrat(II) (Kaliumferrocyanid)
5 mM	Kaliumhexacyanidoferrat(III) (Kaliumferricyanid)
150 mM	Natriumchlorid
2 mM	Magnesiumchlorid
1 mg/ml	X-Gal

2.2.12 Quantitative Detektion der SA- β -Gal -Aktivität

Die Verwendung des fluorogenen Substrats 5-Dodecanoylaminofluorescein Di- β -D-Galaktopyranosid (C₁₂-FDG) erlaubt die durchflusszytometrische Quantifizierung von Zellen mit einer erhöhten SA- β -Gal-Aktivität. Das membranpermeable C₁₂-FDG dringt in die Zelle ein und wird dort von der SA- β -Gal gespalten, sodass C₁₂-Fluorescein entsteht. Auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaften bleibt die Kohlenstoffkette nach ihrem Eintritt in der Zellmembran verankert und verhindert so die Diffusion des fluoreszierenden Farbstoffs aus der Zelle (Y. Z. Zhang et al., 1991). Im Anschluss können die Fluorescein-positiven Zellen im Durchflusszytometer detektiert und quantifiziert werden. Wie auch beim histochemischen Nachweis erfolgt die Messung bei einem suboptimalen pH-Wert von 6,0. Dies wird durch die Zugabe des vakuolären H⁺-ATPase-Inhibitors Bafilomycin A1 (BAFA1) erreicht, welcher eine Alkalisierung der Lysosomen bewirkt (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

Vorbereitend wurden 2·10⁵ HCT116 Wildtyp-Zellen in einer 12er Mikrotiterplatte ausgesät und am Folgetag transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Aufteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen mit anschließender Strahlenexposition. Die Messung der SA- β -Gal-Aktivität fand an Tag 3 nach Bestrahlung statt. Dazu wurde der Zellüberstand jeweils in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die übrig gebliebenen adhären Zellen in der Mikrotiterplatte mit BAFA1-haltigem Medium (100 nM) überschichtet. Die abgenommenen Zellüberstände wurden bei 500 x g und RT für 5 min zentrifugiert, um abgelöste Zellen zu sedimentieren. Das Medium wurde aspiriert, die Zellen in 500 μ l BAFA1-haltigem Medium aufgenommen und wieder der zugehörigen Vertiefung in der Mikrotiterplatte zugeführt. Es folgte eine einstündige Inkubation im Zellinkubator bei 37 °C und 5% CO₂, um einen Anstieg des lysosomalen pH-Werts zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurde die C₁₂-FDG-Lösung (Endkonzentration je Vertiefung: 28 μ M) auf die Zellen gegeben und für 2 h im Zellinkubator inkubiert. Für die anschließende darauf folgende Messung im Durchflusszytometer wurde der Zellüberstand abgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die adhären Zellen wurden mittels Trypsin abgelöst und in dasselbe

Röhrchen wie die jeweiligen Zellüberstände gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 500 x g und 4 °C für 5 min wurde das Nährmedium abgenommen und die Zellen in 125 µl PBS resuspendiert. Die Detektion der C₁₂-Fluorescein-markierten Zellen erfolgte am Durchflusszytometer (LRS Fortessa) im Kanal FITC-A. Je Bedingung wurden 10.000 Zellen (*events*) erfasst.

2.2.13 Luciferase-Reporter-Gen-Test

Mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Gen-Tests kann die transkriptionelle Genregulation untersucht werden. Dabei werden putative regulatorische Elemente, wie z.B. Promotoren, vor ein Luciferase-Gen kloniert (Abb. 6). Die Expression des Reportergens steht dabei unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors, woraus sich eine direkte Korrelation ihrer Aktivitäten ergibt. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgt durch die Detektion von Biolumineszenz, welche bei der Oxidation ihrer Substrate freigesetzt wird.



Abb. 6: Schematische Darstellung eines Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukts.

Der *Dual-Luciferase Reporter Assay* basiert auf der Kotransfektion von zwei Luciferase-Reportersystemen. Die Leuchtkäfer Luciferase (*Photinus pyralis*) spiegelt die Aktivität des zu untersuchenden Promotors wider, während die Renilla Luciferase (*Renilla reniformis*) konstitutiv exprimiert wird und als interne Kontrolle zur Normalisierung z.B. durch variierende Transfektionseffizienzen dient. Beide Luciferasen oxidieren unterschiedliche Substrate, sodass ihre Aktivität nacheinander in der gleichen Probe gemessen werden kann.

Für die Untersuchung der p53-abhängigen Induzierbarkeit des putativen miR-30e- sowie miR-30c-Promotors wurden 2·10⁵ HCT116 p53^{-/-}-Zellen je Vertiefung einer 12er Mikrotiterplatte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmid-Transfektion (vgl. Kapitel 2.2.4.2). Neben den Luciferase-Vektoren wurde noch ein p53-Expressionsplasmid (pcDNA3-FLAG-TP53, Tab. 16) oder der entsprechende Leervektor (pcDNA3) in die Zellen eingebracht.

Mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Gen-Tests wurde darüber hinaus eine miR-30e-abhängige Regulation des p21-Promotors überprüft. In diesem Fall wurden an Tag 1 4·10⁵ HCT116 p53^{-/-}-Zellen je Vertiefung einer 6er Mikrotiterplatte ausgesät. Diese wurden an Tag 2 mit miRNA-Mimiks transfiziert und an Tag 3 auf 12er Mikrotiterplatten verteilt. Die Transfektion mit den Luciferase-Reporter-Gen-Plasmiden fand an Tag 4 statt. Die

2. Material und Methoden

Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte 24 h nach der Plasmid-Transfektion. Dazu wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Pro Probe wurden 250 µl *Passive Lysis Buffer* (1x) in die Vertiefung gegeben und die Zellen für 15 min bei 250 rpm und RT auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Danach wurde das Zelllysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 17.000 x g und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Es folgte die Messung der Lichtemission am Berthold Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer. Pro Probe wurden 20 µl Zelllysate eingesetzt und 100 µl *Luciferase Assay Reagent II* appliziert. Nach 2 s wurde die Aktivität der Leuchtkäfer Luciferase gemessen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 100 µl *Stop & Glo Reagent* und die Detektion der Renilla Luciferase-Aktivität. Die für beide Messungen verwendete Integrationszeit betrug 5 s. Für die Auswertung des Luciferase-Reporter-Tests wurde zunächst das Verhältnis zwischen der Aktivität der Leuchtkäfer und der Renilla Luciferase innerhalb einer Probe ermittelt. Die bereinigten Luciferase-Aktivitäten wurden im nächsten Schritt in Relation zum promotorlosen Ausgangsvektor (pGI4.10[*luc2*]) gesetzt. Zuletzt wurde ein relativer Vergleich zwischen den untersuchten Bedingungen (pcDNA3/ pcDNA3-FLAG-*TP53* bzw. miR-Con-/miR-30e-Mimik) erstellt.

2.2.14 Klonierung

Die putativen Promotorregionen von miR-30e, miR-30c und p21 wurden in Luciferase-Reportervektoren kloniert. Dazu wurde die genomische DNA aus HCT116 Wildtyp-Zellen isoliert und die entsprechenden Sequenzabschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Anschließend wurden diese in den (promotorlosen) Luciferase-Reportervektor eingefügt, sodass sie die Luciferase-Expression kontrollieren. Die nachfolgende Vervielfältigung des Vektors fand in Bakterienzellen statt.

2.2.14.1 Isolierung von genomischer DNA

Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des *DNeasy Blood and Tissue Kits* (Tab. 19) gemäß den Herstellerangaben. Dazu wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und 20 µl Proteinkinase K sowie 200 µl absoluten Ethanol zugefügt. Nach einer gründlichen Durchmischung wurde das Gemisch auf eine *DNeasy Mini Spin Columns* (Isolationssäule) gegeben und bei 6.000 x g und RT für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß gestellt. Die Membran wurde mit 500 µl *Buffer AW1* gewaschen und der Durchfluss entsorgt. Nachdem die Säule erneut in einem neuen 2 ml-Sammelgefäß platziert wurde, folgte ein Waschschriff mit 500 µl *Buffer AW2*. Der Durchfluss wurde verworfen und die verbliebene Flüssigkeit durch erneutes zentrifugieren entfernt. Danach wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 200 µl ddH₂O auf die Membran der Säule gegeben. Nach einer einminütigen

2. Material und Methoden

Inkubation bei RT erfolgte die Eluation der gebundenen DNA durch Zentrifugation. Die DNA-Konzentration der Probe sowie ihre Reinheit wurden am NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm (A260). Zur Beurteilung von Verunreinigungen durch Proteine oder Phenolreste wird das Verhältnis zwischen A260/A280 bzw. A260/A230 bestimmt. Die Spanne für die zu erwartenden Werte liegt zwischen 1,8 - 2,0 bzw. 2,0 - 2,2.

2.2.14.2 Amplifizierung der putativen miR-30e- und miR-30c-Promotorbereiche

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion können DNA-Sequenzen *in vitro* vervielfältigt werden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen aufgetrennt. Anschließend lagern sich sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) an, die DNA-Polymerasen als Startpunkt für die Synthese eines komplementären Einzelstrangs dienen. In nachfolgenden Zyklen werden die Amplifikate exponentiell vermehrt. Als Matrize wurde die genomische DNA aus HCT116 Wildtyp-Zellen eingesetzt und die putativen Promotorbereiche von miR-30e und miR-30c mit Hilfe der *Phusion* DNA-Polymerase amplifiziert. Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

PCR-Reaktion

100 ng	genomische DNA
10 µl	5x <i>Phusion</i> HF-Puffer
1 µl	10 mM dNTPs
1,25 µl	20 µM Vorwärts-Primer (Tab. 14)
1,25 µl	20 µM Rückwärts-Primer (Tab. 14)
0,5 µl	<i>Phusion</i> DNA-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Die Reaktion wurde unter nachfolgenden Bedingungen im *TProfessional Thermocycler* durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	} 35
Anlagerung	58 °C (<i>MIR30E</i>) 62 °C (<i>MIR30C</i>)	30 s	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1

2.2.14.3 Amplifizierung des p21-Promotors

Zur Amplifizierung von genomischen DNA-Fragmenten mit einer Größe von >4 kb wurde die LA *Taq* DNA-Polymerase (Tab. 17) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde nach unten aufgeführtem Schema angesetzt:

PCR-Reaktion

240 ng	genomische DNA
2 µl	25 mM Magnesiumchlorid
2 µl	2,5 mM dNTPs
2 µl	10 µM Vorwärts-Primer (Tab. 14)
2 µl	10 µM Rückwärts-Primer (Tab. 14)
2 µl	LA <i>Taq</i> Buffer II
0,08 µl	10x LA <i>Taq</i> DNA-Polymerase
ad 25 µl	H ₂ O

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 35
Anlagerung	60 °C	30 s	
Elongation	68 °C	4 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

2.2.14.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Moleküle entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt, da die negativ-geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats ein konstantes Masse-/Ladungsverhältnis erzeugen. Dazu wurde ein TAE-Agarosegel (0,8 - 1,5% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer, 0,01% *HDGreen DNA-Dye*) hergestellt und jede Probe mit 10x *FastDigest Green Buffer* (Verhältnis 1:10) versetzt, welcher ein Dichtereagenz enthält und farblich markiert ist. Die Proben wurden in die Vertiefungen des Agarosegels aufgetragen und bei konstanter Spannung in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt.

1x TAE-Puffer

40 mM	Tris (pH 8,0)
20 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA

2.2.14.5 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Tab. 19). Dazu wurde die DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Im nächsten Schritt wurde das 3-fache Volumen *Buffer QG* zugefügt. Die Erwärmung auf 50 °C bewirkte die Auflösung der Agarose. Anschließend erfolgte die Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 1:1. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Probe auf die *QIAquick spin column* (Isolationssäule) pipettiert und bei 18.000 x g und RT für 1 min zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 500 µl *Buffer QG*. Im Anschluss wurden 750 µl *Buffer PE* appliziert und für 2 min auf der Säule inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Durchfluss verworfen, die Isolationssäule in ein 2 ml-Sammelgefäß gestellt und erneut zentrifugiert. Die Isolationssäule wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß platziert und 30 µl H₂O zugefügt. Nach einer einminütigen Inkubation erfolgte die Elution der DNA durch Zentrifugation.

2.2.14.6 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen und schneiden die DNA. Im Rahmen von Klonierungen werden sie verwendet, um z.B. den Luciferase-Reportervektor zu linearisieren und komplementäre DNA-Enden zum PCR-Produkt (Promotor) zu erzeugen, sodass anschließend eine Verknüpfung (Ligation) beider stattfinden kann. Für die Herstellung eines Reportervektors, welcher den putativen miR-30e-Promotor enthielt, erfolgte der Verdau mit den Enzymen NheI und HindIII (Tab. 17). Der putative miR-30c-Promotor wurde mit XhoI und HindIII geschnitten und der p21-Promotor mit KpnI und NheI. Die Ansätze eines Restriktionsverdaus setzten sich folgendermaßen zusammen:

Restriktionsansatz PCR-Produkt

16 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt
1 µl	Restriktionsenzym 1 (Tab. 17)
1 µl	Restriktionsenzym 2 (Tab. 17)
2 µl	Puffer

Linearisierung des Vektors

2 µl	pGI4.10[<i>luc2</i>]
1 µl	Restriktionsenzym 1 (Tab. 17)
1 µl	Restriktionsenzym 2 (Tab. 17)
2 µl	Puffer
ad 20 µl	H ₂ O

Der Verdau der PCR-Produkte sowie des pGI4.10[*luc2*]-Vektors fand über Nacht bei 37 °C im Thermoblock statt. Bei der Verwendung von *FastDigest*-Restriktionsenzymen wurde die Inkubationszeit auf 1 h verkürzt.

2.2.14.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase (Tab. 17) katalysierte die Verknüpfung des linearisierten Vektors mit dem Promotorfragment durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen den 3'-Hydroxy-Enden und den 5'-Phosphat-Enden. Dazu wurden 2 µl Ligase Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase, der linearisierte Vektor sowie das Promotorfragment in einem Gesamtvolumen von 20 µl vermischt. Das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert betrug 1:3. Die Ligation fand über Nacht bei 16 °C statt.

2.2.14.8 Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterien

Die Einbringung der Plasmid-DNA in den kompetenten Bakterienstamm *Escherichia coli* (E. coli) DH5α erfolgte durch die Methode der Hitzeschock-Transformation. Dazu wurde der Ligationsansatz (5 µl) zu 50 µl Bakteriensuspension gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s mit anschließender zweiminütiger Inkubation auf Eis. Die Bakteriensuspension wurde in 500 µl vorgewärmtes Antibiotikum-freies LB-Medium überführt und für 1 h bei 37 °C und konstantem Schütteln inkubiert. Nachfolgend wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Bakterieninkubator bei 37 °C gelagert.

LB-Medium

25 g	Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)
1 l	H ₂ O

2.2.14.9 Analytische Präparation von DNA-Plasmiden aus E. coli DH5α (Miniprep)

Für die Isolierung von DNA-Plasmiden aus E. coli DH5α zu analytischen Zwecken wurden die Puffer des *GenElute HP Plasma Maxi Kits* (Tab. 19) verwendet. Zunächst wurde eine Flüssigkultur mit einer Einzelzellkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und konstantem Schütteln expandiert. Die Bakterienkultur wurde bei 17.000 x g und 4 °C für 1 min zentrifugiert, das Nährmedium entfernt und die Zellen in 250 µl *Resuspension solution* aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 250 µl *Lysis buffer* sowie eine gründliche Durchmischung. Danach wurde die Probe für 5 min bei RT inkubiert bevor die alkalische Lyse durch Hinzufügen von 350 µl *Neutralization solution* abgestoppt wurde. Nach einer Zentrifugation bei 17.000 x g und 4 °C für 5 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

(25:24:1-Gemisch) extrahiert. Die Zentrifugation der Probe fand für 1 min bei 17.000 x g und 4 °C statt. Im Anschluss wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol absolut versetzt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 20 min bei 17.000 x g und 4 °C wurde der Überstand entfernt und die sedimentierte DNA getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in H₂O aufgenommen und die Sequenz mittels Sanger-Sequenzierung (Eurofins MWG) überprüft.

2.2.14.10 Plasmidaufreinigung

Die Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurde mit dem *Qiafilter Maxi Kit* (Tab. 19) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde eine Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium, welches mit Ampicillin versetzt war, angelegt. Die Bakteriensuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4.500 x g für 30 min zentrifugiert. Nach Entfernen des LB-Mediums wurden die sedimentierten Bakterienzellen in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und anschließend 10 ml Puffer P2 zugefügt. Zur Durchmischung wurde das Gefäß mehrmals invertiert. Die alkalische Lyse erfolgte für 5 min bei RT und wurde durch die Zugabe von 10 ml eiskaltem Puffer P3 abgestoppt. Das Gemisch wurde in den zylindrischen Hohlraum der *QIAfilter Cartridge* gegeben und für 10 min inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Äquilibration der *Qiagen-Tip 500* (Isolationssäule) mit 10 ml *Buffer QBT*. Im nächsten Schritt wurde das Lysat durch den Filter der *QIAfilter Cartridge* gedrückt und auf die Isolationssäule überführt. Nach der Bindung der DNA an die Membran wurden zwei Waschschrte mit je 30 ml *Buffer QC* durchgeführt. Danach wurde die Säule in einem 15 ml Reaktionsgefäß platziert und die DNA in 15 ml *Buffer QF* eluiert. Es folgte die Fällung der Plasmid-DNA durch die Zugabe von 10,5 ml Isopropanol. Nach einer Zentrifugation für 45 min bei 4.500 x g wurde das Isopropanol wieder entfernt. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde mit 5 ml Ethanol (70% (v/v)) gewaschen und 30 min bei 4.500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Ethanol wurde entfernt und die DNA für 5-10 min getrocknet. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA in 300 µl H₂O aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA erfolgte am NanoDrop Spektralphotometer.

2.2.14.11 Klonierung der p21-Promotorfragmente

Zur Identifizierung regulatorisch-relevanter Bereiche des p21-Promotors wurden acht verkürzte Varianten hergestellt (Abb. 7). Die Generierung der Fragmente 1-5 erfolgte durch enzymatischen Restriktionsverdau, während die Fragmente 6-8 durch Mutagenese entstanden.

2. Material und Methoden

wurden diese in *E. coli* DH5 α -Bakterien transformiert und vervielfältigt (vgl. Kapitel 2.2.14.8 - 9).

Die Fragmente 6-8 wurden durch gezielte Mutagenese generiert. Dazu wurde das *Q5 site directed mutagenesis Kit* (Tab. 19) verwendet und mittels PCR Deletionen in der p21-Promotor-Sequenz erzeugt. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass sie den zu entfernenden DNA-Abschnitt flankierten. Dieser wurde dementsprechend nicht amplifiziert und es entstand ein linearisiertes PCR-Produkt. Als Matrize diente das Plasmid pGI4.10[*luc2*] p21-Promotor Fragment 1 (vgl. Kapitel 2.2.14.11). Die PCR-Reaktion setzte sich folgendermaßen zusammen:

Reaktionsansatz

10 ng	pGI4.10[<i>luc2</i>] p21-Promotor Fragment 1
1,25 μ l	10 μ M Vorwärts-Primer (Tab. 14)
1,25 μ l	10 μ M Rückwärts-Primer (Tab. 14)
12,5 μ l	2x <i>Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix</i>
ad 25 μ l	H ₂ O

Die PCR folgte dem untenstehenden Temperaturschema:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	}25
Anlagerung	72 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	2 min	1

Im Anschluss wurde der *KLD Enzyme Mix*, bestehend aus einer Kinase, einer Ligase und dem Reaktionsenzym DpnI, zum PCR-Produkt gegeben. Dieses wird phosphoryliert und im nächsten Schritt ligiert. Zeitgleich findet die Degradation des Ausgangsplasmids durch DpnI statt. Da das Restriktionsenzym nur die methylierte Form seiner Erkennungssequenz spaltet, bleibt die neusynthetisierte DNA intakt.

Reaktionsansatz

1 μ l	PCR-Produkt
5 μ l	2x <i>KLD Reaction Buffer</i>
1 μ l	10x <i>KLD Enzyme Mix</i>
3 μ l	H ₂ O

2. Material und Methoden

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend erfolgte die Einschleusung der DNA-Plasmide in *E. coli DH5 α* -Bakterien mittels Hitzeschock-Transformation (vgl. Kapitel 2.2.14.8), wo die Amplifikation stattfand (vgl. Kapitel 2.2.14.9).

2.2.15 Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen mittels DNA-Pulldown

Die DNA-Pulldown-Methode eignet sich zur Untersuchung von direkten DNA-Protein-Interaktionen. Dabei binden Proteine aus Kernextrakten an biotinylierte DNA-Sonden und werden nachfolgend durch die Verwendung von Streptavidin-Agarose *Beads* extrahiert. Auf diese Weise wird eine spezifische Anreicherung dieser Proteine erzielt. Im Anschluss erfolgt die Analyse der Proteine mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens oder durch massenspektrometrische Messungen.

2.2.15.1 Herstellung einer biotinylierten DNA-Sonde

Die doppelsträngige DNA-Sonde für den *Pulldown* wurde mittels PCR hergestellt und enthielt die 600 bp-Sequenz vor dem Transkriptionsstart des p21-Promotors (600 bp-Promotor). Zur Validierung des DNA-Pulldowns wurde eine zweite Sonde (p53-BS-DNA-Sonde) generiert, die eine gut untersuchte p53-Bindungsstelle umfasste (W. S. el-Deiry et al., 1993). Als Matrize diente der Luciferase-Vektor pGI4.10[*luc2*] p21-Promotor (vgl. Kapitel 2.2.14.3). Die Verwendung von 5'-biotinylierten Oligonukleotiden als Vorwärts-Primer für die Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz ermöglichte eine spätere Kopplung an die Streptavidin-Agarose *Beads*. Die Amplifikation erfolgte durch die *Pfu* DNA-Polymerase und unter Verwendung der in Tab. 14 genannten Oligonukleotide. Ein Reaktionsansatz setzte sich typischerweise wie folgend zusammen:

Reaktionsansatz

320 ng	pGI4.10[<i>luc2</i>] p21-Promotor (DNA-Plasmid)
160 μ l	10 x <i>Pfu</i> DNA-Polymerase Buffer
32 μ l	10 mM dNTP
48 μ l	10 μ M Vorwärts-Primer (biotinyliert) (Tab. 14)
48 μ l	10 μ M Rückwärts-Primer (Tab. 14)
13,4 μ l	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase
ad 1600 μ l	H ₂ O

2. Material und Methoden

Die PCR-Reaktion lief unter folgenden Bedingungen im TProfessional Thermocycler ab:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	} 36
Anlagerung	61 °C	30 s	
Elongation	74 °C	1 min	
Finale Elongation	74 °C	5 min	1

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels der Größe entsprechend aufgetrennt (vgl. Kapitel 2.2.14.4). Die Bande in der zu erwartenden Größe wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraktion Kits* (Tab. 19) isoliert. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop Spektralphotometer.

2.2.15.2 Koppeln der biotinylierten DNA-Sonden an Streptavidin-Agarose *Beads*

Je Probe wurden 40 µl 50%ige Streptavidin-Agarose *Beads* eingesetzt und vor der Kopplung an die DNA-Sonden zunächst zwei Mal mit dem Lysepuffer gewaschen. Dazu wurden 500 µl Lysepuffer HGMK zur Streptavidin-Agarose gegeben, diese durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 4 °C für 1 min sedimentiert und der Puffer entfernt. Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Streptavidin-Agarose im Verhältnis 1:1 mit Lysepuffer HGMK versetzt. Anschließend wurden jeweils 4 µg DNA-Sonde zu 40 µl 50% Streptavidin-Agarose gegeben und das Reaktionsvolumen mit HGMK-Puffer auf 500 µl aufgefüllt. Die Kopplung erfolgte für 2 h bei ständiger Rotation, gefolgt von drei Waschschriften mit HGMK-Puffer unter den zuvor beschriebenen Bedingungen. Danach wurde erneut HGMK-Puffer im Verhältnis 1:1 zu der Streptavidin-Agarose pipettiert.

Lysepuffer HGMK

0,1%(v/v)	NP-40
10 mM	HEPES (pH 7,9)
5 mM	Magnesiumchlorid
100 mM	Kaliumchlorid
10% (v/v)	Glycerol

Frisch zugefügt wurden:

1 mM	DTT
1 mM	Natriumorthovanadat
1 mM	Natrium-Pyrophosphat
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
10 µg/ml	Pepstatin
10 µg/ml	Leupeptin
10 µg/ml	Aprotinin

2.2.15.3 Herstellung von Kernextrakten

Für jede Kulturbedingung wurde eine 14,5 cm Zellkulturschale mit $4 \cdot 10^6$ HCT116 Wildtyp-Zellen vorbereitet. Am nächsten Tag erfolgte die transiente Transfektion mit miRNA-Mimiks. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit IR behandelt. 2 h nach der Strahlenexposition wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Sedimentierung der Zellen durch die Zentrifugation bei $550 \times g$ und 4°C für 5 min, wurde das Nährmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Daran schlossen sich die Bestimmung des gepackten Zellvolumens und die Aufnahme der Zellen im doppelten Volumen Lysepuffer A an. Nach einem 30-minütigen Inkubationsschritt auf Eis wurden die Proben für 10 s gründlich durchmischt. Die danach noch intakten Zellkerne wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei $2.600 \times g$ und 4°C für 5 min sedimentiert. Der Überstand (zytoplasmatische Fraktion) wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Überprüfung der Zellfraktionierung aufbewahrt. Die Zellkerne wurden zweimal mit 500 µl Lysepuffer A gewaschen. Für die Lyse der Zellkerne wurde das 1,3-fache Volumen Lysepuffer HG MK (ausgehend vom initial bestimmten gepackten Zellvolumens) verwendet (vgl. Kapitel 2.2.15.2). Der Aufschluss der Zellen fand für 10 min auf Eis bei regelmäßiger Vibration statt. Anschließend wurden die Zellen bei $10.400 \times g$ und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt die nukleäre Fraktion, welche in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (vgl. Kapitel 2.2.6).

Lysepuffer A

10 mM	HEPES (pH 7,9)
1,5 mM	Magnesiumchlorid
10 mM	Kaliumchlorid
300 mM	Saccharose
0,5%(v/v)	NP-40

Frisch zugefügt wurden:

1 mM	DTT
1 mM	Natriumorthovanadat
1 mM	Natrium-Pyrophosphat
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
10 µg/ml	Pepstatin
10 µg/ml	Leupeptin
10 µg/ml	Aprotinin

2.2.15.4 *Pulldown* der DNA-Sonden

Je Probe wurden 400 µg nukleäre Proteine mit 40 µl DNA-gekoppelten Streptavidin-Agarose *Beads* inkubiert. Das Probenvolumen wurde mit HGMK-Puffer auf 250 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei konstanter Rotation und 4 °C. Am Folgetag wurden die Proben bei 20.000 x g und 4 °C für 1 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer, um ungebundene Proteine zu eliminieren. Anschließend wurde SDS-Probenpuffer (5x) (vgl. Kapitel 2.2.7) hinzugefügt und die Proben für 15 min bei 95 °C aufgeköcht. Dies führte zur Elution der DNA-Sonden sowie der daran gebundenen Proteine.

Waschpuffer

0,5% (v/v)	NP-40
10 mM	HEPES (pH 7,9)
5 mM	Magnesiumchlorid
100 mM	Kaliumchlorid
10% (v/v)	Glycerol

Frisch zugefügt wurden:

1 mM	Dithiothreitol
1 mM	Natriumorthovanadat
1 mM	Natrium-Pyrophosphat
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
10 µg/ml	Pepstatin
10 µg/ml	Leupeptin
10 µg/ml	Aprotinin

Die Untersuchung der eluierten Proteine erfolgte entweder mittels Western Blot-Verfahren (vgl. Kapitel 2.2.7 - 8) oder MALDI-MS-Analyse. Die MS-Messungen wurden von Dr. Stefanski im Molecular Proteomics Laboratory (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) oder Dr. Velic am Proteome Center Tübingen (Universität Tübingen) durchgeführt. Dazu wurden die Proteinproben in flüssigem Stickstoff eingefroren und der entsprechenden Einrichtung übergeben bzw. auf Trockeneis versendet.

2.2.16 Transkriptionsfaktor-Aktivitätstest

Dieses Testverfahren ermöglicht die zeitgleiche Ermittlung der Aktivitäten von 96 Transkriptionsfaktoren. Dabei werden Kernextrakte gewonnen und mit kurzen DNA-Sonden inkubiert, die den Konsensussequenzen der verschiedenen Transkriptionsfaktoren entsprechen. Die Transkriptionsfaktoren im Kernextrakt bilden Komplexe mit den DNA-Sonden, welche anschließend über eine Säule isoliert werden. Jede Vertiefung der sogenannten Hybridisierungsplatte ist mit DNA-Sequenzen beschichtet, die jeweils komplementär zu einer DNA-Sonde sind, und die DNA-Transkriptionsfaktorkomplexe immobilisieren. Durch die Zugabe einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), welche an die biotinylierten DNA-Sonden bindet, wurde die Lichtemission je Vertiefung gemessen. Diese korreliert mit der Aktivität des entsprechenden Transkriptionsfaktors im Kernextrakt. Im Anschluss ist es möglich, die Aktivitäten der einzelnen Transkriptionsfaktoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen miteinander zu vergleichen.

2.2.16.1 Herstellung von Kernextrakten

Für die Zellfraktionierung wurden zwei 10 cm Zellkulturschalen mit je $3 \cdot 10^6$ HCT116 Wildtyp-Zellen ausgesät. Am Folgetag wurde eine der Zellkulturschalen mit miR-Kontroll-Mimiks und die andere mit miR-30e-Mimiks transfiziert und 8 h später auf jeweils zwei 14,5 cm Zellkulturschalen verteilt. Die Strahlenexposition fand 72 h nach der Transfektion statt. 2 h nach IR erfolgte die Ernte der Zellen, indem diese mit einem Zellschaber abgelöst und zusammen mit dem Zellkulturmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Die Zellen gleicher Bedingungen wurden dabei vereinigt. Die Zellen wurden für 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellfraktionierung fand mit Hilfe des *Nuclear Extraction Kits* (Tab. 19) statt. Dazu wurden die Zellen in 2 ml *Buffer I* (inkl. 1% (v/v) DTT und 1% (v/v) Protease-Inhibitor, im Kit enthalten) aufgenommen und für eine effizientere Durchmischung in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte über eine Dauer von 30 min unter horizontalem Schütteln bei 200 rpm und 4 °C. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1.200 x g und 4 °C wurde der Überstand

(zytoplasmatischer Extrakt) abgenommen. Die Zellkerne wurden in 1 ml *Buffer II* (inkl. 1% (v/v) DTT und 1% (v/v) Protease-Inhibitor) resuspendiert und bei 15.000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt die nukleäre Fraktion und wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach dem Bradford-Verfahren (vgl. Kapitel 2.2.6) durchgeführt.

2.2.16.2 Transkriptionsfaktor-Aktivitätstest

Für die Bestimmung der Transkriptionsfaktor-Aktivitäten wurde der *Promoter-Binding TF Profiling Array II* (Tab. 19) entsprechend der Herstellerempfehlungen verwendet. Es wurde jedoch auf die Zugabe einer kompetitiven Promotorsequenz verzichtet. Die Kernextrakte (9 µg Protein) wurden mit 15 µl *TF Binding Buffer Mix*, 5 µl *Probe Mix II* (enthält die DNA-Sonden) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 30 µl vermischt. Ein 30-minütiger Inkubationsschritt bei RT gewährleistete die Bindung der Transkriptionsfaktoren im Kernextrakt an die DNA-Sonden. Die komplexierten Transkriptionsfaktoren wurden nachfolgend durch eine säulen-basierte Aufreinigung isoliert. Nach der Äquilibration der *Isolation Column* (Isolationssäule) mit 200 µl eiskaltem *Filter Binding Buffer* folgten ihre Beladung mit dem Transkriptionsfaktor-Gemisch und eine Inkubation auf Eis für 30 min. Im Anschluss wurden 500 µl *Filter Wash Buffer* appliziert und für 3 min inkubiert. Die Säule wurde für 1 min bei 4.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Durchfluss verworfen, gefolgt von drei weiteren Waschschritten. Zur Elution der Probe wurden 100 µl *Elution Buffer* auf die Säule gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und bei 100 x g und RT für 2 min zentrifugiert. Die Denaturierung der Proben erfolgte für 5 min bei 98 °C. Anschließend wurden 500 µl kaltes ddH₂O sowie 10 ml *Hybridization Buffer* (1x) zu jeder Probe gegeben und durch Schwenken vermischt. In jeder der 96 Vertiefungen einer *Hybridization plate* wurden 100 µl des Gemisches pipettiert und über Nacht bei 42 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit durch Invertieren der Platte aus den Vertiefungen entfernt. Darauf folgten drei Waschschrritte mit je 200 µl *Hybridization Wash Buffer*. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Zugabe von 200 µl *Blocking Buffer* abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT und regelmäßiger Durchmischung wurde der Puffer wieder entfernt. 20 µl *Blocking Buffer* wurden mit 40 µl Streptavidin-HRP (für 2 Platten) versetzt, 95 µl in jede Vertiefung gegeben und für 45 min bei konstantem Schütteln inkubiert. Es folgten drei Waschschrritte mit 200 µl *Detektion Buffer* (1x). Die Substratlösung bestand aus 1 ml Substrat A, 1 ml Substrat B und 8 ml *Substrat Dilution Buffer*. In jede Vertiefung wurden 95 µl appliziert und nach sechsminütiger Inkubation die Messung der Lichtemission im Luminometer (Promega GloMax Multi) gestartet. Die Integrationszeit des Signals betrug 1 s. Als Nächstes wurde die Substratlösung zur

zweiten Platte gegeben und die Prozedur wiederholt. Daraufhin konnten die einzelnen Transkriptionsfaktoraktivitäten in miR-Con- und miR-30e-transfizierten Kernextrakten miteinander verglichen werden. Die Auswertung der Messungen erfolgte anhand der folgenden Formel, welche auch die Gesamtsignalstärke berücksichtigt:

$$miR - 30e - abhängige \text{ Aktivität} = \frac{Signal_{miR-30e} - Signal_{miR-Con}}{Signal_{miR-30e} + Signal_{miR-Con}}$$

2.2.17 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen qRT-PCR (*quantitative Real Time-PCR*) kann die Menge eines Zielgens in einer Probe bestimmt werden. Dazu wird zunächst die Gesamt-RNA einer Probe isoliert und durch die reverse Transkriptase in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Diese dient als Matrize für die nachfolgende qRT-PCR-Reaktion.

2.2.17.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die RNA-Isolierung aus Zellen wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Tab. 19) entsprechend den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Dazu wurden $4 \cdot 10^5$ Zellen in einer 6er Mikrotiterplatte ausgesät, gegebenenfalls transient transfiziert und 24-72 h später bestrahlt. Im nächsten Schritt erfolgte die Ernte der Zellen mit einem Zellschaber und die Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß. Nach einem Zentrifugationsschritt bei $5.000 \times g$ und $4^\circ C$ für 5 min wurde das Nährmedium aspiriert und die sedimentierten Zellen mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen fand in $350 \mu l$ RLT-Puffer (inkl. 0,01% β -Mercaptoethanol) durch Vibration statt. Nach der Zugabe von $350 \mu l$ Ethanol (70%) zur Probe wurde diese gründlich durchmischt und auf die *RNeasy Spin Column* (Isolationssäule) gegeben. Die Isolationssäule wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der *Buffer RW1* wurde auf die Säule gegeben und es folgte eine erneute Zentrifugation. Nachdem der Durchfluss entsorgt wurde, erfolgten zwei Waschschriffe mit $500 \mu l$ *Buffer RPE*. Die Säule wurde in ein neues 2 ml Sammelgefäß gestellt und ein weiteres Mal zentrifugiert, um Pufferreste vollständig zu entfernen. Anschließend wurde die Säule in einem $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäß platziert und die RNA in $50 \mu l$ RNase-freiem H_2O eluiert. Die Messung der RNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte am NanoDrop Spektralphotometer. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm. Das Verhältnis zwischen den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt Auskunft über eine Verunreinigung durch Proteine und sollte zwischen 1,9-2,1 liegen. Eine mögliche Kontamination mit Phenolresten kann durch den Quotienten A_{260}/A_{230} beurteilt werden. Die zu erwarteten Werte liegen hier zwischen 2,0-2,2.

2.2.17.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und schreibt mRNA in DNA um. Die synthetisierte DNA dient anschließend als Matrize für die qRT-PCR-Reaktion. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Tab. 19). Jeder Probe wurden die einzelnen Komponenten des untenstehenden Reaktionsansatzes beigemischt:

Reaktionsansatz

1 µg	RNA
0,8 µl	100 mM dNTPs
1,0 µl	<i>MultiScrib RT enzyme</i>
2,0 µl	10x <i>RT Buffer</i>
2,0 µl	Random Primer
1,0 µl	RNAse Inhibitor
ad 10 µl	H ₂ O

Die Reaktion lief unter folgenden Bedingungen im TProfessional Thermocycler ab:

Schritt	Temperatur	Zeit
Hybridisierung	16 °C	10 min
Elongation	37 °C	120 min
Inaktivierung	85 °C	5 min

2.2.17.3 qRT-PCR

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mittels TaqMan-Methode. Dabei wird neben spezifischen Primern zur Amplifikation noch eine TaqMan-Sonde verwendet. Diese ist am 5'-Ende an einen fluorogenen Reporterfarbstoff und am 3'-Ende an einen *Quencher* gekoppelt. Bei einer intakten Sonde wird die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zum Quencher verringert. Die TaqMan-Sonde hybridisiert zwischen den beiden Primerbindungsstellen an die DNA. Bei der Amplifikation des Zielgens spaltet die *Taq*-Polymerase die Sonde durch ihre endogene 5'-Nukleaseaktivität. Durch die Separierung vom Quencher steigt das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs an. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität ist damit proportional zur Menge des synthetisierten Amplikons. Für jede Probe wurden technische Replikate in einer 96er Mikrotiterplatte gemessen, wobei ein Reaktionsansatz aus 25 ng cDNA, 10 µl 2x TaqMan Universaler Master-Mix (Tab. 2), 1 µl 20x TaqMan mRNA-Sonde (Tab. 12) und 8,5 µl H₂O bestand. Die Reaktion lief im 7300 Real Time PCR System gemäß dem folgenden PCR-Programm ab.

2. Material und Methoden

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Inkubation	50 °C	2 min	1
Polymerase Aktivierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	} 40
Anlagerung & Extension	60 °C	1 min	

Die Auswertung erfolgte nach der vergleichenden C_t (*threshold cycle*)-Methode, auch $2^{(\Delta\Delta C_t)}$ -Methode genannt, wobei *ACTB* als Referenzgen diente. Es wurde eine relative Quantifizierung im Vergleich zu einer Kontrollprobe vorgenommen.

2.2.18 p21 mRNA-Stabilitätstest

Die Stabilität einer mRNA lässt Rückschlüsse auf ihre posttranskriptionelle Regulation zu. Zur Beurteilung der Stabilität einer endogenen mRNA kann dabei die Halbwertszeit herangezogen werden. Bei gleichzeitiger Inhibition der Transkription spiegelt die zeitliche Veränderung der mRNA-Expression ihren Abbau wider. Die Behandlung mit dem Zytostatikum Actinomycin D (ActD), welches in die DNA interkaliert und dadurch die DNA-abhängige RNA-Polymerase hemmt, bewirkt eine Transkriptionsblockade. Für die Untersuchung der p21 mRNA-Halbwertszeit wurden $4 \cdot 10^5$ HCT116 Wildtyp-Zellen in einer 6er Mikrotiterplatte ausgesät und am Folgetag mit miR-Mimiks transfiziert. 24 h später wurden die transfizierten Zellen auf die zu untersuchenden Zeitpunkte verteilt, während die Bestimmung der Halbwertszeit erst nach 72 h erfolgte. Wie in Abb. 8 dargestellt, wurde die p21 mRNA-Expression durch die Behandlung mit ionisierender Strahlung induziert und 3 h später ActD (Enkonzentration 1 $\mu\text{g/ml}$) appliziert, um die mRNA-Neusynthese zu inhibieren. Die Detektion der p21 mRNA-Expression mittels qRT-PCR fand zu den Zeitpunkten 0, 3, 4, 5, 7, 9 h nach IR (bzw. 0, 1, 2, 4, 6 h nach ActD-Zugabe) statt. Die Ernte erfolgte durch Aspiration des Nährmediums und der Zugabe von 350 μl RLT-Puffer (inkl. 0,01% β -Mercaptoethanol) in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Vibration gründlich homogenisiert. Anschließend wurde die p21 mRNA-Expression, wie in Kapitel 2.2.18 beschrieben, ermittelt. Zur Bestimmung der p21 mRNA-Stabilität wurde die relative p21 mRNA-Expression auf den Zeitpunkt der ActD-Zugabe (3 h nach IR) normalisiert. Aus der grafischen Auftragung der mRNA-Expression gegen die Zeit ergab sich mittels linearer Regression eine Gerade aus deren Steigung die Halbwertszeit berechnet werden konnte.

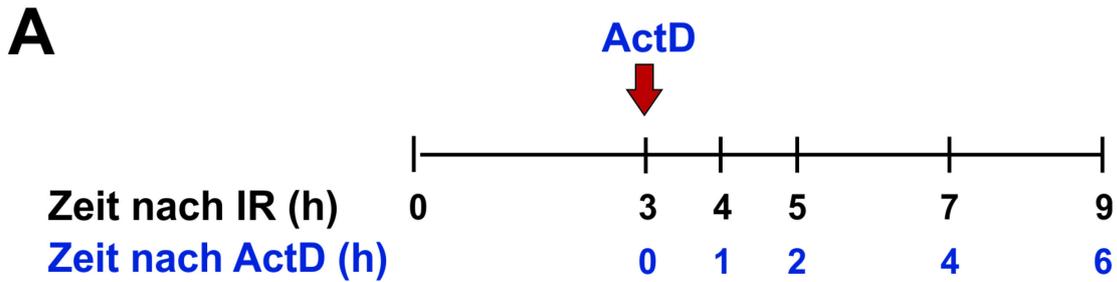


Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der mRNA-Halbwertszeit-Bestimmung. Die Zellen wurden bestrahlt und nach 3 h Actinomycin D (ActD) zugeben. Die p21 mRNA-Expression wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR ermittelt.

2.2.19 Relative Quantifizierung der miRNA-Expression (qRT-PCR)

2.2.19.1 miRNA-Isolierung

Am Tag vor der Strahlenexposition wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen in einer 6er Mikrotiterplatte ausgesät. Die Isolierung der miRNA erfolgte mit Hilfe des *miRNeasy Mini Kits* (Tab. 19) entsprechend den Herstellerangaben. Für die Ablösung der adhärennten Zellen wurde ein Zellschaber verwendet und die Zellen einschließlich des Nährmediums in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Mittels Zentrifugation bei $5.000 \times g$ und 4°C für 5 min wurden die Zellen sedimentiert und das Medium aspiriert. Es folgte ein Waschschriff mit PBS. Die Zellen wurden in $700 \mu\text{l}$ *QIAzol Lysis Reagent* resuspendiert und durch Vibration lysiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden $140 \mu\text{l}$ Chloroform zugefügt und die Probe durch invertieren gründlich vermischt. Die Probe wurde erneut bei RT für 2 min inkubiert und anschließend die RNA durch Zentrifugation von den Proteinen und der DNA getrennt. Nach der Überführung der wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß erfolgte die Zugabe von $450 \mu\text{l}$ absolutem Ethanol. Das Gemisch wurde auf die RNAeasy-Säule pipettiert und nachfolgend zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und $700 \mu\text{l}$ *Buffer RWT* auf die Membran appliziert. Erneut fand ein Zentrifugationsschritt statt und der Durchfluss wurde entsorgt. Darauf folgten zwei Waschschriffe mit $500 \mu\text{l}$ *Buffer RPE*. Die Säule wurde in ein neues 2 ml-Sammelgefäß überführt und zentrifugiert, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde die Säule in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß platziert und $30 \mu\text{l}$ H_2O auf die Membran gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 1 min wurde die miRNA mittels Zentrifugation eluiert. Die Überprüfung der Ausbeute und Reinheit der miRNA erfolgte am NanoDrop Spektralphotometer (A260/A280: 1,9 - 2,2; A260/A230: 2,0 - 2,2).

2.2.19.2 Reverse Transkription

Die Umschreibung reifer miRNA in cDNA fand mit dem *TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit* (Tab. 19) statt. Auf Grund der geringen Größe einer miRNA (22 Nukleotide) ist es nicht möglich, Standardprimer für die cDNA-Synthese einzusetzen. Stattdessen erfolgt die Umschreibung mit Hilfe von Haarnadelschleifen-Primer, die sich spezifisch an eine Ziel-miRNA anlagern und zur Verlängerung des 3'-Endes führen. Daher ist es notwendig, für jede zu untersuchende miRNA sowie für die interne Kontrolle, eine separate cDNA-Synthese durchzuführen. Um dennoch eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde für alle cDNA-Reaktionen einer Probe ein gemeinsamer Ansatz hergestellt.

Ansatz je cDNA-Reaktion

5 µl	10 ng miRNA
0,15 µl	100 mM dNTPs
1,0 µl	<i>MultiScribe RT enzyme</i>
1,5 µl	10x <i>RT Buffer</i>
0,19 µl	RNase Inhibitor
4,16 µl	H ₂ O

Aus diesem Ansatz wurden jeweils 12 µl entnommen und mit 3 µl des miRNA-spezifischen Primers (5x) vermischt. Die Reaktion lief nach folgendem Programm im TProfessional Thermocycler ab:

Schritt	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	16 °C	30 min
Reverse Transkription	42 °C	30 min
Reaktionsstopp	85 °C	5 min

2.2.19.3 qRT-PCR

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte durch die Verwendung der bereits beschriebenen TaqMan-Methode. Dazu wurden die einzelnen Bestandteile der Reaktion zusammengefügt und in eine 96er Mikrotiterplatte pipettiert. Für jede Probe wurden technische Triplikate angefertigt. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 1,33 µl cDNA, 10 µl 2x TaqMan Universaler Master-Mix (Tab. 2), 1 µl 20x TaqMan miRNA-Sonde (Tab. 13) und 7,67 µl H₂O zusammen. Die Amplifizierung der DNA sowie die Fluoreszenz-Messung wurde im 7300 Real Time PCR System durchgeführt.

2. Material und Methoden

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Inkubation	50 °C	2 min	1
Polymerase Aktivierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	} 40
Anlagerung/Elongation	60 °C	60 s	

Die Auswertung fand nach der $2^{(\Delta\Delta Ct)}$ -Methode statt, wobei die small noncoding RNA (snRNA) RNU6B als endogene Referenz verwendet wurde. Es wurde eine relative Quantifizierung im Vergleich zu einer Kontrollprobe vorgenommen.

2.2.20 CRISPR/CAS9

Die dauerhafte und spezifische Ausschaltung der Expression einer miRNA kann mit Hilfe des CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeats)/CAS (CRISPR-associated)-Systems, dem adaptiven Immunsystem von Bakterien und Archaeen, erreicht werden (Horvath & Barrangou, 2010). Ein CRISPR-Locus besteht aus repetitiven Sequenzen, die von variablen Sequenzen (*protospacer*) unterbrochen werden, sowie assoziierten CAS-Genen (Doudna & Charpentier, 2014). Die *Protospacer* sind homolog zu genomischen Sequenzen von Viren und Phagen und wurden nach einer überstandenen Infektion in den CRISPR-Locus integriert (Mojica et al., 2005; Bolotin et al., 2005). Während CAS-Gene für Endonukleasen kodieren, werden die nicht-kodierenden *Protospacer* in kurze mRNAs (CRISPR-RNA, crRNA) transkribiert. Die crRNA hybridisiert mit einer weiteren RNA, genannt tracrRNA (trans-activating crRNA), die anschließend die CAS bindet und stabilisiert. Dieser Ribonukleoproteinkomplex wird von der crRNA zur komplementären Ziel-DNA geleitet und bindet diese mittels Watson-Crick-Basenpaarung. Im Anschluss spaltet CAS die DNA (Hsu et al., 2014). Das CRISPR/CAS-System kann umprogrammiert und gegen jede beliebige DNA-Sequenz gerichtet werden (Jinek et al., 2012). Zur Herstellung von *Knockout*-Zellen wird vorwiegend das CRISPR/CAS-System TYP II, auch CRISPR/CAS9; verwendet. Dieses benötigt, neben der Endonuklease CAS9, eine zur Zielsequenz komplementäre crRNA und eine tracrRNA (Doudna & Charpentier, 2014). Eine weitere Voraussetzung ist das Vorhandensein eines sogenannten PAM (protospacer adjacent motif)-Motivs in direkter Nähe der genomischen Zielsequenz, da nur so eine Erkennung durch die CAS9 erfolgen kann (Sternberg et al., 2014). Die CAS9 erzeugt etwa 3-4 bp vor dem PAM-Motiv einen Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA (Garneau et al., 2010), der durch zelleigene DNA-Reparaturmechanismen beseitigt wird. In Abwesenheit einer exogenen Matrize erfolgt dabei vorwiegend NHEJ (nonhomologous end joining) (Sander & Joung, 2014). Die so entstehenden Insertionen und/oder Deletionen in der Gensequenz können auf

2. Material und Methoden

Proteinebene zu einer Verschiebung des Leserasters oder alternativ zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation führen (Bibikova et al., 2002). Im Idealfall entsteht so ein funktionsloses Protein. Anders verhält es sich jedoch, wenn miRNAs mit Hilfe des CRISPR/CAS9-Systems ausgeschaltet werden sollen, da diese nicht für ein Protein kodieren. Hier verfolgt man den Ansatz, die Prozessierungsstellen der pre-miRNA zu mutieren, um die Reifung der miRNA zu verhindern (H. Chang et al., 2016). Dabei wird ausgenutzt, dass die Sequenz und Struktur der Schnittstellen und ihrer Umgebung entscheidend für ihre Erkennung und Spaltung durch die Endonukleasen Drosha und Dicer ist (vgl. Kapitel 1.6.3). Werden diese Bereiche mutiert, nimmt die Effektivität der Prozessierung deutlich ab, sodass weniger reife miRNA entsteht. Auf diese Weise werden genau genommen keine *Knockout*- sondern *Knockdown (KD)*-Zellen generiert, in denen die Menge der reifen miRNA jedoch um bis zu 96% reduziert werden kann (Chang et al., 2016).

Die Generierung von miR-30e-KD-Zellen umfasste die transiente Transfektion der Zellen mit den Komponenten des CRISPR/CAS9-Systems, die Selektion mutierter Klone sowie den Nachweis des *Knockdowns* mittels miRNA-Expressionsanalyse und Sanger-DNA-Sequenzierung. Schematisch ist dies in Abb. 9 dargestellt. Es wurden zwei unterschiedliche Selektionsverfahren angewendet. Im ersten Fall wurden die Zellen mit einem fluorogenen Reporter gen transfiziert, im Durchflusszytometer isoliert und Einzelzellverdünnungen hergestellt. Im zweiten Fall wurde ein Resistenzgen gegen Puromycin in die Zellen eingebracht und eine Antibiotikum-basierte Selektion durchgeführt.

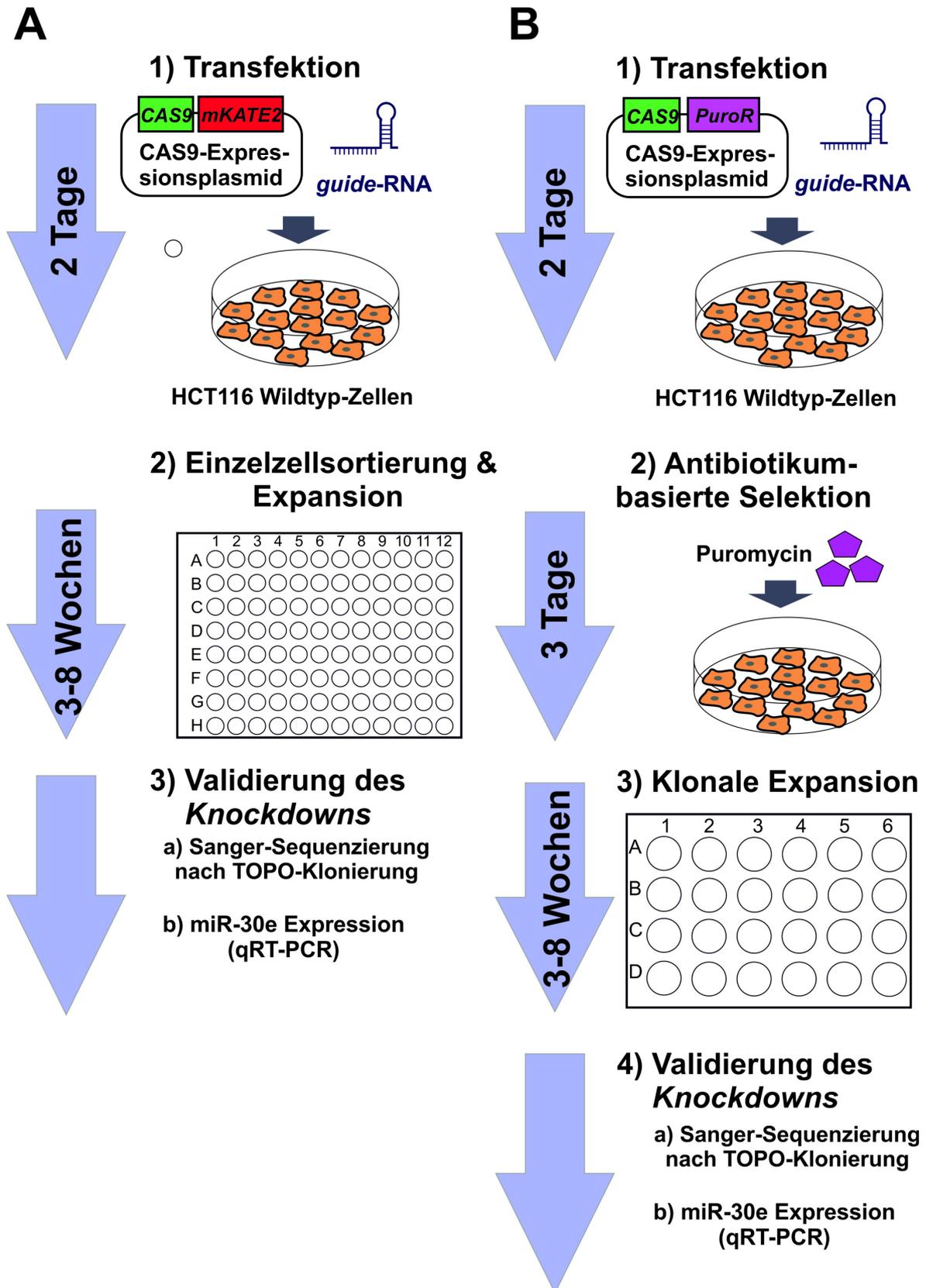


Abb. 9: Ablauf der Genomeditierung durch Verwendung des CRISPR/CAS9-Verfahrens. HCT116 Wildtyp-Zellen wurden transient mit *guide*-RNAs und einem CAS9-Expressionsplasmid transfiziert. Das Plasmid kodierte zusätzlich für (A) einen fluorogenen Reporterfarbstoff (mKATE2) oder (B) eine Puromycinresistenz (PuroR). Positiv-transfizierte Zellen wurden mit Hilfe (A) durchflusszytometrischer Einzelzellsortierung oder (B) Antibiotikabehandlung selektioniert und expandiert. Die Überprüfung des miR-30e-Knockdowns erfolgte durch Sanger-Sequenzierung sowie miR-30e-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR.

2.2.20.1 Transiente Transfektion mit dem CRISPR/CAS9-System

Die Geneditierung erfolgte mit dem Edit-R CRISPR/CAS9-System (Tab. 8 - 9). Dieses setzt sich aus einem CAS9-Expressionsplasmid, einer crRNA sowie der tracrRNA zusammen. Es wurden fünf verschiedene crRNAs getestet und entweder einzeln oder in Kombination mit einer zweiten crRNA eingesetzt. Je nach Selektionsverfahren wurde ein CAS9-Plasmid verwendet, welches entweder für einen fluorogenen Reporterfarbstoff (mKATE2) oder eine Puromycinresistenz (PuroR) kodierte.

4·10⁵ HCT116 Wildtyp-Zellen wurden in einer 6er Mikrotiterplatte ausgesät und am nächsten Tag das CRISPR/CAS9-System mittels Lipofektion eingebracht. Dazu wurden die Lösungen 1 und 2 hergestellt und nach einer fünfminütigen Inkubationszeit vermischt. Nach weiteren 20 min erfolgte die Zugabe von 2 ml McCoy 5A (10% FCS) und der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen gegeben.

Lösung 1	Optimem	140 µl
	CAS9-Plasmid (100 ng/µl)	40 µl
	tracrRNA (10 µM)	10 µl
	crRNA (10 µM)	10 µl (bei zwei crRNAs: 5 µl/crRNA)
Lösung 2	Dharmafect Duo	12 µl
	Optimem	188 µl

2.2.20.2 Durchflusszytometrische Einzelzellsortierung

Die Selektion fluoreszenzmarkierter Zellen fand 48 h nach der Transfektion statt. Dazu wurde das Nährmedium aspiriert und die Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst. Die Zugabe von frischem Medium stoppte die Reaktion und die Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 800 x g und RT für 5 min wurde das Medium entfernt und die Zellen in PBS versetzt mit 1% FCS und 1 mM EDTA resuspendiert. Die Filtrierung der Zellsuspension mit Hilfe eines Zellsiebes (40 µM Porengröße) stellte eine Vereinzelung der Zellen sicher. Die durchflusszytometrische Zellsortierung wurde von Dipl. Ing. Raba der Core Flow Cytometry Facility, angesiedelt am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf, durchgeführt. Die Zellen wurden einzeln auf die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte verteilt, in welche bereits Nährmedium vorgelegt worden war.

2.2.20.3 Puromycin-Selektion

8 h nach der Transfektion erfolgte die Aufteilung der Zellen auf jeweils fünf 10 cm Zellkulturschalen. Am nächsten Tag wurde Puromycin-haltiges Nährmedium (10% FCS,

2. Material und Methoden

100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1 µg/ml Puromycin) auf die Zellen gegeben und täglich erneuert. Nach vier Tagen wurde der Selektionsprozess beendet und die Kultivierung fand in Puromycin-freiem Standardmedium statt. Sobald sich Einzelzellkolonien ausgebildet hatten, wurden diese gepickt und expandiert.

2.2.20.4 Validierung des *MIR30E*-Knockdowns

Zur Bestätigung des *MIR30E*-Knockdowns wurde die miR-30e-Expression der Zellklone mittels qRT-PCR bestimmt. Das Vorgehen erfolgte wie in Kapitel 2.2.18 beschrieben. Durch die Sequenzierung des *MIR30E*-Genlocus wurde bestätigt, dass die Verringerung der miR-30e-Expression auf eine genomische Veränderung zurückzuführen ist. Dazu wurde die genomische DNA der Klone isoliert und die *MIR30E*-Sequenz amplifiziert. Die beste Ausbeute konnte erzielt werden, indem eine verschachtelte PCR (*Nested PCR*) durchgeführt wurde. Bei dieser Methode werden zwei aufeinanderfolgende PCRs durchgeführt, wobei das PCR-Produkt der ersten Reaktion als Matrize für die zweite dient. Bei der zweiten Vervielfältigung kommt ein anderes Primerpaar zum Einsatz, welches komplementär zum entstandenen Amplifikat ist. Auf diesem Weg wurde eine spezifische Anreicherung des PCR-Produkts erreicht. Zunächst erfolgte die Vervielfältigung einer 5 kb-Sequenz aus der genomischen DNA, welche den *MIR30E*-Genlocus umspannte.

Reaktionsansatz

500 ng	genomische DNA
50 µl	5x Phusion HF-Buffer
5 µl	100 mM dNTPs
6,25 µl	20 µM Vorwärts-Primer miR-30e-Promotor (Tab. 14)
6,25 µl	20 µM Rückwärts-Primer miR-30c-Promotor (Tab. 14)
2,5 µl	Phusion DNA-Polymerase (Tab. 17)
ad 250 µl	H ₂ O

Temperaturprogramm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 35
Anlagerung	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	5 min	
Finale Elongation	72 °C	15 min	1

2. Material und Methoden

Das Produkt aus der vorangegangenen Amplifikation diente als Matrize für die zweite PCR-Reaktion. Für die Synthese wurde die *Taq* DNA-Polymerase (Tab. 17) verwendet, da diese auf Grund einer fehlenden 3'-5'-Exonuklease-Aktivität einen 3'-dATP-Überhang produziert. Dieser ist Voraussetzung für den nachfolgenden Klonierungsschritt.

Reaktionsansatz

50 ng	PCR-Produkt
25 µl	10x <i>Taq</i> Buffer
5 µl	10 mM dNTPs
6,25 µl	20 µM Vorwärts-Primer <i>MIR-30E</i> -Genlocus (Tab. 14)
6,25 µl	20 µM Rückwärts-Primer <i>MIR-30E</i> -Genlocus (Tab. 14)
20 µl	25 mM MgCl ₂
2,5 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
ad 250 µl	H ₂ O

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 35
Anlagerung	54 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Um Aussagen über die homo- oder heterozygote Ausprägung der Mutationen treffen zu können, wurde die Methode der Topoisomerase-basierten Klonierung (TOPO-Klonierung) angewendet. Diese ermöglicht die direkte Ligation von PCR-Produkten mit einem 3'-dATP-Überhang in ein Plasmid. Die kovalent an das Plasmid gebundene Topoisomerase I erzeugt bei der Linearisierung des Plasmids einen 5'-dNTP-Überhang. Daran lagert sich das PCR-Produkt über komplementäre Basenpaarbindung an und wird von der Topoisomerase I mit diesem verbunden. Für die TOPO-Klonierung wurde das *Topo TA Cloning Kit* (Tab. 19) verwendet.

TOPO-Klonierung

2 µl	finale PCR-Produkt
1 µl	Salzlösung
1 µl	TOPO-Vektor
2 µl	H ₂ O

2. Material und Methoden

Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT erfolgte die Einbringung der TOPO-Reaktion (6 μ l) in 50 μ l *E. coli* DH5 α mittels Hitzeschock-Transformation (vgl. Kapitel 2.2.14.8). Die Bakterien wurden zur Selektion auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Einzelzellkolonie wurde eine Flüssigkultur angeimpft und eine analytische DNA-Präparation vorgenommen. Es folgte eine Sequenzierung des *MIR30E*-Genlocus nach dem Sanger-Verfahren (MWG Eurofins, Ebersberg).

2.2.21 Statistik

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen gepaarten Student's t-Test ermittelt. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgend festgelegt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$
*** $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 miR-30e wird in Abhängigkeit von p53 nach ionisierender Strahlung verstärkt exprimiert

Wird die Tumorzelllinie HCT116 ionisierender Strahlung (20 Gy) ausgesetzt, können zwei gegensätzliche Zellschicksalsentscheidungen auftreten. Entscheidend ist hierbei der Expressionsstatus des Tumorsuppressors p53. In p53-profizienten HCT116 Wildtyp-Zellen führt Strahlensexposition hauptsächlich zur Einleitung von Seneszenz, während p53-defiziente HCT116-Zellen überwiegend in die Apoptose gehen (Sohn et al., 2006; Neise et al., 2013). Ein *Microarray* in diesem Zellsystem ermöglichte die Identifizierung von miRNAs, deren Expression in bestrahlten HCT116 Wildtyp-Zellen spezifisch verändert ist und diese demnach Seneszenz-assoziiert auftreten. Eine der miRNA, die in der strahlungsinduzierten Seneszenz verstärkt exprimiert wird, ist miR-30e.

Real Time PCR-Analysen bestätigten, dass die Expression von miR-30e nach Bestrahlung in p53-profizienten HCT116 Wildtyp-Zellen deutlich hochreguliert wurde, während sie in p53-defizienten Zellen nur leicht anstieg (Abb. 10A). Hierdurch wurde nicht nur auf die Seneszenzspezifität der miR-30e hingewiesen, sondern auch auf eine mögliche Kontrolle durch p53. Um die Abhängigkeit der miR-30e-Hochregulation von p53 zu verifizieren, wurde ein Luciferase-Reportergentest in p53-defizienten HCT116 Zellen durchgeführt. Bei diesem wurde die Induzierbarkeit einer putativen miR-30e-Promotorregion durch einen p53-Expressionsvektor überprüft. Dazu wurde die genomische Sequenz, welche sich stromaufwärts des Transkriptionsstarts von miR-30e befindet, in einen Luciferase-Vektor kloniert und die Promotor-Aktivität ermittelt. Es wurde festgestellt, dass die Überexpression von p53 diese deutlich erhöhte (Abb. 10C), was eine p53-abhängige Regulation von miR-30e bewies.

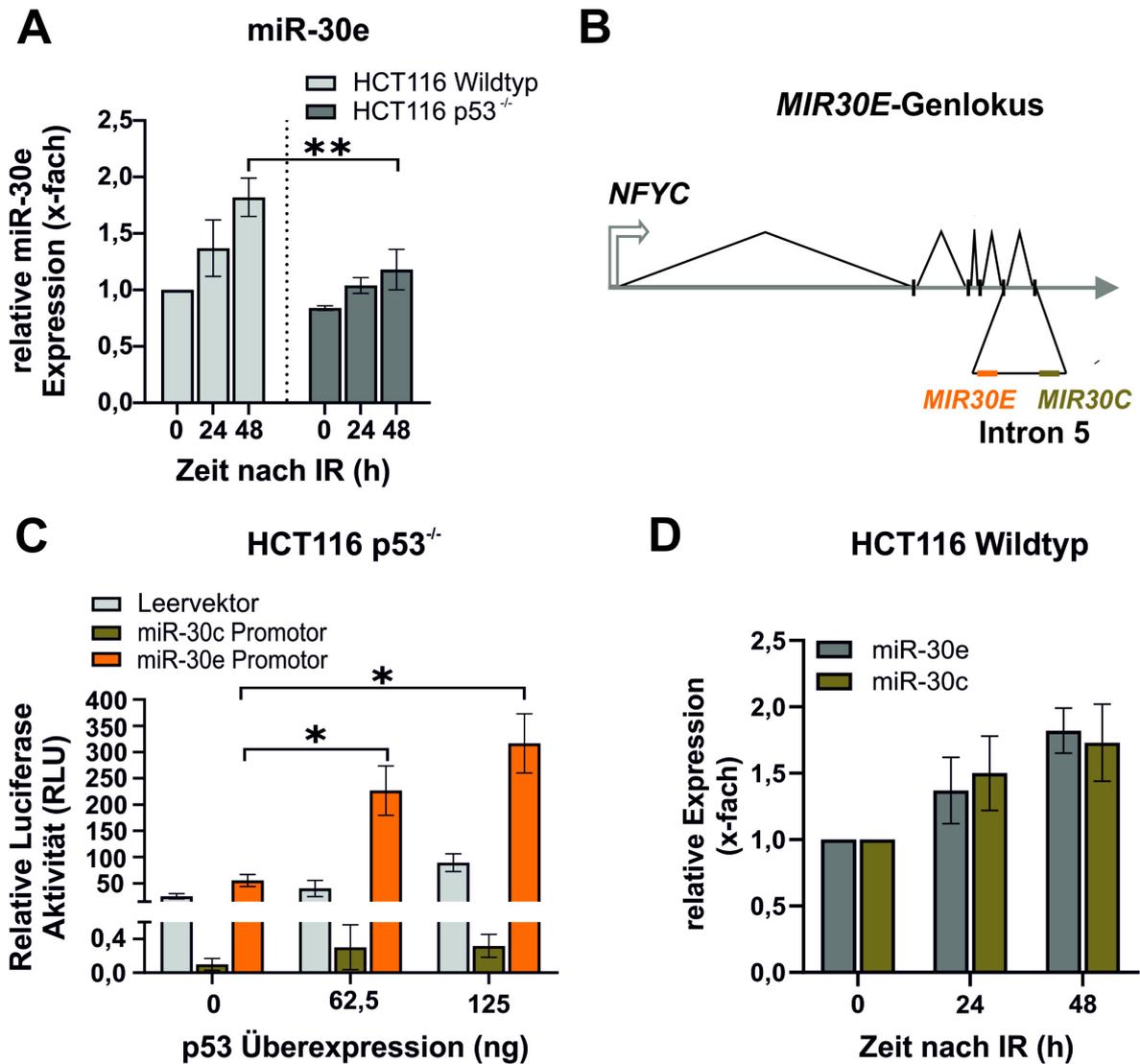


Abb. 10: miR-30e und miR-30c werden zusammen nach Bestrahlung p53-abhängig hochreguliert. (A) HCT116 Wildtyp- und HCT116 p53^{-/-}-Zellen wurden ionisierender Strahlung (20 Gy) ausgesetzt und die miR-30e-Expression zu den angegebenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mind. drei unabhängig durchgeführten Experimenten. (B) Schematische Darstellung des *MIR30E*- und *MIR30C*-Genlocus lokalisiert im Intron 5 des *NFYC*-Gens. (C) HCT116 p53^{-/-}-Zellen wurden mit Luciferase-Reportergenkonstrukten transfiziert, in welchen die Luciferase entweder unter der Kontrolle der putativen miR-30e- oder der miR-30c-Promotorregion stand. Gleichzeitig wurde ein p53-Expressionsplasmid kotransfiziert. Nach 24 h wurde die p53-abhängige Luciferase-Aktivität gemessen. (D) Die Expression von miR-30c und miR-30e wurde in unbehandelten und bestrahlten HCT116 Wildtyp-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten durch qRT-PCR quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten (C, D).

Daraus ergaben sich zudem Schlussfolgerungen über die transkriptionelle Regulation des *MIR30E*-Gens. *MIR30E* ist im Intron 5 des proteinkodierenden *NFYC*-Gens kodiert, wo auch das *MIR30C*-Gen lokalisiert ist (Abb. 10B). Intronsche miRNAs können entweder mit dem Protein-kodierenden Gen kotranskribiert oder transkriptionell unabhängig über einen eigenen Promotor induziert werden. Die räumliche Nähe zweier miRNAs im Genom kann zudem auf eine Regulation durch einen gemeinsamen Promotor als miRNA-Cluster hindeuten. Die Induzierbarkeit der untersuchten, putativen miR-30e-

Promotorregion durch p53 weist zuerst einmal auf einen eigenen Promotor und damit auf eine von NFYC-unabhängige transkriptionelle Regulation hin. Um die Frage zu klären, ob *MIR30E* und *MIR30C* gemeinsam unter der Kontrolle eines Promotors stehen oder unabhängig voneinander reguliert werden, wurde auch die Induzierbarkeit der genomischen Sequenz stromaufwärts des *MIR30C*-Transkriptionsstarts durch p53 untersucht. Der miR-30c-Promotor wies sowohl basal als auch nach p53-Überexpression eine sehr geringe Luciferase-Aktivität auf (Abb. 10C). Die gemessene Signalintensität war dabei deutlich niedriger als die des Leervektors und kann daher als unspezifisches Hintergrundsignal betrachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass *MIR30E* und *MIR30C* gemeinsam als Gencluster reguliert werden. Ein weiteres Indiz hierfür stellt das Expressionsmuster von miR-30c in bestrahlten HCT116 Wildtyp-Zellen dar, welches mit miR-30e korreliert (Abb. 10D).

3.2 miR-30e schützt HCT116 Wildtyp-Zellen vor strahlungsinduzierter Apoptose

Wie bereits beschrieben, unterscheiden sich HCT116 Wildtyp- und HCT p53^{-/-}-Zellen im Hinblick auf ihr Zellschicksal nach Bestrahlung. Während p53-profiziente Wildtyp-Zellen hauptsächlich seneszent werden und nur in sehr geringen Mengen sterben, leiten p53-defiziente Zellen fast ausschließlich Apoptose ein. Es stellte sich daher die Frage, ob eine erhöhte miR-30e-Expression, wie sie in den Wildtyp-Zellen nach DNA-Schädigung auftritt, vor Apoptose schützt. Zu diesem Zweck wurde die Zelltodrate in unbestrahlten und bestrahlten HCT116 Wildtyp-Zellen bestimmt, die entweder mit einer Kontroll-Mimik (miR-Con) oder einer miR-30e-Mimik transfiziert wurden. Der Zelltodnachweis erfolgte mittels eines LDH-Zytotoxizitätstests, welcher die LDH-Freisetzung in den Zellkulturüberstand quantifiziert. Tatsächlich reduzierte die Überexpression von miR-30e die LDH-Aktivität im Überstand bestrahlter Zellen und damit die Zelltodinduktion (Abb. 11A). Keine Unterschiede waren hingegen in unbehandelten Zellen erkennbar, was darauf zurückzuführen ist, dass unter basalen Bedingungen so gut wie kein Zelltod stattfand, der dementsprechend auch nicht durch miR-30e verhindert werden konnte. Die Messung der Caspase-3-Enzymaktivität (DEVDase-Aktivität) dient als Nachweis der Apoptose und kann damit Aufschluss über die Form des auftretenden Zelltods geben. Während unbehandelte Zellen nur eine niedrige Caspase-3-Aktivierung aufwiesen, stieg diese nach Strahlenexposition an (Abb. 11B). Verglichen mit miR-Con-transfizierten HCT116 Wildtyp-Zellen reduzierte die Transfektion mit miR-30e die strahlungsinduzierte Caspase-3-Aktivität. Ursächlich hierfür könnte eine verminderte Expression der Caspase-3 sein, da miRNAs typischerweise posttranskriptionale Regulatoren ihrer Zielgene sind. Daher wurde der Effekt von miR-30e auf die Proteinexpression des katalytisch inaktiven

3. Ergebnisse

Caspase-3-Vorläufers, Procaspase-3 (CASP3), durch Anwendung des Western Blot-Verfahrens untersucht. Die Überexpression von miR-30e führte dazu, dass die zelluläre Proteinmenge an Procaspase-3 in unbehandelten sowie bestrahlten HCT116 Wildtyp-Zellen sichtbar abnahm (Abb. 11C). miR-30e besitzt demnach ein anti-apoptotisches Potential, welches selbst die geringe Hintergrundapoptose reduziert, die auch in seneszenten Zellen nach Bestrahlung nachweisbar ist. Als molekularer Mechanismus ist hier die Reduzierung der Procaspase-3 auf Proteinebene und die daraus resultierende Hemmung des Caspase-3-abhängigen Zelltods zu nennen.

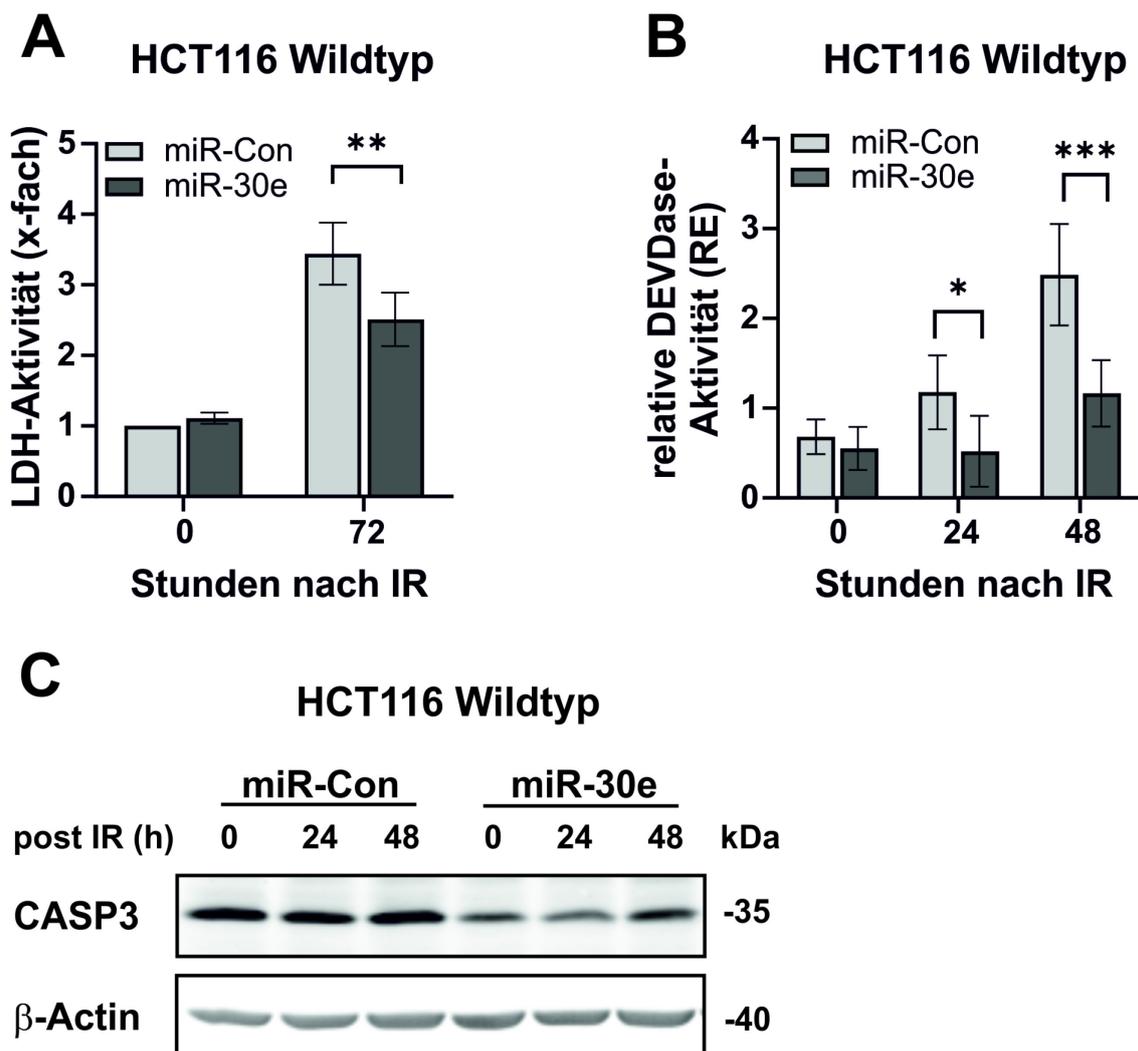


Abb. 11: miR-30e reduziert den Zelltod und die DEVDase-Aktivität nach Strahlenexposition. HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit einer Kontroll- oder einer miR-30e-Mimik transfiziert. (A) Zur Zelltodbestimmung wurde die LDH-Aktivität im Zellüberstand unbehandelten und bestrahlter Zellen 72 h nach IR (20 Gy) ermittelt. (B) Fluorometrische Messung der DEVDase-Aktivität in Zellextrakten aus unbehandelten und bestrahlten Zellen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus acht (A) bzw. fünf (B) unabhängigen Experimenten. (C) Zellextrakte aus unbehandelten und bestrahlten Zellen wurden mittels des Western Blot-Verfahrens auf die Expression der Procaspase-3 (CASP3) hin untersucht. β -Actin diente dabei als Ladekontrolle. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. RE, relative Einheiten.

3.3 miR-30e verstärkt die Seneszenzinduktion nach Strahlenexposition

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob miR-30e auch die strahlungsinduzierte, p53-abhängige Seneszenzinduktion in HCT116 Wildtyp-Zellen beeinflusst. Seneszente Zellen in der Zellkultur zeichnet typischerweise eine Größenzunahme sowie eine flache und ausgebreitete Morphologie aus. Die Ausbildung dieses seneszenten Phänotyps war nach Bestrahlung in HCT116 Wildtyp-Zellen deutlich zu erkennen (Abb. 12A). Die Überexpression von miR-30e verstärkte die Seneszenzinduktion zusätzlich, was insbesondere in der enormen Vergrößerung des Zellumfangs sichtbar wurde. Zur besseren Veranschaulichung der Größenzunahme wurden repräsentativ die Umrisslinien einiger Zellen durch eine gestrichelte Umrandung markiert. Eine weitere charakteristische Veränderung ist eine Zunahme der SA- β -Gal-Aktivität, die häufig als Marker verwendet wird. Diese wird durch eine histochemische Färbung, bei der ein chromogenes Substrat verwendet wird, visualisiert. Während nur eine geringe Anzahl unbehandelter Zellen angefärbt wurde, nahm der Anteil SA- β -Gal-positiver, also seneszenten Zellen nach Bestrahlung deutlich zu. Allerdings ist eine quantitative Bestimmung der SA- β -Gal-Aktivität mit Hilfe einer kolorimetrischen Anfärbung nicht möglich und damit der Unterschied zwischen miR-Con und miR-30e transfizierten Zellen nicht eindeutig feststellbar. Die Verwendung eines fluorogenen, in der Zelle verbleibenden Substrats hingegen erlaubt die Erfassung der Anzahl seneszenten Zellen in einer Probe mittels Durchflusszytometrie. Nach der Transfektion mit miR-30e-Mimiks wurden nach Bestrahlung unter Anwendung dieser Methodik deutlich mehr Zellen mit einer erhöhten SA- β -Gal-Aktivität detektiert als in miR-con-transfizierten Zellen (Abb. 12B). Die miR-30e-abhängige Zunahme seneszenten Zellen, die mit Hilfe der histochemischen Färbung beobachtet wurde, konnte somit bestätigt werden. MiR-30e schützt HCT116 Wildtyp-Zellen demnach nicht nur vor der strahlungsinduzierten Apoptose, sondern verstärkt darüber hinaus auch die Seneszenzantwort.

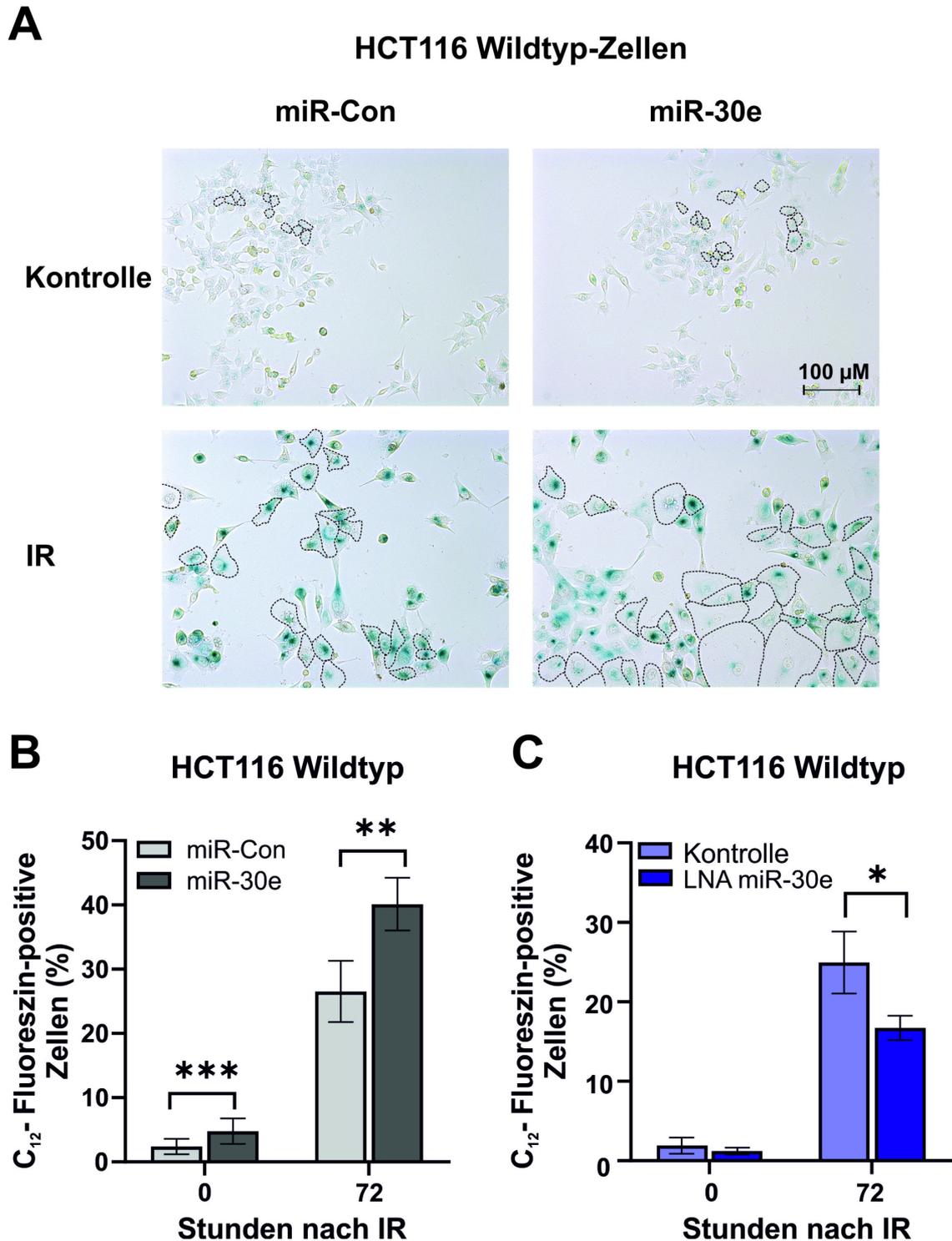


Abb. 12: miR-30e verstärkt die Seneszenzinduktion in bestrahlten HCT116 Wildtyp-Zellen. HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit miR-Con- oder miR-30e-transfiziert und bestrahlt (20 Gy) (A, B). (A) Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und solche mit einer erhöhten SA-β-Gal-Aktivität durch die Umwandlung eines kolorimetrischen Substrats (X-Gal) visualisiert. Die gezeigten mikroskopischen Aufnahmen stehen stellvertretend für mindestens drei unabhängig durchgeführte Experimente. (B) Quantitative Messung der Zellen mit erhöhter SA-β-Gal-Aktivität durch Umsetzung des fluorogenen SA-β-Gal-Substrats C₁₂-FDG. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus sechs unabhängigen Experimenten. (C) HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit einem LNA-Inhibitor gegen miR-30e transfiziert, während die Kontrollzellen nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden. Die quantitative Messung der SA-β-Gal-Aktivität erfolgte in unbehandelten und bestrahlten (20 Gy) Zellen durch die Verwendung des fluorogenen β-Gal-Substrats C₁₂-FDG. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die bisher erzielten Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung von miR-30e basierten auf der Verwendung von miR-30e-Mimiks. Die Überexpression einer miRNA hat den Vorteil, dass ein bestehender Effekt verstärkt und dadurch besser sichtbar wird. Ein Nachteil dieser Herangehensweise ist, dass unspezifische Nebeneffekte der miRNA-Mimik gerade bei hohen intrazellulären Konzentrationen nicht vollständig ausgeschlossen werden können. Daher sollte die pro-seneszente Wirkung der miR-30e in einem zellulären System verifiziert werden, indem miR-30e-abhängige Signalwege inaktiviert sind. Eine Möglichkeit die Aktivität einer miRNA zu hemmen, ist die Verwendung von *locked nucleic acids* (LNA)-Inhibitoren (Roberts et al., 2006). Dabei handelt es sich um einzelsträngige RNA-Mimiks, deren Sequenz perfekt komplementär zu ihrer Ziel-miRNA ist. Der LNA-Inhibitor und die miRNA bilden einen stabilen Heteroduplex aus, wodurch die miRNA ihre normale Funktion nicht mehr ausüben kann. Tatsächlich führte die Hemmung miR-30e-abhängiger Signalwege durch den miR-30e LNA-Inhibitor in bestrahlten Zellen zu einer verminderten Aktivität der SA- β -Gal und unterstrich folglich die Bedeutung der miR-30e als pro-seneszenter Entscheidungsträger in der DNA-Schadensantwort (Abb. 12C).

3.4 miR-30e führt zu einer Hochregulation von p21 in DNA-geschädigten Zellen

Ein zentraler Effektor der p53-abhängigen DNA-Schadensantwort ist der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p21. Nach Bestrahlung wird p21 in Abhängigkeit von p53 transkriptionell hochreguliert und forciert die Einleitung eines Zellzyklusarrests. Es war daher denkbar, dass die erhöhte Seneszenzinduktion durch miR-30e über eine gesteigerte Expression von p21 erfolgt. Aufgrund dessen wurde im nächsten Schritt eine mögliche miR-30e-abhängige Regulation von p21 untersucht. Unter basalen Bedingungen waren die zellulären p21-Proteinmengen in An- und Abwesenheit einer miR-30e-Mimik wie erwartet sehr gering und mittels Western Blot-Verfahrens kaum zu detektieren (Abb. 13A). Strahlungsinduzierte DNA-Schäden führten zu einer Stabilisation der Proteinexpression von p53 sowie einer deutlichen Hochregulation von p21. Tatsächlich war in miR-30e-transfizierten Zellen eine stärkere p21-Zunahme zu beobachten als nach miR-Con-Transfektion, wohingegen die Expression des Transkriptionsfaktors p53 durch miR-30e nicht beeinflusst wurde. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass der durch miR-30e verursachte Anstieg von p21 unabhängig von p53 erfolgt. Um den Mechanismus der miR-30e-vermittelten p21-Regulation aufzuklären, wurde auch die p21 mRNA-Expression untersucht. Im Falle einer transkriptionellen Regulation oder einem Effekt auf die mRNA-Stabilität, wäre eine Veränderung der p21 mRNA-Menge in Anwesenheit der miR-30e-Mimik festzustellen. Beeinflusst miR-30e die p21 mRNA-Expression hingegen nicht, ist ein translationaler Effekt wahrscheinlich. qRT-PCR-

3. Ergebnisse

Analysen zeigten, dass miR-30e die strahlungsinduzierte p21 mRNA-Expression sichtbar steigerte (Abb. 13B). Übereinstimmend dazu führte die Inhibition von miR-30e zu einer verminderten p21 mRNA-Menge in bestrahlten Zellen (Abb. 13C). Folglich resultierte die miR-30e-abhängige Zunahme der p21-Proteinexpression aus der Hochregulation der p21 mRNA.

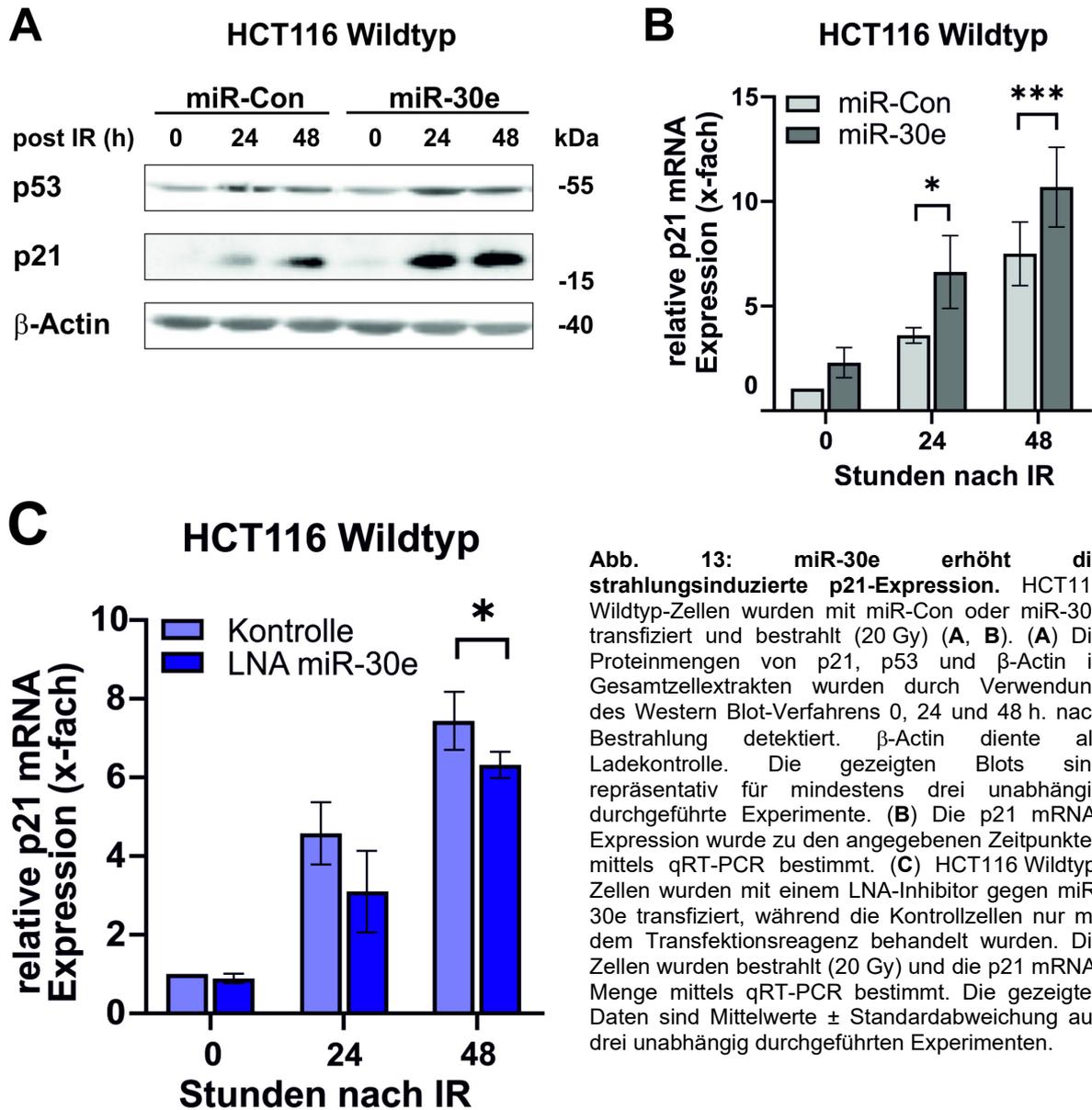


Abb. 13: miR-30e erhöht die strahlungsinduzierte p21-Expression. HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit miR-Con oder miR-30e transfiziert und bestrahlt (20 Gy) (A, B). (A) Die Proteinmengen von p21, p53 und β-Actin in Gesamtzell-extrakten wurden durch Verwendung des Western Blot-Verfahrens 0, 24 und 48 h. nach Bestrahlung detektiert. β-Actin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens drei unabhängig durchgeführte Experimente. (B) Die p21 mRNA-Expression wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR bestimmt. (C) HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit einem LNA-Inhibitor gegen miR-30e transfiziert, während die Kontrollzellen nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden. Die Zellen wurden bestrahlt (20 Gy) und die p21 mRNA-Menge mittels qRT-PCR bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

3. Ergebnisse

Ursächlich für die erhöhte p21 mRNA-Expression in miR-30e-transfizierten Zellen könnte entweder die Zunahme ihrer Stabilität oder eine gesteigerte Transkriptionsrate sein. Um die Stabilität der p21 mRNA zu ermitteln, wurde die Hochregulation von p21 in miR-Con- und miR-30e-transfizierten Zellen durch Strahlenexposition induziert und anschließend Actinomycin D, ein Inhibitor der Transkription, appliziert (Abb. 14A). In Abwesenheit einer Neusynthese spiegeln nachfolgende Änderungen der p21 mRNA-Menge ihre Degradation wider und geben so Auskunft über ihre Stabilität. Der Anstieg der p21 mRNA zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Zugabe, 3 h nach Strahlenexposition, wurde sowohl in miR-Con- als auch in miR-30e-transfizierten HCT116 Wildtyp-Zellen bestätigt (Abb. 14B).

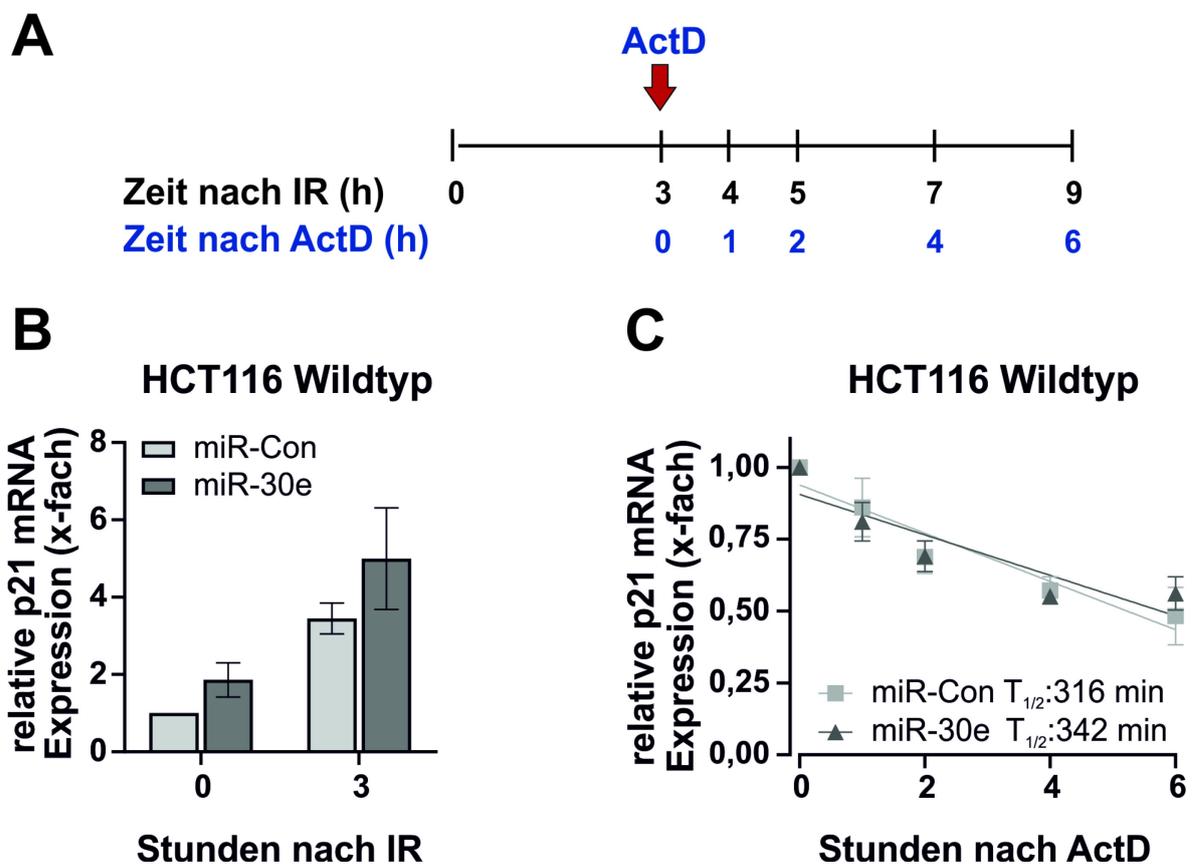
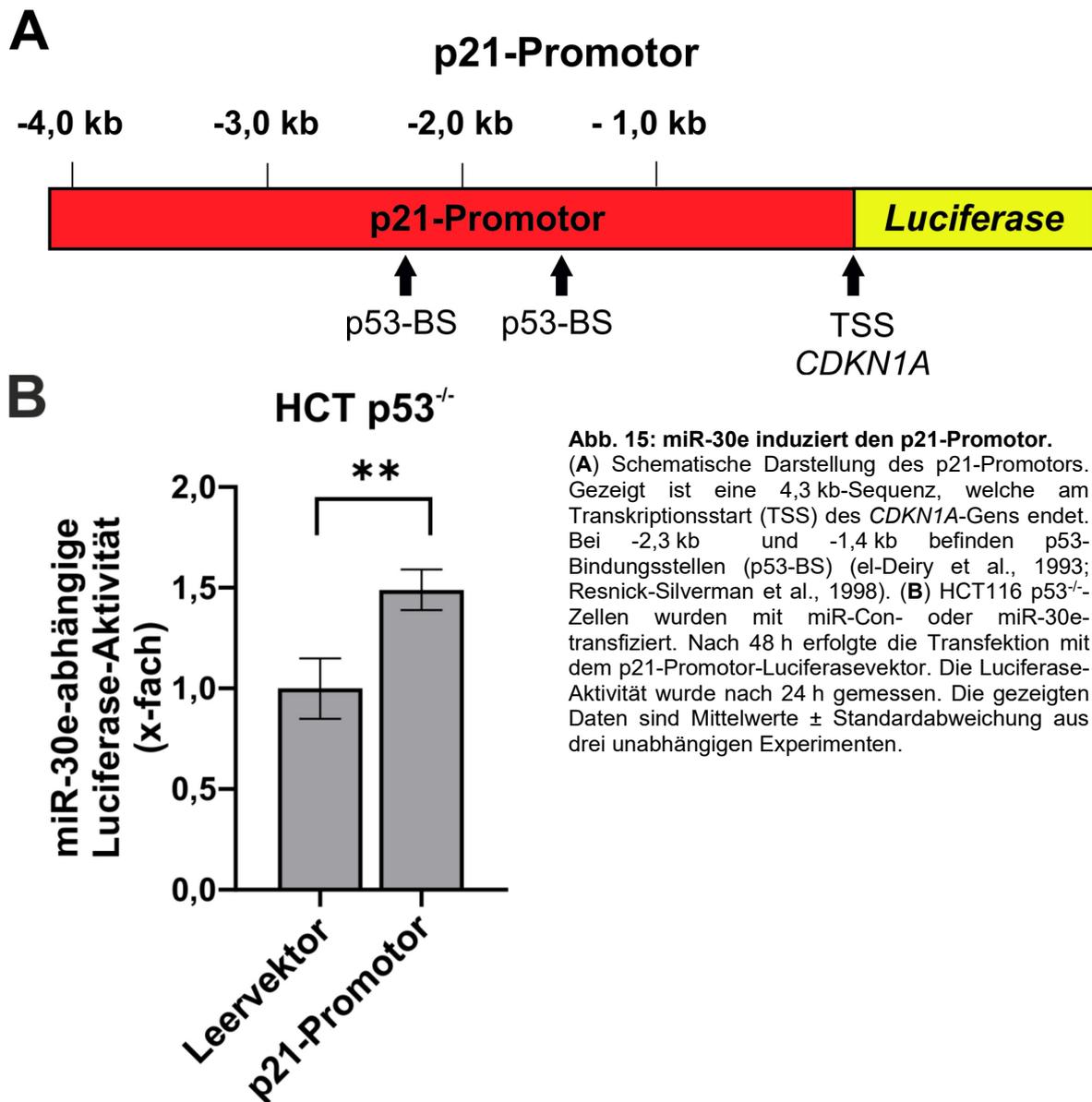


Abb. 14: miR-30e hat keinen Effekt auf die p21 mRNA Stabilität. (A) HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit einer Kontroll-miR oder miR-30e transfiziert und bestrahlt (20 Gy). Drei Stunden nach IR wurde Actinomycin D (ActD) zugegeben und die p21 mRNA-Expression zu den dargestellten Zeitpunkten mittels qRT-PCR bestimmt. (B) Bestrahlungs-abhängige p21 mRNA-Induktion vor der Zugabe von ActD. (C) p21 mRNA-Expressionsanalyse nach ActD-Behandlung (0, 1, 2, 4, 6 h), jeweils dargestellt als Vielfaches des 0 h-Werts. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Dennoch war bereits zu diesem Zeitpunkt eine stärkere p21-Induktion durch miR-30e zu erkennen. Allerdings wurde die Stabilität der p21 mRNA durch die Überexpression der miR-30e nicht verändert (Abb. 14C). Der prozentuale Rückgang der p21 mRNA, welcher in Relation zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation (3 h nach IR) berechnet wurde, war in miR-Con- und miR-30e-transfizierten Zellen vergleichbar. Dies weist darauf hin, dass die Hochregulation von p21 nicht durch eine Stabilisierung der p21 mRNA erfolgt, sondern wahrscheinlich auf eine transkriptionelle Induktion zurückzuführen ist. Typischerweise binden miRNAs an die 3'-UTR ihrer Ziel-mRNA, was je nach Komplementarität der Sequenzen die hydrolytische Spaltung der mRNA oder die Hemmung ihrer Translation zur Folge hat. Dementsprechend weist eine miRNA in der Regel eine inhibierende Wirkungsweise in Bezug auf die Ziel-mRNA aus. Da miR-30e zu einer Erhöhung von p21 führt, handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein direktes miR-30e-Ziel.

3.5 Die p21-Regulation von miR-30e erfolgt auf transkriptioneller Ebene und ist unabhängig von p53

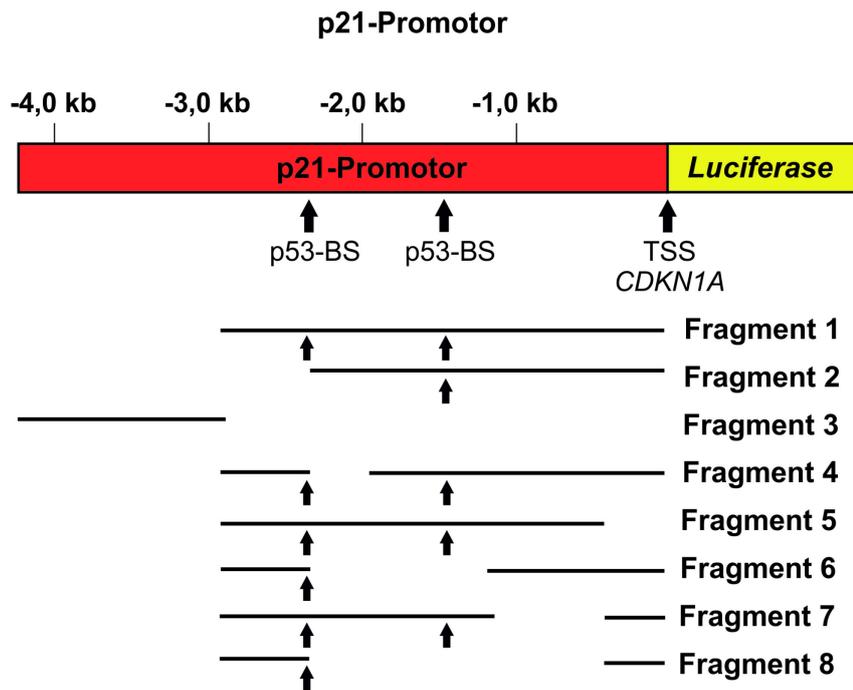
Im nächsten Schritt wurde die Promotoraktivität von p21 nach miR-30e-Überexpression und damit eine mögliche transkriptionelle Regulation untersucht. Eine 4,3 kb DNA-Sequenz des p21-Promotors, die stromaufwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert ist, wurde dazu in einen Luciferase-kodierenden Vektor kloniert (Abb. 15A). Mittels Mimik-Transfektion wurde die Induzierbarkeit des p21-Promotors durch miR-30e überprüft. Dabei wurde die miR-30e-abhängige Luciferase-Aktivität als Vielfaches der miR-Con-abhängigen Aktivität berechnet. Es zeigte sich, dass miR-30e die Promotor-Aktivität von p21 erhöht (Abb. 15B). Zudem erfolgte die Induktion des p21-Promotors durch miR-30e unabhängig von p53, da die Experimente in p53-defizienten HCT116-Zellen durchgeführt wurden. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass p21 auf transkriptioneller Ebene durch miR-30e reguliert wird.



Um die von miR-30e-regulierte Region des p21-Promotors einzugrenzen, wurden acht Promotorfragmente generiert, die unterschiedliche Bereiche abdecken (Abb. 16A). Auch hier wurde wieder die miR-30e-abhängige Luciferase-Aktivität ermittelt und mit der des bereits verwendeten 4,3 kb-Gesamtpromotorkonstrukts verglichen. Das Fehlen der miR-30e-induzierten Promotorregion in einem Fragment würde sich in einer verringerten Aktivität widerspiegeln. Das Gesamtpromotorkonstrukt wies nach miR-30e-Überexpression eine 1,5-fach erhöhte Aktivität auf (Abb. 16B). Von den acht getesteten Promotorfragmenten wurden Fragment 1, Fragment 3 und Fragment 5 signifikant weniger effizient durch miR-30e induziert. Die Aktivität des Fragments 1 zum Gesamtpromotor war jedoch nur sehr geringfügig verringert, während Fragment 3 und Fragment 5 deutliche Unterschiede zeigten. Beim Vergleich dieser beiden Fragmente fällt auf, dass diesen eine 600 Basensequenz direkt am Transkriptionsstart von *CDKN1A* fehlt. Die übrigen

Promotorfragmente, die keine bzw. nur eine geringfügige Veränderung aufwiesen, enthalten hingegen allesamt diese Region. Dies lässt den Rückschluss zu, dass dieses 600 Basenfragment benötigt wird, damit miR-30e p21 induzieren kann. Darüber hinaus wurde mit Hilfe der Aktivitätsanalyse der Promotorfragmente erneut bestätigt, dass die reduzierte miR-30e-abhängige Promotoraktivität von Fragment 3 und Fragment 5 nicht mit der Induzierbarkeit durch p53 korrelierte.

A



B

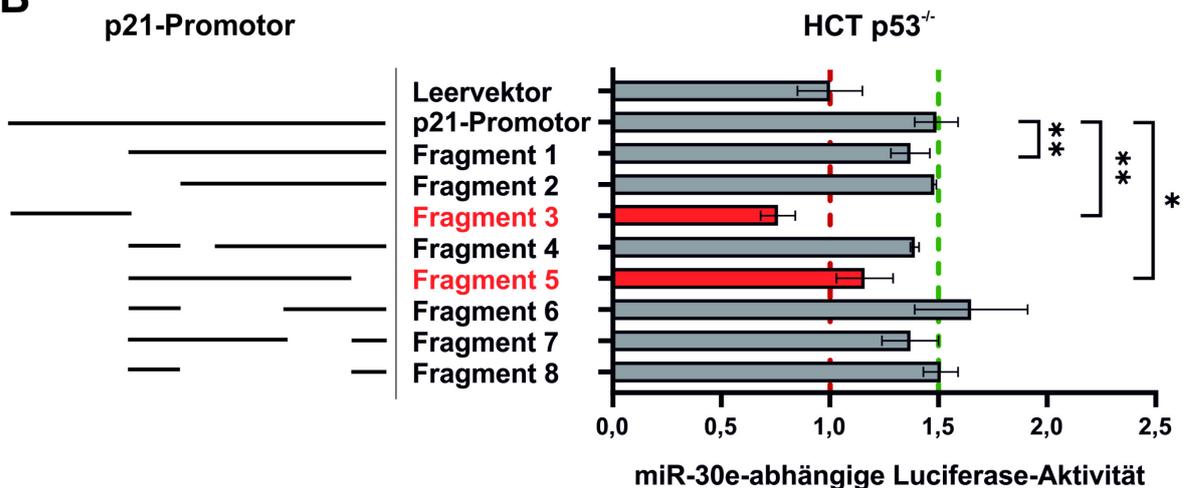


Abb. 16: miR-30e benötigt eine 600 bp-Sequenz zur Induktion des p21-Promotors. (A) Schematische Übersicht der acht p21-Promotorfragmente. (B) HCT116 p53^{-/-}-Zellen wurden mit miR-Con oder miR-30e transfiziert. 48 h nach der Mimik-Transfektion wurden sie mit einem Luciferase-Reportergenvektor transfiziert, in welchem die Luciferase entweder unter der Kontrolle des p21-Promotors oder eines p21-Promotorfragments stand. Die Luciferase-Aktivität wurde 24 h später bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. p53-BS, p53-Bindungsstelle; TSS, Transkriptionsstart.

3.6 Identifizierung miR-30e-regulierter Transkriptionsfaktoren

3.6.1 Massenspektrometrische Identifizierung miR-30e-regulierter Transkriptionsfaktoren

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass miR-30e p21 vermutlich indirekt auf transkriptioneller Ebene mittels eines 600 Basen großen Promotorfragments reguliert. Der nächste Schritt bestand in der Identifikation des hierfür verantwortlichen Transkriptionsfaktors. Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) ist es möglich, Proteine, bspw. in einem Zellextrakt, basierend auf ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis zu identifizieren. Diese Methode sollte dazu verwendet werden, um miR-30e-regulierte Transkriptionsfaktoren zu ermitteln. Die MALDI-MS-Analysen wurden von Dr. Stefanski (Molecular Proteomics Laboratory, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) bzw. Dr. Velic (Proteome Center Tübingen, Universität Tübingen) durchgeführt.

Ein erster Ansatz verfolgte das Ziel Transkriptionsfaktoren zu ermitteln, die in Abhängigkeit von miR-30e im Zellkern bestrahlter HCT116 Wildtyp-Zellen angereichert werden. Dafür wurden nukleäre Zellfraktionen von miR-Con- sowie miR-30e-transfizierter Zellen isoliert und massenspektrometrisch untersucht. Die Schwierigkeit bei der Identifikation von Transkriptionsfaktoren stellt deren für gewöhnlich geringes Expressionsniveau in der Zelle im Vergleich zu anderen Proteinen wie bspw. Bestandteilen des Zytoskeletts dar. Die Verwendung des nukleären Extrakts anstelle des Gesamtzellextrakts diente dazu, die Komplexität der zu untersuchenden Proben zu reduzieren. Es stellte sich dennoch die Frage, ob die Sensitivität der MS-Methode zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren in Zellkernextrakten grundsätzlich ausreichend ist. Als Positivkontrolle konnte hier der Transkriptionsfaktor p53, welcher in HCT116 Wildtyp-Zellen nach strahlungsinduzierten DNA-Schäden stabilisiert und vermehrt exprimiert wird, verwendet werden. p53 sollte demnach zumindest in den bestrahlten Proben nachgewiesen werden können. Seine Identifikation war jedoch mit Hilfe von MS-Analysen, die sowohl von Dr. Stefanski als auch von Dr. Velic durchgeführt wurden, nicht möglich. Das Western Blot-Verfahren hingegen ermöglichte die Detektion des p53-Proteins in Zellkernextrakten und zeigte auch dessen Zunahme nach Strahlenexposition (Abb. 17A). Allerdings ist die Western Blot-Methode nicht geeignet, um eine große Anzahl bekannter oder unbekannter Transkriptionsfaktoren zu überprüfen. Dies beweist, dass die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren in Zellkernextrakten außerhalb der Nachweisgrenze der MS-Analyse liegt. Da schon die strahlungsinduzierte Induktion von p53, welche in der Literatur ausführlich dokumentiert ist, massenspektrometrisch nicht belegt werden konnte, ist anzunehmen, dass auch zahlreiche andere Transkriptionsfaktoren unerkannt bleiben würden. Dieser Ansatz konnte daher nicht weiterverfolgt werden.

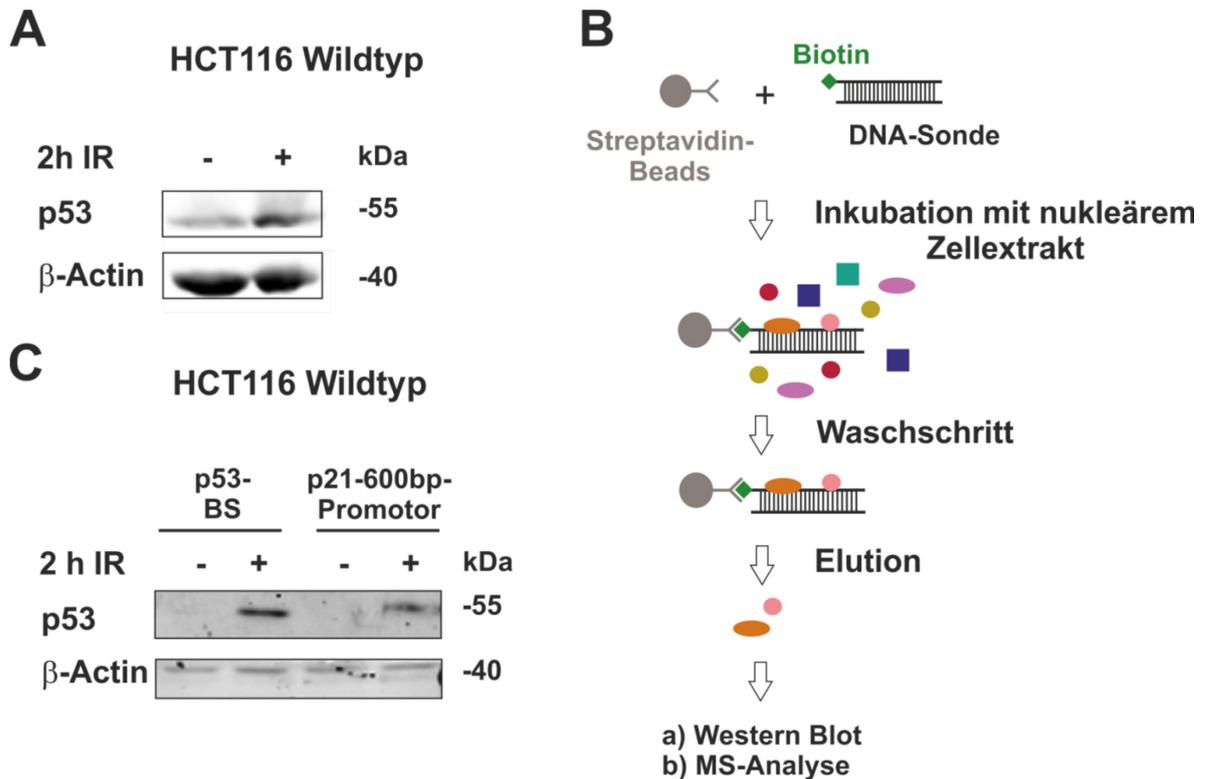


Abb. 17: Spezifische Anreicherung von p53 am p21-Promotor nach strahlungsinduzierter Stabilisierung in HCT116 Wildtyp-Zellen. (A) p53 Stabilisierung in HCT116 Wildtyp-Zellen nach Bestrahlung. HCT116 Wildtyp-Zellen wurden bestrahlt (20 Gy) oder blieben unbehandelt. 2 h nach IR wurden die Zellen geerntet und eine Zellfraktionierung durchgeführt. Die Kernextrakte wurden mit Hilfe der Western Blot-Methode auf die Expression von p53 und β -Actin untersucht. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. (B) Schematische Darstellung eines DNA-Pull-downs. (C) Die nukleäre Fraktion unbehandelter und bestrahlter (20 Gy) HCT116 Wildtyp-Zellen wurde isoliert. Für den Pull-down wurden zwei biotinylierte DNA-Sonden verwendet. Eine enthielt die bekannte p53-Bindungsstelle (p53-BS) und die andere, die durch miR-30e-induzierte, 600 Basensequenz des p21-Promotors (p21-600bp-Promotor). Die Sonden wurden jeweils an Streptavidin-Agarose Beads gekoppelt und mit Zellkernextrakten inkubiert. Ungebundene Proteine wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die an die DNA gebundenen Proteine wurden eluiert und die p53-Proteinexpression mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens bestimmt. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Ziel des zweiten Ansatzes war die Erstellung eines Affinitätsprofils von Transkriptionsfaktoren, welche miR-30e-abhängig an die zuvor identifizierte p21-Promotorregion, nachfolgend als p21-600bp-Promotor bezeichnet, binden. Zum Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen wurde der MS-Analyse ein Pull-down vorgeschaltet (Abb. 17B). Der Vorteil dieses Vorgehens besteht darin, dass spezifisch nur solche Transkriptionsfaktoren detektiert werden, die an den p21-600bp-Promotor binden. Dadurch erfolgt deren Anreicherung in der Probe, während Proteine, die nicht mit dem p21-600bp-Promotor interagieren, eliminiert werden. Dazu wird das biotinylierte Promotorfragment (DNA-Sonde) mit der Kernfraktion miR-Con- oder miR-30e-transfizierter, bestrahlter Zellen inkubiert. Nachdem die Transkriptionsfaktoren im nukleären Extrakt an die DNA gebunden haben, wird das DNA-Fragment mit einer Streptavidin-gekoppelten Matrix immobilisiert, die Proteine eluiert und

massenspektrometrisch identifiziert. Die durch den *Pulldown* erzielte spezifische Anreicherung soll ermöglichen, dass Transkriptionsfaktoren, die zuvor unterhalb der Nachweisgrenze der MS-Analyse lagen, nun detektiert werden können.

Zunächst musste jedoch überprüft werden, ob das verwendete *Pulldown*-Protokoll geeignet ist, um selektiv DNA-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Als Positivkontrolle diente eine DNA-Sonde, die eine vergleichbare Größe besaß und –im Gegensatz zum p21-600bp-Promotor- eine hinreichend belegte Bindungsstelle für p53 (p53-BS) aufwies. Beide DNA-Sonden wurden mit Kernextrakten unbehandelter oder bestrahlter Zellen inkubiert und der *Pulldown* durchgeführt. Die anschließende Analyse der Proteinexpression mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens bestätigte eine Anreicherung von p53 in den bestrahlten Proben, die mit der p53-BS-DNA-Sonde aufgereinigt wurden, im Vergleich zum p21-600bp-Promotor (Abb. 17C). Die anschließende MS-Messung sollte Transkriptionsfaktoren identifizieren, die miR-30e-abhängig an den p21-600bp-Promotor binden und dadurch eine Hochregulation von p21 vermitteln könnten. Es wurden daher Zellkernextrakte bestrahlter HCT116 Wildtyp-Zellen miteinander verglichen, die entweder mit miR-Con- oder miR-30e-transfiziert wurden. Erneut konnte die p53-BS-DNA-Sonde als Positivkontrolle verwendet werden, um durch die Detektion von p53 in bestrahlten Zellen die grundsätzliche Nachweisbarkeit von Transkriptionsfaktoren zu belegen. Es war nicht möglich, den Transkriptionsfaktor mittels MS-Analyse zu identifizieren, da dessen Anreicherung durch den *Pulldown* anscheinend nicht ausreichend war. In allen vier *Pulldown*-Proben wurden die beiden Proteine *X-ray repair cross complementing protein* (XRCC) 5 und 6 mit einer hohen Anzahl PSMs (*peptide spectrum match*) gefunden (Tab. 26). PSM stellt dabei ein Maß zur Beurteilung der Quantität eines Proteins dar. XRCC5 und XRCC6 spielen in der Reparatur von DNA-Schäden eine Rolle (Thacker & Zdzienicka, 2003), weshalb ihre zahlreiche Bindung an doppelsträngige DNA-Stücke, wie es DNA-Sonden sind, nachvollziehbar ist. Auch wenn es sich bei diesen nicht um Transkriptionsfaktoren handelt, bestätigt dies dennoch, dass der *Pulldown* grundsätzlich eine Anreicherung von DNA-gebundenen Proteinen ermöglicht. Die Tatsache, dass mehrere Zytoskelett-assoziierte Proteine mit einer hohen Abundanz nachgewiesen wurden, weist darauf hin, dass selbst nach dem *Pulldown* die Komplexität der Probe noch sehr hoch war. Transkriptionsfaktoren, die typischerweise in geringen Konzentrationen in der Zelle vorkommen, können unter diesen Bedingungen nicht identifiziert werden. Die MS-Methode erwies sich daher auf Grund ihrer unzureichenden Sensitivität als nicht geeignet, um die Fragestellung zu beantworten.

Tab. 26: MS-Analyse der *Pulldown*-Proben. Dargestellt sind die zehn Proteine mit den höchsten detektierten PSM-Anzahlen, die aus Kernextrakten von HCT116 Wildtyp-Zellen an die DNA-Sonden (p53-BS & p21-600 bp-Promotor) gebunden haben. Die Daten sind die Ergebnisse eines MS-Laufs.

Protein	DNA-Sonde p53-BS (600 bp)		DNA-Sonde p21-600 bp-Promotor	
	Kontrolle	2 h IR	miR-Con 2 h IR	miR-30e 2 h IR
XRCC6	355	236	320	365
XRCC5	341	202	290	418
Myosin-9	398	182	240	320
Fettsäure-Synthetase	402	190	228	207
β-Actin	266	202	114	279
CAD-Protein	252	100	203	164
Filamin A	194	125	135	174
PARP	152	101	151	174
α-Actinin-4	173	144	68	180
α-Tubulin	133	105	88	126

DNA-Reparatur-assoziierte Proteine sind blau dargestellt, Zytoskelett-assoziierte grün.
bp, Basenpaare; PSM, peptide spectrum match.

3.6.2 Der Transkriptionsfaktor MEF2D ist ein Zielprotein von miR-30e

In einem dritten Ansatz wurde versucht miR-30e-regulierte Transkriptionsfaktoren anhand eines ELISA (*enzyme-linked immunosorbent Assay*)-ähnlichen Testsystems im Mikrotiterplattenformat zu identifizieren. Dieses Format ermöglicht es zeitgleich die Aktivitäten von 96 Transkriptionsfaktoren zu bestimmen. Diese wurden in den isolierten Kernfraktionen aus miR-Con- und miR-30e-transfizierten Zellen gemessen und miteinander verglichen, wobei die Signale der einzelnen Transkriptionsfaktoren unterschiedlich stark waren. Einige bewegten sich nah am Hintergrundrauschen, während andere nur für eine der beiden Bedingungen messbare Aktivitäten zeigten. In solchen Fällen stieß eine Auswertung durch die Bestimmung des Vielfachen nach einer Normalisierung an ihre Grenzen. Es wurde daher eine Auswertungsform gewählt, in welche die Gesamtsignalstärke miteinfließt, sodass nur Transkriptionsfaktoren mit einer gewissen Aktivität und einer deutlichen Veränderung hervorgehoben werden.

Basierend auf der Formel:

$$\text{miR} - 30e - \text{abhängige Aktivität} = \frac{\text{Signal}_{\text{miR}-30e} - \text{Signal}_{\text{miR}-\text{Con}}}{\text{Signal}_{\text{miR}-30e} + \text{Signal}_{\text{miR}-\text{Con}}}$$

entspricht ein 2,33-facher Anstieg der Messwerte in Anwesenheit von miR-30e einer Änderung der miR-30e-abhängigen Aktivität von +0,4. Ein Rückgang der miR-30e-abhängigen Aktivität um -0,4 bedeutet dementsprechend eine Abnahme der gemessenen Aktivität um den Faktor 2,33. Die Auswahlgrenzen der Änderungen der miR-30e-abhängigen Aktivität wurden bei $\pm 0,4$ festgelegt. Für einige der untersuchten Transkriptionsfaktoren unterschieden sich die ermittelten Signalstärken nur leicht vom Hintergrundrauschen, wodurch sich hohe Schwankungen ihrer Aktivitäten zwischen den einzelnen Experimenten ergaben und für diese somit keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte (Abb. 18). Unter den analysierten Transkriptionsfaktoren, deren Aktivitäten deutlich messbar und daher auch verlässlich auswertbar waren, erwiesen sich das CCAAT/Enhancer-Binding protein α (C/EBP α) und der myoocyte enhancer factor 2 (MEF2) innerhalb der Auswahlgrenzen verändert und stellten potentielle Kandidaten für weitere Experimente dar.

Für eine bessere Darstellung wurden die Datensätze der beiden Transkriptionsfaktoren in eine separate Abbildung übertragen (Abb. 19).

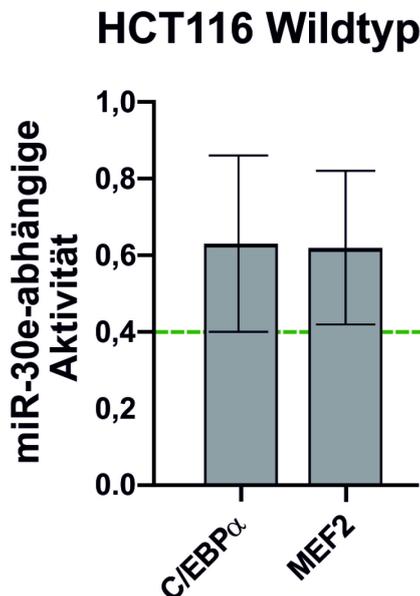


Abb. 19: miR-30e erhöht die Aktivität der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und MEF2.

miR-Con- und miR-30e-transfizierte HCT116 Wildtyp-Zellen wurden bestrahlt (20 Gy). Nach 2 h wurden die Zellen geerntet und die nukleäre Zellfraktion für die Bestimmung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren eingesetzt. Die Berechnung der miR-30e-abhängigen Aktivität erfolgte basierend auf einem Algorithmus, der die Aktivität unter Kontrollbedingungen berücksichtigt. Die grün-gestrichelte Linie entspricht laut Algorithmus einem Anstieg der Aktivität um den Faktor 2,33 und wurde als Auswahlgrenze gewählt, während ein Wert von 0 keine Veränderung der Aktivität bedeutet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Das hier eingesetzte Testverfahren verwendet Konsensussequenzen um die Transkriptionsfaktoren aus dem Kernextrakt zu immobilisieren und die Messung ihrer Aktivität zu ermöglichen. Diese Sequenzen können spezifisch für einen einzelnen Transkriptionsfaktor sein (C/EBP α) oder, wie im Falle von MEF2, von mehreren Mitgliedern einer Transkriptionsfaktorfamilie erkannt werden. Die humane MEF2-Familie umfasst insgesamt vier Mitglieder (MEF2A-D), von denen MEF2A in HCT116 Wildtyp-Zellen mutiert ist und MEF2B in diesen nicht exprimiert wird (Barretina, 2012; Martis et al., 2018). Die weiteren Analysen konzentrierten sich daher auf MEF2C und MEF2D. Um festzustellen, ob einer der beiden identifizierten Transkriptionsfaktoren an der miR-30e-abhängigen p21-Hochregulation beteiligt ist, sollten diese mit Hilfe von siRNAs inhibiert und der resultierende Effekt auf die p21 Transkription untersucht werden. Im ersten Schritt wurde die Effizienz des *Knockdowns* durch die siRNAs überprüft. Die Proteinexpression von C/EBP α blieb nach der siRNA-Transfektion jedoch unverändert (Abb. 20A). Auch wenn miR-30e zusätzlich überexprimiert wurde, waren keine Unterschiede zu erkennen. Dies könnte grundsätzlich bedeuten, dass die verwendete siRNA nicht funktioniert, der Antikörper ein anderes Protein erkennt oder C/EBP α eine hohe Stabilität aufweist. Allerdings zeigten auch zwei andere gegen C/EBP α -gerichtete Antikörper keine Expressionsverringering nach Einsatz der siRNA. Zudem wurde die Proteinexpression erst 48 h nach der Transfektion bestimmt, sodass eine Reduzierung auch bei einer langen Halbwertszeit wahrscheinlich gewesen wäre. Die Ursache konnte jedoch nicht abschließend ermittelt werden. Die MEF2C-Proteinmenge konnte durch siRNA-

3. Ergebnisse

Transfektion ebenfalls nicht verringert werden (Abb. 20B). Auch in Anwesenheit von miR-30e blieb sie unverändert. Die Anzahl der MEF2C mRNA-Kopien hingegen konnte durch die Verwendung von siRNA erfolgreich reduziert werden (Abb. 20C). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die siRNA grundsätzlich funktionsfähig ist und MEF2C inhibiert. Daher wäre auch ein Effekt auf die Proteinexpression zu erwarten gewesen, der -wie zuvor beschrieben- jedoch nicht festgestellt werden konnte. Ursächlich hierfür könnte ein Problem bei der Detektion des Proteins durch den Antikörper oder eine zu hohe Stabilität sein. Weder die Verwendung zweier unterschiedlicher Antikörper gegen MEF2C noch die Detektion der Proteinexpression 48 h nach der siRNA-Transfektion konnte die Divergenz der Beobachtungen erklären. Eine abschließende Ursache konnte folglich nicht identifiziert werden. Da ein erfolgreicher *Knockdown* von C/EBP α und MEF2C nicht gewährleistet werden konnte, wurden bezüglich dieser Transkriptionsfaktoren keine weiterführenden funktionellen Analysen durchgeführt.

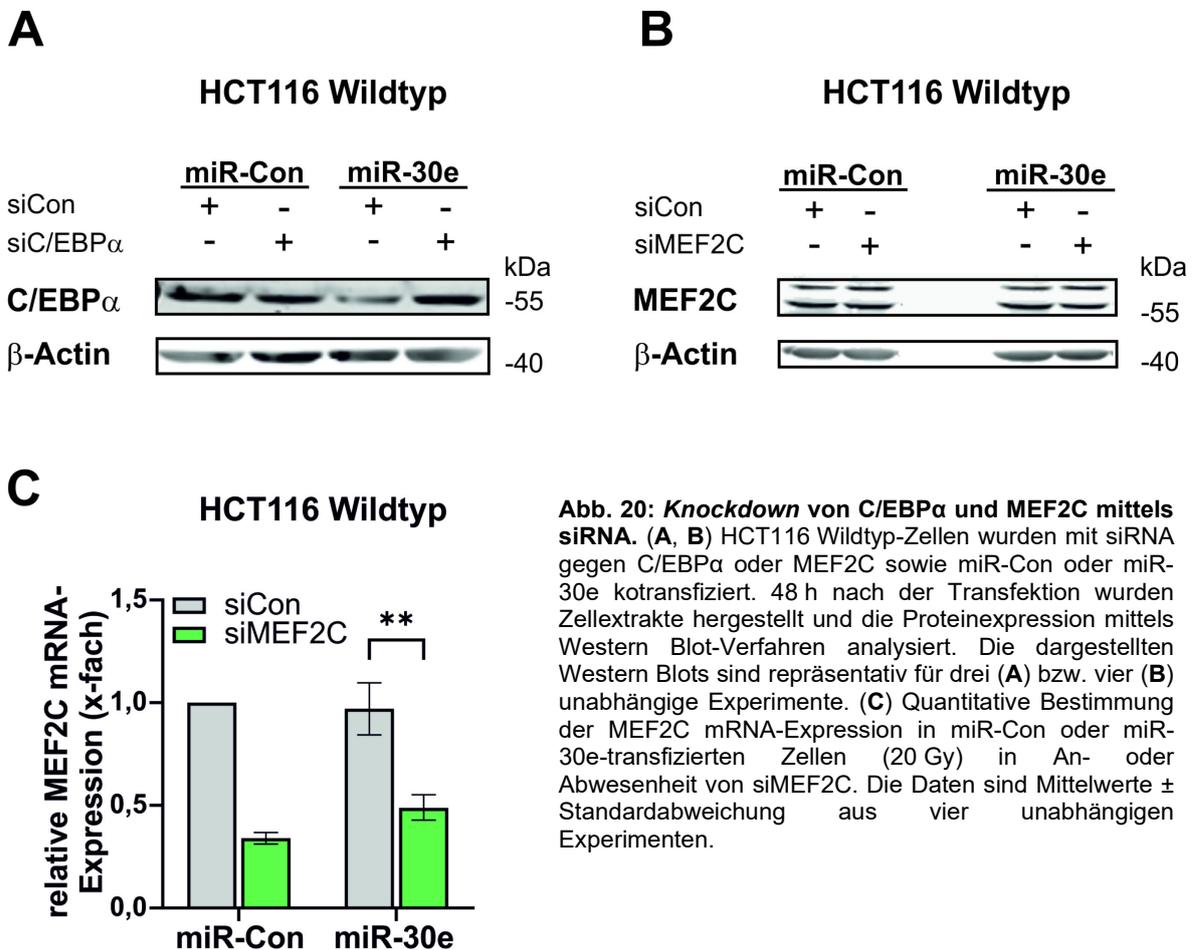


Abb. 20: Knockdown von C/EBP α und MEF2C mittels siRNA. (A, B) HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit siRNA gegen C/EBP α oder MEF2C sowie miR-Con oder miR-30e kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Zellextrakte hergestellt und die Proteinexpression mittels Western Blot-Verfahren analysiert. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für drei (A) bzw. vier (B) unabhängige Experimente. (C) Quantitative Bestimmung der MEF2C mRNA-Expression in miR-Con oder miR-30e-transfizierten Zellen (20 Gy) in An- oder Abwesenheit von siMEF2C. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

3. Ergebnisse

Dagegen bewirkten siRNAs gegen MEF2D eine deutliche Abnahme der Proteinmenge (Abb. 21A). Darüber hinaus wiesen Zellen, die mit miR-30e/siCon-kotransfiziert wurden, mehr MEF2D auf als miR-Con/siCon-transfizierte. Dies unterstützt die These einer miR-30e-abhängigen MEF2D-Regulation, wie sie der Transkriptionsfaktoraktivitätstest bereits vermuten ließ. Auf mRNA-Ebene war zu beobachten, dass die MEF2D-Expression nach Bestrahlung anstieg, wobei es keine Unterschiede zwischen miR-Con- und miR-30e-transfizierten Zellen gab (Abb. 21B). Im nächsten Schritt wurde die SA- β -Gal-Aktivität nach siMEF2D-Transfektion bestimmt. Tatsächlich führte die Reduktion von MEF2D dazu, dass nach Bestrahlung weniger Zellen in die Seneszenz gingen (Abb. 21C). Folglich könnte der Transkriptionsfaktor MEF2D nicht nur ein Zielprotein der miR-30e darstellen, sondern auch an der Induktion von p21 sowie der Seneszenzeinleitung nach Bestrahlung beteiligt sein.

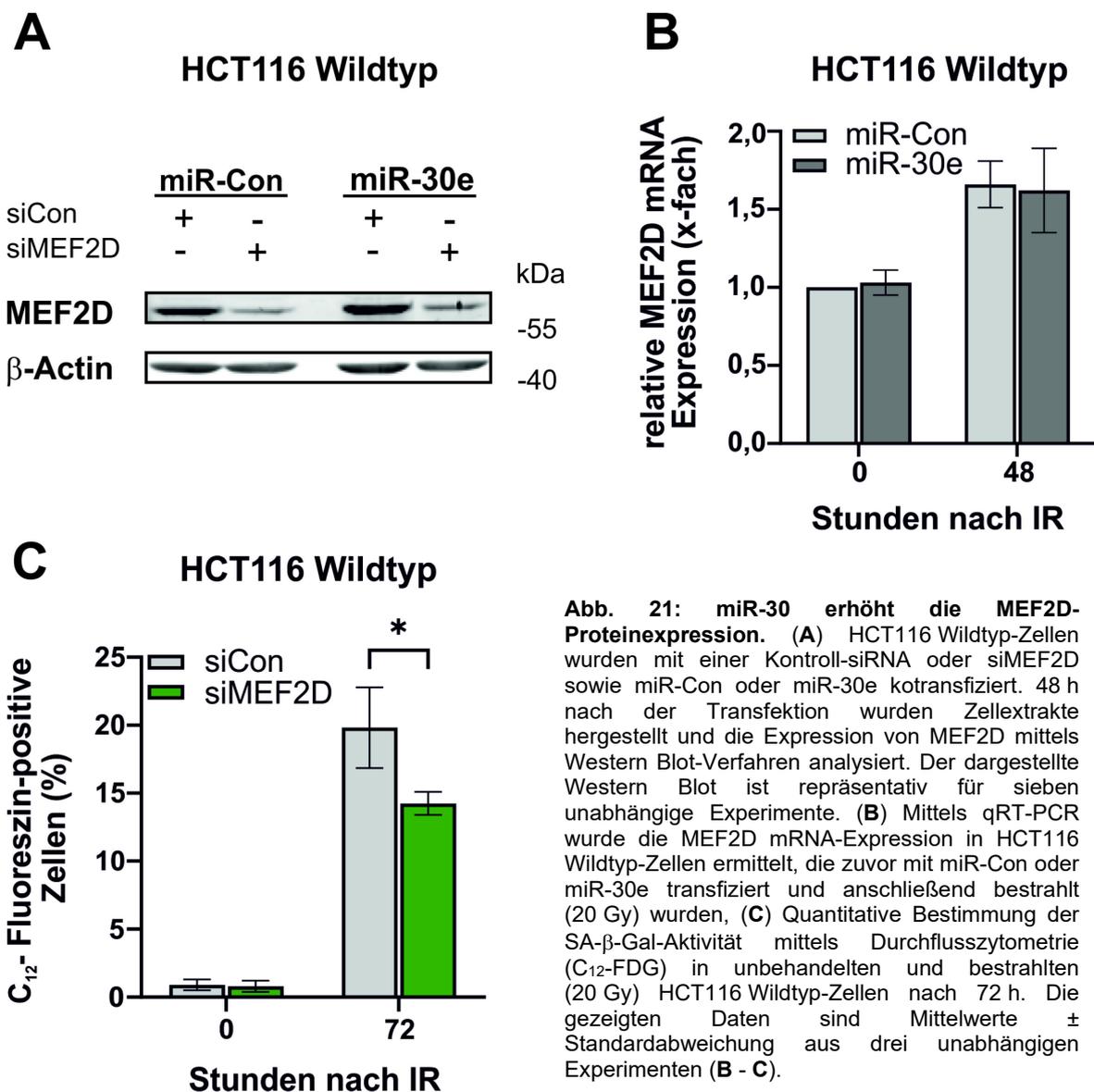
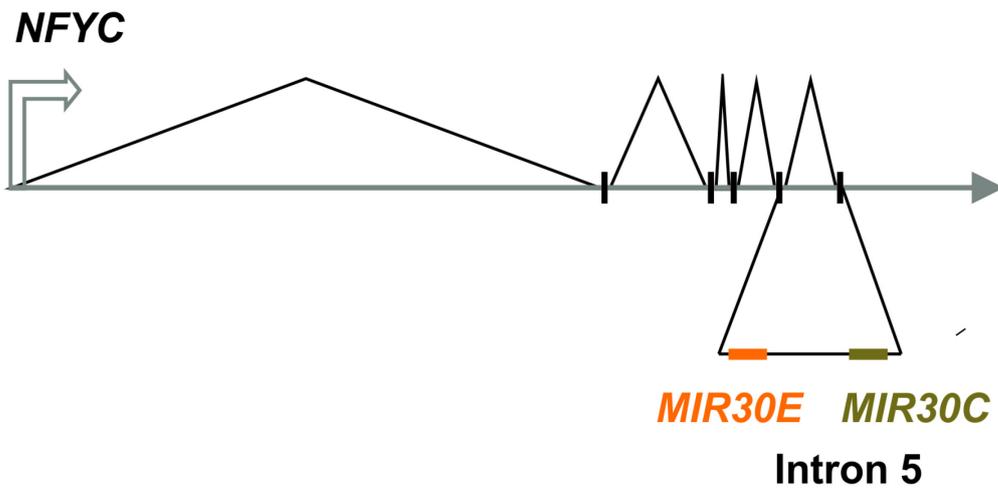


Abb. 21: miR-30 erhöht die MEF2D-Proteinexpression. (A) HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA oder siMEF2D sowie miR-Con oder miR-30e kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Zellextrakte hergestellt und die Expression von MEF2D mittels Western Blot-Verfahren analysiert. Der dargestellte Western Blot ist repräsentativ für sieben unabhängige Experimente. (B) Mittels qRT-PCR wurde die MEF2D mRNA-Expression in HCT116 Wildtyp-Zellen ermittelt, die zuvor mit miR-Con oder miR-30e transfiziert und anschließend bestrahlt (20 Gy) wurden, (C) Quantitative Bestimmung der SA- β -Gal-Aktivität mittels Durchflusszytometrie (C_{12} -FDG) in unbehandelten und bestrahlten (20 Gy) HCT116 Wildtyp-Zellen nach 72 h. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (B - C).

3.7 Generierung von HCT116 miR-30e-KD-Zellen durch Anwendung des CRISPR/CAS9-Verfahrens

Um eine weiterführende Charakterisierung der miR-30e-Funktionen vornehmen zu können, sollten mit Hilfe des CRISPR/CAS9-Systems miR-30e *Knockdown* (KD)-Zellen generiert werden. Dies hat den Vorteil, dass eine spezifische und dauerhafte Inaktivierung miR-30e-abhängiger Signalwege erzielt wird. Die Wirkungsweise von LNA-Inhibitoren hingegen basiert auf einer Sequenzkomplementarität zur Ziel-mRNA. Auf Grund der hohen Homologie der miR-30-Familienmitglieder untereinander (vgl. Tab. 1), kann hier eine Kreuzreaktion nicht restlos ausgeschlossen werden.

Die Ausschaltung einer miRNA mittels CRISPR/CAS9-Verfahren beruht darauf, die Prozessierungsstellen der miRNA-Vorläuferform zu mutieren, sodass eine effiziente Reifung verhindert wird und miRNA-KD-Zellen entstehen (vgl. Kapitel 2.2.20). Der *MIR30E*-Genlocus stellte hier eine große Herausforderung dar. Zum einen ist *MIR30E* im Intron 5 des proteinkodierenden *NFYC*-Gens lokalisiert und zum anderen befindet sich das *MIR30C*-Gen in räumlicher Nähe (Abb. 22A). Die beiden miRNAs trennen dabei nur 2,9 kb und sie werden, wie die Luciferase-Reportergerätestests nahelegen, von einem gemeinsamen Promotor reguliert (vgl. Kapitel 3.1). Um nun spezifisch den Einfluss einer Deletion von miR-30e zu analysieren, darf dementsprechend weder die Expression oder Funktion von *NFYC*, noch die von miR-30c, durch diese beeinträchtigt werden. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, eine Antibiotika-Resistenzkassette zur Selektion mutierter Klone ins Genom einzubringen. Es wurden fünf crRNAs getestet, die gegen unterschiedliche Bereiche der pre-miR-30e gerichtet waren (Abb. 22B - C).

A**MIR30E-Genlokus****B****Zielsequenzen der crRNAs**

crRNA 1: 5'-CTACTGTAAACAT **CCT** TGAC-3'
 crRNA 2: 5'-ATCCTTGACT **TGG** AAGCTGTA-3'
 crRNA 3: 5'-GGAAGCTGTAAGGTGTTTCAG- **AGG** -3'
 crRNA 4: 5'-TTTCAGT **CGG** ATGTTTACAG-3'
 crRNA 5: 5'-AGTCGGATGTTTACAGCGGC- **AGG** -3'

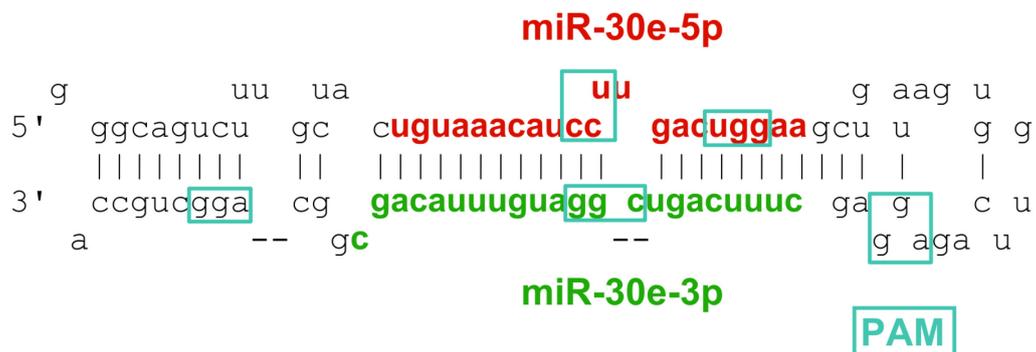
PAM**C****pre-miR-30e**

Abb. 22: Design der crRNAs gegen miR-30e. (A) Schematische Darstellung des *MIR30E*-Genlokus. *MIR30E* und *MIR30C* bilden ein Gencluster, welches im Intron 5 des *NFYC*-Gens lokalisiert ist. Die schwarzen senkrechten Striche stellen Exons dar, die überspannenden Dreiecke Introns. (B) Zielsequenzen der verwendeten crRNAs gegen miR-30e. Die PAM-Motive sind blau markiert. (C) Schematische Darstellung der pre-miR-30e. CAS9 bindet an die blau-markierten PAM-Motive und fügt 3 - 4 nt von diesen entfernt einen Doppelstrangbruch ein. Bei dem Versuch der Zelle diesen zu reparieren, entstehen oft Deletionen von 1 - x Basen. Farblich in rot bzw. grün hervorgehoben sind zudem der gereifte miR-30e-5p- und miR-30e-3p-Strang.

3. Ergebnisse

HCT116 Wildtyp-Zellen wurden transient jeweils mit einer crRNA, einer tracrRNA und einem Expressionsvektor, welcher neben der CAS9 noch für den Fluoreszenzmarker mKATE2 kodiert, transfiziert. Somit war es möglich, positiv-transfizierte Zellen mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Einzelzellsortierung zu selektionieren. Es wuchsen 24 Klone heran, bei deren Überprüfung jedoch keiner einen miR-30e-*Knockdown* aufwies (Tab. 27). Die geringe Anzahl an Klonen könnte auf die mit 0,05% bis 0,1% positiv-transfizierter Zellen sehr niedrige Transfektionseffizienz zurückzuführen sein. Daher war es notwendig, eine große Zellzahl zu sortieren. Trotz mehrerer Versuche und Variationen der Transfektionsbedingungen gelang es nicht, die Transfektionsrate für das CAS9-kodierende Plasmid zu erhöhen. Des Weiteren zeigte sich, dass die Zellen in einer Einzelzellverdünnung nur äußerst schlecht wuchsen. Die durchflusszytometrische Sortierung bedeutete zudem einen zusätzlichen mechanischen Stress, was sich sehr wahrscheinlich auch auf das Überleben auswirkte. Aus den genannten Gründen wurde ein alternativer Ansatz gewählt, der die Selektion positiv-transfizierter Zellen anhand einer Antibiotikaresistenz vorsah. Darüber hinaus wurde auch die Kombination von zwei crRNAs getestet, da dies größere Deletionen erzeugt und so die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen miRNA-Ausschaltung erhöht. Die Zellen wurden 48 h nach erfolgter Transfektion für drei Tage in Puromycin-haltigen Medium kultiviert. Sobald die resistenten Klone eine gewisse Zellzahl erreicht hatten, wurden sie separiert und expandiert. Diese Selektionsmethode erlaubte zum einen die einfache Selektion größerer Zellzahlen und zum anderen war hier die Erstellung von Einzelzellverdünnungen nicht erforderlich. Während nicht-transfizierte HCT116 Wildtyp-Zellen, die als Negativkontrolle verwendet wurden, durch die Behandlung vollständig abgetötet wurden, konnten 147 Puromycin-resistente Klone gewonnen und expandiert werden (Tab. 27).

Tab. 27: Übersicht CRISPR/CAS9-Klone

miR-30e- <i>Knockdown</i>	Einzelzellsortierung	Puromycin-Selektion
ja	0	3
nein	24	147

Die erfolgreiche Editierung des *MIR30E*-Genlokus wurde anschließend mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Drei der 147 Klone wiesen eine Veränderung der genomischen *MIR30E*-Sequenz auf (Abb. 23). Interessanterweise stammten diese drei Klone #8, #29 und #50 allesamt aus dem Transfektionsansatz, welcher crRNA 2 und crRNA 3 miteinander kombinierte. Die nachfolgende Sequenzierung zeigte, dass in Klon #8 und Klon #50 sowohl miR-30e-5p als auch miR-30e-3p deletiert waren, wohingegen sich die Deletion in Klon #29 auf miR-30e-3p beschränkte. Um sicherzustellen, dass beide

MIR30E-Allele mutiert waren, wurden der *MIR30E*-Genlocus dieser Klone amplifiziert, in einen TOPO-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Während in Klon #8 eine Veränderung beider *MIR30E*-Allele nachgewiesen wurde, war in Klon #29 und Klon #50 jeweils nur ein Allel mutiert.

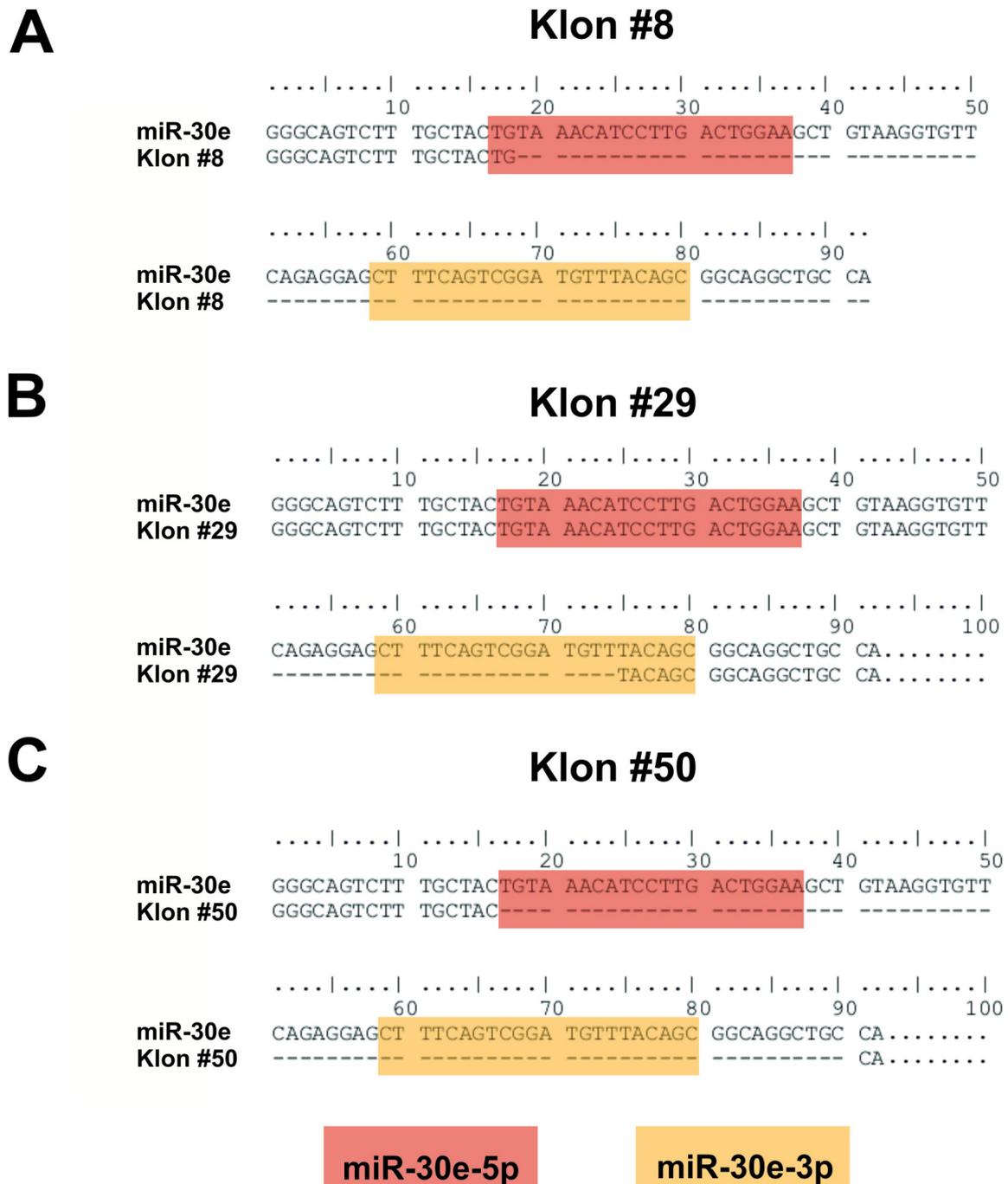


Abb. 23: Sequenzierung des *MIR30E*-Genlocus der Klone #8, #29, #50. Die genomische DNA der mittels CRISPR/CAS9-Klone-generierten Klone wurde isoliert, der *MIR30E*-Genlocus mittels PCR amplifiziert und in einen TOPO-Vektor kloniert. Die Basensequenzanalyse wurde nach Sanger durchgeführt. Dargestellt ist die Nukleotidabfolge der Klone #8 (A), #29 (B) und #50 (C) im paarweisen Vergleich zur pre-miR-30e-Referenzsequenz. In rot bzw. orange markiert sind die gereiften miR-30e-5p- und miR-30e-3p-Stränge.

Um zu bestätigen, dass die genomische Editierung auch zu einer Reduktion der reifen miR-30e führte, wurde mittels qRT-PCR eine Expressions-Analyse vorgenommen, um die miR-30e Level mit denen in HCT116 Wildtyp-Zellen sowie einer CAS9 Kontrolle zu vergleichen. Bei letzterer handelt es sich um eine klonale Zelllinie, die ebenfalls den Prozess der Antibiotika-Selektion durchlaufen hat, zuvor jedoch nur mit einem CAS9-kodierenden-Plasmid (ohne die Zugabe einer crRNA) transfiziert wurde. Die CAS9 Kontrolle wies dementsprechend keine Mutation von *MIR30E* auf. Es wurde sowohl die Expression des miR-30e-5p- als auch des miR-30e-3p-Strangs bestimmt. Wie erwartet gab es keine Unterschiede zwischen HCT116 Wildtyp-Zellen und der CAS9 Kontrolle (Abb. 24A -B). Klon #29 und Klon #50 zeigten entgegen den Erwartungen trotz eines mutierten *MIR30E*-Allels keine verringerte miR-30e-5p- oder miR-30e-3p-Expression. In Klon #8 (in rot) hingegen, der eine Mutation beider Allele aufwies, war die basale Expression von miR-30e-5p um mindestens 80% bzw. die von miR-30e-3p sogar um 99% reduziert. Sie konnte auch nach Bestrahlung nicht hochreguliert werden. Darüber hinaus wurde die Expression von miR-30c sowie der NFYC mRNA überprüft, um die gewünschte Spezifität des miR-30e-*Knockdowns* zu belegen. Während die Anzahl der miR-30c-Kopien in HCT116 Wildtyp-Zellen, Klon #29 und Klon #50 vergleichbar war, zeigte sie sich in Klon #8 leicht erhöht (Abb. 24C). Da miR-30e und miR-30c vermutlich als miRNA-Cluster organisiert sind (vgl. Kapitel 3.1), könnte dies auf eine mögliche Kompensation des miR-30e-*Knockdowns* hinweisen. Verglichen mit HCT116 Wildtyp-Zellen wiesen die drei Klone keine Unterschiede in der NFYC-Expression auf (Abb. 24 D). In Klon #8 konnte damit die gewünschte deutliche und spezifische Reduzierung der zellulären, reifen miR-30e-Menge festgestellt werden und daher wurde dieser weitergehend analysiert und charakterisiert.

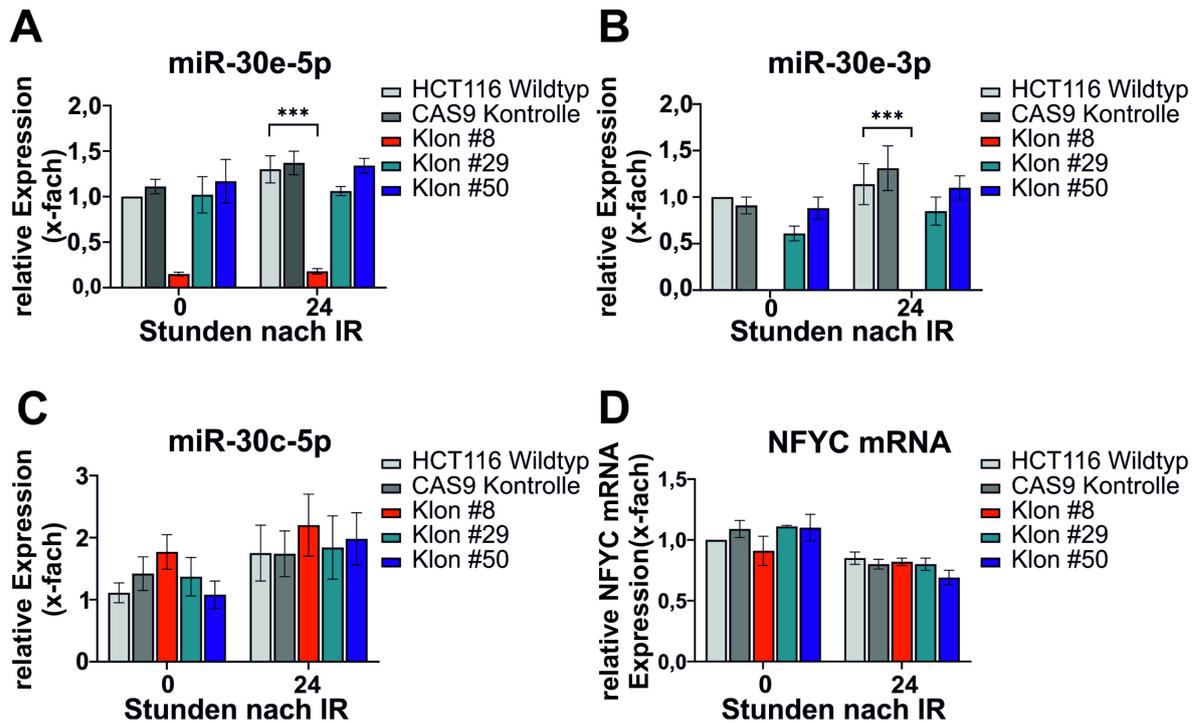


Abb. 24: miR-30e ist in Klon #8 spezifisch herunterreguliert. qRT-PCR-Analysen der miR-30e-5p (A), miR-30e-3p (B), miR-30c-5p (C) und NFYC mRNA- (D) Expression in unbehandelten und bestrahlten HCT116 Wildtyp-Zellen, der CAS9-Kontrolle sowie den Klonen #8, #29 und #50. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier (A) bzw. drei (B-D) unabhängigen Experimenten.

Wie in Kapitel 3.3 und 3.4 dargelegt, führte die Überexpression von miR-30e in HCT116 Wildtyp-Zellen -sowohl basal als auch nach Bestrahlung- zu einer verstärkt auftretenden Seneszenz, die über einen Anstieg von p21 vermittelt wurde. Es war daher zu erwarten, dass Klon #8, ein Zellsystem mit einer deutlich reduzierten miR-30e-Expression, eine verminderte p21-Induktion sowie Seneszenzeinleitung nach DNA-Schädigung aufweisen würde. Die histochemische Anfärbung seneszenten Zellen deutete, wie vermutet, darauf hin, dass der miR-Con-transfizierte Klon #8 nach Bestrahlung eine geringere SA- β -Gal-Aktivität zeigte als entsprechende HCT116 Wildtyp-Zellen (Abb. 25A - B). Die Transfektion mit miR-30e-Mimiks führte in beiden Zellsystemen zu einer Verstärkung des seneszenten Phänotyps, was sich insbesondere in der Abflachung der Zellen sowie einer starken Größenzunahme äußerte. Auch die Blaufärbung war intensiviert. Hier konnte dementsprechend durch eine Kompensation des miR-30e-Knockdowns der Phänotyp wiederhergestellt werden.

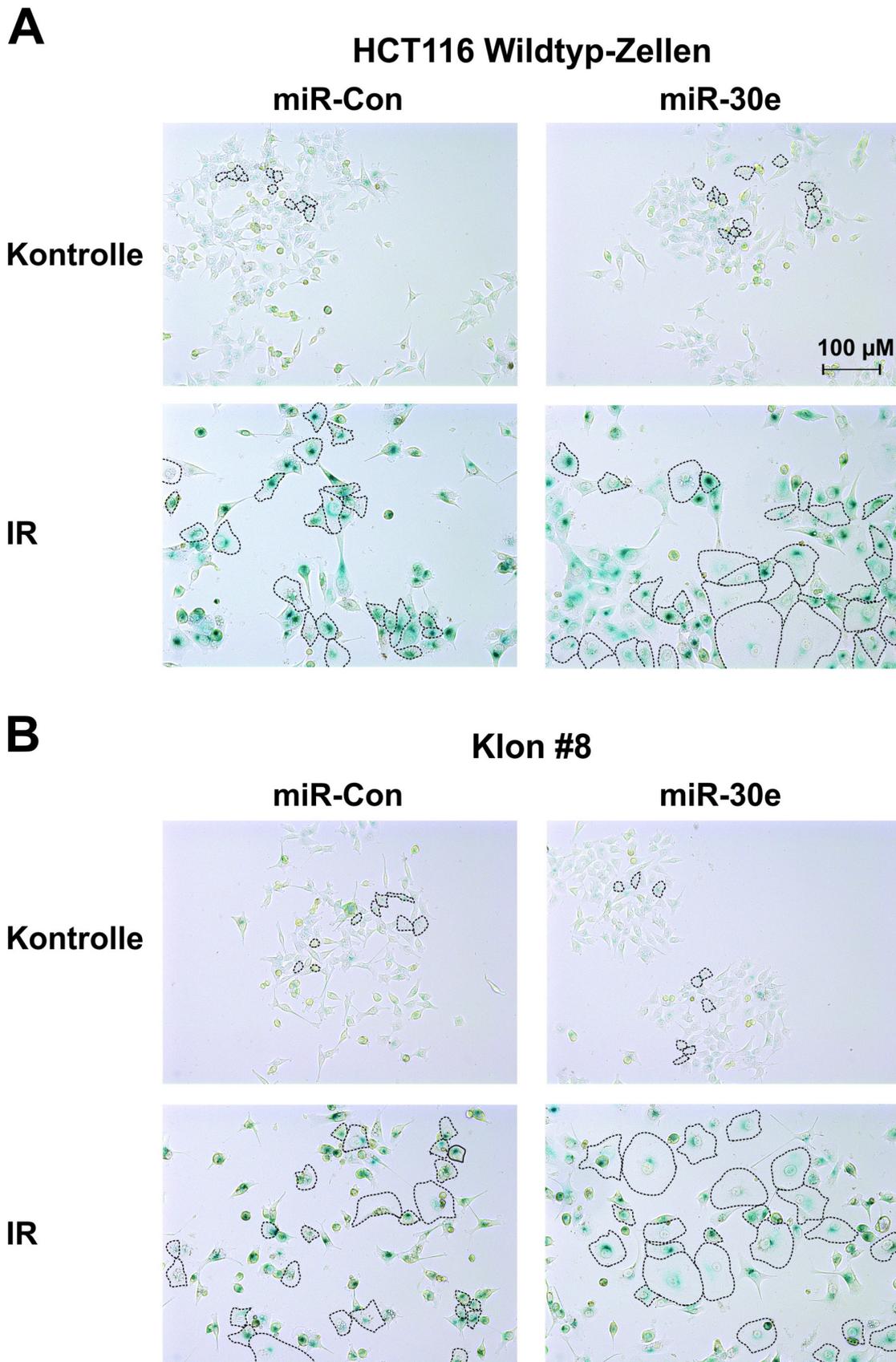


Abb. 25: Seneszenzinduktion in HCT116 Wildtyp-Zellen und Klon #8 nach Strahlenexposition. HCT116 Wildtyp-Zellen (A) sowie Klon #8 (B) wurden mit miR-Con oder miR-30e transfiziert und bestrahlt (20 Gy). 72 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und deren SA- β -Gal-Aktivität kolorimetrisch visualisiert. Es wurden repräsentativ die Umriss einiger Zellen mit schwarz-gestrichelten Linien markiert, um die Größenzunahme zu verdeutlichen. Die gezeigten Aufnahmen sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Die quantitative Bestimmung der Seneszenzinduktion im Durchflusszytometer bestätigte die geringere SA- β -Gal-Aktivität des miR-Con-transfizierten Klon #8 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Abb. 26A). Nach exogener Einbringung von miR-30e und damit verbunden der Aufhebung des *Knockdowns*, nahm die Anzahl seneszenter Zellen zu, erreichte aber nicht das Niveau miR-30e-transfizierter HCT116 Wildtyp-Zellen. Überraschenderweise war die verminderte Seneszenzinduktion in Klon #8 jedoch nicht auf eine verringerte p21 mRNA-Expression zurückzuführen, da die detektierten p21 mRNA-Mengen in Klon #8 und HCT116 Wildtyp-Zellen vergleichbar waren (Abb. 26B). Auch auf Proteinebene zeigte die miR-30e-Reduktion des Klon #8 keine Auswirkung auf die p21-Expression (Abb. 26C). Für die Beurteilung ist hierbei der Vergleich der miR-Con-transfizierten Zellen ausschlaggebend, welcher keine Unterschiede zwischen den beiden Zellsystemen erkennen ließ. Obwohl die Transfektion mit miR-30e die Induktion des p21-Proteins in beiden Zelllinien deutlich erhöhte, war auch hier kein Unterschied zwischen Klon #8 und den Wildtyp-Zellen erkennbar. Zusammengenommen wurde der miR-30e-reduzierte Klon #8 durch die Behandlung mit ionisierender Strahlung zwar weniger effizient in die Seneszenz getrieben als HCT116 Wildtyp-Zellen, ohne jedoch eine verminderte p21-Expression aufzuweisen.

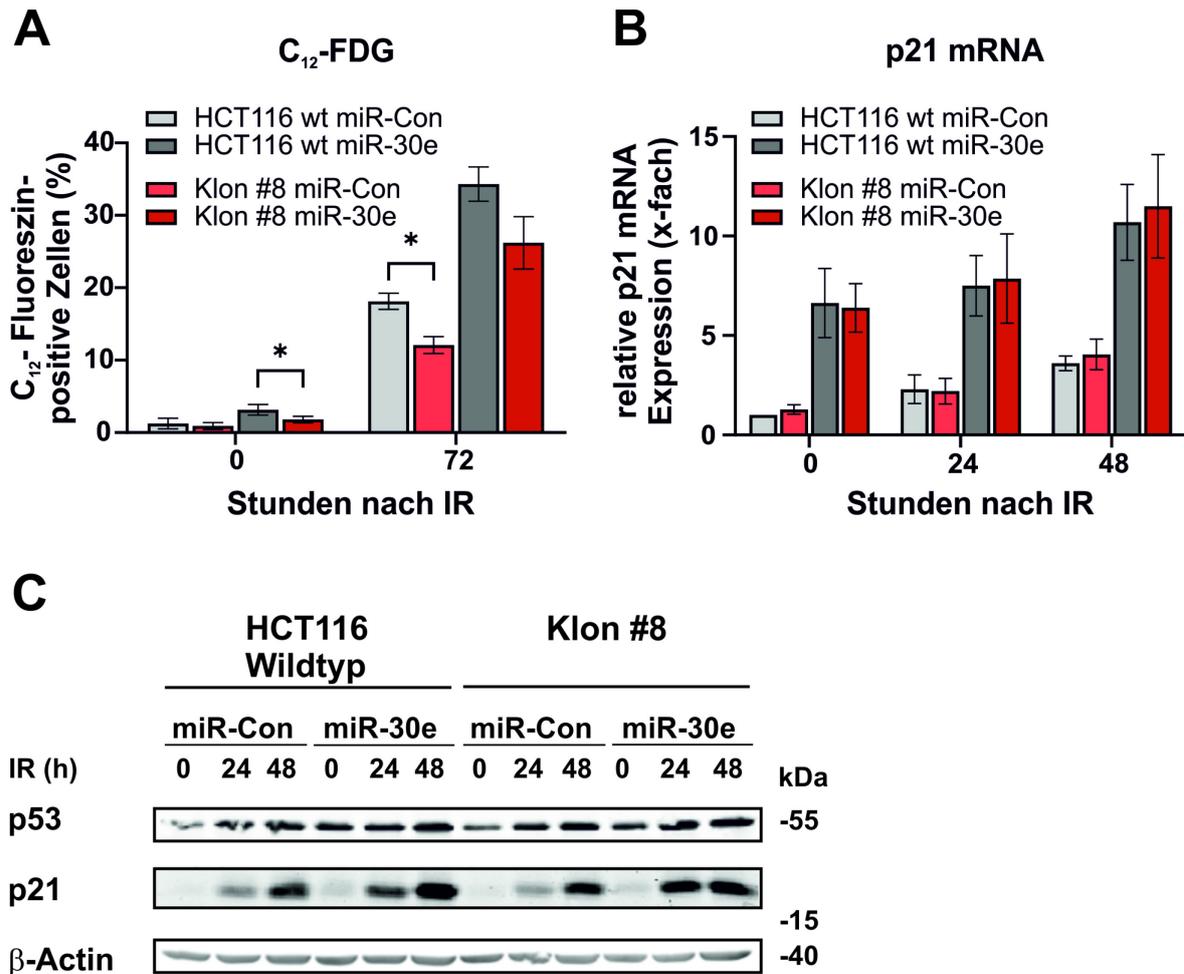


Abb. 26: Klon #8 zeigt eine verminderte Seneszenzinduktion bei unveränderter p21-Expression. HCT116 Wildtyp (wt)-Zellen und Klon #8 wurden mit miR-Con oder miR-30e transfiziert und ionisierender Strahlung ausgesetzt (20 Gy). (A) Die SA-β-Gal-Aktivität wurde mittels Durchflusszytometrie und dem Substrat C₁₂-FDG 0 und 72 h nach IR bestimmt. (B) Quantifizierung der strahlungsinduzierten p21 mRNA-Expression mittels qRT-PCR an den angegebenen Zeitpunkten nach IR. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (A, B). (C) Die Proteinmengen von p21, p53 und β-Actin in Gesamtzellextrakten wurden durch Verwendung des Western Blot-Verfahrens (0, 24 und 48 h nach IR) detektiert. β-Actin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige durchgeführte Experimente.

Weiterhin konnte in HCT116 Wildtyp-Zellen ein miR-30e-vermittelter Schutz vor strahlungsinduzierter Apoptose beobachtet werden, welcher auf eine Suppression der Procaspase-3 zurückzuführen war (vgl. Kapitel 3.2). In der Tat wies Klon #8 eine deutlich höhere Caspase-3-Aktivierung nach Bestrahlung auf als HCT116 Wildtyp-Zellen (Abb. 27A). Die Transfektion mit miR-30e-Mimiks und der damit verbundenen Kompensation des *Knockdowns* reduzierte die Caspase-3-Aktivität von Klon #8 wiederum auf Wildtyp-Niveau und bestätigte ihr anti-apoptotisches Potential. Auch auf Proteinebene führte die Überexpression von miR-30e in Klon #8 und HCT116 Wildtyp-Zellen gleichermaßen zu einer Abnahme der Procaspase-3 (Abb. 27B). Eine Verringerung der reifen miR-30e dagegen, wie es in miR-Con-transfizierten Zellen des Klon #8 der Fall ist, zeigte keine Auswirkungen auf die Procaspase-3-Expression im Vergleich mit HCT116

3. Ergebnisse

Wildtyp-Zellen. Die verstärkte Aktivierung von Caspase-3 in Klon #8 nach Bestrahlung war dementsprechend keine Folge einer erhöhten Expression der Procaspase-3. Gegensätzlich dazu ergab die Messung der LDH-Aktivität eine geringere Zelltodinduktion in Klon #8 nach Bestrahlung (Abb. 27C). Entgegen den Erwartungen wiesen bestrahlte, miR-Con-transfizierte und damit miR-30e-reduzierte Klon #8 Zellen eine vergleichbare Zelltodrate auf wie miR-30e-transfizierte HCT116 Wildtyp-Zellen. Die Transfektion von Klon #8 mit miR-30e konnte die Zelltodzahlen nach Bestrahlung noch einmal leicht reduzieren. Basierend auf diesen Beobachtungen bestand kein kausaler Zusammenhang zwischen dem miR-30e-Expressionstatus und der Zelltodinduktion. Die Beobachtungen, die auf der exogenen Überexpression von miR-30e erzielt wurden, konnten damit nur teilweise verifiziert werden.

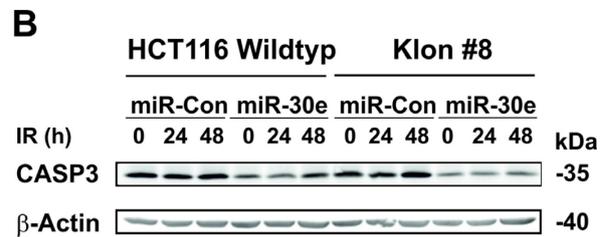
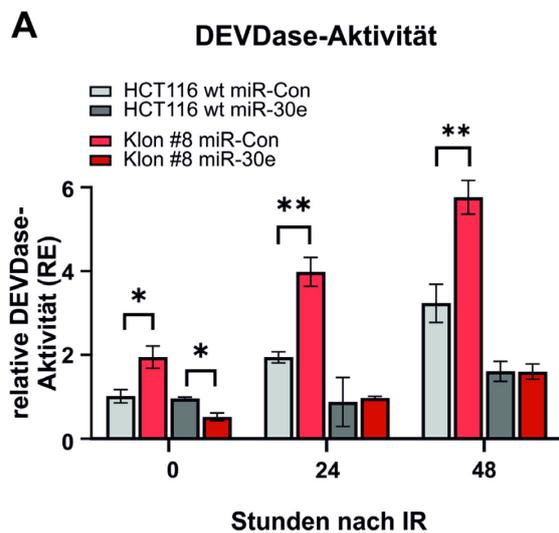
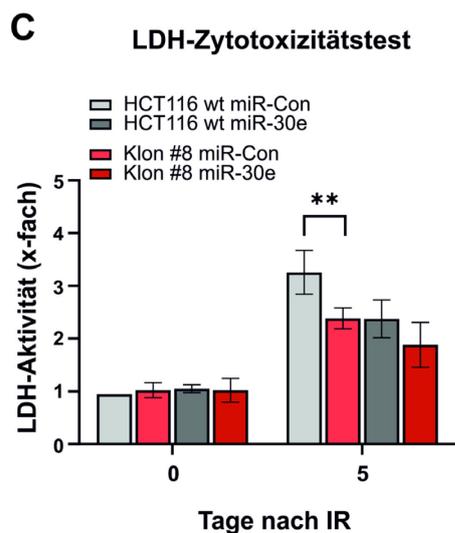


Abb. 27: Einfluss des miR-30e-Knockdowns auf die Caspase-3-Aktivität sowie den Zelltod. HCT116 Wildtyp (wt)-Zellen sowie Klon #8 wurden mit Kontroll- oder miR-30e-Mimiks transfiziert und ionisierender Strahlung (20 Gy) ausgesetzt. **(A)** Fluorometrische Messung der DEVDase-Aktivität in Zellextrakten drei Tage nach IR-Behandlung. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Zellextrakte aus unbehandelten und bestrahlten Zellen wurden hergestellt und die Expression der Procaspase-3 (CASP3) mittels Western Blot Verfahrens analysiert. β -Actin diente dabei als Ladekontrolle. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **(C)** Quantifizierung des Zelltods anhand der LDH-Aktivität im Zellüberstand fünf Tage nach IR. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. RE, relative Einheiten.



4. Diskussion

Das Vorliegen eines DNA-Schadens in einer Zelle löst eine komplexe Signalkaskade aus, in deren Zentrum der Tumorsuppressor p53 steht. Zum p53-Regelnetzwerk zählen auch miRNAs, welche auf verschiedenen Ebenen der DNA-Schadensantwort eingreifen. So regulieren diese direkt oder indirekt die zelluläre Stabilität von p53 oder werden von p53 induziert und modulieren nachgeschaltete Effektoren wie p21 (Suh, 2018). In der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle der miR-30e in der DNA-Schadensantwort näher untersucht. Vorarbeiten belegten, dass miR-30e in Abhängigkeit von p53 nach einer Strahlenexposition in HCT116 Wildtyp-Zellen verstärkt exprimiert wird (Sohn et al., 2016). Auch in humanen Fibroblasten führte oxidativer Stress oder eine Schädigung der DNA zu einer Hochregulation von miR-30e (Faraonio et al., 2012). Interessanterweise ergaben Untersuchungen einer anderen Forschungsgruppe, die unter vergleichbaren Bedingungen in HCT116 Wildtyp-Zellen durchgeführt wurden, keine verstärkte Expression von miR-30e nach einer Behandlung mit ionisierender Strahlung (10 Gy) (Shin et al., 2009). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese nur solche miRNAs berücksichtigten, deren Expression mindestens verdoppelt oder halbiert wurde. In unserem Labor belegten qRT-PCR- sowie *Microarray*-Analysen hingegen 24 h nach Bestrahlung einen Anstieg von miR-30e um das etwa 1,5-fache (Sohn et al., 2016). Wie in Kapitel 1.6.3 beschrieben, werden während der Biogenese zwei reife miRNAs (-5p und -3p) gebildet. In dieser Arbeit wurde die Rolle der miR-30e-5p untersucht, da diese in den verwendeten HCT116 Wildtyp-Zellen vorwiegend exprimiert wird.

4.1 Die Expression von miR-30e wird auf transkriptioneller Ebene von p53 induziert

Die strahlungsinduzierte Hochregulation von miR-30e erfolgte in p53-profizienten HCT116 Wildtyp-Zellen, während deren Expression in p53-defizienten Zellen unverändert blieb. In dieser Dissertation konnte mit Hilfe eines Luciferase-Reporter-Gen-Experiments nachgewiesen werden, dass p53 die potentielle Promotorregion von miR-30e (-1860 bis +118 bp vom TSS) induziert und *MIR30E* dementsprechend ein direktes transkriptionelles Zielgen von p53 darstellt (Abb. 10A, 10C). Zwischenzeitlich gelang einer anderen Forschungsgruppe die Identifikation einer Bindungsstelle für p53, die sich etwa 0,5 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts von *MIR30E* befindet, und damit die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit bestätigte (Laudato et al., 2017). Neben miR-30e wird auch das Familienmitglied miR-30c (miR-30c1) nach DNA-Schädigung p53-abhängig verstärkt exprimiert (Abb. 10D). Beide miRNAs sind im Intron 5 des *NFYC*-Gens kodiert. Die

räumliche Nähe in Kombination mit einem korrelierenden Expressionsmuster deutet auf ihre Organisation in einem Gencluster und damit auf ihre Transkription als polycistronische mRNA hin. Gegensätzlich dazu wurde die Regulation von miR-30c durch den Transkriptionsfaktor *GATA-binding factor 3* (GATA3) in Brustkrebszellen beschrieben. Eine Chromatin-Immunpräzipitation belegte die Bindung von GATA3 an die putativen Promotorregionen von miR-30c1 und miR-30c2 (Bockhorn et al., 2013). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Induktion dieser putativen miR-30c1-Promotorregion durch p53 untersucht, welche jedoch keinerlei Promotoraktivität aufwies (Abb. 10C). Zudem enthielt diese, basierend auf dem Algorithmus der JASPAR-Datenbank, keine putative p53-Konsensussequenz, weshalb eine eigenständige Induktion von *MIR30C* durch p53 unwahrscheinlich ist (Fornes et al., 2019). Auch in einer anderen Studie, die c-MYC-reprimierte miRNAs identifizierte, deutete das Expressionsmuster auf die Organisation als Cluster hin (T.-C. Chang et al., 2008). Zusammengenommen weisen die Ergebnisse auf eine gemeinsame p53-abhängige Regulation von *MIR30E* und *MIR30C* als Gencluster hin.

4.2 miR-30e reguliert die Expression der Procaspase-3 und schützt HCT116 Wildtyp-Zellen vor dem strahlungsinduzierten Zelltod

Wie funktionelle Analysen belegen, schützt die Überexpression von miR-30e HCT116 Wildtyp-Zellen vor dem strahlungsinduzierten Zelltod (Abb. 11). Dies war auf die verminderte Expression der Procaspase-3 und damit verbunden einer verringerten enzymatischen Aktivität der Caspase-3, einem zentralen Effektor der Apoptose, zurückzuführen. Auch andere Studien belegten eine inhibitorische Wirkung von miR-30e auf die Apoptoseinduktion. In Kardiomyozyten wird miR-30e unter hypoxischen Bedingungen herunterreguliert, was zu einer massiven Einleitung von Apoptose führt. Ursächlich hierfür scheint die Reprimierung des pro-apoptotischen BCL-2-Proteins BIM durch miR-30e zu sein (Mo et al., 2019). Zudem schützt die Überexpression von miR-30e Zellen davor in die Apoptose zu gehen, nachdem diese mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin behandelt wurden (Roca-Alonso et al., 2015). Gegensätzlich dazu wurde aber auch eine pro-apoptotische Wirkung von miR-30e beschrieben. In Brustkrebszellen erhöht miR-30e die Aktivität der Caspase-3 und bewirkt so eine gesteigerte Sensitivität der Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Paclitaxel. Interessanterweise inhibiert die Überexpression von miR-30e in diesen Zellen auch die Zellproliferation, was an einen p21-vermittelten Zellzyklusarrest erinnert (Hershkovitz-Rokah et al., 2015; M.-M. Liu et al., 2017). Auch die miR-30e-abhängige Blockade des JAK/STAT-Signalwegs resultiert in Zellen des hepatozellulären Karzinoms in der Einleitung von Apoptose (J. Mao et al.,

2017). Es ist naheliegend, dass die teilweise konträren Beobachtungen auf die Verwendung unterschiedlicher zellulärer Systeme zurückzuführen sind.

4.3 Die miR-30e-abhängige Seneszenzinduktion erfolgt durch Hochregulation von p21

miR-30e demonstrierte nicht nur ein anti-apoptotisches Potential, sondern trieb HCT116 Wildtyp-Zellen nach der Bestrahlung verstärkt in die Seneszenz. Dies zeigte sich zum einen in der charakteristischen Größenzunahme und dem Abflachen der Zellen, sowie einer Steigerung der SA- β -Gal-Aktivität in Anwesenheit von miR-30e (Abb. 12). Analog wurde auch in humanen Fibroblasten beobachtet, dass die Transfektion mit miR-30e-Mimiks zur Ausprägung von Seneszenz führte (Faraonio et al., 2012). Zudem wird miR-30e, gemeinsam mit miR-29, in der RB-induzierten Seneszenz verstärkt exprimiert. MiR-30e hemmt dabei das Onkogen B-MYB (*MYB-related protein B*) und trägt so zur Manifestierung des seneszenten Zellstatus bei (I. Martinez et al., 2011). Dies hebt, zusammen mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen, die Bedeutung der miR-30e in der Seneszenzeinleitung hervor. Dabei korrelierte die miR-30e-abhängige Seneszenzinduktion mit einer verstärkten p21-Expression. Es wurde sowohl ein Anstieg der p21-mRNA-Menge als auch der Proteinexpression festgestellt (Abb. 13). Der Einsatz spezifischer Inhibitoren gegen miR-30e verminderte zudem nicht nur die Seneszenzinduktion nach Bestrahlung, sondern reduzierte auch die p21-Expression und bestätigte so die zuvor beschriebenen Versuchsergebnisse.

4.4 miR-30e reguliert die Expression von p21 auf transkriptioneller Ebene unabhängig von p53

Der beobachtete miR-30e-abhängige Anstieg der p21-mRNA in bestrahlten Zellen implizierte, dass miR-30e entweder auf translationaler Ebene die Stabilität der p21-mRNA erhöht oder die Transkription von p21 induziert. Eine direkte Regulation ist jedoch eher unwahrscheinlich, da miRNAs typischerweise posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression sind und ihre Ziel-mRNAs für gewöhnlich destabilisieren oder deren Translation hemmen (Huntzinger & Izaurralde, 2011). Es wurden allerdings auch Ausnahmen beschrieben wie z.B. die murine miR-466l, welche die Stabilität der IL-10 (Interleukin-10)-mRNA erhöht. Dazu konkurriert miR-466l mit dem RBP Tristetrapolin um die Bindung an AU-Elemente in der 3'-UTR der IL-10-mRNA und verhindert so ihre Tristetrapolin-vermittelte Degradation (F. Ma et al., 2010). Grundvoraussetzung hierfür ist die Bindung der miRNA an ihre Ziel-mRNA. Mittels Immunpräzipitation wurde jedoch im Labor für Molekulare Radioonkologie gezeigt, dass miR-30e nicht an der 3'-UTR der p21 mRNA angereichert wird und dieser Weg der Regulation daher auszuschließen ist (Sohn

et al., 2016). Da miR-30e in dieser Arbeit zudem keinen Effekt auf die Halbwertszeit der p21 mRNA hatte (Abb. 14), konnten bspw. RBPs (RBM38, HuR, AUF1), die bekanntermaßen die Stabilität der p21 mRNA beeinflussen, als Zielproteine von miR-30e ausgeschlossen werden (W. Wang et al., 2000; Lal et al., 2004; Shu et al., 2006).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Regulation von p21 durch miR-30e auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Tatsächlich wurde im Rahmen dieser Arbeit demonstriert, dass miR-30e die Aktivität des p21-Promotors in einem Luciferase-Reporter-Gen-Test erhöht (Abb. 15). In der Literatur wurden Einzelfälle beschrieben, in denen miRNAs direkt die Transkription von Genen induzieren (Dragomir et al., 2018). So bindet miR-551b an eine komplementäre Sequenz innerhalb der STAT3-Promotorregion, rekrutiert die RNA-Polymerase II und den Transkriptionsfaktor TWIST1 (*twist-related protein 1*) und führt so zu einer verstärkten Transkription von STAT3 (Chaluvally-Raghavan et al., 2016). Ähnliche Beobachtungen wurden in Bezug auf miR-373 gemacht, welche die Expression von CSDC2 (*gold-shock domain-containing protein C2*) induziert. Auch hier fand man heraus, dass miR-373 an den Promotor von CSDC2 bindet und dort eine Anreicherung der RNA-Polymerase II auslöst (Place et al., 2008). Da die hier untersuchte Promotorregion von p21 jedoch keine Sequenzkomplementarität zur reifen miR-30e aufweist, ist eine direkte transkriptionelle Regulation unwahrscheinlich.

Daraus leitet sich die Folgerung ab, dass eine indirekte Regulation auf transkriptioneller Ebene vorliegen muss. Denkbare Ziele der miR-30e sind dementsprechend Transkriptionsfaktoren, welche p21 hemmen, oder Repressoren von aktivierenden Transkriptionsfaktoren. Aber auch epigenetische Modifikationen, die die Transkription beeinflussen, sind theoretisch möglich. Eine allgemeine Übersicht über die transkriptionelle Regulation von p21 ist in Kapitel 1.5.1 beschrieben. Davon ausgehend ergibt sich eine Vielzahl an potentiellen Kandidaten, welche miR-30e-abhängig p21 modulieren könnten, was die Identifikation der miR-30e-Ziel-mRNA erschwerte. Umso bedeutsamer war es, dass der durch miR-30e induzierbare Bereich des p21-Promotors auf eine Sequenz von 600 Basenpaaren stromaufwärts des Transkriptionsstarts eingegrenzt werden konnte (Abb. 16). Diese Region enthält keine Bindungsstelle für p53 und belegt somit, dass die miR-30e-vermittelte Hochregulation von p21 unabhängig von p53 erfolgt. Innerhalb der 600 Basenpaarregion des p21-Promotors finden sich Erkennungssequenzen für die aktivierenden Transkriptionsfaktoren *immunoglobulin enhancer-binding factor E12/E47*, TGF- β (*transforming growth factor β*), MIZ-1 (*MYC-interacting zinc finger protein-1*), SP1 und SP3 (Gartel & Radhakrishnan, 2005). Demgegenüber stehen die reprimierenden Transkriptionsfaktoren TBX2 (*T-box transcription factor 2*) sowie CDP/cut (*CCAAT displacement protein/cut*) (Nishio & Walsh, 2004; Prince et al., 2004). ZNF76 (*Zinkfingerprotein 76*) verdrängt das TATA-Bindeprotein

vom p21-Promotor und unterbindet so die Expression von p21, während HDAC1 (*Histon-Deacetylase 1*) mit SP1/SP3 um die Bindungsstelle konkurriert (Lagger et al., 2003; Zheng & Yang, 2004). Ebenfalls antagonistisch wirkt c-MYC, dessen exogene Expression die p53-abhängige Aktivierung von p21 in HCT116 Wildtyp-Zellen nach einer DNA-Schädigung verhindert und so Apoptose anstelle eines Zellzyklusarrests auslöst (Seoane et al., 2002). c-MYC bindet dabei nicht direkt an den p21-Promotor, sondern inhibiert SP1, SP3 und MIZ-1 (Gartel & Tyner, 1999; Radhakrishnan et al., 2004; Gartel & Radhakrishnan, 2005; Abbas & Dutta, 2009). Des Weiteren verstärkt c-MYC die Expression des Transkriptionsfaktors AP-4 (*activating enhancer-binding protein-4*), welcher wiederum p21 direkt oder indirekt durch die Repression von TGF- β hemmt (P. Jung & Hermeking, 2009; Abbas & Dutta, 2009). In den verwendeten HCT116 Wildtyp-Zellen ist der *TGF-receptor type 2* (TGFR2) mutiert und TGF- β -abhängige Signalwege daher inaktiv (Miyafuji et al., 2001; Pino et al., 2010). c-MYC stellte einen besonders interessanten Kandidaten für die miR-30e-vermittelte Hochregulation von p21 dar, weil Vorhersage-Algorithmen c-MYC als eine potentielle Zielstruktur von miR-30e einstufen (TargetScanHuman 7.2) (Agarwal et al., 2015). Da die Detektion des Proteins mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens keine spezifischen Signale lieferte, konnten die Auswirkungen von miR-30e auf die Proteinexpression von c-MYC nicht untersucht werden. Die Expression von AP-4, als Vermittler der c-MYC-abhängigen p21-Repression, konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Um auch unbekannte miR-30e-regulierte Proteine identifizieren zu können, die an der transkriptionellen Kontrolle der p21 Expression beteiligt sind, wurde ein DNA-*Pulldown* mit anschließender MALDI-MS-Messung durchgeführt. Ziel war die Erstellung eines Bindungsprofils von Transkriptionsfaktoren, die in Abhängigkeit von miR-30e an die zuvor beschriebene 600 Basenpaarregion des p21-Promotors binden. Die MS-Analysen ergaben, dass zwei DNA-Reparatur-Proteine (XRCC5 und XRCC6) die höchste Abundanz am p21-Promotorfragment aufwiesen (Tab. 26). Es wurde beschrieben, dass sich XRCC5 und XRCC6 als Heterodimer an Doppelstrangbrüche anlagern, als welche auch die Enden der synthetisch hergestellten DNA-Sonden erkannt werden (Fell & Schild-Poulter, 2012). Somit konnte die grundsätzliche Anreicherung DNA-bindender Proteine durch den DNA-*Pulldown* bestätigt werden.

Der Transkriptionsfaktor p53 konnte hingegen weder in Kernextrakten bestrahlter Zellen noch nach spezifischer Anreicherung mit Hilfe des DNA-*Pulldowns* detektiert werden, obwohl er nach Strahlungsexposition in der Zelle nachweislich stark akkumuliert. Da selbst zwei unabhängigen Einrichtungen (Molecular Proteomics Laboratory, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf & Proteome Center Tübingen, Universität Tübingen) der Nachweis von p53 nicht gelang, ist davon auszugehen, dass die Methode der MS-

Analyse zur Bestimmung von Transkriptionsfaktoren unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen nicht geeignet ist. Ursächlich hierfür sind mutmaßlich die niedrigen Expressionsmengen von Transkriptionsfaktoren wie p53 in der Zelle. Ihr Anteil beträgt nur schätzungsweise 0,01-0,001% der gesamten zellulären Proteine (Tacheny et al., 2013).

4.5 miR-30e steigert die Aktivität der Transkriptionsfaktoren CEBP α und MEF2D

Im Gegensatz zu MS-Analysen, konnten durch den Transkriptionsfaktor-Aktivitätstest mit CEBP α und MEF2 zwei Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, deren Aktivität durch miR-30e gesteigert wurde. (Abb. 19). Der detektierte Aktivitätsanstieg implizierte dabei eine indirekte Regulation durch miR-30e, da miRNAs wie bereits beschrieben in der Regel negative Regulatoren der Genexpression sind. Es ist bekannt, dass CEBP α die Genexpression von p21 aktiviert und auch die Degradation des Proteins hemmt (Timchenko et al., 1996). Es ist daher denkbar, dass CEBP α an der miR-30e-vermittelten Hochregulation von p21 beteiligt ist. Außerdem zeigte eine Studie, dass in Adipozytenvorläufer-Zellen eine Transfektion mit miR-30e-Mimiks ebenfalls zu einer Zunahme der CEBP α -Expression führt (J. Wang et al., 2013). Eine funktionelle Charakterisierung der miR-30e-vermittelten CEBP α -Aktivität konnte nicht vorgenommen werden, da siRNAs aus nicht-geklärten Gründen keine verminderte CEBP α -Proteinexpression erzielten.

Anders verhielt es sich mit dem Transkriptionsfaktor MEF2D, der zu einer Familie mit insgesamt vier Mitgliedern gehört, deren Beteiligung an einer Vielzahl von Prozessen der Gewebedifferenzierung und –homöostase hervorzuheben ist (Potthoff & Olson, 2007). Da MEF2A in HCT116 Wildtyp-Zellen mutiert ist und MEF2B in diesen Zellen nicht exprimiert wird, wurden diese nicht weiter untersucht (Barretina, 2012; Martis et al., 2018). Die durchgeführten Überexpressionsstudien zeigten, dass miR-30e die Proteinmenge von MEF2D, nicht aber von MEF2C erhöhte, womit die These einer miR-30e-abhängigen Regulation bestätigt wurde (Abb. 21). Darüber hinaus belegten RNA-Interferenzstudien, dass eine Reduktion von MEF2D die Seneszenzeinleitung nach Strahlenexposition verringert. Es ist beschrieben, dass exogenes MEF2D p21 transkriptionell induziert und auf diesem Weg die Zellproliferation hemmt (M. Zhang et al., 2013). In zukünftigen Experimenten sollte daher durch die Verwendung von siRNAs die Bedeutung von MEF2D für die miR-30e-abhängige p21-Hochregulation geklärt werden. MEF2D bindet bekannterweise an eine mutmaßliche *Enhancer*-Sequenz innerhalb des Intron 1 (TSS +2,1 kb) von *CDKN1A* (Di Giorgio et al., 2015). Dies deutet allerdings daraufhin, dass MEF2D wahrscheinlich nicht an der Induktion des hier identifizierten 600 bp p21-

Promotorfragments beteiligt ist, sondern es sich vielmehr um einen zusätzlichen Mechanismus handeln könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen, sollte in zukünftigen Experimenten mit Hilfe eines Luciferase Reporter-Gen-Tests auch die Induzierbarkeit der beschriebenen *Enhancer*-Sequenz im *CDKN1A*-Gen durch miR-30e untersucht werden. Auch der Einsatz von siRNAs gegen MEF2D könnte Auskunft darüber geben, ob der Transkriptionsfaktor für die miR30e-abhängige Aktivierung des p21-600 bp-Promotorfragments benötigt wird. In dieser Dissertation wurde somit erstmalig die miR-30e-abhängige Regulation der Transkriptionsfaktors MEF2D demonstriert, der einen vielversprechenden Kandidaten für die Vermittlung der miR-30e-induzierten p21-Expression darstellt.

4.6 Generierung und funktionelle Charakterisierung von miR-30e-Knockdown-Zellen mit Hilfe des CRISPR/CAS9-Verfahrens

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellte die Generierung von miR-30e-KD-Zellen mit Hilfe des CRISPR/CAS9-Verfahrens dar, um die Funktion der miR-30e genauer aufzuklären und die Ergebnisse der miRNA Überexpression zu validieren. Die Ausschaltung einer miRNA unterscheidet sich wesentlich von der eines Proteins. Während die Mutation einer einzelnen DNA-Base durch eine Verschiebung des offenen Leserasters schon zu einem nicht-funktionalen Protein führen kann, bedarf die Inaktivierung einer miRNA die Erzeugung größerer Insertionen oder Deletionen innerhalb der genomischen Sequenz. Im konkreten Fall von miR-30e stellten die Lokalisation im Intron des proteinkodierenden *NFYC*-Gens sowie die räumliche Nähe zu *MIR30C* zusätzliche Herausforderungen dar. Trotz dieser Widrigkeiten gelang es, eine spezifische miR-30e-KD-Zelllinie, Klon #8, zu erzeugen. Durch eine Deletion innerhalb der pre-miRNA-Sequenz auf beiden Allelen wurde dabei die effiziente Reifung der miR-30e verhindert. Dies zeigte sich in der verminderten Expression der reifen miR-30e um 80% (miR-30e-5p) bzw. 99% (miR-30e-3p) im Vergleich zu HCT116 Wildtyp-Zellen (Abb. 24). Die erzielte Reduktion ist dabei vergleichbar zu publizierten Daten für andere mittels dieser Methode erzeugten miRNA-KD-Zelllinien (H. Chang et al., 2016). Die Expression von miR-30c sowie NFYC war in Klon #8 nicht beeinträchtigt, sodass dieser als reiner miR-30e-KD Klon charakterisiert werden konnte.

Wie erwartet war die Seneszenzinduktion nach Strahlenexposition in Klon #8 im Vergleich zu HCT116 Wildtyp-Zellen verringert. Durch die exogene Zugabe von miR-30e-Mimiks und damit der Wiederherstellung der miR-30e-Expression konnte diese deutlich angehoben werden (Abb. 25, 26A). Überraschenderweise zeigte Klon #8 aber keine verringerte p21-mRNA- oder Proteinexpression nach Bestrahlung. Die Gründe für die Diskrepanz zwischen den Beobachtungen nach miR-30e-Überexpression in

HCT116 Wildtyp-Zellen und miR-30e-*Knockdown* in Klon #8 konnten nicht eruiert werden. Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die miR-30e-vermittelte Seneszenzeinleitung ohne Beteiligung von p21 erfolgt, obwohl diese Vermutung äußerst nahe liegt. Auch im Hinblick auf den miR-30e-abhängigen Rückgang der Procaspase-3-Expression ergaben sich Widersprüche zu den vorherigen Beobachtungen. So war zwar die DEVDase-Aktivität in Klon #8 verglichen mit HCT116 Wildtyp-Zellen sowohl basal als auch nach Bestrahlung deutlich erhöht (Abb. 27). Auf molekularer Ebene zeigte die Reduktion von miR-30e in Klon #8 jedoch keinen Effekt auf die Procaspase-3-Expression, obwohl die Transfektion mit miR-30e-Mimiks diese weiterhin deutlich verminderte. Zwar ist die hier bestimmte Expression der enzymatisch-inaktiven Procaspase-3 nicht zwangsläufig direkt proportional zur Caspase-3-Aktivität (DEVDase-Aktivität), dies erklärt jedoch nicht die beobachtete Diskrepanz zwischen einer endogenen Verringerung von miR-30e in Klon #8 und der Überexpression von miR-30e in HCT116 Wildtyp-Zellen. Fragen werfen auch die Ergebnisse des LDH-Zytotoxizitätstest auf, welche eine geringere Zelltodrate nach Bestrahlung für Klon #8 verglichen mit HCT116 Wildtyp-Zellen zeigten (Abb. 27C), obwohl in diesem eine Erhöhung der Apoptose und eine Reduktion der Seneszenz vorlag. Ursächlich hierfür ist vermutlich der Rückgang von Caspase-3-unabhängigen Zelltodformen wie bspw. Nekrose. Zudem ist ein kausaler Zusammenhang zwischen der Reduktion von miR-30e in Klon #8 und einem verminderten Eintritt von Zelltod zumindest zu hinterfragen, wenn gleichzeitig auch die Überexpression von miR-30e in Klon #8 einen vergleichbaren Effekt hervorrief. Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass die benötigte Antibiotikum-Selektion während der Klonegenerierung zellschicksalskritische Prozesse beeinflusst haben könnte. Da hier Klone mit einer erhöhten Zelltodresistenz, auch wenn diese nicht in einem direkten Zusammenhang mit miR-30e steht, im Selektionsprozess begünstigt werden und solche mit einer verringerten Proliferationsrate, wie bspw. seneszente Zellen, verdrängt werden. Um diese Effekte möglichst gering zu halten, erfolgte die Kultivierung der Zellen in Puromycin-haltigem Medium nur über einen Zeitraum von 3 Tagen.

Obwohl mehrere sehr zeitaufwendige Versuche durchgeführt wurden, konnten keine weiteren miR-30e-KD-Klone generiert werden. Die erzeugten Klone #29 und #50 wiesen zwar ebenfalls eine Mutation innerhalb des *MIR30E*-Gens auf, diese waren jedoch nur heterozygot ausgeprägt und wirkten sich nicht wirklich auf die miR-30e-Expression aus (Abb. 23). Interessanterweise stammten alle drei Klone aus einem Transfektionsansatz, welcher eine Kombination aus zwei *guideRNAs* gegen miR-30e enthielt. Vermutlich können auf diesem Weg größere Deletionen in der gemonischen Sequenz generiert und so die Wahrscheinlichkeit einer verschlechterten miRNA-Reifung deutlich erhöht werden (H. Yang et al., 2013). Einer der identifizierten Gründe für die

geringe Ausbeute mutierter Klone stellte die sehr geringe Transfektionseffizienz der Zellen mit dem CAS9-Expressionsvektor dar. Die Erfolgsrate schwankte zwischen 0,05% und 0,1% und konnte trotz intensiver Bemühungen nicht gesteigert werden. Auch die Einbringung des Plasmids in die Zellen unter Verwendung von Nukleofektion, einer elektroporationsbasierten Transfektionsmethode, erzielte keine Verbesserung. Diesbezüglich könnte die Etablierung einer viralen Plasmid-Transduktion die Erfolgsquote voraussichtlich deutlich erhöhen. Eine weitere Erklärung könnte in der CRISPR/CAS9-Technologie selbst begründet sein. Die Endonuklease CAS9 erzeugt DNA-Doppelstrangbrüche bei deren anschließender Reparatur durch die Zelle Mutationen erzeugt werden. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass dies ebenfalls zur Einleitung einer p53-abhängigen DNA-Schädigungsantwort führt und einen Zellzyklusarrest auslöst (Haapaniemi et al., 2018). Auch in pluripotenten Stammzellen verursachten CAS9-generierte Doppelstrangbrüche eine hohe p53-vermittelte Zytotoxizität (Ihry et al., 2018). Beides verminderte die Effizienz der Genomeditierung in p53-profizienten Zellen deutlich. Die verwendeten HCT116 Wildtyp-Zellen zeichneten sich außerdem durch eine starke Aktivierung von p53 und damit auch der nachgeschalteten Signalwege nach DNA-Schädigung aus, weshalb es nahe liegt, dass dies die Ausbeute an KD-Klonen auch in dieser Arbeit entscheidend vermindert haben könnte. Die transiente Inhibierung von p53 bspw. durch Nutlin 3A oder siRNA könnte eventuell Abhilfe schaffen und die Effizienz erhöhen.

Für eine abschließende Beurteilung des miR-30e-reduzierten Klon #8 ist es notwendig, die gewonnenen Ergebnisse mit denen weiterer Klone zu vergleichen und so zu verifizieren bzw. analysieren, welche Beobachtungen durch miR-30e und welche durch klon-spezifische Effekte hervorgerufen werden. Dies erfordert eine weitere zeitaufwendige Geneditierung mit Hilfe des CRISPR/CAS9-Verfahrens, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr umgesetzt werden konnte.

4.7 Fazit

Zusammengefasst konnte in dieser Dissertation demonstriert werden, dass miR-30e ein Entscheidungsträger in strahlungsinduzierten Signalwegen ist und das Zellschicksal moduliert (Abb. 28). *MIR30E* ist dabei in HCT116 Wildtyp-Zellen ein direktes Zielgen von p53 und wird nach Bestrahlung transkriptionell induziert. Zudem legen die Versuchsergebnisse nahe, dass *MIR30C* zusammen mit *MIR30E* unter der Kontrolle von p53 steht und beide in einem Gencluster organisiert sind. Funktionell schützt miR-30e HCT116 Wildtyp-Zellen durch die translationale Repression der Procaspase-3 vor der strahlungsinduzierten Apoptose. Diese werden dann stattdessen mittels miR-30e vermehrt in die Seneszenz getrieben, was mit einer Hochregulation von p21 korreliert. Der miR-

30e-vermittelte Anstieg der p21-Expression beruht dabei auf einer indirekten transkriptionellen Regulation, für welche eine 600 Basenpaarsequenz des p21-Promotors stromaufwärts des TSS essentiell war. Zudem wurde mit MEF2D ein neues, indirektes Zielgen von miR-30e identifiziert. Außerdem gelang es die CRISRP/CAS9-Methode zur Ausschaltung einer miRNA in unserer Arbeitsgruppe zu etablieren. Die Analysen der so gewonnenen miR-30e-*Knockdown*-Zelllinie dauern derzeit noch an.

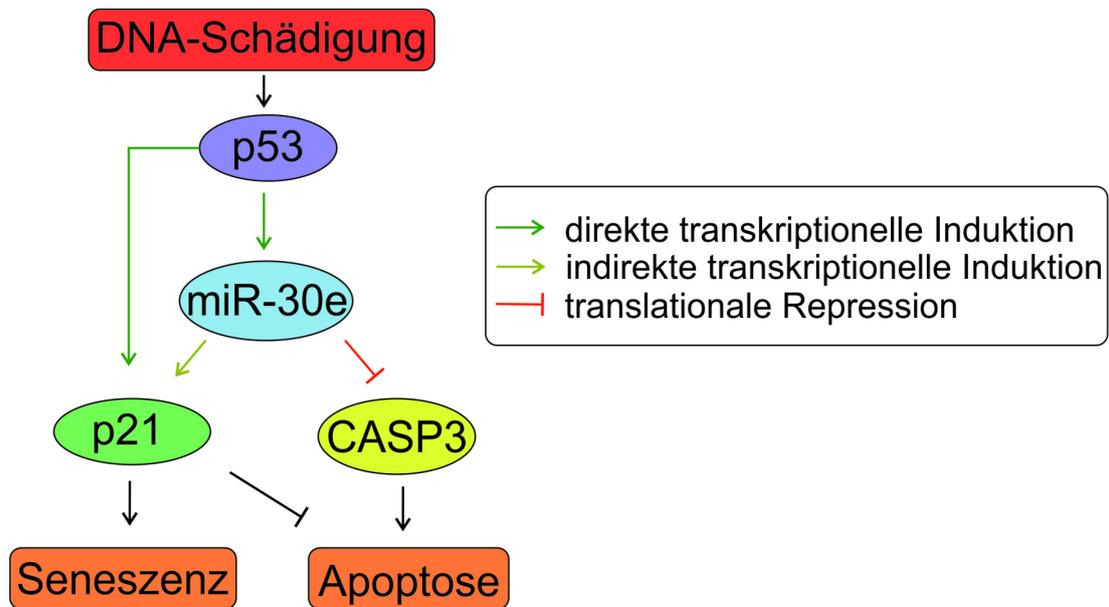


Abb. 28: Schematische Darstellung des pro-seneszenten sowie anti-apoptischen Potentials der miR-30e in strahlungsinduzierten Signalwegen. Nach einer Schädigung der DNA induziert p53 die verstärkte Expression von miR-30e. Diese reguliert die Suppression der Procaspase-3 auf translationaler Ebene und schützt die Zelle vor dem Zelltod. Gleichzeitig vermittelt miR-30e die transkriptionelle Hochregulation von p21 und lenkt die Zellen so in die Seneszenz. CASP3, Procaspase-3.

5. Literaturverzeichnis

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 400-414.
- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T. W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., Longerich, T., Sansom, O. J., Benitah, S. A., Zender, L., & Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*, 15(8), 978-990.
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J.-W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4, e05005.
- Ahn, J. Y., Li, X., Davis, H. L., & Canman, C. E. (2002). Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *J Biol Chem*, 277(22), 19389-19395.
- Alemán, L. M., Doench, J., & Sharp, P. A. (2007). Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA*, 13(3), 385-395.
- Altman, B. J., & Rathmell, J. C. (2012). Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a008763.
- Appella, E., & Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, 268(10), 2764-2772.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 281(5381), 1305.
- Auyeung, V. C., Ulitsky, I., McGeary, S. E., & Bartel, D. P. (2013). Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell*, 152(4), 844-858.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., & Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281(5383), 1674-1677.
- Bargonetti, J., Reynisdottir, I., Friedman, P. N., & Prives, C. (1992). Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev*, 6(10), 1886-1898.
- Bartek, J., Bartkova, J., & Lukas, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*, 26(56), 7773-7779.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Baskerville, S., & Bartel, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11(3), 241-247.
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(5), 961-976.
- Bhattacharya, S., Steele, R., Shrivastava, S., Chakraborty, S., Di Bisceglie, A. M., & Ray, R. B. (2016). Serum miR-30e and miR-223 as Novel Noninvasive Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Am J Pathol*, 186(2), 242-247.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G., & Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161(3), 1169-1175.
- Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 15(6), 725-731.
- Bockhorn, J., Dalton, R., Nwachukwu, C., Huang, S., Prat, A., Yee, K., Chang, Y. F., Huo, D., Wen, Y., Swanson, K. E., Qiu, T., Lu, J., Park, S. Y., Dolan, M. E., Perou, C. M., Olopade, O. I., Clarke, M. F., Greene, G. L., & Liu, H. (2013). MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. *Nat Commun*, 4, 1393.

- Bode, A. M., & Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 4(10), 793-805.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., & Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), 349-352.
- Böhlig, L., Friedrich, M., & Engeland, K. (2010). p53 activates the PANK1/ miRNA-107 gene leading to downregulation of CDK6 and p130 cell cycle proteins. *Nucleic Acids Res*, 39(2), 440-453.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(Pt 8), 2551-2561.
- Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., Zhai, Y., Giordano, T. J., Qin, Z. S., Moore, B. B., MacDougald, O. A., Cho, K. R., & Fearon, E. R. (2007). p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Curr Biol*, 17(15), 1298-1307.
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12), 1097-1101.
- Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C., Nieruchalski, M., & May, E. (2000). Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene*, 19(5), 649-660.
- Bratton, S. B., & Salvesen, G. S. (2010). Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci*, 123(Pt 19), 3209-3214.
- Braun, C. J., Zhang, X., Savelyeva, I., Wolff, S., Moll, U. M., Schepeler, T., Orntoft, T. F., Andersen, C. L., & Dobbstein, M. (2008). p53-Responsive MicroRNAs 192 and 215 Are Capable of Inducing Cell Cycle Arrest. *Cancer Res*, 68(24), 10094-10104.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3(3), e85.
- Brooks, C. L., & Gu, W. (2006). p53 Ubiquitination: Mdm2 and Beyond. *Mol Cell*, 21(3), 307-315.
- Brown, J. P., Wei, W., & Sedivy, J. M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21^{CIP1/WAF1} gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, 277(5327), 831-834.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G₂ arrest after DNA damage. *Science*, 282(5393), 1497-1501.
- Burns, T. F., Bernhard, E. J., & El-Deiry, W. S. (2001). Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo. *Oncogene*, 20(34), 4601-4612.
- Buscemi, G., Perego, P., Carenini, N., Nakanishi, M., Chessa, L., Chen, J., Khanna, K., & Delia, D. (2004). Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene*, 23(46), 7691-7700.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), 1957-1966.
- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 7(4), 147-154.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 857-866.
- Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol*, 11(11), S27-31.
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 729-740.
- Carter, S., Bischof, O., Dejean, A., & Vousden, K. H. (2007). C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol*, 9(4), 428-435.

5. Literaturverzeichnis

- Chaluvally-Raghavan, P., Jeong, K. J., Pradeep, S., Silva, A. M., Yu, S., Liu, W., Moss, T., Rodriguez-Aguayo, C., Zhang, D., Ram, P., Liu, J., Lu, Y., Lopez-Berestein, G., Calin, G. A., Sood, A. K., & Mills, G. B. (2016). Direct Upregulation of STAT3 by MicroRNA-551b-3p Deregulates Growth and Metastasis of Ovarian Cancer. *Cell Rep*, *15*(7), 1493-1504.
- Chang, H., Yi, B., Ma, R., Zhang, X., Zhao, H., & Xi, Y. (2016). CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Sci Rep*, *6*, 22312-22312.
- Chang, T.-C., Yu, D., Lee, Y.-S., Wentzel, E. A., Arking, D. E., West, K. M., Dang, C. V., Thomas-Tikhonenko, A., & Mendell, J. T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*, *40*(1), 43-50.
- Chang, T. C., Wentzel, E. A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K. H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C. J., Arking, D. E., Beer, M. A., Maitra, A., & Mendell, J. T. (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*, *26*(5), 745-752.
- Chen, L., Gilkes, D. M., Pan, Y., Lane, W. S., & Chen, J. (2005). ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J*, *24*(19), 3411-3422.
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, *436*(7051), 740-744.
- Cheng, Q., Chen, L., Li, Z., Lane, W. S., & Chen, J. (2009). ATM activates p53 by regulating MDM2 oligomerization and E3 processivity. *EMBO J*, *28*(24), 3857-3867.
- Child, E. S., & Mann, D. J. (2006). The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle*, *5*(12), 1313-1319.
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO rep*, *15*(11), 1139-1153.
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*, *21*(12), 1424-1435.
- Chipman, L. B., & Pasquinelli, A. E. (2019). miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. *Trends Genet*, *35*(3), 215-222.
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, *40*(2), 179-204.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, *326* (Pt 1)(Pt 1), 1-16.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., & Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*, *3*(4), 339-345.
- Cooke, A., Prigge, A., & Wickens, M. (2010). Translational repression by deadenylases. *J Biol Chem*, *285*(37), 28506-28513.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol*, *5*(1), 99-118.
- Coqueret, O., & Gascan, H. (2000). Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21^{WAF1/CIP1/SI1}. *J Biol Chem*, *275*(25), 18794-18800.
- Cosentino, K., & Garcia-Saez, A. J. (2017). Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? *Trends Cell Biol*, *27*(4), 266-275.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(1), 49-63.

5. Literaturverzeichnis

- de Graaf, P., Little, N. A., Ramos, Y. F. M., Meulmeester, E., Letteboer, S. J. F., & Jochemsen, A. G. (2003). Hdmx Protein Stability Is Regulated by the Ubiquitin Ligase Activity of Mdm2. *J Biol Chem*, 278(40), 38315-38324.
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4(12), 1798-1806.
- Delavaine, L., & La Thangue, N. B. (1999). Control of E2F activity by p21^{Waf1/Cip1}. *Oncogene*, 18(39), 5381-5392.
- Di Giorgio, E., Gagliostro, E., Clocchiatti, A., & Brancolini, C. (2015). The control operated by the cell cycle machinery on MEF2 stability contributes to the downregulation of CDKN1A and entry into S phase. *Mol Cell Biol*, 35(9), 1633-1647.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., & et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), 9363-9367.
- Ding, X. C., & Grosshans, H. (2009). Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J*, 28(3), 213-222.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Dragomir, M. P., Knutsen, E., & Calin, G. A. (2018). SnapShot: Unconventional miRNA Functions. *Cell*, 174(4), 1038-1038.e1031.
- Eichhorn, S. W., Guo, H., McGeary, S. E., Rodriguez-Mias, R. A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S. H., Ghoshal, K., Villen, J., & Bartel, D. P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell*, 56(1), 104-115.
- el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y., & et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G₁ arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 54(5), 1169-1174.
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, 1(1), 45-49.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), 817-825.
- Elledge, S. J. (1996). Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. *Science*, 274(5293), 1664-1672.
- Essmann, F., Pohlmann, S., Gillissen, B., Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K., & Jänicke, R. U. (2005). Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J Biol Chem*, 280(44), 37169-37177.
- Fabian, M. R., & Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*, 19(6), 586-593.
- Faraonio, R., Salerno, P., Passaro, F., Sedia, C., Iaccio, A., Bellelli, R., Nappi, T. C., Comegna, M., Romano, S., Salvatore, G., Santoro, M., & Cimino, F. (2012). A set of miRNAs participates in the cellular senescence program in human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ*, 19(4), 713-721.
- Farmer, G., Bargonetti, J., Zhu, H., Friedman, P., Prywes, R., & Prives, C. (1992). Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature*, 358(6381), 83-86.
- Fell, V. L., & Schild-Poulter, C. (2012). Ku regulates signaling to DNA damage response pathways through the Ku70 von Willebrand A domain. *Mol Cell Biol*, 32(1), 76-87.
- Fields, S., & Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, 249(4972), 1046.
- Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, 36(28), 3943-3956.
- Fischer, U., Janicke, R. U., & Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10(1), 76-100.

- Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F. B., Pan, Z. Q., Harper, J. W., Elledge, S. J., O'Donnell, M., & Hurwitz, J. (1994). Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(18), 8655-8659.
- Fornes, O., Castro-Mondragon, J. A., Khan, A., van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P. A., Modi, B. P., Correard, S., Gheorghe, M., Baranašić, D., Santana-Garcia, W., Tan, G., Chèneby, J., Ballester, B., Parcy, F., Sandelin, A., Lenhard, B., Wasserman, W. W., & Mathelier, A. (2019). JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*, *48*(D1), D87-D92.
- Garneau, J. E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, *468*(7320), 67-71.
- Gartel, A. L., & Radhakrishnan, S. K. (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*, *65*(10), 3980-3985.
- Gartel, A. L., & Tyner, A. L. (1999). Transcriptional regulation of the p21^(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res*, *246*(2), 280-289.
- Georges, S. A., Biery, M. C., Kim, S. Y., Schelter, J. M., Guo, J., Chang, A. N., Jackson, A. L., Carleton, M. O., Linsley, P. S., Cleary, M. A., & Chau, B. N. (2008). Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. *Cancer Res*, *68*(24), 10105-10112.
- Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A. J., & Schier, A. F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, *312*(5770), 75-79.
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, *432*(7014), 235-240.
- Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol Cell*, *27*(1), 91-105.
- Gu, B., & Zhu, W. G. (2012). Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int J Biol Sci*, *8*(5), 672-684.
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, *466*(7308), 835-840.
- Guo, L., & Lu, Z. (2010). The Fate of miRNA* Strand through Evolutionary Analysis: Implication for Degradation As Merely Carrier Strand or Potential Regulatory Molecule? *PLoS One*, *5*(6), e11387.
- Guo, S., Lu, J., Schlanger, R., Zhang, H., Wang, J. Y., Fox, M. C., Purton, L. E., Fleming, H. H., Cobb, B., Merckenschlager, M., Golub, T. R., & Scadden, D. T. (2010). MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(32), 14229-14234.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(8), 509-524.
- Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B., & Taipale, J. (2018). CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*, *24*(7), 927-930.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, *301*(1), 5-17.
- Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Adv Drug Del Rev*, *87*, 3-14.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, *18*(24), 3016-3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B. T., & Kim, V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, *125*(5), 887-901.

5. Literaturverzeichnis

- Hanahan, D., & Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458-460.
- Harper, J. W. (1997). Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv*, 29, 91-107.
- Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Mol Cell*, 28(5), 739-745.
- Harrington, E. A., Bruce, J. L., Harlow, E., & Dyson, N. (1998). pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 11945-11950.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), 296-299.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A. L., Linsley, P. S., Chen, C., Lowe, S. W., Cleary, M. A., & Hannon, G. J. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447(7148), 1130-1134.
- Helin, K., Harlow, E., & Fattaey, A. (1993). Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, 13(10), 6501-6508.
- Hermeking, H. (2012). MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 12(9), 613-626.
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*, 28(6), 436-453.
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*, 128(4), 1238-1246.
- Hershkovitz-Rokah, O., Modai, S., Pasmanik-Chor, M., Toren, A., Shomron, N., Raanani, P., Shpilberg, O., & Granot, G. (2015). MiR-30e induces apoptosis and sensitizes K562 cells to imatinib treatment via regulation of the BCR-ABL protein. *Cancer Lett*, 356(2 Pt B), 597-605.
- Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S. J., & Mak, T. W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, 287(5459), 1824-1827.
- Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, 361(15), 1475-1485.
- Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962), 167-170.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- Hu, H., Du, L., Nagabayashi, G., Seeger, R. C., & Gatti, R. A. (2010). ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(4), 1506-1511.
- Hu, H. Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y. H., Chen, W., & Khaitovich, P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, 10, 413.
- Hu, W., Chan, C. S., Wu, R., Zhang, C., Sun, Y., Song, J. S., Tang, L. H., Levine, A. J., & Feng, Z. (2010). Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504. *Mol Cell*, 38(5), 689-699.
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K., & Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(47), 16961-16966.
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12(2), 99-110.
- Ihry, R. J., Worringer, K. A., Salick, M. R., Frias, E., Ho, D., Theriault, K., Kommineni, S., Chen, J., Sondey, M., Ye, C., Randhawa, R., Kulkarni, T., Yang, Z., McAllister, G., Russ, C., Reece-Hoyes, J., Forrester, W., Hoffman, G. R., Dolmetsch, R., &

5. Literaturverzeichnis

- Kaykas, A. (2018). p53 inhibits CRISPR–Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*, 24(7), 939-946.
- Ivanovska, I., Ball, A. S., Diaz, R. L., Magnus, J. F., Kibukawa, M., Schelter, J. M., Kobayashi, S. V., Lim, L., Burchard, J., Jackson, A. L., Linsley, P. S., & Cleary, M. A. (2008). MicroRNAs in the miR-106b Family Regulate p21/CDKN1A and Promote Cell Cycle Progression. *Mol Cell Biol*, 28(7), 2167.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., & Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell*, 39(2), 292-299.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2), 113-127.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., & Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*, 273(16), 9357-9360.
- Jascur, T., Brickner, H., Salles-Passador, I., Barbier, V., El Khissiin, A., Smith, B., Fotedar, R., & Fotedar, A. (2005). Regulation of p21^{WAF1/CIP1} Stability by WISp39, a Hsp90 Binding TPR Protein. *Mol Cell*, 17(2), 237-249.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*, 16(7), 421-433.
- Jung, P., & Hermeking, H. (2009). The c-MYC-AP4-p21 cascade. *Cell cycle* 8, 982-989.
- Jung, Y. S., Qian, Y., & Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal*, 22(7), 1003-1012.
- Kaesler, M. D., & Iggo, R. D. (2004). Promoter-specific p53-dependent histone acetylation following DNA damage. *Oncogene*, 23(22), 4007-4013.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S. A., Kung, A. L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D. M., & Rajewsky, K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, 19(4), 489-501.
- Kang, T. W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., Tacke, F., Ott, M., Luedde, T., Longerich, T., Kubicka, S., & Zender, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), 547-551.
- Kawai, H., Wiederschain, D., Kitao, H., Stuart, J., Tsai, K. K. C., & Yuan, Z.-M. (2003). DNA damage-induced MDMX degradation is mediated by MDM2. *J Biol Chem*, 278(46), 45946-45953.
- Kawamata, T., Seitz, H., & Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol*, 16(9), 953-960.
- Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., & Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*, 252(5013), 1708.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2), 209-216.
- Kim, Y. K., Kim, B., & Kim, V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(13), E1881-1889.
- Kitaura, H., Shinshi, M., Uchikoshi, Y., Ono, T., Iguchi-Arigo, S. M., & Ariga, H. (2000). Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and

- p21^{cip1/waf1/sdi1} in DNA replication and transcription. *J Biol Chem*, 275(14), 10477-10483.
- Kruse, J.-P., & Gu, W. (2008). SnapShot: p53 Posttranslational Modifications. *Cell*, 133(5), 930-930.e931.
- Kruse, J. P., & Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell*, 137(4), 609-622.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., & Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387(6630), 299-303.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev*, 24(22), 2463-2479.
- Kung, A. L., Rebel, V. I., Bronson, R. T., Ch'ng, L. E., Sieff, C. A., Livingston, D. M., & Yao, T. P. (2000). Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev*, 14(3), 272-277.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20), 3613-3622.
- Lagger, G., Doetzelhofer, A., Schuettengruber, B., Haidweger, E., Simboeck, E., Tischler, J., Chiocca, S., Suske, G., Rotheneder, H., Wintersberger, E., & Seiser, C. (2003). The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol*, 23(8), 2669-2679.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J*, 23(15), 3092-3102.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Müller, R.-U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D. B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H.-I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C. E., Nagle, J. W., Ju, J., Papavasiliou, F. N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M. J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J. J., Sander, C., Zavolan, M., & Tuschl, T. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129(7), 1401-1414.
- Lane, D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-16.
- Lane, D. P., & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature*, 278(5701), 261-263.
- Laptenko, O., & Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ*, 13(6), 951-961.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 858-862.
- Laudato, S., Patil, N., Abba, M. L., Leupold, J. H., Benner, A., Gaiser, T., Marx, A., & Allgayer, H. (2017). P53-induced miR-30e-5p inhibits colorectal cancer invasion and metastasis by targeting ITGA6 and ITGB1. *Int J Cancer*, 141(9), 1879-1890.
- Le, M. T. N., Teh, C., Shyh-Chang, N., Xie, H., Zhou, B., Korzh, V., Lodish, H. F., & Lim, B. (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev*, 23(7), 862-876.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Ageing Cell*, 5(2), 187-195.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.

5. Literaturverzeichnis

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415-419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, *23*(20), 4051-4060.
- Lees, J. A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N., & Helin, K. (1993). The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol*, *13*(12), 7813-7825.
- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., & George, D. L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol*, *6*(5), 443-450.
- Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, *351*(6326), 453-456.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15-20.
- Li, M., Brooks, C. L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., & Gu, W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, *302*(5652), 1972-1975.
- Li, M., Marin-Muller, C., Bharadwaj, U., Chow, K. H., Yao, Q., & Chen, C. (2009). MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease. *World J Surg*, *33*(4), 667-684.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., & Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*, *371*(6497), 534-537.
- Li, Y., & Kowdley, K. V. (2012). MicroRNAs in common human diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, *10*(5), 246-253.
- Liao, J.-M., Cao, B., Zhou, X., & Lu, H. (2014). New insights into p53 functions through its target microRNAs. *J Mol Cell Biol*, *6*(3), 206-213.
- Lin, Z., Li, J. W., Wang, Y., Chen, T., Ren, N., Yang, L., Xu, W., He, H., Jiang, Y., Chen, X., Liu, T., & Liu, G. (2016). Abnormal miRNA-30e Expression is Associated with Breast Cancer Progression. *Clin Lab*, *62*(1-2), 121-128.
- Linares, L. K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Müller, S., & Scheffner, M. (2003). HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(21), 12009-12014.
- Linzer, D. I. H., & Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, *17*(1), 43-52.
- Liu, M.-M., Li, Z., Han, X.-D., Shi, J.-H., Tu, D.-Y., Song, W., Zhang, J., Qiu, X.-L., Ren, Y., & Zhen, L.-L. (2017). MiR-30e inhibits tumor growth and chemoresistance via targeting IRS1 in Breast Cancer. *Sci Rep*, *7*(1), 15929-15929.
- Liu, Q., Rand, T. A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H. E., Smith, D. P., & Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science*, *301*(5641), 1921-1925.
- Liu, X., Yang, W.-T., & Zheng, P.-S. (2014). Msi1 promotes tumor growth and cell proliferation by targeting cell cycle checkpoint proteins p21, p27 and p53 in cervical carcinomas. *Oncotarget*, *5*(21), 10870-10885.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., & Carrington, J. C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, *297*(5589), 2053-2056.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M. A., Celeste, A., Manis, J. P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T. T., Alt, F. W., & Chen, J. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell*, *21*(2), 187-200.

5. Literaturverzeichnis

- Lund, E., Guttlinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, *303*(5654), 95-98.
- Ma, F., Liu, X., Li, D., Wang, P., Li, N., Lu, L., & Cao, X. (2010). MicroRNA-466l Upregulates IL-10 Expression in TLR-Triggered Macrophages by Antagonizing RNA-Binding Protein Tristetraprolin-Mediated IL-10 mRNA Degradation. *J Immunol*, *184*(11), 6053.
- Ma, Q., Wang, X., Li, Z., Li, B., Ma, F., Peng, L., Zhang, Y., Xu, A., & Jiang, B. (2013). microRNA-16 represses colorectal cancer cell growth in vitro by regulating the p53/survivin signaling pathway. *Oncol Rep*, *29*(4), 1652-1658.
- Ma, Y. X., Zhang, H., Li, X. H., & Liu, Y. H. (2018). MiR-30e-5p inhibits proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by target-ing USP22. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *22*(19), 6342-6349.
- MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., & Doudna, J. A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(2), 512-517.
- Mao, J., Hu, X., Pang, P., Zhou, B., Li, D., & Shan, H. (2017). miR-30e acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma partly via JAK1/STAT3 pathway. *Oncol Rep*, *38*(1), 393-401.
- Mao, L., Liu, S., Hu, L., Jia, L., Wang, H., Guo, M., Chen, C., Liu, Y., & Xu, L. (2018). miR-30 Family: A Promising Regulator in Development and Disease. *Biomed Res Int*, *2018*, 9623412.
- Martinez, I., Cazalla, D., Almstead, L. L., Steitz, J. A., & DiMaio, D. (2011). miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(2), 522-527.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., & Tuschl, T. (2002). Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. *Cell*, *110*(5), 563-574.
- Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., & Sonenberg, N. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, *317*(5845), 1764-1767.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., & Elledge, S. J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(19), 10389.
- Mazan-Mamczarz, K., Galbán, S., López de Silanes, I., Martindale, J. L., Atasoy, U., Keene, J. D., & Gorospe, M. (2003). RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(14), 8354-8359.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *5*(4), a008656.
- McLure, K. G., & Lee, P. W. (1998). How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J*, *17*(12), 3342-3350.
- Meek, D. W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer*, *9*(10), 714-723.
- Meek, D. W., & Anderson, C. W. (2009). Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *1*(6), a000950.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, *15*(2), 185-197.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., & Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, *11*(3), 577-590.
- Miyafuji, Y., Zhong, X., Uchida, I., Koi, M., & Hemmi, H. (2001). Growth inhibition due to complementation of transforming growth factor- β receptor type II-defect by human chromosome 3 transfer in human colorectal carcinoma cells. *J Cell Physiol*, *187*(3), 356-364.

5. Literaturverzeichnis

- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., & Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, *9*(6), 1799-1805.
- Mo, B., Wu, X., Wang, X., Xie, J., Ye, Z., & Li, L. (2019). miR-30e-5p Mitigates Hypoxia-Induced Apoptosis in Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Suppressing Bim. *Int J Biol Sci*, *15*(5), 1042-1051.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C. s., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol*, *60*(2), 174-182.
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D., & Deppert, W. (2005). Transcription-independent proapoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol*, *17*(6), 631-636.
- Monteys, A. M., Spengler, R. M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K. A., Xing, Y., & Davidson, B. L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, *16*(3), 495-505.
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, *374*(6518), 131-134.
- Morgan, D. O., Fisher, R. P., Espinoza, F. H., Farrell, A., Nourse, J., Chamberlin, H., & Jin, P. (1998). Control of eukaryotic cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinases. *Cancer J Sci Am*, *4 Suppl 1*, S77-S83.
- Moroni, M. C., Hickman, E. S., Denchi, E. L., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Müller, H., & Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol*, *3*(6), 552-558.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M., & Krammer, P. H. (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*, *188*(11), 2033-2045.
- Murchison, E. P., Partridge, J. F., Tam, O. H., Cheloufi, S., & Hannon, G. J. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(34), 12135-12140.
- Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, *7*(3), 683-694.
- Neise, D., Sohn, D., Stefanski, A., Goto, H., Inagaki, M., Wesselborg, S., Budach, W., Stuhler, K., & Janicke, R. U. (2013). The p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor BI-D1870 prevents gamma irradiation-induced apoptosis and mediates senescence via RSK- and p53-independent accumulation of p21WAF1/CIP1. *Cell Death Dis*, *4*, e859.
- Nishio, H., & Walsh, M. J. (2004). CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(31), 11257-11262.
- Nottrott, S., Simard, M. J., & Richter, J. D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, *13*(12), 1108-1114.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, *288*(5468), 1053-1058.
- Okada, N., Lin, C.-P., Ribeiro, M. C., Biton, A., Lai, G., He, X., Bu, P., Vogel, H., Jablons, D. M., Keller, A. C., Wilkinson, J. E., He, B., Speed, T. P., & He, L. (2014). A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev*, *28*(5), 438-450.
- Olena, A. F., & Patton, J. G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*, *222*(3), 540-545.
- Ooi, A. G., Sahoo, D., Adorno, M., Wang, Y., Weissman, I. L., & Park, C. Y. (2010). MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(50), 21505-21510.

5. Literaturverzeichnis

- Ozsolak, F., Poling, L. L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X. S., Roeder, R. G., Zhang, X., Song, J. S., & Fisher, D. E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*, 22(22), 3172-3183.
- Pan, Y., & Chen, J. (2003). MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX. *Mol Cell Biol*, 23(15), 5113-5121.
- Parker, R., & Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 11(2), 121-127.
- Perkins, N. D. (2002). Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21^{WAF1/CIP1/SDI1}. *Cell Cycle*, 1(1), 39-41.
- Peters, D., Radine, C., Reese, A., Budach, W., Sohn, D., & Jänicke, R. U. (2017). The DEAD-box RNA helicase DDX41 is a novel repressor of p21^{WAF1/CIP1} mRNA translation. *J Biol Chem*, 292(20), 8331-8341.
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., & Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, 21(4), 533-542.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., & Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309(5740), 1573-1576.
- Pino, M. S., Kikuchi, H., Zeng, M., Herraiz, M.-T., Sperduti, I., Berger, D., Park, D.-Y., lafrate, A. J., Zukerberg, L. R., & Chung, D. C. (2010). Epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatellite instability. *Gastroenterology*, 138(4), 1406-1417.
- Place, R. F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E. J., & Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(5), 1608-1613.
- Platt, N., da Silva, R. P., & Gordon, S. (1998). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol*, 8(9), 365-372.
- Potthoff, M. J., & Olson, E. N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*, 134(23), 4131.
- Prince, S., Carreira, S., Vance, K. W., Abrahams, A., & Goding, C. R. (2004). Tbx2 directly represses the expression of the p21^{WAF1} cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res*, 64(5), 1669-1674.
- Radhakrishnan, S. K., Feliciano, C. S., Najmabadi, F., Haegebarth, A., Kandel, E. S., Tyner, A. L., & Gartel, A. L. (2004). Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle. *Oncogene*, 23(23), 4173-4176.
- Radine, C., Peters, D., Reese, A., Neuwahl, J., Budach, W., Jänicke, R. U., & Sohn, D. (2020). The RNA-binding protein RBM47 is a novel regulator of cell fate decisions by transcriptionally controlling the p53-p21-axis. *Cell Death Differ*, 27(4), 1274-1285.
- Raman, V., Martensen, S. A., Reisman, D., Evron, E., Odenwald, W. F., Jaffee, E., Marks, J., & Sukumar, S. (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, 405(6789), 974-978.
- Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., & Oren, M. (2007). Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*, 26(5), 731-743.
- Reisman, D., Elkind, N. B., Roy, B., Beamon, J., & Rotter, V. (1993). c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ*, 4(2), 57-65.
- Resnick-Silverman, L., St Clair, S., Maurer, M., Zhao, K., & Manfredi, J. J. (1998). Identification of a novel class of genomic DNA-binding sites suggests a mechanism for selectivity in target gene activation by the tumor suppressor protein p53. *Genes & development*, 12(14), 2102-2107.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110(4), 513-520.
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K. M., & Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 35(17), 5944-5953.

- Roberts, P., Noerholm, M., Ståhlberg, N., Mouritzen, P., & Glue, C. (2006). miRCURY™ LNA research tools for microRNA. *Nat Methods*, 3(9), I-II.
- Robles, A. I., Bemmels, N. A., Foraker, A. B., & Harris, C. C. (2001). APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res*, 61(18), 6660-6664.
- Roca-Alonso, L., Castellano, L., Mills, A., Dabrowska, A. F., Sikkel, M. B., Pellegrino, L., Jacob, J., Frampton, A. E., Krell, J., Coombes, R. C., Harding, S. E., Lyon, A. R., & Stebbing, J. (2015). Myocardial MiR-30 downregulation triggered by doxorubicin drives alterations in β -adrenergic signaling and enhances apoptosis. *Cell Death Dis*, 6(5), e1754-e1754.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273(10), 5858-5868.
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett*, 332(2), 237-248.
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 32(4), 347-355.
- Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805), 784-788.
- Schirle, N. T., Sheu-Gruttadauria, J., & MacRae, I. J. (2014). Structural basis for microRNA targeting. *Science*, 346(6209), 608.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., & Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254(3), 439-459.
- Sendoel, A., & Hengartner, M. O. (2014). Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology*, 29(3), 168-176.
- Seoane, J., Le, H. V., & Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21^{Cip1} Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature*, 419(6908), 729-734.
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*, 15(7), 397-408.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 9(10), 1149-1163.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 9(3), 459-470.
- Shi, Y. (2004). Caspase Activation: Revisiting the Induced Proximity Model. *Cell*, 117(7), 855-858.
- Shiloh, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci*, 31(7), 402-410.
- Shin, S., Cha, H. J., Lee, E. M., Jung, J. H., Lee, S. J., Park, I. C., Jin, Y. W., & An, S. (2009). MicroRNAs are significantly influenced by p53 and radiation in HCT116 human colon carcinoma cells. *Int J Oncol*, 34(6), 1645-1652.
- Shmueli, A., & Oren, M. (2004). Regulation of p53 by Mdm2: fate is in the numbers. *Mol Cell*, 13(1), 4-5.
- Shu, L., Yan, W., & Chen, X. (2006). RNPC1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, is required for maintaining the stability of the basal and stress-induced p21 transcript. *Genes Dev*, 20(21), 2961-2972.
- Shvarts, A., Steegenga, W. T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., van Ham, R. C., van der Houven van Oordt, W., Hateboer, G., van der Eb, A. J., & Jochemsen, A. G. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J*, 15(19), 5349-5357.
- Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., & Janicke, R. U. (2006). p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res*, 66(23), 11254-11262.

5. Literaturverzeichnis

- Sohn, D., Peters, D., Piekorz, R. P., Budach, W., & Janicke, R. U. (2016). miR-30e controls DNA damage-induced stress responses by modulating expression of the CDK inhibitor p21^{WAF1/CIP1} and caspase-3. *Oncotarget*, *7*(13), 15915-15929.
- Sokolova, V., Fiorino, A., Zoni, E., Crippa, E., Reid, J. F., Gariboldi, M., & Pierotti, M. A. (2015). The Effects of miR-20a on p21: Two Mechanisms Blocking Growth Arrest in TGF-beta-Responsive Colon Carcinoma. *J Cell Physiol*, *230*(12), 3105-3114.
- Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (1998). Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*, *1387*(1-2), 17-31.
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, *507*(7490), 62-67.
- Stommel, J. M., Marchenko, N. D., Jimenez, G. S., Moll, U. M., Hope, T. J., & Wahl, G. M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J*, *18*(6), 1660-1672.
- Suh, N. (2018). MicroRNA controls of cellular senescence. *BMB reports*, *51*(10), 493-499.
- Sullivan, K. D., Galbraith, M. D., Andrysik, Z., & Espinosa, J. M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ*, *25*(1), 133-143.
- Sun, Y., Coppe, J. P., & Lam, E. W. (2018). Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends Mol Med*, *24*(10), 871-885.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Miura, M., & Akahane, K. (1999). Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene*, *18*(5), 1239-1244.
- Tacheny, A., Dieu, M., Arnould, T., & Renard, P. (2013). Mass spectrometry-based identification of proteins interacting with nucleic acids. *J Proteomics*, *94*, 89-109.
- Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G., & Kastan, M. B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell*, *123*(1), 49-63.
- Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A., & Ohtsubo, M. (1999). MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett*, *447*(1), 5-9.
- Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., & Hermeking, H. (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*, *6*(13), 1586-1593.
- Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., & Nakagama, H. (2007). Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(39), 15472-15477.
- Thacker, J., & Zdzienicka, M. Z. (2003). The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair*, *2*(6), 655-672.
- Tian, Y., Simanshu, D. K., Ma, J. B., Park, J. E., Heo, I., Kim, V. N., & Patel, D. J. (2014). A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer. *Mol Cell*, *53*(4), 606-616.
- Timchenko, N. A., Wilde, M., Nakanishi, M., Smith, J. R., & Darlington, G. J. (1996). CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev*, *10*(7), 804-815.
- Timmer, J. C., & Salvesen, G. S. (2007). Caspase substrates. *Cell Death Differ*, *14*(1), 66-72.
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *20*(1), 5-20.
- Tsuchiya, N., Izumiya, M., Ogata-Kawata, H., Okamoto, K., Fujiwara, Y., Nakai, M., Okabe, A., Schetter, A. J., Bowman, E. D., Midorikawa, Y., Sugiyama, Y., Aburatani, H., Harris, C. C., & Nakagama, H. (2011). Tumor suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res*, *71*(13), 4628-4639.

5. Literaturverzeichnis

- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307-310.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669-687.
- Vousden, K. H., & Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 594-604.
- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413-431.
- Wade, M., Li, Y.-C., & Wahl, G. M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 13(2), 83-96.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., & Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 369(6481), 574-578.
- Waldman, T., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1995). p21 Is Necessary for the p53-mediated G₁ Arrest in Human Cancer Cells. *Cancer Research*, 55(22), 5187-5190.
- Wang, B., Xiao, Z., & Ren, E. C. (2009). Redefining the p53 response element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14373-14378.
- Wang, D., Zhu, C., Zhang, Y., Zheng, Y., Ma, F., Su, L., & Shao, G. (2017). MicroRNA-30e-3p inhibits cell invasion and migration in clear cell renal cell carcinoma by targeting Snail1. *Oncol Lett*, 13(4), 2053-2058.
- Wang, H. W., Noland, C., Siridechadilok, B., Taylor, D. W., Ma, E., Felderer, K., Doudna, J. A., & Nogales, E. (2009). Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol*, 16(11), 1148-1153.
- Wang, J., Guan, X., Guo, F., Zhou, J., Chang, A., Sun, B., Cai, Y., Ma, Z., Dai, C., Li, X., & Wang, B. (2013). miR-30e reciprocally regulates the differentiation of adipocytes and osteoblasts by directly targeting low-density lipoprotein receptor-related protein 6. *Cell Death Dis*, 4(10), e845-e845.
- Wang, S., & El-Deiry, W. S. (2006). p73 or p53 directly regulates human p53 transcription to maintain cell cycle checkpoints. *Cancer Res*, 66(14), 6982-6989.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M. C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N., & Gorospe, M. (2000). HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol*, 20(3), 760-769.
- Wang, X., Xuan, Z., Zhao, X., Li, Y., & Zhang, M. Q. (2009). High-resolution human core-promoter prediction with CoreBoost_HM. *Genome Res*, 19(2), 266-275.
- Wang, Y., Chen, J., Lin, Z., Cao, J., Huang, H., Jiang, Y., He, H., Yang, L., Ren, N., & Liu, G. (2016). Role of deregulated microRNAs in non-small cell lung cancer progression using fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *Oncol Lett*, 11(1), 801-808.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323-330.
- Welch, C., Chen, Y., & Stallings, R. L. (2007). MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 26(34), 5017-5022.
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855-862.
- Wilczynska, A., & Bushell, M. (2015). The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ*, 22(1), 22-33.
- Wojtowicz, E. E., Lechman, E. R., Hermans, K. G., Schoof, E. M., Wienholds, E., Isserlin, R., van Veelen, P. A., Broekhuis, M. J., Janssen, G. M., Trotman-Grant, A., Dobson, S. M., Krivdova, G., Elzinga, J., Kennedy, J., Gan, O. I., Sinha, A., Ignatchenko, V., Kislinger, T., Dethmers-Ausema, B., Weersing, E., Alemdehy, M. F., de Looper, H. W., Bader, G. D., Ritsema, M., Erkeland, S. J., Bystrykh, L. V., Dick, J. E., & de Haan, G. (2016). Ectopic miR-125a Expression Induces Long-Term Repopulating Stem Cell Capacity in Mouse and Human Hematopoietic Progenitors. *Cell Stem Cell*, 19(3), 383-396.

5. Literaturverzeichnis

- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., & Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, *139*(5), 1281-1292.
- Wong, C. M., Wong, C. C., Lee, J. M., Fan, D. N., Au, S. L., & Ng, I. O. (2012). Sequential alterations of microRNA expression in hepatocellular carcinoma development and venous metastasis. *Hepatology*, *55*(5), 1453-1461.
- Wu, F., Zhu, S., Ding, Y., Beck, W. T., & Mo, Y. Y. (2009). MicroRNA-mediated regulation of Ubc9 expression in cancer cells. *Clin Cancer Res*, *15*(5), 1550-1557.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Meng, R. D., Kao, G., Muschel, R., Yen, T., & el-Deiry, W. S. (1999). Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, *18*(47), 6411-6418.
- Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(11), 4034-4039.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., & Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, *7*(7A), 1126-1132.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, *284*(5756), 555-556.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., & Currie, A. R. (1980). Cell Death: The Significance of Apoptosis. In G. H. Bourne, J. F. Danielli & K. W. Jeon (Eds.), *Int Rev Cytol* (Vol. 68, pp. 251-306): Academic Press.
- Xu, S.-Q., & El-Deiry, W. S. (2000). p21WAF1/CIP1 Inhibits Initiator Caspase Cleavage by TRAIL Death Receptor DR4. *Biochem Biophys Res Commun*, *269*(1), 179-190.
- Xu, X., Tsvetkov, L. M., & Stern, D. F. (2002). Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Mol Cell Biol*, *22*(12), 4419-4432.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C., & Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, *445*(7128), 656-660.
- Yamakuchi, M., Ferlito, M., & Lowenstein, C. J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(36), 13421-13426.
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, *154*(6), 1370-1379.
- Yang, S. J., Yang, S. Y., Wang, D. D., Chen, X., Shen, H. Y., Zhang, X. H., Zhong, S. L., Tang, J. H., & Zhao, J. H. (2017). The miR-30 family: Versatile players in breast cancer. *Tumour Biol*, *39*(3), 1010428317692204.
- Yi, C., Wang, Q., Wang, L., Huang, Y., Li, L., Liu, L., Zhou, X., Xie, G., Kang, T., Wang, H., Zeng, M., Ma, J., Zeng, Y., & Yun, J. P. (2012). MiR-663, a microRNA targeting p21WAF1/CIP1, promotes the proliferation and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, *31*(41), 4421-4433.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, *17*(24), 3011-3016.
- Yu, F., Deng, H., Yao, H., Liu, Q., Su, F., & Song, E. (2010). Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene*, *29*(29), 4194-4204.
- Zamzami, N., & Kroemer, G. (1999). Condensed matter in cell death. *Nature*, *401*(6749), 127-128.
- Zannini, L., Delia, D., & Buscemi, G. (2014). CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol*, *6*(6), 442-457.
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*, *32*(16), 4776-4785.
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem*, *280*(30), 27595-27603.
- Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E., & Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*, *21*(21), 5875-5885.

5. Literaturverzeichnis

- Zhang, J., Cho, S.-J., Shu, L., Yan, W., Guerrero, T., Kent, M., Skorupski, K., Chen, H., & Chen, X. (2011). Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas. *Genes Dev*, 25(14), 1528-1543.
- Zhang, M., Truscott, J., & Davie, J. (2013). Loss of MEF2D expression inhibits differentiation and contributes to oncogenesis in rhabdomyosarcoma cells. *Mol Cancer*, 12(1), 150.
- Zhang, S., Li, G., Liu, C., Lu, S., Jing, Q., Chen, X., Zheng, H., Ma, H., Zhang, D., Ren, S., Shen, Z., Wang, Y., Lu, Z., Huang, D., Tan, P., Chen, J., Zhang, X., Qiu, Y., & Liu, Y. (2019). miR-30e-5p represses angiogenesis and metastasis by directly targeting AEG-1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci*.
- Zhang, Y., Gao, J.-S., Tang, X., Tucker, L. D., Quesenberry, P., Rigoutsos, I., & Ramratnam, B. (2009). MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene. *FEBS Lett*, 583(22), 3725-3730.
- Zhang, Y. Z., Naleway, J. J., Larison, K. D., Huang, Z. J., & Haugland, R. P. (1991). Detecting lacZ gene expression in living cells with new lipophilic, fluorogenic beta-galactosidase substrates. *FASEB J*, 5(15), 3108-3113.
- Zheng, G., & Yang, Y. C. (2004). ZNF76, a novel transcriptional repressor targeting TATA-binding protein, is modulated by sumoylation. *J Biol Chem*, 279(41), 42410-42421.

6. Anhang

6.1 Publikationen

Radine, C., Peters, D., Reese, A., Neuwahl, J., Budach, W., Jänicke, R.U. & Sohn, D. (2020). The RNA-binding protein RBM47 is a novel regulator of cell fate decisions by transcriptionally controlling the p53-p21-axis. *Cell Death Differ*, 27(4), 1274-1285.

Peters, D., Radine, C., Reese, A., Budach, W., Sohn, D. & Jänicke, R.U. (2017). The DEAD-box RNA helicase DDX41 is a novel repressor of p21^{WAF1/CIP1} mRNA translation. *J Biol Chem*, 292(20), 8331-41.

Hüsemann, L.C., Reese, A., Radine, C., Piekorz, R.P., Budach, W., Sohn, D. & Jänicke, R.U. (2020). The microtubule targeting agents eribulin and paclitaxel activate similar signaling pathways and induce cell death predominantly in a caspase-independent manner. *Cell Cycle*, 19(4), 464–478.

6.2 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die vorliegende Dissertation wurde zuvor in keiner anderen Fakultät als Promotionsleistung eingereicht. Zudem versichere ich, dass ich keine vorherigen Promotionsversuche unternommen habe.

Düsseldorf, 05. Oktober 2020

Alina Reese

6.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Reiner U. Jänicke, der mir die Möglichkeit der Anfertigung meiner Doktorarbeit im Labor für Molekulare Radioonkologie geboten hat. Des Weiteren möchte ich ihm vor allem für seine kompetente, fachliche Beratung und seine hilfreiche Unterstützung während der gesamten Zeit meinen besonderen Dank aussprechen.

Mein ausdrücklicher Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Sebastian Wesselborg für die Begutachtung meiner Arbeit und darüber hinaus für die freundliche Bereitstellung von Geräten und Räumlichkeiten seines Instituts.

Herzlich danken möchte ich außerdem Dr. Dennis Sohn für seine tatkräftige Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung meiner Doktorarbeit. Er stand mir stets bei Fragen hilfreich zur Seite und bereicherte meine Forschung durch seine Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich Claudia Radine, Judith Neuwahl, Christine Hachmann und Selina Dangeleit danken. Ich konnte mich stets auf ihre Unterstützung verlassen. Vielen Dank für das freundschaftliche Miteinander während der gemeinsamen Zeit.

Ich danke auch allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin für ihre Hilfsbereitschaft, die netten Gespräche und die angenehme Gemeinschaft, die den Arbeitsalltag bereichert haben.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihr aufgebrachtes Verständnis sowie ihre uneingeschränkte Unterstützung.