

# **Identifizierung und Charakterisierung der Funktion von IAPs in der Regulation von microRNAs in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Sina Christin Schütte**  
aus Westerstede

Düsseldorf, September 2023

aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Andreas Krieg
2. Prof. Dr. Ulrich Rütter

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2024

„Man braucht nichts im Leben zu fürchten, man muss nur alles verstehen.“  
Marie Curie

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	13
Abstract.....	15
1 Einleitung .....	17
1.1 Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Neoplasien (GEP-NEN) .....	17
1.1.1 Bisherige NEC-Onkogenese-Forschung .....	20
1.2 Überleben und Apoptose .....	21
1.2.1 Extrinsischer Weg.....	22
1.2.2 Intrinsischer Weg.....	23
1.3 <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i> -Familie (IAP) .....	24
1.3.1 XIAP (BIRC4).....	25
1.3.2 BIRC5 ( <i>Baculoviral IAP Repeat Containing 5</i> ) .....	27
1.3.3 Das Bindeglied NF- $\kappa$ B ( <i>Nuclear Factor Kappa B</i> ) .....	28
1.4 MicroRNAs (miRNA/ miR) .....	29
1.5 Zielsetzung .....	33
2 Material .....	34
2.1 Zelllinien und Bakterienstämme .....	34
2.1.1 Zelllinien.....	34
2.1.2 Bakterienstämme.....	37
2.2 Antibiotika .....	37
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	37
2.4 Chemikalien.....	38
2.5 Medien, Puffer und Lösungen .....	39
2.5.1 Zellkultur Medien .....	39
2.5.2 LB-Medium .....	39
2.5.3 Puffer .....	39
2.6 Transfektionsreagenzien, Reaktionsmixe und Enzyme .....	41
2.6.1 Transfektionsreagenzien .....	41
2.6.2 cDNA-Synthese- und PCR-Lösungen .....	41
2.6.3 Enzyme.....	41
2.7 Größenstandards.....	41
2.7.1 DNA-Leiter .....	41
2.7.2 Protein-Größenstandards .....	41
2.8 Vektoren und Expressionskonstrukte .....	41
2.9 Antikörper .....	43
2.9.1 Western Blot .....	43
2.9.1.1 Primärantikörper .....	43
2.9.1.2 Antikörper Co-Immunpräzipitation (Co-IP) .....	43
2.9.1.3 IgG-Kontrolle der Co-Immunpräzipitation .....	44
2.9.1.4 Sekundärantikörper .....	44
2.10 Real Time PCR-Primer.....	44
2.11 MicroRNA-Assays für qPCR und MirVana™ Mimics und Inhibitoren .....	45
2.12 Pri-microRNA-Assays (Thermo Fisher).....	45
2.13 Kit Systeme.....	45
2.14 Laborgeräte .....	46
2.14.1 Thermozykler .....	46
2.14.2 Sterilbänke und Inkubatoren.....	46
2.14.3 Zentrifugen.....	46
2.14.4 Kühl- und Gefrierschränke.....	46
2.14.5 Heizblöcke und Wasserbäder.....	46
2.14.6 Waagen .....	46
2.14.7 Mikroskope .....	46
2.14.8 Sonstiges .....	47
2.15 Software.....	47
3 Methoden .....	48
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	48
3.1.1 Gesamt-RNA-Isolation aus FFPE-Patientenproben.....	48
3.1.2 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanen Karzinom-Zelllinien .....	50

3.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	51
3.1.4	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription.....	51
3.1.5	Messung der RNA-Expression mittels Real-Time PCR .....	52
3.1.6	Überprüfung der Effizienz der verwendeten Oligonukleotide .....	53
3.1.7	Reverse Transkription für microRNAs .....	54
3.1.8	Messung der microRNA-Expression mittels Real-Time PCR .....	54
3.1.9	Messung der pri-microRNA-Expression mittels Real-Time PCR .....	55
3.1.10	Short-Tandem-Repeat (STR)-Analyse .....	56
3.1.11	Restriktion von Plasmiden .....	56
3.1.12	Agarose-Gelelektrophorese.....	57
3.1.13	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	57
3.1.14	Isolierung von Plasmid-DNA durch Midi- bzw. Maxipräparation .....	57
3.1.15	MicroRNA-Array-Analyse (Exiqon).....	58
3.1.15.1	Probenvorbereitung .....	58
3.1.15.2	7thGen Array .....	60
3.1.15.3	Array-Signalintensität.....	60
3.2	Proteinbiochemische Methoden .....	61
3.2.1	Präparation von Proteinlysaten aus Zelllinien .....	61
3.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	61
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	62
3.2.4	Western Blotting .....	62
3.2.5	Immunbiologische Proteindetektion.....	63
3.3	Zellbiologische Methoden .....	64
3.3.1	Passagieren von humanen Karzinom-Zelllinien .....	64
3.3.2	Gefrierkonservierung von humanen Zelllinien .....	64
3.3.3	Auftauen von Gefrierkulturen.....	65
3.3.4	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	65
3.3.5	PCR zur Detektion von Mykoplasmen.....	65
3.3.6	Einbringung von Fremd-DNA in humane Zelllinien .....	66
3.3.6.1	Transiente Transfektion .....	66
3.3.6.1.1	Reverse Transfektion.....	66
3.3.6.1.1.1	Reverse Transfektion mit FLAG-BIRC5 Plasmiden .....	67
3.3.6.1.1.2	Reverse Transfektion mit microRNA-Mimics und Inhibitoren .....	68
3.3.6.2	Behandlung der Zellkultur mit YM155 .....	69
3.3.7	Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	69
3.3.8	Scratch-Assay (Wund-Assay).....	71
3.4	Statistik .....	71
3.5	Nomenklatur .....	73
4	Ergebnisse .....	74
4.1	Transduktion der NEC-DUE-Zellen .....	74
4.1.1	Unterschiede zwischen den NEC-Zelllinien .....	79
4.2	MicroRNA-Array-Analyse der NEC-Zelllinien .....	82
4.2.1	Datenanalyse (Exiqon) .....	82
4.2.2	Bewertung der microRNA-Expressions-Analyse in den NEC .....	83
4.2.3	Auswahl der microRNAs für Folgeanalysen .....	84
4.2.4	Quantifizierung der Exiqon NEC-Array-Ergebnisse .....	87
4.3	Situation in den Primärtumoren .....	90
4.3.1	Quantifizierung der microRNA-Array-Analyse der Primärtumorproben .....	91
4.3.2	Magen-NEC-G3 .....	96
4.4	<i>Proof of Principle</i> .....	98
4.4.1	YM155-Versuche .....	98
4.4.2	Überprüfung einer Regulation in TT2609-C02 BIRC5-KD Zellen .....	100
4.4.3	<i>Rescue</i> -Versuch mittels Plasmid Transfektion .....	102
4.5	Auswirkungen der microRNA-Regulation .....	104
4.5.1	Epithelial-mesenchymale Transition (EMT).....	104
4.5.2	Wund-Assay ( <i>in vitro</i> Scratch-Assays) .....	109
4.5.3	Bestätigung von microRNA-124-3p Zielgenen .....	113
4.5.4	Mimic- und Inhibitorversuche zur Validierung der Zielgene .....	113
4.6	Analyse der BIRC5-vermittelten microRNA-Regulation .....	118

4.6.1	DICER-Versuch .....	119
4.7	Co-Immünpräzipitation (Co-IP).....	120
4.7.1	Endogene BIRC5-IP .....	120
4.7.2	Massenspektrometrische Analyse .....	122
4.7.3	Lokalisation der microRNA-Regulation.....	125
4.7.4	Pri-microRNA-Assays .....	126
4.7.5	Vergleich der TFs in NEC-DUE1 GIPZ n.s. mit BIRC5-KD .....	127
5	Diskussion.....	131
5.1	NEC-Zellkulturmodell.....	132
5.2	<i>Knockdown</i> (KD) der IAPs in NEC-DUE-Zelllinien .....	133
5.3	MicroRNA-Array-Ergebnisse .....	135
5.4	Überprüfung der NEC-Primärtumorproben .....	139
5.5	Überprüfung einer BIRC5-abhängige microRNA-Regulation .....	143
5.6	Rolle der microRNAs in NEC.....	146
5.6.1	Epithelial-mesenchymale Transition - EMT .....	147
5.6.2	Validität der microRNA-Assays .....	150
5.6.3	Migration von Tumorzellen als Teil der EMT .....	152
5.6.4	Bestätigung weiterer Zielgene der microRNA-124-3p.....	153
5.7	Suche nach dem microRNA-Regulationsmechanismus über BIRC5.....	155
5.7.1	Co-Immünpräzipitation – Co-IP .....	156
5.7.2	Diskussion der BIRC5-abhängigen microRNA-Regulation .....	160
5.7.3	Hinweise zur Art der Bindung .....	163
5.7.4	Überprüfung der Lokalisation der microRNA-Regulation .....	165
5.7.5	RNA-Bindungsproteine .....	167
5.7.6	Transkriptionsfaktoren von microRNA-Genen.....	169
5.8	MicroRNA-Expressionsmodulation als medizinische Therapie .....	172
6	Schlussfazit.....	174
7	Anhang.....	176
8	Literatur .....	195
9	Danksagung.....	212
10	Eidesstattliche Versicherung .....	213

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Zelllinien .....	34
Tab. 2	STR-Analyse der etablierten Zelllinien und korrespondierenden Primärtumoren .....	36
Tab. 3	Statistiken hinsichtlich Knockdowns.....	75
Tab. 4	Statistiken zur IAP-Expression .....	81
Tab. 5	Auswahl der in NEC-DUE1 hochregulierten microRNAs nach BIRC5-KD .....	85
Tab. 6	Statistiken zur NEC-Array-Ergebnisse .....	89
Tab. 7	Statistiken zu microRNAs in Primärtumoren .....	92
Tab. 8	Statistische Daten zu microRNAs in NEC-G3.....	95
Tab. 9	Daten der Magen-Primärtumorproben .....	96
Tab. 10	Statistiken zu microRNAs in Primärtumoren .....	97
Tab. 11	Statistiken zur YM155-Behandlung.....	100
Tab. 12	Statistiken zu TT2609-C02 nach BIRC5-KD .....	101
Tab. 13	Statistiken zur BIRC5-Plasmid-Transfektion .....	103
Tab. 14	Statistiken zu EMT-Genen nach BIRC5-KD.....	105
Tab. 15	Statistiken zur Transfektion .....	106
Tab. 16	Statistiken zu EMT-Genen nach Mimic/Inhibitor-Behandlung.....	108
Tab. 17	Statistiken zu 96 h nach Mimic-Behandlung .....	109
Tab. 18	Statistiken zum Wund-Assay .....	112
Tab. 19	Statistiken zu EMT nach Mimic/Inhibitor-Behandlung.....	115
Tab. 20	Statistiken zu EMT nach Mimic/Inhibitor-Behandlung.....	117
Tab. 21	Statistiken zur Regulation von <i>DICER</i> .....	120
Tab. 22	Einordnung der Co-IP Proteine in Signalwege .....	123
Tab. 23	Mögliche Bindungspartner aus Datenbanken .....	124
Tab. 24	Statistiken zur pri-microRNA .....	127
Tab. 25	Statistiken zu TFs.....	129

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Lokalisation von NEN. ....	18
Abb. 2	Schematische Darstellung der Lokalisationen der GEP-NEC-Zelllinien.....	20
Abb. 3	Schematische Darstellung einzelner Schritte des Apoptosevorgangs.. ..	21
Abb. 4	Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalwegs. ....	23
Abb. 5	Schematische Darstellung der einzelnen IAP-Familienmitglieder und ihrer Untereinheiten. ....	25
Abb. 6	Schematische Darstellung der IAP-Domänen und Größenvergleich von XIAP und BIRC5.....	26
Abb. 7	Schematische Darstellung des Typ 2 Apoptosesignalwegs und der Rolle der IAPs.....	26
Abb. 8	Schematische Darstellung des inflammatorischen positiven Feedback Loops. ....	29
Abb. 9	Schematische Darstellung der microRNA-Biogenese. ....	30
Abb. 10	Mikroskopische Aufnahme der Zelllinien NEC-DUE1 (oben) und NEC-DUE2 (unten).. ..	37
Abb. 11	Vektorkarten des pcDNA3.1+ Vektors.....	42
Abb. 12	HE-Schnitte zur Gesamt-RNA-Isolation aus FFPE-Gewebe. ....	48
Abb. 13	Western Blot Ergebnis des lentiviral induzierten BIRC5- und XIAP-KD.....	74
Abb. 14	Densitometrische Auswertung der Western Blot Banden zur Quantifizierung des KD.. ..	75
Abb. 15	Western Blot Ergebnis der XIAP- und BIRC5-Expression in Abhängigkeit. ....	76
Abb. 16	Western Bot Ergebnis der BIRC5-Expression in nativen NEC-DEU1 Zellen. ....	79
Abb. 17	Densitometrischer Vergleich der BIRC5- und XIAP-Expression in den Zelllinien.. ..	81
Abb. 18	Venn-Diagramm der Überschneidung der Zielgene der 3 Top-microRNAs. ....	86
Abb. 19	qRT-PCR-Analyse der microRNA-Expression in NEC-DUE1 und NEC-DUE2.....	88
Abb. 20	Quantifizierung der tumorigenen microRNAs miR-143-3p, 145-5p und 192-5p.....	92
Abb. 21	Heatmap der BIRC5-abhängigen miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p. ....	94
Abb. 22	Quantifizierung von miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p in Colon-NEC-G3-Primärtumorproben..	95
Abb. 23	Quantifizierung der microRNA-124-3p in Colon- und Magen-NEC.. ..	97
Abb. 24	YM155-Behandlung der Zelllinien .....	99
Abb. 25	Überprüfung des BIRC5-KD mittels Western Blot in TT2609-C02.....	101
Abb. 26	Analyse von miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p nach BIRC5-KD in TT2609-C02. ....	101
Abb. 27	Western Blot Ergebnis der BIRC5-Expressionsplasmide.....	102
Abb. 28	qRT-PCR-Analyse der microRNA-Expression nach Transfektion .....	103
Abb. 29	qRT-PCR-Analyse der EMT-Gene nach BIRC5-KD in NEC-DUE1. ....	105
Abb. 30	Regulation der microRNA-124-3p nach Mimic- bzw. Inhibitor-Behandlung. ....	106
Abb. 31	qRT-PCR-Analyse von <i>ZEB2</i> , <i>SNAI2</i> und <i>CDH1</i> .. ..	107

Abb. 32 Expression der miR-124-3p und 143-3p 96 h nach Mimic-Behandlung.....	109
Abb. 33 Mikroskopische Auswertung des Wund-Assays der NEC-DUE2..	111
Abb. 34 Auswertung des Wund-Assays von NEC-DUE2.....	112
Abb. 35 Western Blot Ergebnis potentieller Zielgene der miR-124-3p. ....	113
Abb. 36 qRT-PCR-Analyse der Zielgene der miR-124-3p. ....	114
Abb. 37 Western Blot Ergebnis nach miR-124-3p Mimic- und Inhibitorbehandlung.....	116
Abb. 38 Densitometrie der Western Blot Ergebnisse der Mimic- und Inhibitorbehandlung. ....	117
Abb. 39 qRT-PCR-Analyse von <i>DICER</i> nach BIRC5-KD in NEC-DUE1 und NEC-DUE2.....	119
Abb. 40 Western Blots der BIRC5-Pärzipitation der Proben für die Massenspektrometrie. ....	121
Abb. 41 qRT-PCR-Analyse der pri-microRNAs von NEC-DUE-Zellen nach BIRC5-KD.....	126
Abb. 42 Western Blot Ergebnis zum Nachweis der XRCC5- und TARDBP-Expression .....	128
Abb. 43 Densitometrie der XRCC5-Bande bei 15 kDa und TARDBP in NEC-DUE1. ....	129
Abb. 44 Schematische Darstellung der BIRC5-Domänen mit Proteininteraktionen. ....	164
Abb. 45 Schematische Zusammenfassung der BIRC5-abhängigen microRNA-Regulation.....	172

**Abkürzungsverzeichnis**\* Wert  $\leq 0,05$ \*\* Wert  $\leq 0,005$ \*\*\* Wert  $\leq 0,0005$ \*\*\*\* Wert  $\leq 0,00005$ 

°C Grad Celsius

 $\mu\text{g}$  Mikrogramm $\mu\text{l}$  Mikroliter $\mu\text{M}$  Mikromol

Abb. Abbildung

A. *dest* Aqua dest, destilliertes Wasser

Abb. Abbildung

aCGH *Array-based comparative genomic hybridization*Adj. p. Val. *Adjusted p-Value*, angepasster p-Wert nach Benjamini-Hochberg-KorrekturAGO2 *Argonaute RISC Catalytic Component 2*

AK Antikörper

APAF-1 *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*

APS Ammonium-Persulfat

AS Aminosäure

ATP Adenosintriphosphat

ATRX ATRX Chromatin Remodeler, ATP-abhängige Helikase

BIR *Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat*BIRC5 Survivin, *Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein 5*

bp Basenpaar

BRUCE BIRC6, *Baculoviral IAP Repeat Containing 6*

bspw. beispielsweise

C(t) *Cycle threshold*, Zyklusschwelle

Ca19-9 epitheliale Marker Carbohydrat-Antigen 19-9

CARD Caspase aktivierende und rekrutierende Domäne

CASP Caspase

CEA karzinoembryonisches Antigen

CD56 NCAM1, Neural Cell Adhesion Molecule 1

CDK1 Cyclin Dependent Kinase 1

CDH1 *Cadherin 1 Calcium-Dependent Adhesion Protein, epithelial*

cDNA complementary (komplementäre) DNA

CDX2 *Caudal Type Homeobox 2*

Chr Chromosom

c-IAP-1/2 *Baculoviral IAP Repeat Containing 2/3, BIRC2/3, Inhibitor Of Apoptosis Protein*

CK8/18/20 Keratin 8/18/20

CNA *copy number variations*, KopienzahlvariationCMV *human cytomegalovirus promoter*c-MYC *MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*

CPC chromosomaler Passagierkomplex

CS Cell Signaling

DARS Aspartyl-TRNA Synthetase1

DAXX Death Domain Associated Protein

DD *death domain*, Todes-Domäne

DDX DEAD-Box Helikase, ATP-abhängige RNA Helikase

Destatis StBA, Deutsches Statistisches Bundesamt

DGCR8 *PASHA DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8, Microprocessor Complex Subunit*DIABLO/Smac *IAP-Binding Mitochondrial Protein, Second Mitochondria-Derived Activator Of Caspase*DICER *Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease*DROSHA *Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease*

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphate

DSB Doppelstrangbruch

**EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure  
**FET** Proteinfamilie *FUS, EWSR1, TAF15*  
**EIF4A3** Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A3  
**ELAVL1** ELAV Like RNA Binding Protein 1  
**EMT** Epithelial-mesenchymale Transition  
**ENETS** European Neuroendocrine Tumor Society  
**FAS** Fas *cell surface death receptor*, CD95, APO1  
**FBS** fötales Kälberserum  
**FC** Fold Change, Expressionsverhältnis  
**FFPE** Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe  
**FLAG** artifizielles Tag-Protein, DYKDDDDK-Tag  
**FUS** Fused-in-Sarcoma  
**fw** *forward*, Primer in 5'-3'-Richtung  
**g** Beschleunigung  
**G3** Grad 3, Tumorstadium, schlecht differenziert  
**GAPDH** Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  
**GEP** gastroenteropankreatisch  
**GEP-NEC** gastroenteropankreatisches neuroendokrines Karzinom  
**GEP-NEN** gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasie  
**GFP** grün fluoreszierendes Protein  
**GIPZ n.s.** GIPZ lentiviral *non-silencing* Kontrollvektor  
**GOI** gene of interest, Gen von Interesse  
**GST** glutathione S-transferase, 211 AS großes Tag  
**h** Stunden  
**HE-Färbung** Hämatoxylin-Eosin-Färbung  
**HIST2H3A** Histon H3.2  
**HF** *High Fidelity*  
**HNRNP** Ribonukleoprotein, *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*  
**HPRT1** Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1  
**HRP** *Horseradish Peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase  
**HSP90** *Heat Shock Protein 90*, Hitzeschockprotein  
**HSP90AA1** *Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1*, Hitzeschockprotein  
**Hy3** Fluoreszenzfarbstoff, Hydantoin-basierter Farbstoff  
**Hy5** Fluoreszenzfarbstoff, Hydantoin-basierter Farbstoff  
**I** Invitrogen  
**IAP** *Inhibitor of Apoptosis Protein*, Apoptoseinhibitor  
**IBM** IAP-Bindungsmotiv  
**IgG** Immunglobulin G  
**IκB** NF-κB Inhibitor  
**IKK** IκBα-Kinase-Komplex  
**IL6/IL8** Interleukin6/ 8  
**ILP2** BIRC8, Inhibitor Of Apoptosis-Like Protein 2  
**INCENP** *Inner Centromere Protein*  
**IP** Immunpräzipitation  
**IRS** immunreaktiver Score  
**IQA** Interquartilabstand  
**kb** Kilobase  
**KD** *Knockdown*  
**kDa** Kilodalton  
**KEGG** *Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes*  
**Ki-67** MIB-1, Protein, Zellteilungsmarker, Mitosemarker, Proliferationsmarker  
**KHDRBS3** *KH RNA Binding Domain Containing, Signal Transduction Associated 3*  
**KO** *Knockout*  
**KRAS** KRAS Proto-Onkogen  
**LIN28B** Lin-28 Homolog B  
**LN MET** Lymphknotenmetastase  
**log2** Logarithmus zur Basis 2  
**LRR** *Leucin-rich repeat*, Leucin-reiche Aminosäuresequenz

**M** Mol  
**mA** Milliampere  
**mAB** monoklonaler Antikörper  
**MARS** Methionyl-TRNA Synthetase1  
**MBNL1** *Muscleblind Like Splicing Regulator 1*  
**MCM5** *Minichromosome Maintenance Complex Component 5*  
**MCS** Multiple Cloning Site  
**MENT1** *Methylated in normal thymocytes protein*  
**Mdn** Median  
**mg** Milligramm  
**MIB-1** Protein Ki-67, Proliferationsmarker, Zellteilungsmarker, Mitosemarker  
**min** Minuten  
**ml** Milliliter  
**MLIAP** BIRC7, Melanoma Inhibitor Of Apoptosis Protein  
**MOMP** *mitochondrial outer membrane permeabilization*  
**MRE** microRNA response element, microRNA-Antwortelement  
**mRNA** *messenger-RNA*, Boten-Ribonukleinsäure  
**MSI2** Musashi RNA Binding Protein 2  
**MW** Mittelwert  
**n** Anzahl  
**NACHT** Domäne bestehend aus NAIP, CIITA, HET-E und TEP1  
**NaOH** Natriumhydroxid  
**NAIP** BIRC1, NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein  
**NB** Novus Biologicals  
**NCBI** *National Center for Biotechnology Information*  
**NCCD** Nomenclature Committee on Cell Death  
**NEC** neuroendokrines Karzinom  
**NEN** neuroendokrine Neoplasie  
**NES** nukleäres Exportsignal, Kernexportsignal  
**NET** neuroendokriner Tumor  
**NF- $\kappa$ B** *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*  
**NG** Normalisierungsgen (z. B.: GAPDH, HPRT1, TBP)  
**NGW** Normalgewebe  
**ng** Nanogramm  
**nm** Nanometer  
**NLS** nukleäres Lokalisationssignal, Kernlokalisierungssignal  
**n. s.** nicht signifikant, Wert ist > 0,05  
**OD** Optische Dichte  
**o. g.** oben genannt  
**ORF** *open reading frame*, offener Leserahmen  
**P** Passage  
**pAB** polyklonaler Antikörper  
**PBS** *Phosphate-buffered saline*, phosphatgepufferte Kochsalzlösung  
**PCBP2** *Poly (RC) Binding Protein 2*  
**PCR** Polymerasekettenreaktion  
**PCA** *Principal Component Analysis*, Hauptkomponentenanalyse  
**POL2** *POLR2A RNA Polymerase II Subunit A*  
**PT** Primärtumor  
**PZT** programmierte Zelltod  
**qPCR** quantitative PCR  
**qRT-PCR** quantitative Reverse Transkriptase PCR  
**RAN-GTPase** *Member RAS Oncogene Family*  
**RB1** *RB transcriptional Corepressor 1*  
**RBM** *RNA-binding-motiv*, RNA-Bindungsstelle, RNA-Bindungsmotiv  
**RBP** *RNA-binding-protein*, RNA-Bindungsprotein  
**RELA** P65 Proto-Onkogen, NF-KB Untereinheit  
**RIN** RNA Integritätsnummer  
**RING** *Really Interesting New Gene*-Domäne

**RIP2** Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 2  
**RISC** *RNA-induced silencing complex*  
**RNA** Ribonukleinsäure  
**RT** Raumtemperatur  
**RZT** regulierter Zelltod  
**SD** Standardabweichung  
**SDS** *Sodium Dodecyl Sulfat*, Natriumdodecylsulfat  
**Sek** Sekunde  
**shRNA** *small hairpin RNA*  
**SNAI2** *Snail Family Transcriptional Repressor 2*  
**SP** Stichprobenzahl  
**SSTR2A/SSTR5** Somatostatin-Rezeptoren  
**STAT3** *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*  
**STR** short tandem repeats, Mikrosatelliten  
**s. o.** siehe oben  
**s. u.** siehe unten  
**Tab.** Tabelle  
**TAB1** *TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 1*  
**TAK1** MAP3K7, *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7*  
**TARDBP (TDP-43)** *TAR DNA Binding Protein*  
**TBP** *TATA-Box Binding Protein*, TATA-Bindeprotein  
**TF** Transkriptionsfaktor  
**TGW** Tumorgewebe  
**TNF** Tumor-Nekrose-Faktor  
**TP53** Tumor Protein P53  
**TPX2** *Targeting Protein For Xklp2, TPX2 Microtubule Nucleation Factor*  
**TRBP** *RISC-Loading Complex Subunit* TARBP2, TAR RNA-Binding Protein 2  
**TTF-1** thyroider Transkriptionsfaktor 1  
**TUBA1A/TUBA3E** Tubulin, Tubulin Alpha 1a/ Tubulin Alpha 3e  
**U6 snRNA** eine nicht kodierende kleine nukleäre RNA, *small nuclear RNA*  
**u. a.** unter anderem  
**UBA** Ubiquitin-assoziierte Domäne  
**UKD** Uniklinik Düsseldorf  
**VMAT1/VMAT2** vesikulärer Monoamintransporter  
**U-Test** Mann-Whitney-Test  
**UNG** Uracil-DNA-Glykosylase Enzym  
**UV** Ultraviolett  
**WB** Western Blot  
**WHO** World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation  
**XAF1** *X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-associated factor 1*  
**XIAP (BIRC4)** *XIAP X-Linked Inhibitor Of Apoptosis, Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein 4*  
**WT** Wildtyp, repräsentiert die Normalform  
**XPOT5** Exportin For tRNA  
**XRCC5** Ku80 *X-Ray Repair Cross Complementing 5*  
**XRCC6** Ku70 *X-Ray Repair Cross Complementing 6*  
**YM155** Sepantronium Bromide  
**z. B.** zum Beispiel  
**ZEB2** *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2*  
**z. T.** zum Teil

## Zusammenfassung

Die gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN) sind eine seltene Gruppe von Tumoren. Aufgrund ihres Ursprungs aus dem diffusen neuroendokrinen System können sie in allen Teilen des Gastrointestinaltraktes auftreten, wodurch sie biologisch und in ihrem klinischen Verlauf eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren darstellen. Diese Eigenschaften erschweren die Therapierbarkeit von Patienten mit GEP-NEN. Zusätzlich weisen bereits 70 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose Fernmetastasen auf, was komplexe und höchst individuelle Therapieansätze notwendig macht. Insbesondere für die aggressivere Untergruppe der GEP-NEC (neuroendokrine Karzinome) besteht ein großer Bedarf an verbesserten Therapieverfahren, da die Überlebensprognose für Patienten mit Metastasen durchschnittlich gerade mal 5 Monate beträgt.

Die Behandlung der GEP-NEC mit zytotoxischen Medikamenten, die Apoptose induzieren, erweist sich bisher als ineffektiv. Die Tumore zeigen hier eine hohe Resistenz. Vorarbeiten konnten bereits zeigen, dass zwei Mitglieder der IAP- (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) Familie, XIAP (*X-Linked IAP*) und BIRC5 (*Baculoviral IAP Repeat Containing 5*), im Rahmen ihrer namensgebenden Funktion relevant für das unkontrollierte Wachstum der GEP-NEC sind.

Es entstand die Hypothese, dass gerade ein XIAP-BIRC5-Komplex eine aktivierende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor (TF) NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*) hat. NF- $\kappa$ B ist an der Regulierung tumorogener microRNAs beteiligt und könnte daher eine neue Verbindung der IAPs zur microRNA-Biogenese herstellen. Diese neue Funktion soll in dieser Arbeit untersucht werden, da microRNAs wichtige tumorsuppressive und tumorogene post-transkriptionelle Genregulatoren sind und daher zu neuen Therapieansätzen führen könnten.

Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden die etablierten Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 als neuroendokrine Tumorzelllinienmodelle verwendet. Die Zelllinien wurden nach lentiviralem *Knockdown* (KD) beider IAPs im Rahmen einer globalen Array-Analyse auf ihr microRNA-Expressionsmuster überprüft. Als Ergebnis zeigte sich eine signifikante Deregulation einer microRNA-Subpopulation ausschließlich in Abhängigkeit der BIRC5-Expression. In einer zweiten Analyse wurden Primärtumore von NEC-Patienten miteinbezogen, die zusätzliche, ausschließlich tumorabhängig deregulierte, microRNAs lieferte. Hierzu gehörte das im Tumorgewebe herunterregulierte, generell tumorsuppressive miR-143/145-Cluster.

Anschließend erfolgte die quantitative Analyse der z.T. bekannten und für die NEC-Forschung vielversprechendsten anti-tumorogenen microRNAs, mittels entsprechender microRNA-Assays im Rahmen der qRT-PCR. Hierdurch konnten BIRC5-abhängige microRNAs in den Zelllinien, aber auch den Patientenproben bestätigt werden. Zu ihnen gehören die nach BIRC5-KD stärkste hochregulierte neuronale miR-124-3p und 2 microRNAs des miR-24-1-Clusters. Diese Kandidaten wurden in Plasmid-*Rescue*-Versuchen in den NEC-KD Zellen und BIRC5-Inhibitorversuchen bestätigt. Western Blot und qRT-PCR-Analysen mit miR-124-3p Mimic- und

Inhibitor-Behandlungen zeigten eine Relevanz dieser microRNA für die epithelial-mesenchymal Transition in NEC, die eine Voraussetzung für die Bildung von Metastasen ist.

Co-Immünpräzipitationsversuche, unterstützt von qRT-PCR-Analysen der pri-microRNA-Expression, sollten Hinweise zum Mechanismus einer BIRC5-vermittelten microRNA-Regulation liefern. Die Ergebnisse liefern erste Hinweise eines selektiven, im Zellkern lokalisierten Prozesses. Möglich wäre dies durch die Regulation von RNA-Bindungsproteinen (RBP), welche gerade die pri-microRNA-Prozessierung beeinflussen. Alternativ wäre die Regulation von TFs von microRNA-Genen denkbar. Eine BIRC5-Überexpression in NEC könnte über diese zwei Wege, ergänzend zur dualen Funktion in Zellteilung und Apoptose, also ein onkogenes microRNA-Expressionsmuster fördern.

Durch die hier gezeigten Analysen ließen sich mögliche microRNA-Kandidaten für neue Therapieansätze der GEP-NEC finden, wodurch eine Kombinationsbehandlung von antitumorigenen microRNAs und BIRC5-Inhibitoren denkbar wird. MicroRNAs mit einer hohen Zahl an Zielgenen mögen hierbei besonders effektiv und potent wirken, könnten aber auch vermehrt zu Nebenwirkungen durch Regulation unerwünschter Gene führen. Inwieweit microRNAs also tatsächlich anwendbar wären, bleibt fraglich und müsste für jeden Fall eingehend untersucht werden. Zusätzlich mangelt es noch an geeigneten Methoden zur gezielten Verabreichung der microRNAs mit möglichst wenig Nebenwirkungen für den Patienten.

## Abstract

The gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms (GEP-NEN) are a rare group of tumours. Because of their origin in the diffuse neuroendocrine system, these tumours arise in all parts of the gastrointestinal tract and are therefore biological and in their clinical progression a heterogenous group of tumours. These features complicate the therapy of patients with GEP-NEN. Additionally, at the timepoint of diagnosis 70 % of patients already developed distant metastasis which make complex and individual therapies necessary. Especially the aggressive subgroup of GEP-NEC (neuroendocrine carcinoma) needs new therapy methods, given that the median survival of patients with metastasis average out at 5 months.

The treatment of GEP-NEC with cytotoxic medications, aiming at the induction of apoptosis, turned out to be highly ineffective. These tumours show a high resistance. Preliminary results showed that two members of the IAP- (Inhibitor of Apoptosis Protein) Family, XIAP (X-Linked IAP) und BIRC5 (Baculoviral IAP Repeat Containing 5) are functionally relevant for the uncontrolled growth of the GEP-NEC. Both IAPs work tightly together in the apoptosis inhibition and are therefore of high interests for investigating new treatment approaches.

Additionally, the hypothesis arose that an XIAP-BIRC5 complex has an activating effect on the transcription factor (TF) NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B). NF- $\kappa$ B is involved in the regulation of tumorigenic microRNAs and might therefore link the IAPs to microRNA biogenesis. This new function is promising, because microRNAs are important tumour-suppressive and tumorigenic post-transcriptional gene regulators and might lead to new therapy approaches.

In order to investigate these connections, the well-established cell lines NEC-DUE1 and NEC-DUE2 were used as neuroendocrine cancer cell line model. They were provided with a lentiviral knockdown (KD) of both IAPs and analysed in a global array-analysis for their microRNA-expression pattern. As a result, a significant deregulated microRNA subpopulation was shown exclusively in dependence of the BIRC5-expression. Primaries of NEC-patients were included in a second analysis, which showed exclusively tumour-dependent deregulated microRNAs. Especially the tumour-suppressive miR-143/145-cluster was deregulated in tumour tissue.

Subsequently, the quantitative analysis of the anti-tumorigenic microRNAs, some of which are known and most conspicuous for NEC research, was carried out using corresponding microRNA assays in the context of qRT-PCR. Hereby, BIRC5-dependent microRNAs have been confirmed in cell lines, but also in patient probes. To these belong that the strongest upregulated neuronal microRNA (after BIRC5-KD) miR-124-3p and 2 microRNAs of the miR-24-1-cluster. These candidates were confirmed in plasmid-rescue-experiments in NEC-KD cells and BIRC5-inhibitor experiments. Western Blot and qRT-PCR-analysis with miR-124-3p mimic- and inhibitor-treatment showed the relevance of the microRNAs for the epithelial-mesenchymal transition in NEC, which is a precondition for the development of metastasis.

Co-immunoprecipitation experiments, supported by qRT-PCR analysis of the pri-microRNA expression, were expected to give first clues for a BIRC5-supported microRNA regulation. The results so far indicate a selective process localized in the cell nucleus. This might be possible through the regulation of RNA-binding proteins (RBP), which affect exactly the pri-microRNA processing. Alternatively, a regulation of TFs of microRNA-genes might be possible. A BIRC5-overexpression in NEC might, additional to the dual function in mitosis and apoptosis, influence an oncogenic microRNA-expression pattern.

Through the here shown analysis microRNA candidates for a new therapeutic approach of the GEP-NEC might be identified, whereby a combinational treatment of anti-tumorigenic microRNAs and BIRC5-inhibitors are possible. MicroRNA with a high number of target genes might seem particularly effective and potent, but could lead to increased side effects through the regulation of unwanted genes. To what extent microRNAs are really applicable, is still questionable and has to be further investigated. Additionally, there is a lack of methods for a well-directed application of microRNAs with feasible low side-effects for the patient.

## 1 Einleitung

Anlässlich des Weltkrebstages 2020 teilte das Deutsche Statistische Bundesamt (Destatis) mit, dass knapp 1,45 Millionen Menschen aufgrund von malignen Neoplasien in deutschen Krankenhäusern versorgt wurden. In diesem Jahr war Krebs mit rund 231 000 Todesfällen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Obwohl durch die generell steigende Lebenserwartung das Krebsrisiko steigt und die Zahl der Krebstoten in den vergangenen 10 Jahren um rund 10 Prozent zugenommen hat, reduzieren eine immer besser werdende Prävention und Therapierbarkeit das Risiko für den Einzelnen (Destatis Pressemitteilung N 010 2021).

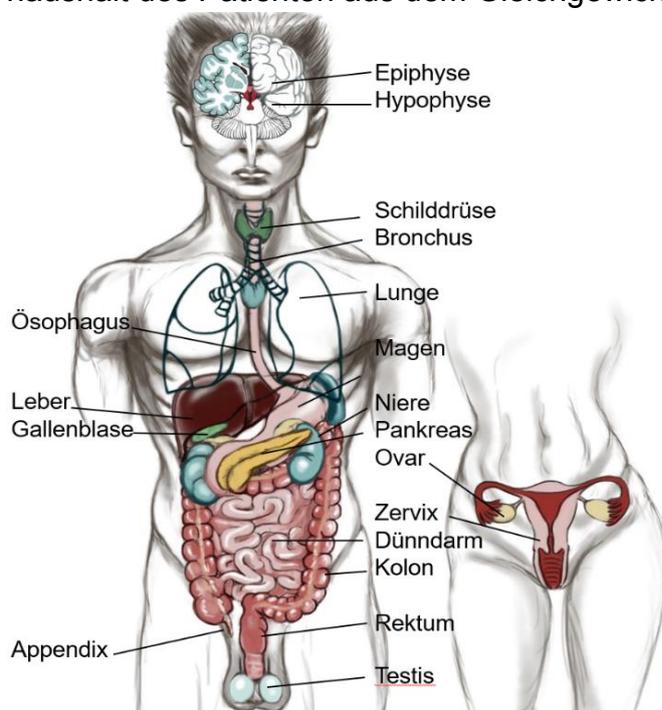
Eine Erkrankung, die sich aus dem eigenen Körper entwickelt, unkontrolliert wächst und in einer Vielzahl von Varianten auftritt, erschwert ihre Behandlung auf vielfältige Weise. Das Ziel der Krebsforschung ist ein schrittweises Verstehen der Tumorigenese von Zellen, um alternative Behandlungsmöglichkeiten für Patienten zu finden. Im Fokus dieser Arbeit stehen daher Zell-interne Vorgänge der seltenen Krebserkrankung der gastroenteropankreatischen Neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN), die zur Therapierbarkeit beitragen könnten.

### 1.1 Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Neoplasien (GEP-NEN)

Maligne Neoplasien werden als bösartige körpereigene Neubildungen definiert. Sie entstehen aus abnormen, unkontrolliert wachsenden Zellen, die sich in andere Bereiche des Körpers und Organe als sogenannte Metastasen ausbreiten (World Health Organisation (WHO) 2022). Die Haupttodesursache ist letztlich die Bildung der Fernmetastasen und die Raumforderung durch unkontrolliertes Wachstum (Fidler 1990). Die bekanntesten Krebserkrankungen sind Lungen-, Colon-, Brust- und Prostatakrebs (WHO 2022). Die GEP-NEN stellen eine seltene Gruppe von Tumoren dar, deren Inzidenz sich aber durch verbesserte Diagnoseverfahren auf 3,65 Fälle pro 100 000 Einwohner in den letzten 10 Jahren erhöht hat. Hierdurch wurde auch das Interesse an diesen Tumoren größer (Lawrence et al. 2011, Yao et al. 2008).

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) entwickeln sich aus neuroendokrinen Zellen und können daher in verschiedensten Bereichen des Körpers auftreten, darunter Lunge, Magen, Darm und Pankreas (s. Abb. 1) (van Riet et al. 2021). Dies macht sie zu einer äußerst heterogenen Gruppe von Tumoren. Insgesamt treten etwa 75 % aller NEN im gastroenteropankreatischen (GEP) System auf und entstammen somit dem diffusen neuroendokrinen System (Modlin et al. 1997, Lloyd et al. 2009) (s. Abb. 2).

Die aktuelle WHO-Klassifikation (5te Ausgabe) unterteilt die NEN in gut differenzierte neuroendokrine Tumore (NET) und gering differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC) (Lloyd et al. 2017, Rindi et al. 2018). Die NEC werden zusätzlich in einen klein- oder großzelligen Typ unterteilt. NECs sind biologisch und klinisch hoch aggressiv und immer Grad 3 (G3. Ki-67- (Proliferationsmarker) Index  $> 20\%$ , Mitose-Index  $> 20$ ), während NETs unterschiedlich eingestuft werden können. Entsprechend ihrer Wachstumsrate werden demzufolge hochdifferenzierte Grad 1 NET (G1: Ki-67-Index  $< 3\%$ , Mitose-Index  $< 2$ ), Grad 2 NET (G2: Ki-67-Index  $3 - 20\%$ , Mitose-Index  $2-20$ ) und schlecht differenzierte Grad 3 NET (G3. Ki-67-Index  $> 20\%$ , Mitose-Index  $> 20$ ) unterschieden (Klöppel et al. 2009). Aus der neuroendokrinen Abstammung der NEN ergeben sich übergeordnete immunhistochemische und morphologische Übereinstimmungen. Sie exprimieren typische Marker, wie Synaphophysin und Chromogranin A (Rindi et al. 1986, Buffa et al. 1987, Wiedermann et al. 1998, Yao et al. 2008), und bilden neurosekretorische Granula, die Peptide und Hormone enthalten können (Pearse 1969, Krieg et al. 2014). Hieraus entsteht die Problematik, dass 30 bis 40 % der NET funktionell aktiv sind. Die Sekretion von Hormonen (wie Insulin) kann den Hormonhaushalt des Patienten aus dem Gleichgewicht bringen (Öberg 2018).



**Abb. 1 Schematische Darstellung der Lokalisation von NEN.** Primärtumore können in allem Hormonproduzierenden Zellen des neuroendokrinen und diffusen neuroendokrinen Systems entstehen. Metastasen können begleitend in Lunge, Leber und Knochen auftreten (s. Abb. 2). (Informationen und Vorlagen: O’Dorisio und Vinik 2014, 2014 WebMD, LLC, Medical gallery of Blausen Medical 2014, Schunke et al. 2017, Pape et al. 2000, van Riet et al. 2021, Begum et al. 2014).

Aufgrund der genannten Übereinstimmungen könnte eine entwicklungsbiologische Verwandtschaft zwischen NEC und NET vermutet werden. Die Abstammung der Progenitorzellen aus unterschiedlichen Organen und Mutationsanalysen zeigen aber, dass dies nicht der Fall ist. Eine Zweiteilung der NEN wird hierzu genetisch untermauert und betrifft Mutationen der Gene *MENT1* (*Methylated in normal thymocytes*

*protein*), *DAXX* (Death Domain Associated Protein) und *ATRX* (ATP-abhängige Heli-kase *ATRX*) in NET und der Gene *TP53* (Tumor Protein P53) und *RB1* (*RB transcrip-tional Corepressor 1*) in NEC-Tumoren (Woischke et al. 2020, Simbolo et al. 2017, Ali et al. 2017, Negtegaal et al. 2019, Rindi et al. 2018, van Riet et al. 2021).

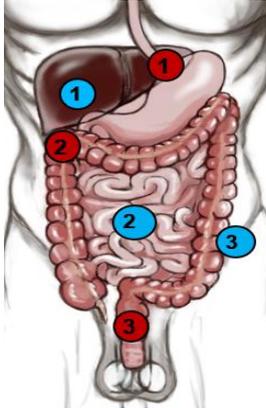
Die Heterogenität der GEP-NEN spiegelt sich zusammenfassend in ihrer abweichen-den Lokalisation, biologischen Verhalten und klinischen Verlauf wider. Diese Eigen-schaften und ihre Seltenheit erschweren die Therapierbarkeit von Patienten mit NEN. Die ENETS- (Europäische Gesellschaft für Neuroendokrine Tumoren) Leitlinien emp-fehlen bisher eine radikale chirurgische Resektion mit kurativer Zielsetzung. Zum Zeit-punkt der Diagnose haben bereits 70 % der Patienten Fernmetastasen. Da es an evi-denzbasierten chirurgischen Therapieempfehlungen mangelt, kann nur auf Experten-Empfehlungen basierende und an den jeweiligen Patienten angepasste Therapiekon-zepte zurückgegriffen werden (Schott et al. 2011, Krausch et al. 2014). Für Patienten mit metastasierten NEC beträgt die Prognose durchschnittlich gerade mal 5 Monate (Pavel et al. 2012).

Der Grund für die schlechte Prognose ist, dass die GEP-NEC eine auffällige Resistenz gegenüber der Induktion der Apoptose aufweisen und daher schlecht auf eine zytoto-xische Therapie ansprechen (Fazio et al. 2013). Das heißt, dass die konventionelle Erstlinientherapie mit Chemotherapeutika wie Cisplatin (Carboplatin) und Etoposid nicht ausreichend für eine Heilung ist (Turner et al. 2010, Meyer et al. 2014) und drin-gend neue Therapieansätze benötigt werden.

Prof. I. Bernard Weinstein prägte den Begriff der „onkogenen Abhängigkeit“. Es han-delt sich um das Phänomen, dass Krebszellen genetische, epigenetische und chromo-somale Abweichungen in einem so hohen Maß aufweisen, dass sie von einem oder mehreren Genen abhängig werden, um ihren malignen Phänotyp zu erhalten, überle-ben und sogar proliferieren zu können. Diese „Onkogene werden zur Achillesferse“ der jeweiligen Krebserkrankung und werden nach Identifikation dieser Gene behandelbar (Weinstein und Joe 2006). Dies wäre ein idealer Ansatz. Er führt von einer aufwändi-gen und individuell angepassten Therapie weg und zu einer allgemein anwendbaren, zielgerichteten und schnell durchführbaren Therapie, von der ein Großteil der Patien-ten profitiert.

Damit dies für die NEC-Patienten erreicht wird, ist ein besseres Verständnis der Tu-morbiologie und der molekularen Resistenzmechanismen der NEC notwendig. Für die präklinische Erforschung innovativer Therapiealternativen wurde daher ein geeignetes

*in vitro* und *in vivo* System etabliert. Die Arbeitsgruppe Krieg hat in den letzten Jahren 3 permanente Zelllinien aus chirurgischen Resektaten von GEP-NEC-Patienten gewonnen (Krieg et al. 2014, Dizdar et al. 2018). Diese Zelllinien eignen sich aufgrund der bereits vorhandenen Datenlage als Versuchsmodell. So gehören die Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 zum großzelligen Typ, während die NEC-DUE3 dem kleinzelligen Typ zugeordnet werden (s. 2.1.1).



**Abb. 2 Schematische Darstellung der Lokalisationen der GEP-NEC-Zelllinien.** Die Primärtumore wurden in typischen Bereichen des GEP-Systems gefunden. Rot steht hierbei für den Primarius und blau für die entnommene Lymphknotenmetastase zur Herstellung der Zelllinie. Die Zahlen entsprechen der Zelllinie NEC-DUE1 (1), NEC-DUE2 (2) und NEC-DUE3 (3). Die Abb. wurde eigenständig nach Vorlage (s. Abb. 1) erstellt.

### 1.1.1 Bisherige NEC-Onkogenese-Forschung

Die aggressiven NECs zeigen klinisch ein schnelles Wachstum und eine hohe Proliferationsrate (Grad 3 NEC). Eine Behandlung wird aufgrund des schlechten Ansprechens der NEC auf zytotoxische Medikamente erschwert. Das gestörte Gleichgewicht zwischen Zelltod und Überleben ist eines der Hauptmerkmale von Krebserkrankungen (Hanahan und Weinberg 2000). In Vorarbeiten wurden mögliche molekulare Mitspieler untersucht, die den Krebszellen ihr Überleben ermöglichten. Die Mitglieder einer Proteinfamilie haben namensgebend die Funktion, den programmierten Zelltod, die Induktion der Apoptose, zu inhibieren. Bisher wurden in Menschen 8 IAP- (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) Familienmitglieder identifiziert, von denen BIRC5 (*Baculoviral IAP Repeat Containing 5*, Survivin) und XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*, BIRC4) die bekanntesten Vertreter darstellen (de Almagro und Vucic 2012). Zusätzlich zu ihren antiapoptotischen Eigenschaften haben sie auch eine Funktion in der Regulation rezeptorvermittelter Signalwege, Zellteilung und Metastasierung (Garrison et al. 2010, Dizdar et al. 2017, Krieg et al. 2009, Mehrotra et al. 2010).

Das humane NEC-Krebszelllinienmodell lieferte weiterführende Daten in der Studie von Dizdar et al. (2017). Hier zeigte sich die funktionelle Relevanz der IAPs für die Aufrechterhaltung der Malignität der GEP-NEN. Der *Knockdown* von jeweils XIAP und BIRC5 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte zu reduziertem Tumorwachstum. Die immunhistochemische Überprüfung von NEN-Patientenproben ergab eine erhöhte Expression von BIRC5, vor allem in den hochproliferativen NEC. Der Einsatz des BIRC5-

Inhibitors YM155 (Sepantronium bromide) bewirkte eine Reduktion der Zellviabilität und des Wachstums von GEP-NEC-Xenotransplantaten. Eine Metaanalyse von immunhistochemischen GEP-NEN-Datensätzen verband insbesondere nukleäres BIRC5 mit einer ungünstigen Patientenprognose (Krieg et al. 2022).

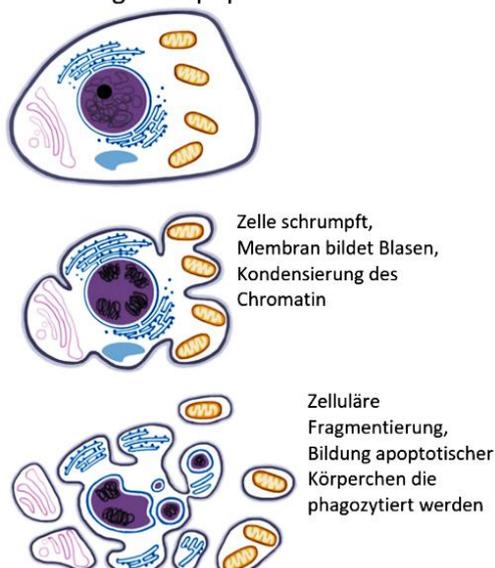
Zusammenfassend weist die Arbeit von Dizdar et al. (2017) BIRC5 und XIAP als entscheidende funktionelle Akteure bei der Modulation von Zellproliferation und Tumorstromwachstum der GEP-NEC-Krebserkrankung aus.

## 1.2 Überleben und Apoptose

Die Umgehung der Apoptoseinduktion ist einer der Hauptschwerpunkte der Onkogenese. Mit dem Begriff Apoptose wird häufig der programmierte Zelltod (PZT) gleichgesetzt. Das *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD 2018) hat Definitionsempfehlungen für die betreffenden Vorgänge zusammengefasst.

Der programmierte Zelltod (PZT) ist eine Form des regulierten Zelltodes (RZT) und kann nur unter strikten physiologischen Vorgaben ablaufen. Innerhalb der Zelle gibt es unter normalen Bedingungen ein Gleichgewicht von pro- und antiapoptotischen Signalen. Überwiegen erstere, wird der Zelltod aktiv von der Zelle eingeleitet und ist nicht lediglich eine Folge schädlicher Einflüsse. Als Auslöser sind Störungen der Homeostase und zelluläre Stresssignale nicht zwingend notwendig. Da er über ein oder mehrere Signalmoleküle aktiviert wird, kann er auch pharmakologisch oder genetisch moduliert werden. Weitere Formen des RZT sind bspw. Autophagie, Nekroptose, mitotischer Zelltod (mitotische Katastrophe) und Verhornung. Der RZT ist an nicht umkehrbaren, morphologischen Veränderungen der Zelle erkennbar (s. Abb. 3) und ist ein natürlicher und notwendiger Vorgang (Galluzzi et al. 2018 - NCCD).

Initiierung der Apoptose in kranken Zelle



**Abb. 3 Schematische Darstellung einzelner Schritte des Apoptosevorgangs.** (Vorlage: Boujard et al. 2014) Mikroskopisch kann beobachtet werden, wie apoptotische Zellen sich zunächst abkugeln, schrumpfen und in kleine Vesikel abschnüren (Blebbing), die letztlich durch Makrophagen aufgenommen werden. Der Prozess kann von der Nekrose durch den Erhalt der Zellmembran unterschieden werden (Informationen und Vorlagen: Kramer 2000).

Überflüssige und beschädigte Zellen werden bei der Wundheilung eliminiert (Pasparakis und Vandenabeele 2015, Johnson et al. 2008, Gurtner et al. 2008). Während der Embryonalentwicklung werden u. a. Zellen bei der Trennung von Zehen und Fingern abgebaut (Alberts et al. 2008) und im adulten Organismus dient der RZT der Erhaltung der Homeostase (Gurtner et al. 2008, Kaczanowski 2016).

Die wichtigste Aufgabe der RZT für die Tumorforschung ist die Eliminierung potentiell schädlicher Zellen. Krebszellen weisen aufgrund fehlerhafter Chromosomentrennung eine erhöhte genomische Instabilität auf (Boveri 1914, Novak 2005). Bei Anhäufung von DNA-Schäden greifen in normalen Zellen multizellulärer Organismen Mechanismen, die Apoptose einleiten. Schadhafte Zellen werden eliminiert, bevor sie nachteilig werden können. Die Apoptose wird zu einem „altruistischen Selbstmord“. Die beschädigte Einheit (Zelle) opfert sich für das Ganze (Organismus) (Kaczanowski 2016). Greift dieser Mechanismus nicht, führt die Anhäufung von DNA-Schäden zur Tumorigenese, insbesondere wenn Onkogene amplifiziert oder anti-tumorigene Gene deletiert werden (Norbury und Zhivotovsky 2004, Eckelman und Salvesen 2006, Caswell und Swanton 2017, Marusyk und Polyak 2009). So wird *C-MYC* als Proto-Onkogen beschrieben, dessen Amplifikation eine bekannte molekulare Veränderung in Krebszellen ist (Dang et al. 1999, Greulich et al. 2000). Weitere bekannte Beispiele sind *TP53*- (Tumor Protein P53, pro-apoptotisch, Chromosom 17p) und *KRAS*- (*KRAS* Proto-Onkogen, GTPase, Chromosom 12p) Alterationen (Hollstein et al. 1991, Woschke et al. 2020, Oliver et al. 2010, *The Cancer Genome Atlas Network* 2012).

Die Apoptose kann über zwei Signalwege ausgelöst werden, die intrinsische und die extrinsische Apoptose.

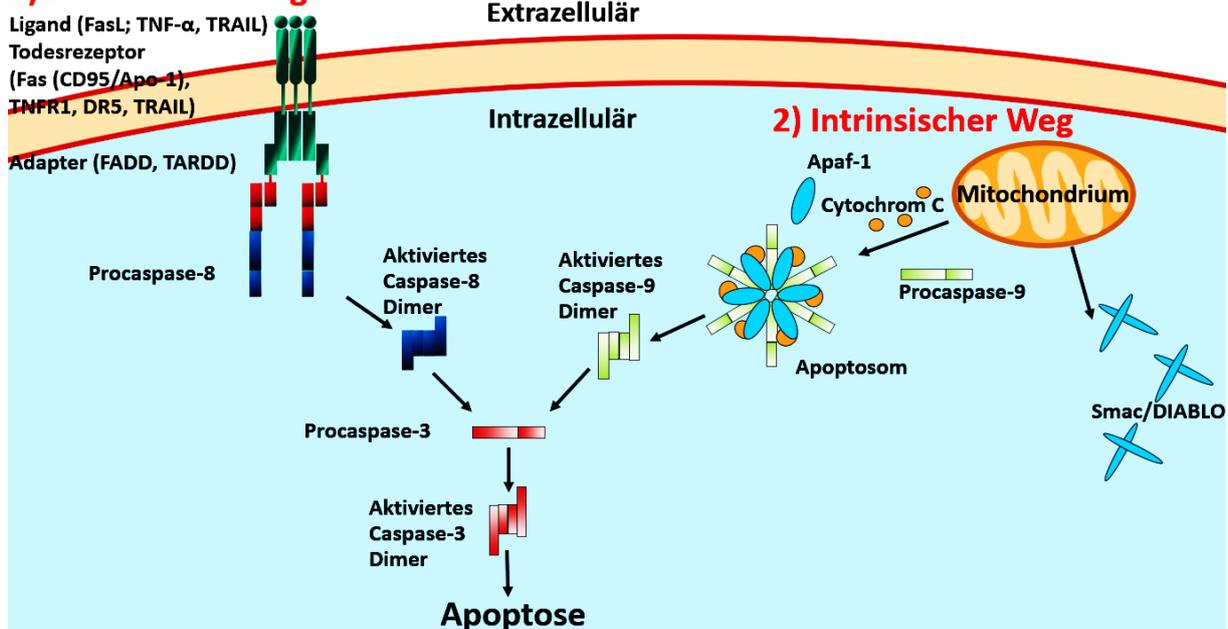
### 1.2.1 Extrinsischer Weg

Die extrinsische Apoptose wird durch extrazelluläre Stresssignale initiiert und durch die Todesrezeptoren, wie den TNF-Rezeptor (Tumor-Nekrose-Faktor) oder FAS (Fas *cell surface death receptor*, CD95, APO1) in der Plasmamembran detektiert. Todesrezeptoren tragen eine zytoplasmatische Todes-Domäne (DD – *death domain*), die nach Konformationsänderung durch Bindung eines Liganden (Todessignal) eine Signalkaskade auslöst, die die Aktivierung der Initiator-Caspase CASP8 (Caspase-8) beinhaltet und durch Effektor-Caspase CASP3 (Caspase-3) weitergeleitet wird (Krammer 2000, Galluzzi et al. 2018).

## 1.2.2 Intrinsischer Weg

Die intrinsische Apoptose wird durch inner- oder extrazelluläre Stresssignale eingeleitet. Hierzu gehören DNA-Schäden, oxidativer Stress und Stress des endoplasmatischen Retikulums, Replikationsstress oder mitotische Defekte (Vitale et al. 2011, Pihán et al. 2017, Li et al. 2001, Galluzzi et al. 2018). Überwiegen diese Signale wird die äußere Mitochondrienmembran durchlässig (*mitochondrial outer membrane permeabilization* - MOMP). Dieser Vorgang ist entscheidend für die intrinsische Apoptose und irreversibel (Tait et al. 2010, Galluzzi et al. 2016). Nach MOMP werden weitere pro-apoptische Signalmoleküle in das Zytoplasma abgegeben, darunter Cytochrom C und Smac/DIABLO (*Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase*) (Li et al. 2001, Chai et al. 2000). Diese führen zur Freisetzung weiterer pro-apoptischer Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Die ATP-abhängige (Adenosintriphosphat) Bindung von Cytochrom C und APAF-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) bildet den Apoptosom-Komplex. Dieser ermöglicht die Rekrutierung der Initiator-Caspase CASP9 zur Aktivierung der Caspasekaskade mittels enzymatischer Spaltung von Pro-CASP3 (s. Abb. 4) (Zou et al. 1999, Li et al. 1997). Die aktivierte Effektor-Caspase CASP3 treibt die intrinsische Apoptose voran, ist aber nicht von ihr abhängig. Caspase-hemmende Stoffe können diesen Weg nicht gänzlich inhibieren, sondern nur verzögern (Galluzzi et al. 2015, Marsden et al. 2002).

### 1) Extrinsischer Weg



**Abb. 4 Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalwegs.** Beide Signalwege werden durch die Caspasekaskade vorangetrieben. Bekannt sind zwölf humane Caspasen (teilweise dargestellt). Caspase-2, Caspase-8,-9 und Caspase-10 sind die Initiator-Caspasen, die beide Signalwege fortsetzen und durch Proteolyse die Effektor-Caspase-3, 6 und 7 aktivieren, die nachfolgende zelluläre Apoptoseproteine schneiden. (Informationen und Vorlagen: Holcik und Korneluk 2001, Lemke et al. 2014, de Almagro und Vucic 2012, Shi 2002, Fox et al. 2016).

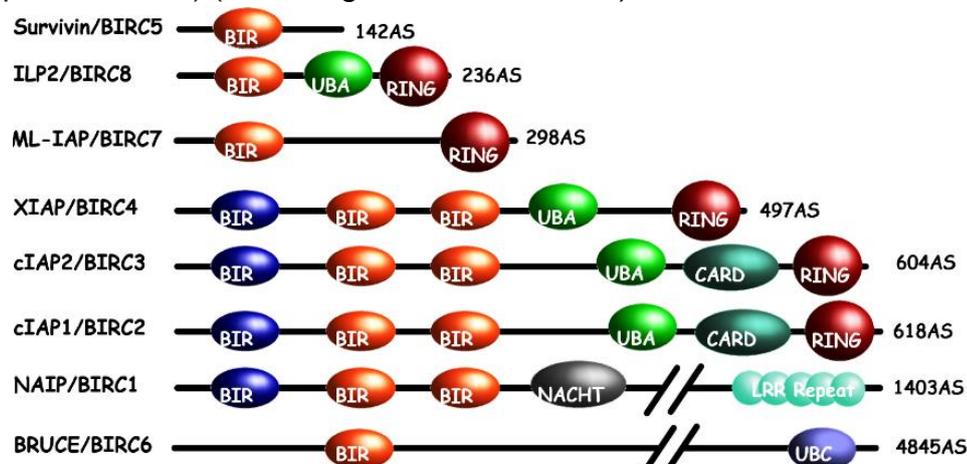
Die Effektor-Caspasen führen zum apoptotischen Tod der Zelle. Sie sind aktiv am Abbau von Lamin (Zellkernmembran) und Aktin (Zytoskelett) beteiligt und aktivieren weitere Mitspieler, wie DNasen und andere Caspasen. Die DNase spaltet die genomische DNA und produziert charakteristische 200 bp (Basenpaar) Fragmente, die mittels Agarose-Gel-Elektrophorese als „Apoptoseleiter“ nachgewiesen werden können (Holcik und Korneluk 2001, Lemke et al. 2014, de Almagro und Vucic 2012, Shi 2002, Fox et al. 2016, Krammer 2000).

### **1.3 Inhibitor of Apoptosis Protein-Familie (IAP)**

Aufgrund ihrer namensgebenden Eigenschaft der Inhibition der Apoptose stehen die IAPs seit Jahren im Fokus diverser Forschungsgruppen für die Tumorigenese verschiedenster Krebserkrankungen (Lunge, Leber-, Nieren-, Gehirn- und Brustkrebs). Auffällig ist, dass häufig Mutationen, Amplifikationen und Translokationen der IAP-Gene auftreten und Krebszellen eine erhöhte Vitalität und Resistenz gegenüber Tumorthérapien erlangen (LaCasse et al. 2008, Fulda und Vucic 2012, Cossu et al. 2019, Mannhold et al. 2010, Dizdar et al. 2017, Liang et al. 2020).

Strukturell zeichnen sich alle Mitglieder durch die hoch konservierte BIR-Domäne aus (*Baculovirus IAP Repeat*). Sie wurde zuerst bei den Baculoviren entdeckt. Die BIR-Region besteht aus ca. 70 Aminosäuren und ist essenziell für die Funktion der IAPs (de Almagro und Vucic 2012, Oberoi-Khanuja et al. 2013, Liang et al. 2020). Die Typ II BIR-Domänen bindet einen spezifischen Proteinabschnitt, das IAP-Bindungsmotiv (IBM), das von aktivierten Caspasen und IAP-Antagonisten exponiert wird. Während die Typ II BIR-Domänen in ihrer Funktion stärker zwischen den IAPs konserviert sind, gibt es größere Unterschiede im Bereich der Typ I BIR-Domäne. Typ I BIR-Domänen binden Proteine aus Zellkommunikationssignalwegen (Berthelet und Dubrez 2013, Eckelman et al. 2006). Die IAPs sind somit auch an der Immunantwort, Zellzyklus, Transkription, Translation, DNA-Reparatur und Signaltransduktion beteiligt (Liang et al. 2020). Das zweite hochkonservierte Proteinmotiv ist die C-terminale RING-Zink-Finger-Domäne (*Really Interesting New Gene*), die eine E3-Ubiquitinligase Aktivität besitzt. Die RING-Domäne dient der Homo- und Heterodimerisierung der IAPs. Die CARD-Domäne (zentrale Caspase Rekrutierungs-Domäne) dient der Regulierung der E3-Ubiquitin Ligase Aktivität und die Ub-assoziierte Domäne (UBA) erkennt mono- und poly-Ub-Ketten und bewirkt die Rekrutierung von IAP-Protein-Komplexen (Berthelet und Dubrez 2013).

Derzeit sind 8 humane IAPs bekannt (s. Abb. 5). XIAP (BIRC4), c-IAP-1 (BIRC2) und c-IAP2 (BIRC3), BIRC5 (Survivin), ILP2 (BIRC8), MLIAP (BIRC7), NAIP (BIRC1) und BRUCE (Apollon/BIRC6) (de Almagro und Vucic 2012).



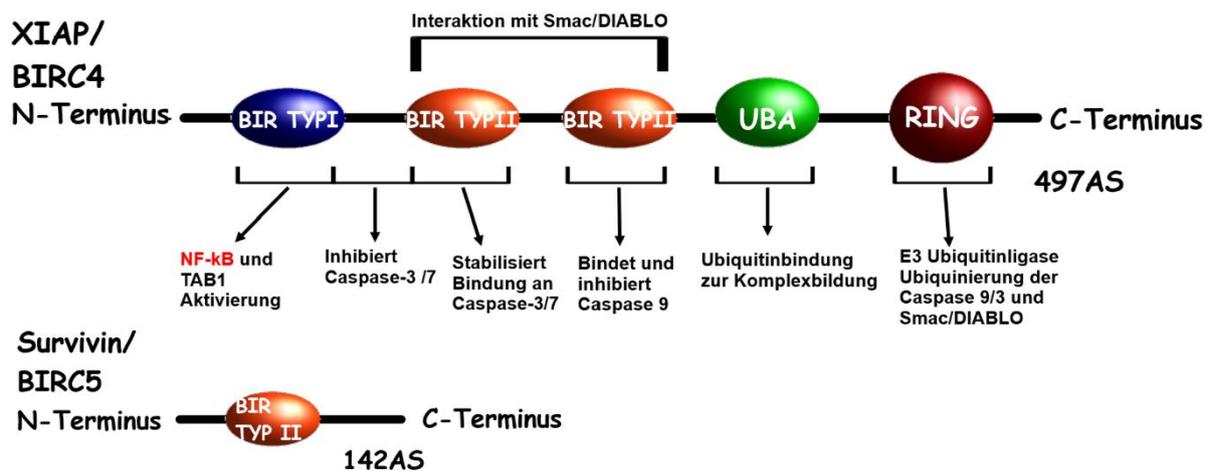
**Abb. 5 Schematische Darstellung der einzelnen IAP-Familienmitglieder und ihrer Untereinheiten.** Allen Mitgliedern ist mindestens eine BIR-Domäne gemeinsam. Dargestellte Domänen beinhalten: BIR-Domäne Typ II (rot) und Typ I (blau) (*Baculovirus IAP Repeat*), Ubiquitin-assoziierte-(UBA) Domäne, RING- (*Really Interesting New Gene*) Finger-Domäne, Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungs-Domäne (CARD), NACHT (NTPase-Domäne), Leucine-reiche-repetitive Domäne (LRR), AS (Aminosäuren) (s. Abb. 6 für die Funktion von Domänen) (Vorlage nach de Almagro und Vucic 2012, Oberoi-Khanuja et al. 2013).

### 1.3.1 XIAP (BIRC4)

XIAP scheint auf den ersten Blick das einflussreichste IAP zu sein, denn es gilt als der stärkste intrinsische Apoptoseregulator. Als einziges Mitglied der IAP-Familie kann es die apoptotischen Signalkaskade direkt inhibieren. Eine hohe XIAP-Konzentration kann die direkte Aktivierung der CASP3 und CASP7 durch CASP9 verhindern (Fulda und Vucic 2012, Eckelman et al. 2006). XIAP wird ubiquitär in fötalem und adultem Gewebe exprimiert (Liston et al. 1996) und ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Mendonça et al. 2022). Verschiedene Krebstypen zeigen eine XIAP-Überexpression, darunter Brustkrebs, Melanoma und das klarzellige Nierenkarzinom (Foster et al. 2009, Jaffer et al. 2007, Kluger et al. 2007, de Almagro und Vucic 2012). Diese Überexpression wird mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Therapieverfahren in Verbindung gebracht (Mohamed et al. 2018).

Strukturell besteht XIAP aus drei aufeinanderfolgenden BIR-Domänen, einer UBA-Domäne und einer RING-Domäne (Eckelman et al. 2006) (s. Abb. 6). Die erste BIR-Domäne ermöglicht eine Interaktion mit dem TAB1/TAK1 (*TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 1/TGF-Beta-Activated Kinase 1*) Komplex. Dies führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*), wodurch es auch eine Funktion in Signaltransduktionsprozessen ausübt (Lu et al. 2007). Die zweite BIR-Domäne bindet RIP2 (*Receptor-Interacting Protein (RIP)-Like Interacting*

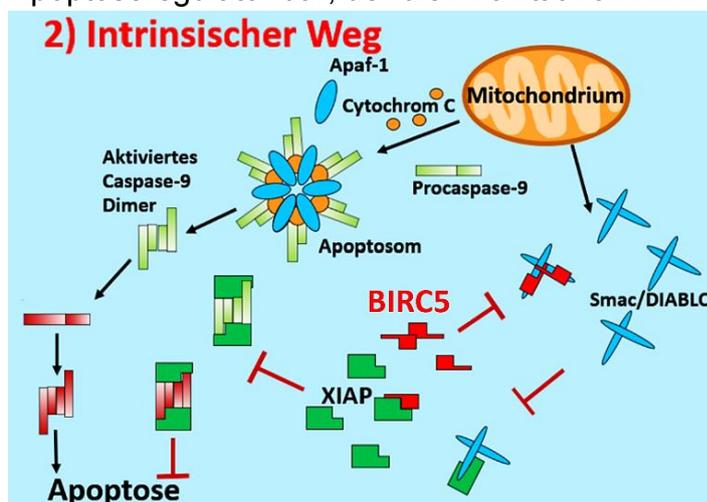
Caspase-Like), welches ebenfalls NF- $\kappa$ B aktiviert (Krieg et al. 2009).



**Abb. 6 Schematische Darstellung der IAP-Domänen und Größenvergleich von XIAP und BIRC5.** XIAP besitzt alle charakteristischen IAP-Domänen. Die BIR-Domäne 1 gehört zu BIR-Typ1. Sie kann IBM (Caspase-Domäne) nicht binden, dient aber der Zellkommunikation, Bindung von TAB1 (*Transforming Growth Factor  $\beta$ -Activated kinase 1* ( $TAK1 = TGF\text{-}\beta$ -aktivierte Kinase 1) - Binding protein 1) und NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Aktivierung. Im Gegensatz hierzu binden BIR-Domäne 2 und 3 BIR-Typ2-Domänen IBM (Vorlage nach Holcik und Korneluk 2001, Berthelet und Dubrez 2013).

Der entscheidende Unterschied von XIAP zu den anderen IAPs ist die Linkerregion zwischen den ersten beiden BIR-Domänen. Sie ermöglicht die eigentliche Caspase-Inhibition, während die nachfolgenden beiden BIR-Domänen lediglich binden (Huang et al. 2001, Eckelman et al. 2006).

Bei Apoptoseinduktion wird neben Cytochrom C auch Smac/DIABLO in das Zytoplasma entlassen (s. 1.2.2). Dieses kann XIAP inhibieren und so die Apoptosekaskade in Gang halten (Du et al. 2000, Verhagen et al. 2000, Galluzzi et al. 2018). Das kleinste IAP BIRC5 kann hier wiederum intervenieren, indem es XIAP stabilisiert und einen IAP-IAP-Komplex bildet, der XIAP schützt (Jaiswal et al. 2015). BIRC5 kann Smac/DIABLO auch direkt über seine N-terminale IBM binden (Liu et al. 2000, Wu et al. 2000). Hierdurch stellt sich BIRC5 im Gegensatz zu XIAP (s. Abb. 7) als ein eher indirekter Apoptoseregulator dar, der die Aktivität von XIAP gewährleistet.



**Abb. 7 Schematische Darstellung des Typ 2 Apoptosesignalwegs und der Rolle der IAPs XIAP und BIRC5.** XIAP ist das potenteste IAP-Mitglied, da es direkt an Caspasen bindet. BIRC5 schützt XIAP, indem es die Inhibition durch Smac/DIABLO unterbindet (Informationen und Vorlagen: Sun et al. 2005).

### 1.3.2 BIRC5 (*Baculoviral IAP Repeat Containing 5*)

BIRC5 ist mit 142 Aminosäuren Länge und 16,5 kDa das kleinste Mitglied der IAPs. Es besteht nur aus seiner N-terminalen BIR-Domäne und einer C-terminalen alpha-Helix (s. Abb. 6). In gesunden Zellen wird BIRC5 streng reguliert. Es ist in ausdifferenzierten Zellen aus adultem Gewebe kaum nachweisbar und wird während der G2/M-Phase des Zellzyklus hochreguliert. Während der Embryonalentwicklung, in deren Verlauf ein erhöhtes Zellwachstum und Umstrukturierung von Geweben und Organen stattfindet, wird BIRC5 hochreguliert (Jha et al. 2012, Ambrosini et al. 1997, Mahotka et al. 1999). BIRC5 hat also nicht nur eine Funktion als IAP, sondern auch während der Mitose. Aus dieser dualen Funktion ergibt sich ein großes tumorigenes Potenzial (Warrier et al. 2020).

BIRC5 ist das am häufigsten tumorspezifisch exprimierte Mitglied der IAP-Familie und daher ein vielversprechendes Forschungsziel. Ein Vergleich von 32 humanen Krebserkrankungen mit ihrem zugehörigen Normalgewebe zeigte, dass BIRC5 in 94 % der Tumore und in 21 unterschiedlichen humanen Krebstypen hochreguliert war. Es zeigte auch die stärkste prognostische Relevanz (Biomarker). Eine hohe BIRC5-Expression wurde allgemein mit verringertem Gesamtüberleben der Patienten in Verbindung gebracht (Liang et al. 2020). Die Arbeit von Dizdar et al. (2017) zeigte in 60 % der GEP-NEN Genkopiezahlgewinne (CNA) von *BIRC5*. Der Nachweis seiner funktionellen Relevanz für Proliferation und Apoptose über *in vivo* und *in vitro* Experimente macht es zu einem geeigneten Biomarker der GEP-NEC (Mahotka et al. 2002, Krieg et al. 2013, Werner et al. 2016).

Abweichend von WT-BIRC5 (142 AS) treten verschiedene Splicevarianten auf. Die vorherrschenden Isoformen sind Survivin-2B (165 AS mit 18,6 kDa) und Survivin- $\Delta$ Ex3 (137 AS mit 15,6 kDa) (Mahotka et al. 1999), deren Funktion bislang nicht gänzlich geklärt wurde und die sich in ihrer Lokalisation und Expression unterscheiden. WT-BIRC5 ist anti-apoptotisch, das pro-apoptotische Survivin-2B ist zytoplasmatisch und das onkogene anti-apoptotische Survivin- $\Delta$ Ex3 ist im Zellkern lokalisiert (Khan et al. 2014, Végran et al. 2011, Mahotka et al. 1999, Garg et al. 2016). Hierbei werden nukleäres BIRC5 mit Zellteilungsregulation, zytoplasmatisches BIRC5 mit Zytoprotektion (Chemotherapie-Resistenz) und mitochondriales BIRC5 mit Tumorwachstum und Apoptoseresistenz in Verbindung gebracht (Duffy et al. 2007, Stauber et al. 2007).

Im Rahmen der Mitose wird BIRC5 in der G2/M-Phase des Zellzyklus auch in ausdifferenzierten Zellen nachweisbar hochreguliert. Es interagiert mit dem mitotischen

Spindelapparat und reguliert die Mikrotubulidynamik. BIRC5 bewerkstelligt als Teil des chromosomalen Passagierkomplexes (CPC) die korrekte Chromosomen-Trennung, bipolare Spindelformation, Scheckpunktkontrolle und Zytokinese der Zellteilung (Warrier et al. 2020). Der Verlust oder Depletion von BIRC5 ist für Zellen, Organe und den gesamten Organismus kritisch. In verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen führt sein Verlust zu Prometaphasedefekten, Scheckpunktdefekten, mitotischer Katastrophe, Zytokinesefehlern und erhöhter Apoptose (Lens et al. 2003, Carvalho et al. 2003, Rajagopalan und Balasubramanian 2002, Yue et al. 2008, Speliotes et al. 2000, Martini et al. 2016, Wheatley und Altieri 2019). Ein Knockout in Mäusen ist nach Tag 2.5 *post-coitum lethal* (Uren et al. 2000).

### 1.3.3 Das Bindeglied NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*)

Diese Erkenntnisse erklären die zunehmende Bedeutung der IAPs für die Krebsforschung. XIAP als potenter direkter Caspaseinhibitor und BIRC5 als „potentes Onkofötal-Gen“ (Funktion in Krebswachstum und fötaler Entwicklung) (Warrier et al. 2020) erscheinen bereits als vielversprechende Ziele. Hinzu kommen weitere Daten aus Vorarbeiten der AG Krieg, die zeigen, dass XIAP an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt ist (Krieg et al. 2009). Es ist bekannt, dass ein XIAP/BIRC5-Komplex eine aktivierende Wirkung auf NF- $\kappa$ B hat, wodurch Tumorzellinvasion und Metastasierung stimuliert werden (Gyrd-Hansen und Meier 2010).

NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in fast allen Zelltypen exprimiert wird. Es ist der Startpunkt von Signaltransduktionskaskaden wie Inflammation, Immunantwort, Differenzierung, Zellwachstum, Tumorigenese und Apoptose. Der inaktive NF- $\kappa$ B-Komplex (I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplex) ist im Zytosol lokalisiert. Der aktivierte Komplex wandert in den Nukleus (Oeckinghaus et al. 2011, Sun 2010). Da inflammatorische Signalwege auch die Entstehung von Krebs begünstigen, wurde hierzu die Rolle von NF- $\kappa$ B in Feedback Loops untersucht (DiDonato et al. 2012). Demnach erhält ein positiver inflammatorischer Feedback Loop, bestehend aus NF- $\kappa$ B, LIN28B (Lin-28 Homolog B), let-7 und IL6 (Interleukin 6), den malignen Phänotyp und fördert die Tumorigenese und das Überleben von Krebszellen (Ma et al. 2011, Iliopoulos et al. 2009). NF- $\kappa$ B aktiviert hierbei das RNA-Bindungsprotein (RBP) LIN28B, welches die Prozessierung von pri-let-7 microRNAs negativ reguliert (Viswanathan et al. 2008).

Fügt man die einzelnen Vorgänge zusammen, ergibt sich die Möglichkeit, dass ein XIAP/BIRC5-Komplex über NF- $\kappa$ B microRNAs regulieren könnte (s. Abb. 8).



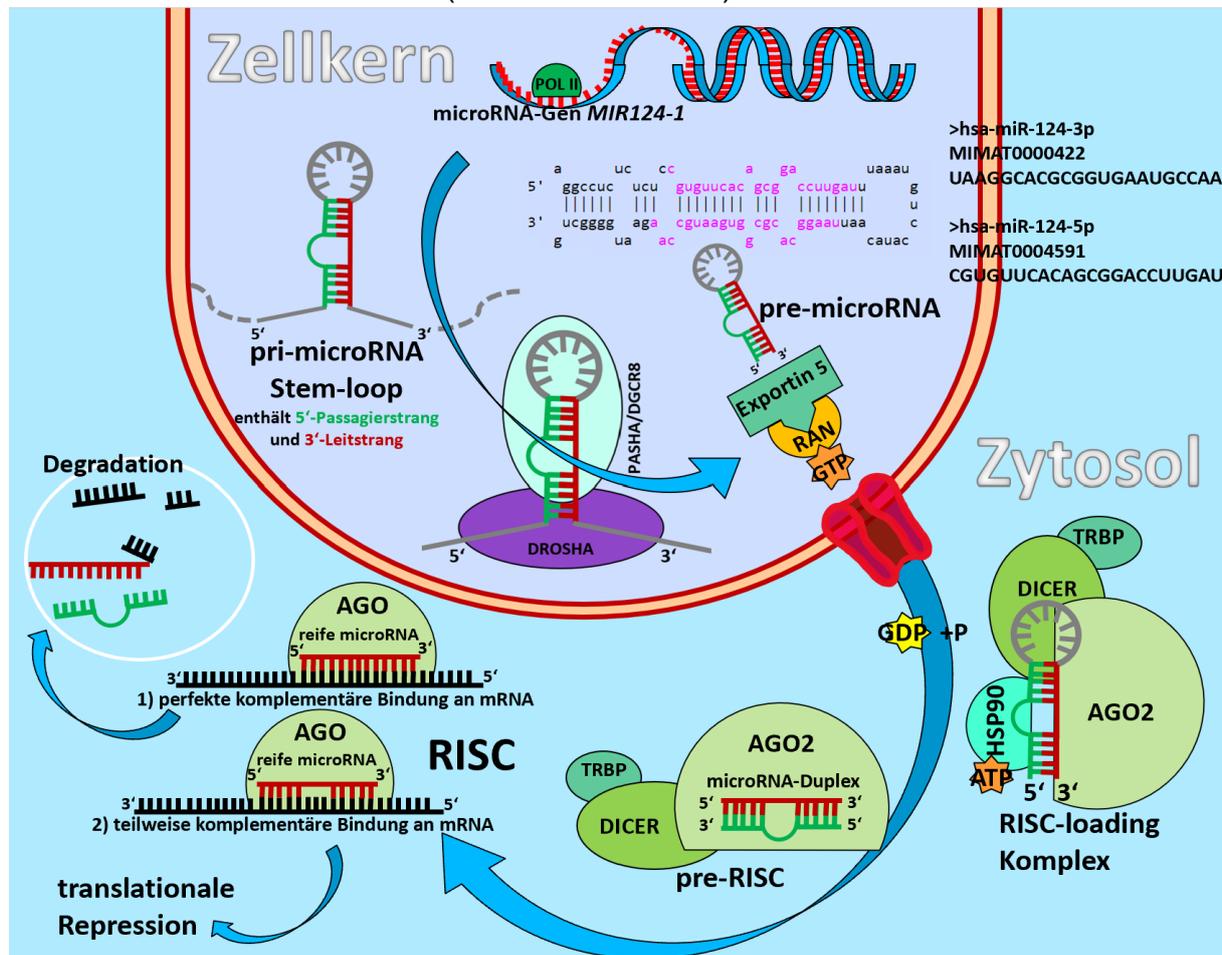
**Abb. 8** Schematische Darstellung des inflammatorischen positiven Feedback Loops während der Zelltransformation. Die erhöhte NF-κB-Aktivität bewirkt eine Herunterregulation der let-7 microRNAs. Beteiligt sind IL6 (Interleukin 6), STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), LIN28 (*Lin-28 Homolog*). (Vorlage nach Iliopoulos et al. 2009).

#### 1.4 MicroRNAs (miRNA/ miR)

MicroRNAs sind kleine, etwa 18 bis 22 Nukleotide lange, nicht codierende, einzelsträngige RNA-Moleküle. Sie sind bedeutende post-transkriptionelle Genregulatoren. Ihre Funktion erfüllen microRNAs durch die Bindung von mRNAs, die infolge für die Transkription blockiert oder destabilisiert und degradiert werden. In wenigen, spezifischen Fällen, abhängig von Zelltyp und Bedingungen, wurde auch eine post-transkriptionelle Hochregulation von Genen beobachtet. Das Besondere ist, dass eine einzige microRNA eine Vielzahl von mRNAs eines Gens und vor allem eine Vielzahl verschiedener Gene regulieren kann. Diese Eigenschaft macht sie zu interessanten Forschungszielen, da sie unterschiedliche Prozesse wie Zellzyklus, Proliferation und Apoptose regulieren und selber als Onko-miRs (krebsfördernd) oder Tumorsuppressoren gelten (Gulyaeva und Kushlinskiy 2016, O'Brien et al. 2018, Felekis et al. 2010). Die Biogenese der microRNAs (s. Abb. 9) beginnt mit dem kodierenden Gen und der RNA Polymerase II oder III. Etwa die Hälfte der bisher entdeckten microRNA-Gene liegt in Intronen, in einigen Fällen auch Exonen Protein-kodierender Gene (intragenische microRNAs). Die übrigen microRNAs werden durch ihr eigenes Gen mit eigenem Promoter transkribiert (intergenische microRNAs).

Das erste Konstrukt während der microRNA-Biogenese wird als pri-microRNA bezeichnet und ist generell immer das längste. Die pri-microRNA bildet eine Haarnadelstruktur aus einem doppelsträngigem Stamm (*Stem*, ca. 33 bp), einer terminalen Schleife (*Loop*) und zwei flankierenden einzelsträngigen Segmenten (Felekis et al. 2010). Cluster-microRNAs werden hierbei in einem einzigen langen Transkript aus mehreren Haarnadel-Elementen transkribiert. Mehrere microRNAs werden also unter dem gleichen Promoter abgelesen (polycistronische microRNAs) und zeigen hierdurch ein co-abhängiges Expressionsmuster (O'Brien et al. 2018, Truscott et al. 2016).

MicroRNAs mit sehr ähnlichen Sequenzen regulieren auch ähnliche Ziel-mRNAs und bilden eine microRNA-Familie (O'Brien et al. 2018).



**Abb. 9** Schematische Darstellung der microRNA-Biogenese. Das microRNA-Gen wird im Zellkern mittels Polymerase II (POL II) transkribiert, wodurch eine Haarnadelstruktur mit zwei potentiellen microRNAs entsteht. Dieser pri-microRNA-Duplex wird durch DROSHA und DGCR8/PASHA zur pre-microRNA geschnitten und über Exportin 5 und RAN-GTPase aus dem Zellkern befördert. Im Zytoplasma wird die pre-microRNA in einen Komplex aus AGO-Proteinen, DICER, HSP90 und TRBP (*TAR RNA Binding Protein 2*) integriert. Der geschnittene microRNA-Duplex besteht aus dem funktionellen, mRNA-regulierenden Leitstrang und dem letztlich degradierten Passagierstrang. Als Teil des RISC-Komplexes erfüllt die microRNA ihre Funktion (Vorlage nach Quellen: Deuiilis 2015, Castanotto und Rossi 2009, miRBase 22.1, Huntley et al. 2016, Jones 2006).

Die pri-microRNA wird durch den Mikroprozessor-Komplex in eine 70-nukleotid große Haarnadelstruktur, die pre-microRNA geschnitten. Innerhalb des Komplexes vermittelt DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Gene*) die Bindung an die pri-microRNA und die Ribonuklease DROSHA (RNase III Enzym) schneidet die flankierenden Einzelstränge (Linker-Regionen) der Haarnadelstruktur ab. Durch diesen Prozess wird die doppelsträngige pre-microRNA freigelegt. Beteiligt an diesem Prozess sind RNA-Bindungsproteine (RBP) und RNA-Helikasen, die die Prozessierung positiv oder negativ modulieren (Felekis et al. 2010). Über den Exportin 5 (XPO5) /Ran-GTPase-Komplex wird die pre-microRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma befördert und von der RNase III Endonuklease DICER (Ribonuklease III, *Double-Stranded RNA-Specific*

*Endoribonuclease*) weiter prozessiert. DICER schneidet die terminale Schleife, wodurch der reife microRNA-Duplex entsteht. Dieser enthält in der Regel zwei potentiell funktionelle microRNAs, die nach ihrem Ursprung -5' oder 3'-Ende der pre-microRNA benannt werden. Die Beladung des AGO-Komplexes, aus Mitgliedern der Argonaut-Proteine-Familie (AGO1-4 in Menschen), mit dem microRNA-Duplex ist ATP-abhängig und wird durch das HSP90- (Heat Shock Protein 90) Chaperon vermittelt. Der Zelltyp, extrinsische Signale und intrazelluläre Prozesse modulieren als Reaktion die Proteinexpression und die RBPs. Diese beeinflussen, welcher Strang tatsächlich funktionell wird (Treiber et al. 2017, Connerty et al. 2015, Choudhury und Michlewski 2012, Lin und Gregory 2015). Der Strang mit der geringsten Stabilität wird hierbei bevorzugt eingebaut und wird als Leitstrang bezeichnet - der andere Strang wird Passagierstrang genannt und degradiert. Hierbei handelt es sich um den Haupt- oder kanonischen microRNA-Biogeneseweg.

Der nicht-kanonische Biogeneseweg ist seltener und variabler. Die zwei Hauptwege beinhalten entweder einen DROSHA/DGCR8-unabhängigen Pfad (pre-microRNAs nach Splicing aus Introns anderer mRNAs, Mirtrons) oder einen DICER-unabhängigen Pfad (aus shRNA, prozessiert durch AGO2) (Felekis et al. 2010, O'Brien et al. 2018). Der funktionelle, mRNA-regulierende Komplex besteht im Kern aus Proteinen der AGO-Familie und dem microRNA-Leitstrang. Als Teil dieses sogenannten RISC-Komplexes (*RNA-induced silencing complex* oder miRISC) kann die microRNA ihre Funktion erfüllen und sequenzspezifisch an eine Ziel-mRNA binden.

Bei vollständiger Bindung kommt es zu einer AGO2-abhängigen Spaltung der mRNA und damit auch zu einer Degradation der microRNA (Jo et al. 2015, Ameres et al. 2010). Der Großteil der Interaktionen mit Ziel-mRNAs ist aber nur teilweise komplementär, was die Endonuklease-Aktivität von AGO2 unterbindet. Die AGO-Proteine fungieren dann ausschließlich als Mediator-Komplex. Somit ist eine miRISC-vermittelte translationale Inhibition der Regelfall.

Die Interaktion zwischen microRNA und mRNA geschieht in der Mehrzahl der Fälle über die microRNA 5'-Anfangsregion (*seed region*) (Jonas und Izaurralde 2015, Ellwanger et al. 2011, Lewis et al. 2003). Eine zusätzliche Bindung an das 3'-Ende erhöht die Stabilität und Spezifität der Interaktion (Broughton et al. 2016). Im Gegenzug weisen mRNAs eine oder mehrere zur microRNA komplementäre Sequenzen auf, so genannte microRNA-Antwort-Elemente oder microRNA-Ziel-Sequenzen (*microRNA response elements*, MREs) (O'Brien et al. 2018, Peter 2010).

Innerhalb des RISC sind microRNAs vor Degradation geschützt (Diederichs und Haber 2007) und können für mehrere Interaktionen wiederverwendet werden - eine microRNA kann also mehrere mRNAs regulieren (Yang et al. 2020). Die Halbwertszeit kann je nach microRNA Stunden bis Tage betragen (Guo et al. 2015, Marzi et al. 2016, van Rooij). Abhängig vom Gen und damit der mRNA-Sequenz gibt es Bindungen mit höherer und geringer Affinität. Dies ermöglicht unterschiedlichen microRNAs und microRNA-Familien Gene unterschiedlich effektiv zu regulieren und abweichend Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse zu nehmen. MicroRNA-Familien können sich hierbei synergistisch unterstützen und in ihrer Funktion verstärken, da sie die gleichen Sequenzen binden (O'Brien et al. 2018, Peter 2010).

Die oben dargestellten Eigenschaften zeigen, dass microRNAs als Onkogene, aber auch als Tumorsuppressoren fungieren können. Dies macht sie äußerst interessant für ihre bisher kaum erforschte Rolle im Rahmen der Tumorigenese der GEP-NEC.

## 1.5 Zielsetzung

MicroRNAs sind wichtige tumorigene- oder tumorsuppressive post-transkriptionelle Gen-Regulatoren und sind selbst Ziele von Regulationsmechanismen, die positiv oder negativ auf ihre Expression einwirken. Ob und inwieweit die IAPs, XIAP (BIRC4) und BIRC5 (Survivin) hierbei eine Funktion erfüllen, wird in dieser Arbeit untersucht.

Denkbar wäre ein Mechanismus, bei dem ein XIAP/BIRC5-Komplex den Transkriptionsfaktor (TF) NF- $\kappa$ B in seiner Aktivität verstärkt. Dieser wiederum ist mit anderen Proteinen, darunter das RNA-Bindungsprotein LIN28B, an einem positiven inflammatorischen Feedback Loop beteiligt, der tumorsuppressive microRNAs reguliert (s. Abb. 8). Diese Zusammenhänge könnten zum tumorigenen Phänotyp der NEC-Krebserkrankung beitragen. Als Regulatoren der microRNA-Expression könnten beide IAPs direkt oder indirekt beteiligt sein.

Aufgrund der bekannten Überexpression und der bereits untersuchten Funktion beider IAPs für das unkontrollierte Wachstum und die Apoptoseinduktion der NEC (Dizdar et al. 2017) liegt die Vermutung nahe, dass so deregulierte microRNAs auch einen Einfluss auf diese zellbiologischen Mechanismen haben. Sollten o.g. Zusammenhänge zutreffen, müsste ein verändertes microRNA-Expressionsmuster nach Deregulation der IAPs messbar sein. Im Idealfall betrifft dies bekannte Onko-miRs (tumorigene microRNAs) oder tumorsuppressive microRNAs, die zu neuen Therapien beitragen können.

Die Komplexität der microRNA-Biogenese (Transkriptionsfaktoren, Transport, pri-microRNA und pre-microRNA Prozessierung, Komplexbildung mit RNA-Bindungsproteinen) in verschiedenen Kompartimenten (Zellkern, Zytoplasma) erschwert die Analyse des gesamten Signalwegs und aller Interaktionspartner. Daher ist das Ziel, wenigstens vielversprechende Kandidaten für zukünftige Untersuchungen zu finden.

Die hier dargestellten Ergebnisse sollen ein besseres Verständnis einer neuen IAP-Funktion bei der Regulation von microRNAs ermöglichen und neue Ansatzpunkte für eine alternative Krebstherapie der GEP-NEC liefern.

## 2 Material

### 2.1 Zelllinien und Bakterienstämme

#### 2.1.1 Zelllinien

Die Entnahme und Forschung der verwendeten Tumorzellen wurde vom Ethikkomitee der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität befürwortet (Studiennummer 3457). Die Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

**Tab. 1 Verwendete Zelllinien**

Bezeichnung	Organismus	Herkunft	Ethnie	Quelle
NEC-DUE1	<i>Homo sapiens</i>	LM	Kaukasier	Prof. Dr. A. Krieg, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Uniklinik Düsseldorf
NEC-DUE2	<i>Homo sapiens</i>	LKM	Kaukasier	
NEC-DUE3	<i>Homo sapiens</i>	LKM	Kaukasier	
TT2609-C02	<i>Homo sapiens</i>	LKM	Kaukasier	ECACC

Die Tab. 1 zeigt eine Übersicht der verwendeten Zelllinien. NEC = neuroendokrines Carcinom, DUE = Düsseldorf, LM = Lebermetastase, LKM = Lymphknotenmetastasen, ECACC = European Collection of Cell Cultures

NEC-DUE1 und NEC-DUE2 wurden in der AG Krieg, Uniklinik Düsseldorf (UKD), als Zelllinienmodell zur Untersuchung der seltenen NEC-Tumorerkrankungen etabliert. Die zugehörigen Daten wurden in der Arbeit von Krieg et al. (2014) veröffentlicht. Die Zelllinien wurden nach den 4 Kategorien von Kenny et al. (2007) charakterisiert. NEC-DUE1 entstammte einer atypischen Lebermetastase (Ki-67 Index: 80 %) eines 71-Jährigen männlichen Kaukasiers, der einen G3 (Grad 3) großzelligen NEC-Primarius am gastroösophagealen Übergang aufwies. NEC-DUE2 wurde aus einer perikolischen Lymphknotenmetastase gewonnen, die von einem G3 großzelligen NEC-Primarius (Ki-67 Index: 80 %) der rechten Dickdarmbiegung eines 71-Jährigen männlichen Kaukasiers stammte. Die Entnahme erfolgte durch Prof. Dr. A. Krieg (Krieg et al. 2014).

Die morphologische und immunhistochemische Charakterisierung der Primarien zur eindeutigen Identifizierung malignen Gewebes und Zellen wurde im Rahmen der jeweiligen Behandlung der Patienten in der Pathologie (UKD) durchgeführt. Mikroskopisch zeigte die Hematoxylin-Eosin- (HE) Färbung morphologisch große Zellen, deren Chromatin atypische Veränderungen aufwies. Es war eine unregelmäßige Verteilung des Heterochromatins im Zellkern, die für Tumorzellen charakteristische „Pfeffer-und-Salz-Struktur“ (Bubendorf 2011), erkennbar.

Für eine Einordnung als neuroendokrine Tumore wurden in der Pathologie (UKD) generelle und spezifische Markerproteine nachgewiesen. Immunhistochemische Färbungen wiesen so die generellen neuroendokrinen Marker nach, zu denen Synaptophysin (SYP), Chromogranin A (CHGA), vesikulärer Monoamintransporter (VMAT1/SLC18A1, VMAT2/SLC18A2), *Cluster of Differentiation 56* (CD56), des

Weiteren Somatostatin-Rezeptoren (SSTR2A und SSTR5), Zytokeratine (CK8, 18, 20), epitheliale Marker Carbohydrat-Antigen 19-9 (Ca19-9), karzinoembryonisches Antigen (CEA) und Transkriptionsfaktoren, wie der thyroidealer Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1/NKX2-1) und Caudal-Typ Homeobox 2 (CDX2). Als weiterer Tumorindikator wurde der Proliferation Index mittels MIB-1 (Proliferationsmarker Protein Ki-67) Antikörperfärbung ermittelt (s. Krieg et al. 2014).

Die NEC-DUE3-Zelllinie wurde 2018 in der AG Krieg etabliert und in der Arbeit von Dizdar et al. (2018) veröffentlicht. Sie stammt von einem 55-jährigen weiblichen Kaukasier mit einem Tumor am Analkanal, der von Prof. Dr. A. Krieg entnommen wurde. Die Metastase zur Zelllinie stammt vom linken Leistenlymphknoten. Die Pathologie (UKD) stufte den Tumor als kleinzelligen GEP-NEC ein. Die HE-Färbung zeigte kleine Zellen mit neuroendokriner Krebsmorphologie und die o. g. Marker zuzüglich TP53 (Tumor Protein 53) und Retinoblastoma-Protein (RB1) (Dizdar et al. 2018).

Die Zelllinien wurden aufgrund der Bakterienlast des Primärtumorgewebes aus Metastasen gewonnen. Diese zeigten, trotz abweichender Lokalisation und damit verbundenem verändertem Selektionsdruck, keine auffälligen Unterschiede auf genetischer und damit auch Proteinebene zum Primarius. Ein Vergleich der genetischen Aberrationen mittels aCGH, durchgeführt von Dr. B. Möhlendick, ermöglichte die Analyse von Genregionen während der Krebsentwicklung. Die Daten zeigten übereinstimmende Muster in Form von Gen-Verlusten und Zugewinnen im Vergleich zwischen Zelllinien, Metastasen und Primarien. Eine weiterführende Charakterisierung der NEC-Zelllinien erfolgte in Vorarbeiten der AG Krieg und ermöglichte ihrer Verwendung als Repräsentanten ihres Ursprungstumors (nachzulesen bei Krieg et al. 2014 und Dizdar et al. 2018). Hierzu gehörte die Überprüfung der Metastasen auf Expression der charakteristischen Markerproteine. Auf diese Weise konnten Metastasen vom umliegenden Gewebe mit anderem Organursprung unterscheiden werden. Elektronenmikroskopisch waren elektronendichte und neurosekretorische Granula sichtbar (s. Krieg et al. 2014, Dizdar et al. 2018). Diese Granula sind eine wichtige Eigenschaft neuroendokriner Zellen (Pearse et al. 1969). Des Weiteren wurde das Wachstum der Zellen über 25 Passagen beobachtet, die Zellen mehreren Zyklen der Kryokonservierung unterzogen und die Tumorgenität und metastasierenden Eigenschaften der Zellen in Mausmodellen überprüft (s. Krieg et al. 2014, Dizdar et al. 2018).

Die NEC-DUE1-Zellen wuchsen in Zellkulturflaschen kugelförmig in Weintrauben-artigen Sphären und bildeten nur schwache Zell-Zell-Kontakte. Die Trauben gingen auch

bei hoher Konfluenz kaum ineinander über, die Zellen ließen sich aber durch Behandlung mit Trypsin gut vereinzeln. Große Zell-Trauben konnten ihre Adhärenz verlieren und ließen sich durch Schütteln ablösen (s. Abb. 10).

Die NEC-DUE2 erschienen mikroskopisch polygonal geformt, wuchsen flächig und kompakt (s. Abb. 10). Die Zellen ließen sich durch Trypsin, verglichen mit NEC-DUE1, schwer vereinzeln und ablösen. Immunhistochemische Färbungen der beta-Aktin-Strukturen des Zytoskeletts der NEC-DUE2 zeigten aber keine stabilen Zell-Zell-Kontakte und die NEC-DUE2 wurde weiter als weintraubenförmig klassifiziert (nachzulesen bei Krieg et al. 2014).

Die Identität der Zelllinien wurde mittels STR- (*Short Tandem Repeat*) Analyse regelmäßig bestätigt. Die Daten (s. Tab. 2) stammen von Dr. B. Möhlendick. Hierzu wurden die Proben eigenständig gewonnen. Die Analyse erfolgte in der Rechtsmedizin des UKD. Diese DNA-Analyse überprüfte STRs, sogenannte Mikrosatelliten (2-6 bp). Nach der DNA-Extraktion wurden die STRs durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf mehreren Chromosomen nachgewiesen. Die Zelllinien zeigten hierbei Übereinstimmungen mit dem Ursprungstumor.

**Tab. 2 STR-Analyse der etablierten Zelllinien und korrespondierenden Primärtumoren**

STR Locus	NEC-DUE1		NEC-DUE2		NEC-DUE3		
	PT	Zelllinie	PT	Zelllinie	PT	LNMET	Zelllinie
D8S1179	12-13	12-13	12-13	12-13	10-11	10-11	10-11
D21S11	32.2	32.2	28-29	28-29	27-29	27-29	27-29
D7S820	10-11	10-11	8-11	8-11	9-11	9-11	9-11
CSF1PO	12	12	13	13	11-12	11-12	11-12
D3S1358	16-17	16-17	15	15	15-18	15-18	15-18
TH01	6-9.3	6-9.3	8	8	6	6	6
D13S317	12	12	8-12	8-12	11	11	11
D16S539	10	10	10-11	10-11	11-12	11-12	11-12
D2S1338	19-20	19-20	17	17	17-26	17	17
D19S433	13-16	13-16	15-16	15-16	15-15.2	15-15.2	15-15.2
VWA	17	17	14-18	14-18	16-17	16-17	16-17
TPOX	8-9	8-9	8	8	8-11	8-11	8
SD18S51	13-20	13-20	12-15	12-15			
Amelogenin	XY	XY	X	X	XX	XX	XX
D5S818	13	13	12	12	11	11	11
FGA	20-25	20-25	21	21	20-21	20-21	20-21
D22S1045	15-16	15-16	11-16	11-16			
D1S1656	14-15	14-15	12-14	12-14	12-14	12-14	12-14
D10S1248	16-17	16-17	14	14			
D2S441	11	11	11	11			
D12S391	18	18	17-23	17-23	18	18-19	18-19
SE33	25.2	25.2	22.2-24.2	22.2-24.2			
D6S11043					11-18	11-18	11-18
Penta E					12	12	12
D18S51					12-15	12-15	12-15
Penta D					9	9	9

PT = Primärtumor; LNMET = Lymphknotenmetastase

Die Tab. 2 zeigt STRs der Primärtumore (PT) und zugehörigen Zelllinien NEC-DUE1, NEC-DUE2 und NEC-DUE3 der AG Krieg. Für NEC-DUE3 erfolgte auch ein Vergleich mit der entsprechenden Lymphknotenmetastase (LN MET). Die STR-Daten und Tab. stammen von Dr. B. Möhlendick.



**Abb. 10 Mikroskopische Aufnahme der Zelllinien NEC-DUE1 (oben) und NEC-DUE2 (unten).** Die NEC-DUE1 zeigen ihr typisches kugelförmiges Aussehen und traubenartiges Wachstum in Zell-Clustern. Die NEC-DUE2 waren polygonal geformt und wuchsen flächiger, wurden aber aufgrund fehlender Zell-Zell-Kontakte wie die NEC-DUE1 als weintraubenförmig klassifiziert (Krieg et al. 2014). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden eigenständig erstellt.

### 2.1.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) phoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1	Univ.-Prof. Dr. med. Pfeffer, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität

### 2.2 Antibiotika

Ampicillin [1mg/ml]	Thermo Fisher
Penicillin/Streptomycin [10000U/ml]	Millipore <sup>®</sup>
Puromycin [10mg/ml]	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>

### 2.3 Verbrauchsmaterialien

Eingesetzte Verbrauchsmaterialien wurden von den im Folgenden aufgelisteten Firmen bezogen: BD Bioscience (Heidelberg), Bio-Rad (München), Biozym<sup>®</sup> (Hessisch Oldendorf), Braun (Melsungen), Corning<sup>®</sup> (Wiesbaden), Eppendorf (Hamburg), Falcon<sup>™</sup>/BD (Heidelberg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Merck Millipore<sup>®</sup> (Darmstadt), Sarstedt<sup>™</sup> (Nümbrecht), Starlab (Ahrensberg), Thermo Fisher Scientific (Oberhausen), Whatman<sup>®</sup> (Dassel), VWR<sup>®</sup> (Darmstadt).

Name	Hersteller
Conical Centrifuge Tubes 50 ml, 15 ml	Falcon <sup>™</sup> , Sarstedt <sup>™</sup>
Einwegspritzen	Braun
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One
Objektträger Superfrost Plus	Menzel-Gläser
Pipettenspitzen	Sarstedt <sup>™</sup> , Greiner Bio-One, Biozym <sup>®</sup>
Optical Flat 8-Cap Strips	Bio-Rad
Skalpell	Bayha <sup>®</sup>
Stripetten	Sarstedt <sup>™</sup>
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Zellschaber	TPP
Zellkulturflaschen (T-75, T-175)	Sarstedt <sup>™</sup>
Whatman <sup>®</sup> -Papier	Whatman <sup>®</sup>
96-/6-Well Platten	Sarstedt <sup>™</sup> , Greiner Bio-One
96 Well-PCR-Platten (VE 50)	4titude <sup>®</sup>

## 2.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders genannt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Biotium™ (Aachen), Sigma-Aldrich® (Hamburg), Thermo Fischer Scientific (Oberhausen), Bio-Rad (München), Fisher Scientific™ (Schwerte), VWR® (Darmstadt), Pan™ Biotech (Aidenbach), Roche (Mannheim), New England Biolabs® (NEB®, Frankfurt am Main), Merck Millipore® (Darmstadt) und Sellekchem (München) bezogen.

Name	Hersteller
Acrylamid	Sigma-Aldrich®
30 % Acrylamid Bis-Acrylamid Lösung	Bio-Rad
Agar	Invitrogen
Agarose	Biozym®
Albumin Standard 2 mg/ml	Thermo Fisher
Amoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich®
Bovines Serumalbumin (BSA)	NEB®, Sigma-Aldrich®
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich®
Chloroform	Merck
Dinabeads Protein G	Life Technologies™
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad
Dimethylphthalat (DMP)	Thermo Fisher
Eisessig	Merck
Ethanol	J.T.Baker®
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fötale Kälberserum FCS	Gibco™
Gel Red™	Biotium™
Glycerin	Sigma-Aldrich®
Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	AppliChem
HEPES	AppliChem
Laemmli-Puffer (4x)	Bio-Rad
Methanol	J.T.Baker®
Milchpulver	Nestle®
β-Mercaptoethanol	AppliChem
Natriumchlorid	J.T.Baker®
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
NEBuffer™ 3.1	New England Biolabs®
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Phosphatpuffer (PBS)	Gibco™
Ponceau Pulver	Sigma-Aldrich®
Ponceau Solution	Sigma-Aldrich®
SDS (Lauryl, Sodium Dodecyl Sulfate)	Sigma-Aldrich®
Streptavidin	Bio-Rad
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka Biochemika
NP-40, Nonidet® P40	Merck
Triethanolamine	Merck

Tris-Base	Sigma-Aldrich®
Tris-HCL	Sigma-Aldrich®
Triton® X-100	Sigma-Aldrich®
Trypsin	Gibco™
Trypan Blue Solution, 0.4 %	Gibco™
Tween® 20	Sigma-Aldrich®
qPCR <i>Human Reference Total RNA</i>	Agilent
Xylol	VWR®
YM155 (Sepantronium Bromide)	Sellekchem

## 2.5 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.5.1 Zellkultur Medien

RPMI 1640	Gibco™
Opti-MEM™ ( <i>Reduced Serum Medium</i> )	Gibco™
FBS (Fötale Kälberserum)	Gibco™
DMSO	Sigma-Aldrich®

### 2.5.2 LB-Medium

5 g/l Hefeextrakt	Biosciences
10 g/l Trypton	BD Biosciences
10 g/l Natriumchlorid	VWR®

### 2.5.3 Puffer

DPBS (Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	Sigma-Aldrich®
Trypsin 0,25 % EDTA 0,02 % in PBS	PAN
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich®
4-fach Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich®

#### Ammoniumpersulfat-Lösung (10 % (w/v))

1 g	Ammoniumpersulfat-Pulver
Ad 10 ml	dH <sub>2</sub> O

#### Ponceau S-Lösung

0,5 % (w/v)	Ponceau S-Pulver
1 % (v/v)	Eisessig
Ad 500 ml	dH <sub>2</sub> O

#### Laemmli-Puffer (6x)

100 mM	Tris-HCL (pH 8,0)
1 mM	EDTA
2 % (w/v)	SDS
12,5 % (v/v)	Glycerin
2 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau

RIPA-Puffer für Immunpräzipitation<sup>1</sup> und Proteinisolation<sup>2</sup>

150 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl
1,00 %	Nonidet P40
0,50 %	EDTA <sup>1</sup> / Desoxycholat <sup>2</sup>
1	Complete Mini w/o EDTA/ 10ml (Roche)

## SDS-Page Laufpuffer (Towbin) (10x)

250 mM	Tris
1,92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

## Transferpuffer (10x)

250 mM	Tris-Base
1,92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

## Transferpuffer (1x)

10 %	Transferpuffer (10x)
20 % (v/v)	Methanol
70 %	dH <sub>2</sub> O

## Tris-HCl (pH 8,8)

	pH 8,8 mit HCl einstellen
1,5 M	Tris
Ad 1L	dH <sub>2</sub> O

## Tris-HCl (pH 6,8)

	pH 6,8 mit HCl einstellen
1,0 M	Tris
Ad 1L	dH <sub>2</sub> O

## 10x Tris-Buffered-Saline (TBS) pH 7,5

100 mM	Tris-HCl
1,5 M	NaCl
1x TBS-T	
10 %	10x TBS
90 %	dH <sub>2</sub> O
0,01 % (v/v)	Tween <sup>®</sup> 20

## Western Blot SDS-Gel

(geändert nach Harlow und Lane.1988)

	Trenngel (10 %) (10 ml)	Sammelgel (5 %) (4 ml)
30 % Acrylamid/ Bisacrylamid	3,3 ml (30 % (v/v))	0,67 ml (17 % (v/v))
1,5 M Tris-HCl + SDS (pH = 8,8)	2,5 ml (375 mM)	
1 M Tris-HCl + SDS (pH = 6,8)		0,5 ml (125 mM)
A. dest.	4 ml (25 % (v/v))	2,7 ml (68 % (v/v))
10 % SDS	100 µl (0,1 % (w/v))	40 µl (0,1 % (w/v))
TEMED	40 µl (0,1 % (w/v))	4 µl (0,01 % (w/v))
10 % APS	100 µl (0,1 % (w/v))	40 µl (0,1 % (w/v))

## 2.6 Transfektionsreagenzien, Reaktionsmische und Enzyme

### 2.6.1 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine™3000	Thermo Fisher
Lipofectamine™ RNAiMAX	Thermo Fisher

### 2.6.2 cDNA-Synthese- und PCR-Lösungen

cDNA Synthesis Kit qScript fer, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , unspezifische Oligo-(dt-) Primer, RNase-Inhibitor, qScript™ Reverse Transkriptase	Puf- VWR®
PerfeCta® FastMix® II Reaktionspuffer, MgCl <sub>2</sub> , dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), hot-start DNA-Polymerase, AccuVue blue qPCR dye	2x VWR®
DNA Oligonukleotide	MWG Eurofins
Universal ProbeLibrary	Roche
TaqMan™ pri-microRNA Assays	Thermo Fisher
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher
TaqMan™ MicroRNA-Assays	Thermo Fisher
TaqMan™ Universal Master Mix 2 mit UNG	Thermo Fisher

### 2.6.3 Enzyme

Name	Hersteller
HINDIII-HF Restriktionsenzym	New England Biolabs®
BamHI-HF Restriktionsenzym	New England Biolabs®
RNase-Free DNase Set	Qiagen

## 2.7 Größenstandards

### 2.7.1 DNA-Leiter

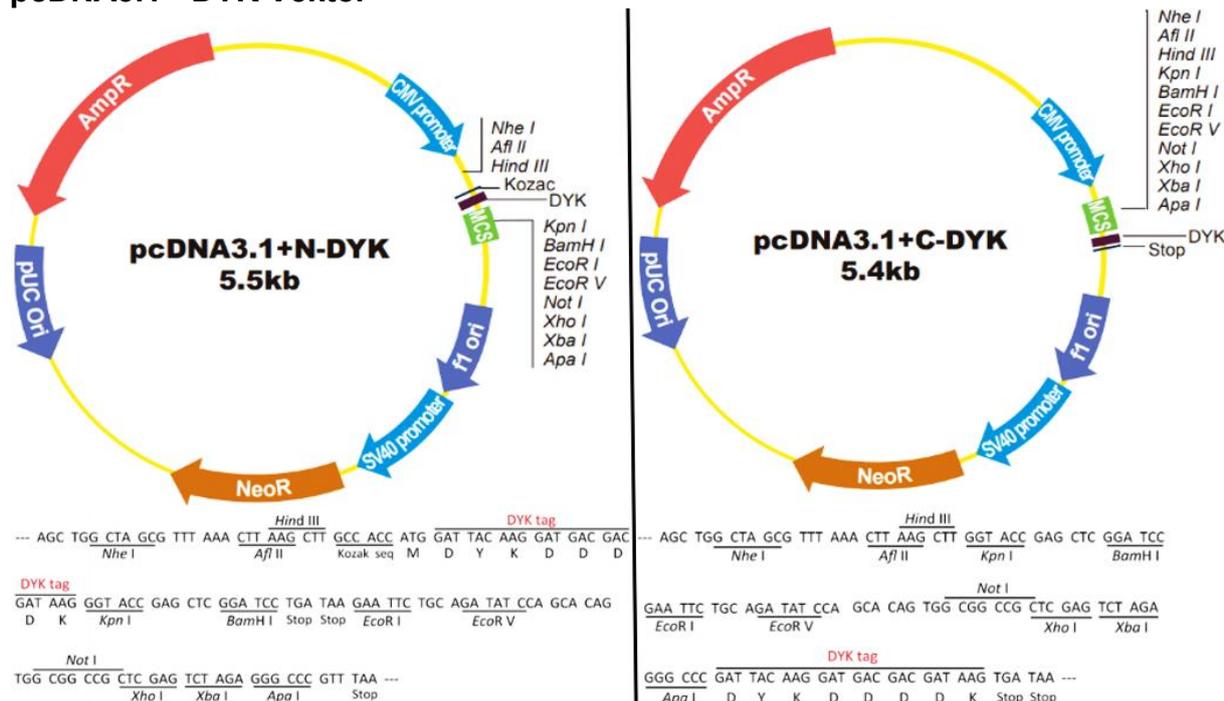
GeneRuler™ 50 bp Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 100 bp Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 1 kb Ladder	Fermentas

### 2.7.2 Protein-Größenstandards

Precision Plus Protein™ WesternC™ Protein Standard (Bio-Rad)  
Precision Strep Tactin-HRP Conjugate (Bio-Rad)  
zur Chemilumineszenz Sichtbarmachung

## 2.8 Vektoren und Expressionskonstrukte

Konstrukname	Vektor	ORF Sequenz Homo Sapiens	Gen Länge	Resis.	Firma
C-FLAG-Kontrolle	pcDNA3.1+/C-(K)-DYK			Amp	GenScript
C-FLAG-BIRC5	pcDNA3.1+/C-(K)-DYK	NM_001168.3	426 bp	Amp	GenScript
N-FLAG-Kontrolle	pcDNA3.1(+)-N-DYK			Amp	GenScript
N-FLAG-BIRC5	pcDNA3.1(+)-N-DYK	NM_001168.3	441 bp	Amp	GenScript

**pcDNA3.1+DYK Vektor**

**Abb. 11 Vektorkarten des pcDNA3.1+ Vektors.** Die Vektorkarten dienen der Kartierung von Restriktionsschnittstellen, der Klonierungskassette und des CMV-Promotors zur Expression in Säugerzellen. Bei den verwendeten Plasmiden handelte es sich um *mammalian high copy* Expressions-Vektoren. Die Vektoren besaßen zur Anzucht in kompetenten *E-coli*-Stämmen eine Ampicillin-Resistenz. In diesen Vektoren klonierte ORFs (*BIRC5*-Gen) exprimierten N-terminal (links) oder C-terminal (rechts) an das BIRC5-Protein gebundenes FLAG (DYKDDDDK Tag, Sigma Aldrich). Bei der in der Vektorkarte jeweils gezeigten *Multiple Cloning Site* (MCS) handelte es sich um ein artifizielles DNA-Oligonukleotid. Sie enthielt aufeinander folgende einzigartige Restriktionsschnittstellen für Restriktionsendonukleasen, zur Klonierung von DNA in das Plasmid (Vektorkarten GenScript®).

**C-FLAG-BIRC5-Vektor (FLAG = DYK)**

Konstrukt Name: BIRC5\_OHu23310D\_pcDNA3.1+/C-(K)-DYK

ORF Clones (Zugangs-Nr.): NM\_001168.3(ORF Sequenz), 426 bp

Vektor: pcDNA3.1+/C-(K)-DYK, Vektor-Quelle: Genscript® IP free vector

Finale Sequenz:

ATGGGTGCCCCGACGTTGCCCCCTGCCTGGCAGCCCTTTCTCAAG  
 GACCACCGCATCTCTACATTCAAGAACTGGCCCTTCTGGAGGGC  
 TGCGCCTGCACCCCGGAGCGGATGGCCGAGGCTGGCTTCATCCAC  
 TGCCCCACTGAGAACGAGCCAGACTTGGCCCAGTGTTCCTTCTGC  
 TTCAAGGAGCTGGAAGGCTGGGAGCCAGATGACGACCCCATAGAG  
 GAACATAAAAAGCATTTCGTCGGTTGCGCTTTCCTTTCTGTCAAG  
 AAGCAGTTTGAAGAATTAACCCTTGGTGAATTTTTGAACTGGAC  
 AGAGAAAGAGCCAAGAACAATTGCAAAGGAAACCAACAATAAG  
 AAGAAAGAATTTGAGGAACTGCGGAGAAAGTGCGCCGTGCCATC  
 GAGCAGCTGGCTGCCATGGAT

C-FLAG-Nukleotidsequenz: GATTACAAGGATGACGACGATAAG

FLAG-Proteinsequenz: DYKDDDDK

N-FLAG Variant Sequenz: GGTACCTGAGGATCC

**N-FLAG-BIRC5-Vektor**

Konstrukt Name: BIRC5\_OHu23310C\_pcDNA3.1(+)-N-DYK  
 ORF Clones (Zugangs-Nr.) NM\_001168.3(ORF Sequenz), 441 bp  
 Vektor: pcDNA3.1(+)-N-DYK, Vektor-Quelle: Genscript® IP free vector,  
 5' Default Cloning Site: KpnI GGTACC, 5' Start Codon: ATG,  
 3' Stop Codon: TGA, 3' Default Cloning Site: BamHI GGATCC

Finale Sequenz:

```
GGTACCATGGGTGCCCCGACGTTGCCCCCTGCCTGGCAGCCCTTT
CTCAAGGACCACCGCATCTCTACATTCAAGAACTGGCCCTTCTTG
GAGGGCTGCGCCTGCACCCCGGAGCGGATGGCCGAGGCTGGCTTC
ATCCACTGCCCCACTGAGAACGAGCCAGACTTGGCCAGTGTTC
TTCTGCTTCAAGGAGCTGGAAGGCTGGGAGCCAGATGACGACCCC
ATAGAGGAACATAAAAAGCATTTCGTCCGTTGCGCTTTCCTTTCT
GTCAAGAAGCAGTTTGAAGAATTAACCCTTGGTGAATTTTTGAAA
CTGGACAGAGAAAGAGCCAAGAACAAAATTGCAAAGGAAACCAAC
AATAAGAAGAAAGAATTTGAGGAAACTGCGGAGAAAGTGCGCCGT
GCCATCGAGCAGCTGGCTGCCATGGATTGAGGATCC
```

**2.9 Antikörper****2.9.1 Western Blot****2.9.1.1 Primärantikörper**

Erstantikörper	Firma	Spezies		Puffer	kDa	Verdünnung
GAPDH (6C5)	Abcam®	Maus	mAB	5 % Milch TBS-T	36	1:10000
HPRT1 (EPR5298)	Abcam®	Kaninchen	mAB	5 % Milch TBS-T	24	1:1000
NF-κB (p50) (D7H5M)	Cell Signaling®	Kaninchen	mAB	5 % Milch TBS-T	50	1:1000
RELA (p65) (L8F6)	Cell Signaling®	Kaninchen	mAB	5 % Milch TBS-T	65	1:1000
STAT3 (124H6)	Cell Signaling®	Maus	mAB	5 % Milch TBS-T	88	1:1000
BIRC5	Novus Biologicals™	Kaninchen	pAB	5 % Milch TBS-T	16	1:1000
XIAP, Klon 28	BD Bioscience	Maus	mAB	2,5 % Milch TBS-T	57	1:1000
TBP (D5G7Y)	Cell Signaling®	Kaninchen	mAB	5 % Milch TBS-T	35-45	1:1000
Ku80 (C48E7)	Cell Signaling®	Kaninchen	mAB	5 % Milch TBS-T	80	1:1000
TARDBP (D9R3L)	Cell Signaling®	Kaninchen	mAB	5 % Milch TBS-T	35; 45	1:1000
HNRNPK (D9A8)	Cell Signaling®	Kaninchen	mAB	5 % Milch TBS-T	58-62	1:1000
FLAG (M2)	Sigma-Aldrich®	Maus	mAB	5 % Milch TBS-T	1	1:1000

Übersicht den im Western Blotting eingesetzten Primärantikörpern. Inkubation über Nacht, mAB = monoklonaler Antikörper, pAB = polyklonaler Antikörper, kDa = Kilodalton, TBS-T = Tris-Buffered-Saline + Tween 20

**2.9.1.2 Antikörper Co-Immunpräzipitation (Co-IP)**

Antikörper	Firma	Spezies	Verdünnung
Survivin	Novus Biologicals™	Kaninchen pAB	2 µg
BIRC5 (71G4B7)	Cell Signaling®	Kaninchen mAB	2 µg
BIRC5 Klon J.33.5	Invitrogen	Kaninchen mAB	2 µg

Für die Co-IP wurden 2 µg des Antikörpers pro Immunpräzipitationsansatz verwendet.

### 2.9.1.3 IgG-Kontrolle der Co-Immunpräzipitation

Antikörper	Firma	Spezies	Verdünnung
Kaninchen IgG X0903	Dako	Kaninchen	2 µg in 300 µl PBS/ Tween (0,02 %)

### 2.9.1.4 Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Spezies	Verdünnung
Anti-Maus IgG-HRP	Sigma-Aldrich®	Ziege	1:1000 - 1:10000
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Cell Signaling®	Ziege	1:1000/ 1:10000

Übersicht der für das Western Blotting verwendeten Sekundärantikörper.

### 2.10 Real Time PCR-Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Roche Sonde	Amplikon (nt)	Gen
E-Cadherin (CDH1) fw*	TGGAGGAATTCTTGCTTTGC	84	64	NM_004360.5
E-Cadherin (CDH1) re*	CGCTCTCCTCCGAAGAAAC			
DICER fw	ACCTGATGCCAGGAGCTTAG	47	134	NM_177438.3
DICER re	GAGGCATTTTTCTCCACTG			
DICER fw	TGTTCCAGGAAGACCAGGTT	8	76	
DICER re	ACTATCCCTCAAACACTCTGGAA			
GAPDH fw	AGCCACATCGCTCAGACAC	60	66	NM_002046.7
GAPDH re	GCCCAATACGACCAAATCC			
HPRT1 fw	TGACCTTGATTTATTTTGCAT	73	102	NM_000194.3
HPRT1 re	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT			
NFκB1 fw	CTGGCAGCTCTTCTCAAAGC	22	71	NM_003998.4
NFκB1 re	TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA			
RELA fw	ACCGCTGCATCCACAGTT	47	83	NM_021975.4
RELA re	GATGCGCTGACTGATAGCC			
SNAI2 fw*	TGGTTGCTTCAAGGACACAT	7	77	NM_003068.4
SNAI2 re*	GCAAATGCTCTGTTGCAGTG			
STAT3 re	CGGTCTCAAAGGTGATCAGG	14	77	NM_003068.4
STAT3 fw	GAGCAGAGATGTGGGAATGG			
TBP fw	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	3	75	NM_003194.5
TBP re	CACACGCCAAGAAACAGTGA			
ZEB2 fw*	CCAGACCGCAATTAACAATG	65	111	NM_014795.3
ZEB2 re*	ATGCTGACTGCATGACCATC			
Vimentin fw*	TACAGGAAGCTGCTGGAAGG	34	104	NM_003194.5
Vimentin re*	ACCAGAGGGAGTGAATCCAG			

Übersicht der in der Real Time PCR verwendeten Oligonukleotide. Die Primer wurden mit dem Programm ProbeFinder Version 2.50 und \*2.53 für das humane Gen design. Fw = forward, re = reverse. Die Synthese erfolgte über die Firma Eurofins Genomics.

## 2.11 MicroRNA-Assays für qPCR und MirVana™ Mimics und Inhibitoren

miRBase ID	Sequenz mature microRNA
mmu-miR-124a	mmu UAAGGCACGCGGUGAAUGCC
hsa-miR-124-3p	hsa UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA
hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
hsa-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAAUACCAC
hsa-miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
hsa-miR-145-3p	GGAUUCCUGGAAAUACUGUUCU
hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG
hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGUCUGUU
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC

Die Primer der microRNA-Assays der Firma Thermo Fisher Scientific, zum Nachweis der microRNAs über die qRT-PCR, basierten auf den hier dargestellten Sequenzen. Die Mimics- und Inhibitor-Assays stammten auch von Thermo Fisher Scientific und basieren auf den gleichen Sequenzen der jeweiligen microRNA. Die Informationen zu den Sequenzen entstammen miRBase Version v22.1.

## 2.12 Pri-microRNA-Assays (Thermo Fisher)

Stem-loop	Stem-loop Zugang	microRNA	Stem-loop Sequenz	Chromosomen Lokalisation
hsa-miR-124-1	MI00004 43	hsa-miR-124-3p	AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUU GAUUUAAAUGUCCAUAACAAUUAAGGCACGCG- GUGAAUGCCAAGAAUGGGGCGUG	Chr. 8 - 9903388 - 9903472 [-]
hsa-miR-124-2	MI00004 44	hsa-miR-124-3p	AUCAAGAUUAGAGGCUCUGCUCUCCGUGUUCA CAGCGGACCUUGAUUUAAUGUCAUACAAUUA GGCACGCGGUGAAUGCCAAGAGCGGAGCCUA- CGGCUGCACUUGAA	Chr. 8 - 64379149 - 64379257 [+]
hsa-miR-124-3	MI00004 45	hsa-miR-124-3p	UGAGGGCCCCUCUGCGUGUUCACAGCGGACCU UGAUUUAAUGUCUAUACAAUUAAGGCACGCG- GUGAAUGCCAAGAGAGGCCUCC	Chr. 20 - 63178500 - 63178586 [+]
hsa-miR-24-1	MI00000 80	hsa-miR-24-3p	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUACAGUUCUC AUUUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACA GGAG	Chr. 9 - 95086021 - 95086088 [+]
hsa-miR-24-2	MI00000 81	hsa-miR-24-3p	CUCUGCCUCCCGUGCCUA- CUGAGCUGAAACACAGUUGGUUUGUGUACA- CUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGG	Chr. 19 - 13836287 - 13836359 [-]
hsa-miR-23b	MI00004 39	hsa-miR-23b-3p	CUCAGGUGCUCUGGCUCUUGGGUUCUGGCA UGCUGAUUUGUGACUUAAGAUUAAAUCACAU UGCCAGGGAAUACCACGCAACCACGACCUUGGC	Chr. 9 - 95085208 - 95085304 [+]

## 2.13 Kit Systeme

Name	Hersteller
Clarity™ Western ECL Substrate Kit	Bio-Rad
Quick Blunting™ Kit	New England Biolabs®
NucleoBond™ Xtra Midiprep/ Maxiprep Kit	Macherey-Nagel™
RNeasy/miRNeasy Mini Kit	Qiagen
Direct-zol™ RNA Kits	Zymo
miRNeasy FFPE Kit	Qiagen

## 2.14 Laborgeräte

### 2.14.1 Thermozykler

Name	Hersteller
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
S1000 Thermal	Bio-Rad
GeneTouch™ Thermal Cycler	Bulldog Bio
Chromo4 Real-Time PCR Detector	Bio-Rad
AriaMx Real-time PCR System	Agilent

### 2.14.2 Sterilbänke und Inkubatoren

Name	Hersteller
Brutschrank 6000	Heraeus™
HeraCell™ 240	Heraeus™
Sterilbank	Thermo Electron Corporation

### 2.14.3 Zentrifugen

Name	Hersteller
PlateFuge™	Benchmark
Micro6	Quick-Pak
MiniSpin®Plus	Eppendorf
Multifuge™ 4 KR	Heraeus™
Universal 30RF	Hettich
5417R	Eppendorf
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Fresco™ 17 Centrifuge	Heraeus™
Megafuge™ 1.0R	Heraeus™
LabDancer	VWR™

### 2.14.4 Kühl- und Gefrierschränke

Name	Hersteller
Comfort	Liebherr
Sparkfree Laboratory Freezer	Thermo Fisher
Premium Biofresh	Liebherr

### 2.14.5 Heizblöcke und Wasserbäder

Name	Hersteller
Wasserbad	NeoLab®

### 2.14.6 Waagen

Name	Hersteller
Analysewaage	Kern & Sohn GmbH
Feinwaage Voyager®Pro	Pro Ohaus

### 2.14.7 Mikroskope

Name	Hersteller
Axiovert 200	Carl Zeiss
Axioplan-2 Imaging	Carl Zeiss
DMIL	Leica

### 2.14.8 Sonstiges

Name	Hersteller
Autoklav D-65	Systemec
Bioanalyser 2100	Agilent
Criterion Blotter™	Bio-Rad
Dispenser Pipetten	Eppendorf
Elektrophoresekammer GENEMate	Starlab
Magnetrührer	IKA™ Labortechnik
Mini-PROTEAN® Elektrophorese System, Mini-Protean II Zelle, MINI-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell mit Mini Trans-Blot® Modul	Bio-Rad
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer	Brand
Orbitalschüttler	VELP Scientifica™
Küvetten-Photometer Bio-Photometer	Eppendorf
pH-Meter 211	HANNA Instruments
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfen, PipetBoy	Eppendorf, Integra Biosciences , VWR™
PowerPac™ 300	Bio-Rad
PowerPac™ Basic	Bio-Rad
PTR-35 360 Degree Vertical Multi-Function Rotator	Grand-bio
Rollschüttler SU1400	NeoLab®
Rotationsschüttler	IKA Labortechnik
Stickstofftank	Cryotherm
Tecan Infinite™ M200 Spektrometer	Tecan
Thermomixer® Comfort	Eppendorf
Thermoblock	HLC
VersaDoc™ Imaging System MP 4000	Bio-Rad
Vortex Mixer	NeoLab®
IKA Vortex Mixer	IKA™ Labortechnik

### 2.15 Software

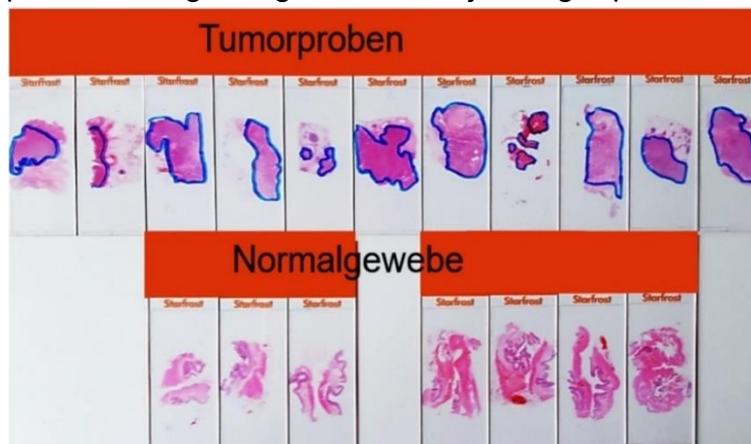
Name	Hersteller
AriaMX Software	Agilent
BRAD.micro	Bio-Rad
DIANA Tools: miR-Path V.3, Tarbase V.7.0	Vlachos et al. (2014-2015)
GraphPad Prism V.5 -9	GraphPad Software
i-control™ V1.9	Tecan
InteractiVenn (unions by list)	Heberle et al. (2015)
KEGG Mapper Version 5.0	Kanehisa et al. (2020-2021)
Quantity One V 4.5.0	Bio-Rad
Opticon® Monitor V 3.1.32	Bio-Rad
Microsoft Office	Microsoft
NECcloner® V 1.10.0	New England Biolabs®
Heatmapper	Babicki et al. (2016)
ProbeFinder Assay Design Software	Roche

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Gesamt-RNA-Isolation aus FFPE-Patientenproben

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus FFPE-Proben mit enthaltenden microRNAs wurde das miRNeasy FFPE-Kit von Qiagen verwendet. Die FFPE-Proben von Patienten mit Colon-NEC-Tumoren (Grad 3 Status) stammten aus der Pathologie der Uniklinik Düsseldorf (UKD). Die Beurteilung nach Resektion der Tumore, durchgeführt von Prof. Dr. A. Krieg, erfolgte im Rahmen der Behandlung der NEC-Patienten durch die Pathologie des UKD. Dies umfasste mehrere Sektionen des Tumorgewebes, die in Randbereichen ein Gemisch gesunder und maligner Zellen enthielten. Der Pathologe Dr. H. Mayringer hat in allen HE-Schnitten der Tumorproben die Bereiche markiert, die ausschließlich Tumorzellen enthielten (s. Abb. 12). Sowohl die Anfertigung der HE-Schnitte, die Schnitte für die Gesamt-RNA-Isolation als auch die Bewertung der Tumorproben erfolgten durch die Pathologie. Die ersten Schnitte vom FFPE-Block wurden verworfen, da sie Kontakt zur Luft hatten. Für die Probenisolation wurden zehn Schnitte mit 10 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger platziert.



**Abb. 12 HE-Schnitte zur Gesamt-RNA-Isolation aus FFPE-Gewebe.** Die Pathologie (UKD) stellte 11 FFPE-Patientenproben von Colon-G3-NEC-Tumoren zur Verfügung. Die Anfertigung der HE-Schnitte und die Eingrenzung der Tumorbereiche erfolgte innerhalb der Pathologie. Der Tumorbereich (blaue Umrandung) wurde vom Pathologen H. Mayringer eingekreist und enthält nur Tumorgewebe. Die HE-Schnitte dienten als Vorlage für die eigenständig durchgeführte Probenisolation. Vergleichend für das weitere Verfahren wurde entsprechendes Normalgewebe gleichen Ursprungs mitgeführt. Die abgebildeten Schnitte wurden für diese Arbeit eigenständig fotografiert.

Die HE-Schnitte wurden für die eigenständig durchgeführte und im Folgenden beschriebene Probengewinnung verwendet. Nach dem Backen der Schnitte in einem Wärmeofen bei 60 °C für 1 h erfolgte die Entparaffinisierung und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe: 2-mal für 10 min in Xylol, dann jeweils 2-mal je 2 min mit 99,5 %, 96 %, 80 %, einmal in 70 % Ethanol und einmal für 5 min in *A. dest.* mit 3 % Glycerin. Damit für die Tumorproben nur reines Tumorgewebe isoliert wurde, erfolgte

die Mikrodissektion mit einer Kanüle vom Objektträger mit Hilfe der HE-Schnitte als Vorlage. Das Probenmaterial wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben.

Nachfolgend wurde das Protokoll des miRNeasy FFPE-Kits durchgeführt, aus dem die Reagenzienbezeichnungen stammen. 240 µl des PKD-Puffers wurden auf die Proben gegeben und diese kurz gevortext. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 11 000 g. Nach Zugabe von 20 µl Proteinkinase K zur unteren, farblosen Phase wurden die Proben vorsichtig gemischt. Der Proteinkinase K Verdau erfolgte über Nacht bei 56 °C, da dies einen besseren Aufschluss der Proben und höheren RNA-Gewinn ermöglichte. Die Vernetzungen der Formalinfixierung wurden so aufgelöst und Proteine, DNA und RNA zugänglich gemacht.

Am Folgetag wurden die Proben bei 80 °C für 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Die untere farblose Phase wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, für 3 min auf Eis gehalten und für 15 min bei 20 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet enthielt unlösliche Zellbestandteile und vernetzte DNA. Der DNase-Booster-Puffer wurde in einem Verhältnis von 1:10 des Gesamtprobenvolumens und 10 µl DNase-Stocklösung zu den Proben hinzugegeben und gemischt. Es folgte eine kurze Zentrifugation und eine nachfolgende 15 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Im Anschluss wurden 500 µl RBC-Puffer zum Lysat hinzugegeben und gründlich gevortext.

Nach Zugabe von 1 750 µl Ethanol (100 %) wurden die Proben gründlich gemischt und 700 µl der jeweiligen Probe auf je eine Säule pipettiert. Es folgte eine Mehrfachbeladung mit dem gesamten Lysat. Hierbei war die Beladungskapazität der Säulen zu beachten. Für Proben mit großem Gewebebereich wurden daher 2 Säulen verwendet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 sek bei 8 000 g. Der Durchfluss wurde verworfen. Als Waschschrift wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und 15 sek bei 8 000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit einer 2 min Zentrifugation wiederholt. Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß überführt und mit geöffnetem Deckel bei voller Geschwindigkeit für 5 min zentrifugiert. Hierdurch wurde die Membran von Ethanolresten befreit. Abschließend erfolgte der Elutionsschritt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 14 - 30 µl RNase-freiem Wasser. Zur besseren Löslichkeit der RNA wurden die Säulen 5 min inkubiert und 1 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C. Die RNA-Konzentration wurde über eine photometrische Messung mittels Tecan Infinite™ M200 ermittelt. FFPE-Proben zeigten durch den Fixierungsprozess und Lagerung generell eine hohe Fragmentierung

der DNA und RNA und dadurch einen niedrigen RIN-Wert (Bereich 1,5 - 3). Die microRNA-Array-Analyse erfolgte mit Proben mit vergleichbaren RIN-Werten.

### **3.1.2 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanen Karzinom-Zelllinien**

Für die Isolation von Gesamt-RNA mit microRNAs wurde das miRNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Hierzu wurden maximal  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Zunächst erfolgte die Gewinnung der Zellen durch Waschen mit PBS und anschließend mit 0,25 % Trypsin. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe gleicher Mengen Zellkulturmedium mit 5 % FCS gestoppt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 110 g und Waschen des Pellets mit PBS mit anschließender Zentrifugation. Das PBS wurde vollständig abgenommen. Das Zellpellet konnte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mehrere Monate und für eine Woche bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Generell war kein DNase-Verdau notwendig, da durch Qiazol und das RNeasy Kit der Großteil an DNA eliminiert wurde. Die Zellen wurden durch Zugabe von 700  $\mu\text{l}$  QIAzol-Lyse Reagenz und anschließendem Pipettieren homogenisiert. Jedes Lysat wurde mit einer 1 ml Spritze mehrmals aufgezogen und weiter lysiert. Die Proben wurden für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, wodurch Nukleoproteinkomplexe aufgelöst werden konnten. Im nächsten Schritt wurde 140  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzu pipettiert, für 15 sek stark gevortext und für 2 - 3 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 12 000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nachfolgende Schritte erfolgten bei RT. Das Lysat teilte sich in drei Phasen auf. Die obere farblose Phase enthielt die RNA, eine weiße Interphase und eine untere, violette, organische Phase.

Die obere Phase wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und das 1,5-Fache des Probenvolumens 70 % Ethanol zum RNA-Lysat gegeben und durch Pipettieren homogenisiert. Die gesamte Probe wurde (durch mehrfaches Beladen) auf eine Säule in einem 2 ml Sammelgefäß gegeben und bei 8 000 g für 15 sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nun konnte ein DNase-Verdau auf der Säule erfolgen. Da für diese Arbeit die Gesamt-RNA (mRNA und microRNAs) relevant war, wurde keine separate Aufreinigung durchgeführt. Ohne DNase-Verdau wurde der folgende Schritt hinzugefügt. Auf die Säulen wurden 700  $\mu\text{l}$  RWT-Puffer gegeben und bei 8 000 g für 15 sek zentrifugiert, um die Säule zu waschen. Nachfolgend (nach DNase-Verdau) wurden 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer auf die Säule gegeben und bei 8 000 g 15 sek zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit einer 2-min. Zentrifugation wiederholt und reinigte die Membran von Ethanolrückständen. Die Säule wurde in einem neuen 2 ml Sammelgefäß platziert und bei voller Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Final wurde die Säule in ein 1,5 ml

Reaktionsgefäß gestellt und 30 - 50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben. Zur besseren Löslichkeit erfolgte eine 5 min Inkubation, bevor die Proben letztlich 1 min bei 8 000 g eluiert wurden. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mittels Tecan Infinite™ M200.

### 3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von RNA- und DNA-Lösungen wurden über das Spektralphotometer Tecan Infinite™ M200 gemessen. Die Mikroplatte wurde mit dem Lösungsmittel, indem die Nukleinsäuren gelöst waren, zur Kalibrierung (*Blank*) beladen. Anschließend wurden 1,5 µl der Proben auf die Messfelder der Mikroplatte geladen. Es folgte die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die Werte sollten im linearen Bereich zwischen 0,5 und 1 liegen und die Nukleinsäuren wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert. Durch die Berechnung des Quotienten aus 260 nm und 280 nm wurde die Reinheit der Proben bestimmt. Für reine DNA liegt der Quotient  $OD_{260/280}$  bei 1,8 und für RNA bei 1,9.

### 3.1.4 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus den isolierten Gesamt-RNA-Proben für die qRT-PCR von Zielgenen (s. 3.1.5) oder auch pri-microRNAs (s. 3.1.9) wurde die Methode der Reversen Transkription verwendet. Hierzu wurde das qScript™ cDNA Synthesis Kit (VWR) benutzt. Die Durchführung erfolgte auf Eis. Die Proben wurden mit *A. dest.* auf 1 µg RNA in 15 µl Endvolumen entsprechend verdünnt. Alle Reagenzien wurden gut gemischt und herunterzentrifugiert. Eine *No Template*-Kontrolle (Ansatz ohne RNA) und *No Amplification*-Kontrolle (Ansatz ohne Reverse Transkriptase), zur Überprüfung der Sauberkeit der Reagenzien, erfolgte für jeden Versuchsdurchlauf und wurde auf jeder Platte mitgeführt. Zum RNA-Gemisch wurden 4 µl qScript™ *Reaction Mix* (5x) und 1 µl qScript™ Reverse Transkriptase hinzugegeben, vorsichtig gevortext und herunterzentrifugiert. Der Reaktionsmix enthielt alle notwendigen Bestandteile, darunter Puffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Primer, RNase-Inhibitor, qScript™ Reverse Transkriptase und Stabilisatoren.

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels Thermozykler. Für 5 min wurden zunächst 22 °C angelegt zur Linearisierung der Einzelstränge, dann folgte die weitere Synthese der DNA durch einen Temperaturschritt von 42 °C für 30 min und letztlich die Inaktivierung des Enzyms bei 85 °C für 5 min. Bei 4 °C konnte die cDNA ein paar Stunden gehalten und bei -20 °C letztlich gelagert werden.

### 3.1.5 Messung der RNA-Expression mittels Real-Time PCR

Die quantitative Analyse der RNA-Expression erfolgte mittels quantitativer Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Verwendet wurden bis zu 50 ng cDNA, Primer mit 20  $\mu$ M Stockkonzentration, PerfeCta<sup>®</sup> FastMix II und Sonden mit einer 10  $\mu$ M Stockkonzentration. Die verwendeten TaqMan<sup>™</sup>-Sonden der Firma Roche trugen an ihrem 5'-Ende einen Reporter-FAM-Fluoreszenzfarbstoff und an ihrem 3'-Ende einen sogenannten Quencher. Bei direkter Nähe des Quenchers zum Reporter wird die Fluoreszenz des FAM-Farbstoffs neutralisiert. Während des PCR-Laufs wird die Sonde in den komplementären Strang eingebaut. Die Taq-Polymerase spaltet mittels ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität den Reporter ab, wodurch die Fluoreszenz messbar wird. Die PCR-Amplifikation wird also gemessen, während sie abläuft, und für jeden neuen Zyklus (insgesamt 40 Zyklen) dokumentiert. Die Messung erfolgt in der logarithmischen Phase, d.h. das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes ist proportional zur Menge des Nukleinsäure-Templates. Der gemessene Ct-Wert (Zyklusschwelle) beschreibt hierbei den Schnittpunkt zwischen einer Amplifikationskurve (Fluoreszenzsignale der 40 Zyklen) und einer definierten Schwellenwertlinie und ist ein relatives Maß für die Konzentration des PCR-Produktes, weshalb die qRT-PCR semiquantitativ ist. Die *forward* und *reverse* Primer mit den zugehörigen Sonden wurden mit dem Programm ProbeFinder 2.50 - 2.53 und Intron-überspannend designt, wodurch sie nicht an genomische DNA binden konnten. Die Synthese der lyophilisierten Primer erfolgte über die Firma Eurofins Genomics.

Im Rahmen der qRT-PCR wurden für jede Probe Dreifachbestimmungen im 96-Well-Format durchgeführt. Hierzu wurden pro Ansatz 10  $\mu$ l PerfeCta<sup>®</sup> Fast Mix II (2-fach Konzentrat), 0,2  $\mu$ l Sonde (0,1  $\mu$ M) und je 0,2  $\mu$ l des *forward* (5'-3') bzw. *reverse* (3'-5') Primers (0,2  $\mu$ M) eingesetzt und der Gesamtansatz mit *A. desf.* auf 18  $\mu$ l pro Well gebracht.

Die Effizienz der Primer für jedes Gen von Interesse (GOI) wurde jeweils überprüft. Es wurden Primer mit Effizienzen zwischen 90 - 110 % eingesetzt. Die zur Normalisierung und als interne Kontrolle verwendeten Primer (GAPDH - Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HPRT1 - Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 und TBP - TATA-Bindeprotein) wurden nach der Pfaffl-Methode überprüft, die die Primer-Effizienz miteinbezieht (Pfaffl 2001). Nicht jedes Normalisierungsgen (NG) ist für jedes Gewebe bzw. jeden Versuchsaufbau geeignet, da während des Versuchsdurchlaufs Schwankungen in seiner Expression auftreten können. Die Pfaffl Methode berechnet

die Genexpressions-Ratio, bei der E die Primer-Effizienz und  $\Delta Ct$  den Mittelwert (MW) der jeweiligen Zyklusschwelle bezeichnet:

$$\text{Gen-Expressions-Ratio} = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}}}{(E_{NG})^{\Delta Ct_{NG}}}$$

Bei keiner Änderung zwischen NG und GOI beträgt die Ratio 1, das NG bleibt also im Rahmen des Versuchs stabil und ist somit geeignet.

Als Negativkontrolle der qRT-PCR diente die *No Template* Kontrolle und die *No Amplification* Kontrolle aus der cDNA-Synthese, die keine Reverse Transkriptase enthielt. Als *Blank* zur Kalibrierung des PCR-Laufs wurde der PerfeCta<sup>®</sup>-Reaktions-Mix mit Primern mit *A. dest.* eingesetzt (statt cDNA). Für die jeweiligen Probenansätze in einer 96-Well-Platte (weiß) wurden zu den 18  $\mu$ l Reaktionsansatz 2  $\mu$ l cDNA-Produkt gegeben und die Reaktionsgefäße mit lichtdurchlässigen Strips verschlossen. Die Platte wurde anzentrifugiert und im qPCR-Thermalzykler gemessen:

- 1) 95 °C                    2 min
- 2) 95 °C                    10 sek
- 3) 60 °C                    30 sek
- 4) Fluoreszenzmessung
- 5) Bei 2) neu beginnen für 39 Zyklen
- 6) Ende 4 °C  $\infty$

Die Auswertung der Messung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode nach Livak (Livak und Schmittgen 2001). Die n-fache Expression der RNA wird in Relation zur Expression des NG innerhalb derselben Probe gesetzt. Der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert liefert die relative vervielfältigte Genexpression nach einer Veränderung (Behandlung, Erkrankung). Während jedes Zyklus vervielfältigt sich die Menge der DNA um den Faktor 2. Bei der Berechnung des  $\Delta Ct$ -Wertes wird der Ct-Mittelwert der Kontrollproben verwendet. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\Delta\Delta Ct = ((Ct_{(MW_{GOI})} - Ct_{(MW_{GOI})}) - (Ct_{(NG)} - Ct_{(MW_{NG})})).$$

### 3.1.6 Überprüfung der Effizienz der verwendeten Oligonukleotide

Zur Ermittlung der Effizienz von qPCR-Primern wurden Effizienzkurven erstellt. Dazu kam eine Referenz-cDNA zum Einsatz. Die Firma Agilent lieferte eine gepoolte humane Gesamt-RNA aus 10 verschiedenen humanen Karzinom-Zelllinien (QPCR *Human reference Total RNA* 1  $\mu$ g/ $\mu$ l). Diese wurde in 1/10 Verdünnungen von 10 - auf eine Konzentration von 0,0001 ng/ $\mu$ l herabgesetzt und mit einem Volumen von 2  $\mu$ l in den qPCR-Reaktionen eingesetzt. Die Referenz-RNA lieferte stabile Ergebnisse, die als Kontrolle dienten und verschiedene Durchläufe vergleichbar machten. Die Ct-Werte der einzelnen cDNA-Verdünnungen werden in ein Diagramm übertragen, mit

den Konzentrationen als X-Achse. Eine Ausgleichsgerade wird durch die Punkte gelegt. Über die Steigung (X) mit  $R^2$  als Korrelationskoeffizient erfolgt die Berechnung der Effizienz (E) über folgende Formel:

$$E = \left(10^{\left(\frac{R^2}{X}\right)}\right)$$

Hierbei sollte  $R^2 > 0,98$  entsprechen, damit die Effizienz idealerweise bei einem Wert von 2 liegt. Dies entspricht einer Verdopplung des PCR-Produkts pro Zyklus. Es wurden Primer bis zu einer Effizienz von 1,8 für die qRT-PCR verwendet.

### 3.1.7 Reverse Transkription für microRNAs

Die Isolation von microRNAs erfolgte mit dem miRNEasy Mini Kit (Qiagen). Es enthielt alle für die Reaktion notwendigen Komponenten, mit Ausnahme der Primer (TaqMan™ MicroRNA-Assays Thermo Fisher). Verwendet wurden spezifische *Stem-loop*-RT-Primer, die nur die maturierte microRNA von Interesse banden. Für die Reverse Transfektion wurden 1 - 10 ng Gesamt-RNA pro 15 µl Reaktionsansatz umgesetzt.

Alle Komponenten wurden gevortext, herunterzentrifugiert und für die Reaktion, mit Ausnahme der RNA, auf Eis zusammengeführt. Der Ansatz bestand aus 0,15 µl 100 mM dNTPs (mit dTTP), 1 µl der Multiscribe™ Reverse Transkriptase (50 Units/µl), 1,5 µl des 10-fach Reverse Transkriptase-Puffers, 0,19 µl RNase Inhibitoren (20 Units/µl), aufgefüllt mit Nuklease-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 13 µl für jeden Reaktionsansatz. Je nach Probenzahl wurden mit Anpassung der Mengen der einzelnen Komponenten ein größerer Reaktionsansatz hergestellt und von diesen je 13 µl in Reaktionsgefäße auf Eis vorgelegt. Von der jeweiligen Probe wurde mit Nuklease-freiem Wasser eine Verdünnung hergestellt, von der 2 µl zum 13 µl Reaktions-Ansatz pipettiert wurde, um 10 ng RNA zu erhalten. Als *No Template* Kontrolle wurde ein Ansatz nur mit Nuklease-freiem Wasser hergestellt zur Überprüfung auf Verunreinigungen der Reagenzien. Final wurden zu jedem Ansatz 3 µl des jeweiligen Primers hinzugegeben, dies führte zu einem Gesamtvolumen von 18 µl.

Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Thermozykler nach folgenden Bedingungen: Für 30 min wurden die Proben bei 16 °C gehalten, danach folgten 30 min bei 42 °C und schließlich für 5 min 85 °C. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -15 °C bis -20 °C.

### 3.1.8 Messung der microRNA-Expression mittels Real-Time PCR

Für die Durchführung der quantitativen PCR zum Nachweis von microRNAs wurde der TaqMan™ Universal PCR Master Mix II (mit UNG = Uracil DNA Glycosidase), der

TaqMan™ microRNA-Assay (Sonde) und die jeweilige cDNA benötigt, die zuvor mit entsprechenden Primern versetzt wurden. Alle Materialien wurden auf Eis aufgetaut, durch Invertieren gemischt und herunterzentrifugiert. Der microRNA-Assay war spezifisch für die jeweilige microRNA und enthielt die TaqMan™ MGB-Sonde. Diese besaß einen Reporter FAM-Farbstoff am 5'-Ende und einen nicht-fluoreszenten Quencher-Farbstoff (NFQ) am 3'-Ende (s. 3.1.5). Die DNA-Polymerase spaltete mit der Ziel-Sequenz hybridisierte Sonden, wodurch die Fluoreszenz messbar wurde.

Für die weitere Durchführung wurden für jede Probe Dreifachbestimmungen berücksichtigt. Das jeweilige Gesamtreaktionsvolumen betrug 20 µl und das maximal einzusetzende Volumen an cDNA 2 µl. Des Weiteren wurden *No Template* Kontrollen aus der cDNA-Synthese mitgeführt und für jede Sonde *Blank* Ansätze eingeplant, die keine cDNA, sondern Nuklease-freies Wasser enthielten. Der *Blank* diente dem Ausschluss von unspezifischen Signalen. Der PCR-Reaktionsansatz bestand aus 10 µl Universal PCR Master Mix II, 7 µl Nuklease-freiem Wasser, 1 µl des 20-fachen RNA-Assays und 2 µl der cDNA. Die Proben wurden in weißen PCR-Platten angesetzt, mit optischen Strips verschlossen, herunterzentrifugiert und im Thermalzykler nach folgendem Programm gemessen:

- 1) 50 °C                    2 min
- 2) 95 °C                    10 min (Enzymaktivierung)
- 3) 95 °C                    15 sek (Denaturierung)
- 4) 60 °C                    60 sek (Amplifikation)
- 5) Fluoreszenzmessung
- 6) bei 3) neu beginnen für 39 Zyklen
- 7) Ende 4 °C ∞

Die Ergebnisauswertung der Messung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (s. 3.1.5).

Zur Normalisierung wurde die U6 snRNA, eine nicht kodierende kleine nukleäre RNA (*small nuclear RNA*), verwendet.

### 3.1.9 Messung der pri-microRNA-Expression mittels Real-Time PCR

Der Nachweis der pri-microRNA-Regulation erfolgte wie im Abschnitt 3.1.5, mit der Ausnahme, dass für Primer und Sonde TaqMan™ pri-microRNA-Assay verwendet wurden. Wie der microRNA-Assay (s. 3.1.8) enthielt dieser Assay sowohl die spezifischen PCR-Primer für die cDNA-Synthese als auch eine passende Sonde für die RT-PCR. Die Assays waren so designt, dass sie in der Nähe der Haarnadel-Sequenz banden, wie sie in der Sanger miRBase Sequenzdatenbank hinterlegt waren. Enthalten waren 2 ungefärbte PCR-Primer (900 nM, 150 nM finale 1X Reaktionskonzentration) und eine FAM-Farbstoff-markierte TaqMan MGB Sonde (250 nM finale 1X

Reaktionskonzentration). Der Assay wurde sowohl in der cDNA-Synthese mit dem VWR™ PerfeCta® Reagenzien durchgeführt (wie unter 3.1.4), als auch die Sonde mit den PerfeCta® FastMix® II (wie unter 3.1.5) verwendet. Da die pri-microRNA Untersuchung in den gleichen Zelllinien stattfand, wurden auch die gleichen Normalisierungsgene herangezogen.

### 3.1.10 Short-Tandem-Repeat (STR)-Analyse

Zur Überprüfung der Identität der verwendeten Zelllinien und um Kontaminationen mit anderen Zelllinien in der Zellkultur auszuschließen, wurden STR-Analysen eingesetzt. Verwendet wurden das Identifier-1 Kit der Firma ABI und das PowerPlex® ESI-17 Kit der Firma Promega mit insgesamt 16 zu untersuchenden Systemen. Die Probengewinnung hierzu erfolgte eigenständig im Rahmen der laufenden Zellkultur. Die STR-Analysen wurden in Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt.

### 3.1.11 Restriktion von Plasmiden

Die Überprüfung der Identität von Plasmiden war durch Restriktion der jeweiligen Plasmide mit entsprechenden Enzymen (Enzyme von New England Biolabs®) möglich. Die zugehörigen Restriktionsschnittstellen konnten den Vektorkarten entnommen werden (s. Abb. 11). Mit ihrer Hilfe konnten Plasmide in Stücke bestimmter Größe zerlegt und enthaltene Gen aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Die High-Fidelity® (HF) Restriktionsenzyme besaßen eine geringe Star-Aktivität (unspezifische Enzymaktivität). Die Restriktionsschnittstelle von BamHI lag bei G/GATCC. BamHI konnte nicht hitzeinaktiviert werden. Das geschnittene Produkt musste über ein Agarosegel aufgereinigt werden. Die Bande mit dem geschnittenen Produkt (z. B. Leervektor nach Entfernen des Inserts) wurde aus dem Gel herausgelöst und über ein entsprechendes Kit aufgereinigt. HindIII konnte bei 80 °C inaktiviert werden. Die Schnittstelle von HindIII ist A/AGCTT. Die Software NEBcloner® Version 1.10.0 lieferte für einen Doppelverdau mit beiden Enzymen ein entsprechendes Protokoll mit Puffern und Temperaturen. Der Doppelverdau wurde nach folgendem Protokoll angesetzt:

Enzym	Temperatur (°C)	Puffer	Aktivität in Puffer	Hitzeinaktivierung (°C)
BamHI-HF	37	rCutSmart™	100 %	Nein
HindIII-HF	37	rCutSmart™	100 %	80

Eingesetzt wurden 1 µg der zu schneidenden DNA (Plasmid), 5 µl (1X) des 10X rCutSmart-Puffers und je 1,0 µl, entsprechend 20 Units, der beiden Plasmide. Die Firma

empfahl die Verwendung von 10 - 20 Units für genomische DNA in einem einstündigen Verdau in einem Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl mit Nuklease-freiem Wasser. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 5 - 15 min. Der Ansatz wurde auf ein Agarosegel geladen.

### **3.1.12 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Überprüfung von PCR-Produkten nach der Restriktion von Plasmiden erfolgte über die Agarose-Gelelektrophorese mit einem 1-2%igen Agarosegel. Gel Red™ interkaliert in die DNA, macht sie so unter UV-Licht sichtbar und wurde mit in den flüssigen Ansatz gegeben. 6 µl der PCR-Probe wurden mit 2 µl DNA-Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Bewertung der Produktgröße wurden Größenstandards der Firma Fermentas aufgetragen (100 bp Leiter oder 1 kb Leiter). Je nach Größe des Gels wurde eine Spannung von 80 - 110 V für 1 h angelegt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht im VersaDoc™ 4000.

### **3.1.13 Transformation von *E. coli* DH5α**

Plasmide, die zur Transfektion in humane Zellen verwendet wurden, konnten beliebig vervielfältigt werden. Die Amplifikation von Plasmid-DNA erfolgte zunächst in der Bakterienart *Escherichia coli* (*E. coli*). Für die Transformation wurden kompetente *E. coli*-Zellen, hier des Stammes DH5α, benötigt. Die Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf hat den kompetenten Stamm zur Verfügung gestellt.

Für die Transformation wurden 1 µg Plasmid-DNA zu 50 µl Bakteriensuspension gemischt. Die Suspension wurde 20 min in einem Eisbad inkubiert, worauf ein Hitzeschock für genau 45 sek bei 42 °C folgte. Anschließend wurden die Zellen für 2 min in ein Eisbad gebracht. Währenddessen gelangte das Plasmid in die Zellen. Zu diesem Ansatz wurden 500 µl LB-Medium gegeben und es folgte eine Inkubation der Zellen für 1 h bei 37 °C bei permanentem Schütteln. Dieser Ansatz konnte in einem Erlenmeyerkolben überführt werden, der etwa 250 ml LB-Medium mit Selektionsmarker enthält. Für eine bessere Selektion konnten 100 - 200 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten ausplattiert werden. Die Agarplatten wurden zuvor mit 10 µg/ml des Antibiotikums supplementiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank im Erlenmeyerkolben auf einem Horizontalschüttler.

### **3.1.14 Isolierung von Plasmid-DNA durch Midi- bzw. Maxipräparation**

Aufgrund des Selektionsdrucks durch das Antibiotikum konnten nur *E. coli*-Zellen mit

dem aufgenommenen Plasmid wachsen. Eine Einzelkolonie wurde entnommen und zur Anzucht in 5 ml Selektionsmedium in ein Glasröhrchen überführt. Nach erneuter Inkubation über Nacht bei 37 °C unter permanentem Schütteln wurde die Vorkultur in 200 - 250 ml Selektionsmedium überführt, wo sie über Nacht (max. 18 h) bei permanentem Schütteln wuchs. Die Kultur sollte nicht zu lange inkubieren, da das Antibiotikum sonst verbraucht und Zellen ohne Plasmid aufgetreten wären.

Die Zellsuspension wurde mit Hilfe des NucleoBond™ Maxipräparationskits nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel™) aufgereinigt. Hierbei kam das Prinzip der alkalischen Lyse zum Einsatz. Ein mit RNase A versetzter NaOH/SDS-Puffer lysierte die Bakterien und denaturierte Nukleinsäuren und Proteine. Ein Überschreiten der 5-minütigen Lyse wurde vermieden, da sonst auch die DNA denaturiert wäre. Vortexen wurde vermieden, damit chromosomale DNA nicht den Ansatz kontaminiert. Der Lysepuffer wurde vor dem Beladen der Säulen mit dem entsprechenden Puffer neutralisiert. Das Gemisch wurde nach dem Prinzip der Anion-austausch-Chromatographie gefiltert, wobei die Plasmid-DNA an die Säule gebunden und aufgereinigt werden konnte. Die Bindungskapazität der Säulen wurde berücksichtigt. Das Gemisch lief aufgrund der Schwerkraft durch die Säulen. Mit mehreren Waschschritten wurden Proteine, RNA und Verunreinigungen ausgewaschen. Im Anschluss wurde die gebundene DNA über einen Puffer mit erhöhtem pH-Wert eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von Isopropanol präzipitiert, gevortext und anschließend bei 15 000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Isopropanol wurde abgegossen, das Pellet 15 - 30 min bei RT getrocknet und je nach Größe in 150 - 400 µl *A. dest.* aufgenommen.

Jedes Konstrukt wurde mittels Sanger-Sequenzierung (GATC-Service der Firma Eurofins) analysiert, um den korrekten Aufbau des Plasmids zu verifizieren und die Intaktheit des zu untersuchenden Gens sicherzustellen. Die Sequenzierung erfolgte mittels Standard-Primern der Firma Eurofins. Generell wurde der CMF-F Primer von GATC zur Sequenzierung verwendet (CMV-F CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG). Zur Sequenzierung von Plasmiden wurde eigens eine Konzentration von 100 ng/µL in einem Volumen von 20 µL (*A. dest.* ohne EDTA) eingestellt und der DNA-Gehalt wurde wiederum mit dem Tecan Infinite™ M200 gemessen.

### **3.1.15 MicroRNA-Array-Analyse (Exiqon)**

#### **3.1.15.1 Probenvorbereitung**

Zur Analyse der Regulation von microRNAs wurden Gesamt-RNA-Proben mit

microRNAs aus humanen *Knockdown*- (KD-) Krebszelllinien mit zugehörigen Leervektor kontrollen und Normal- und Tumorgewebe von Colon-NEC-Patienten zur microRNA-Array-Analyse nach Exiqon (Dänemark) geschickt. Die RNA- und microRNA-Isolation erfolgte eigenständig mit dem miRNeasy Kit. Mit dem Tecan Infinite™ M200 erfolgte eigens die RNA-Konzentrationsbestimmung (A260), die Bestimmung von Proteinkontaminationen (RNA A260/280 Ratio ~2,0) und die Überprüfung von Kontaminationen mit Puffer-Rückständen oder organischen Verbindungen (Ratio A260/A230). Die RNA-Integrität (RIN) der FFPE-Proben wurde eigenständig mit dem Agilent 2100 Bioanalyser (zur Verfügung gestellt von der Kinderklinik des UKD) kontrolliert und die empfohlene RNA-Konzentration eingestellt. Die RIN-Werte der FFPE-Proben lagen erwartungsgemäß unter einem Wert von 3 und die der Zellkulturproben lagen durchschnittlich bei 9,5 (RIN = 7 gute Array-Performanz). Zur Färbung und Array-Hybridisierung von der Firma Exiqon empfohlene Ratios lagen oberhalb von 1,6. Alle A260/A280 Ratios lagen bei 2 oder knapp darunter.

Die Proben wurden nach Exiqon geschickt und durchliefen dort eine weitere Qualitätskontrolle, an deren Anschluss das microRNA-Expressions-Profiling mit dem miRCURY LNA™ microRNA-Assay 7<sup>th</sup> Gen von der Firma Exiqon durchgeführt wurde. Die verwendeten 7thGen Arrays trugen die gegen microRNAs gerichteten Sonden. Die Färbung erfolgte mit dem miRCURY LNA™ microRNA *Hi-Power Labelling* Kit, Hy3™ /Hy5™. Von den Proben wurden 550 ng Gesamt-RNA verwendet und mit dem Hy3™- und Hy5™-Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Die Hy3™ gefärbten Proben und die Hy5™-gefärbte Referenz-RNA wurden gemischt und auf dem Array hybridisiert. Es handelte sich damit um einen zweifarbigen Array, zur Berechnung einer Fluoreszenz-Ratio. Der Scan erfolgte mit dem Agilent G2565BA Microarray Scanner System (Agilent Technologies Inc. USA) und die Bildanalyse mit dem ImaGene® 9 (miRCURY LNA™ microRNA-Array Analysis Software, Exiqon). Die quantifizierten Signale wurden hintergrundkorrigiert (normierte Expression mit *offset value* 10, Ritchie et al. 2007) und durch Anwendung des globalen Lowess (*LOcally WEighted Scatterplot Smoothing*) Regressionsalgorithmus (gut geeignet für Dual-Farben-Setup) normalisiert. Die Ratio (Hy3/Hy5) wurde zuerst aus den normalisierten Hy3- und Hy5-Signalen berechnet, bevor aus den 4 Messpunkten pro Probe und microRNA auf dem Slide der Mittelwert (MW) gebildet wurde. Der Mittelwert der Ratios der 4 Messpunkte wurde log<sub>2</sub>transformiert. Für die weitere Datenanalyse (z.B. *Heatmaps*, *Dotplots* und *PCA-Plots*, s. Anhang) wurden also die log<sub>2</sub>-transformierten normalisierten MW-Ratios (normalisierte

log<sub>2</sub> Ratio) verwendet. Die log<sub>2</sub> Fold Change-Berechnung erfolgte durch Subtraktion des MW der Kontrolle (GIPZ n.s., NGW) vom MW der Proben (BIRC5-KD, TGW).

### 3.1.15.2 7thGen Array

Die Arrays der siebten Generation enthielten 3100 fixierte Sonden, die humane, Maus- und Ratten-microRNAs abdeckten, wie sie in der miRBase 20.0 Datenbank hinterlegt waren. Zusätzlich wurden auch virale microRNAs eingebunden, die bei diesen Spezies vorkommen. Außerdem waren 25 miRPlus™ humane microRNAs im Array enthalten. Bei den 25 miRPlus™ Sequenzen handelte es sich um einlizenzierte humane Kandidaten microRNA-Sequenzen der Firma Exiqon, die noch nicht in miRBase vermerkt waren. Alle Sequenzen hatten nach Exiqon Angaben strikte Qualitätskontrollen durchlaufen. Allerdings wurden virale und miRPlus™ microRNAs in den nachfolgenden Analysen dieser Arbeit nicht berücksichtigt, sondern ausschließlich humane microRNAs.

Name des Organismus	Kürzel	Allgemeiner Name	miRBase 20.0	Array 7thGen
Homo sapiens	Hsa	Mensch	2042	94 %
Mus Musculus	Mmu	Maus	1281	90 %
Rattus norvegicus	Rno	Ratte	723	95 %

Sonden, die atypische Signalmuster zeigten (sehr hohe Signallevel), galten nach Exiqon-Angaben als biologisch nicht repräsentativ (falsch-positiv). Hierzu zählten: miR-1246, miR-1273g-3p, miR-1280, miR-1908, miR-3124-3p, miR-3686, miR-3940-5p, miR-3960, miR-4279, miR-4285, miR-4290, miR-4443, miR-4454, miR-4456, miR-4467, miR-4497, miR-4516, miR-4639-3p, miR-4708-3p, miR-4764-3p, miR-4787-5p, miR-4800-3p, miR-5100.

### 3.1.15.3 Array-Signalintensität

Die Detektionsgrenze des Arrays lag zwischen AvgHy3 <7,5 - 14,5<. Mit AvgHy3 <7,5, in der die Signale außerhalb von Hintergrundsignalen lagen. Signale an der Grenze ließen auf eine microRNA-Konzentration unterhalb des Detektionslevels schließen. Diese Signale könnten nach Angaben der Firma Exiqon ein relatives Risiko haben, falsch-positiv zu sein. Dies spielt hauptsächlich im Rahmen der Qualitätssicherung von Exiqon eine Rolle. Die Firma wollte damit garantieren, dass definitiv deregulierte microRNAs ausgewählt werden. MicroRNAs von Interesse wurden für diese Arbeit generell immer eigenständig mit Assays der Firma Thermo Fisher Scientific überprüft und dadurch als dereguliert bestätigt (s. 2.11). Exiqon stufte des Weiteren Ergebnisse mit p-Werten unter 0,05 (aus multipler t-Test-Statistik) nach Benjamini-Hochberg-Korrektur (angepasster p-Wert, Adj.P.Val) als signifikant ein. Dieses Korrekturverfahren ist üblich, bei simultaner Durchführung einer hohen Zahl statistischer Tests. Die Zahl der microRNAs, bei der die Nullhypothese: „Die microRNAs zeigen keine abweichende Expression zwischen den Datenreihen“, fälschlich abgelehnt wurde - Typ 1-Fehler (Benjamini et al. 1995), wird korrigiert und die t-Test p-Werte angeglichen.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Präparation von Proteinlysaten aus Zelllinien

Durch die Herstellung von Gesamtzelllysaten konnte die Proteinexpression in Zellen über das Western Blotting untersucht werden. Die Zelllinien wurden bis zu einer Konfluenz von 75 % kultiviert, da gerade bei Untersuchungen von zellteilungsabhängigen Proteinen eine Kontaktinhibition vermieden werden musste. Die in dieser Arbeit verwendeten NEC-Zellen wuchsen adhärent in Zellkulturflaschen und wurden durch 0,25%iges Trypsin gelöst und durch Zentrifugation bei 110 x g für 4 min pelletiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet in 2 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das PBS vom Pellet entfernt. Je nach Pelletgröße wurden die Zellen in 100 - 400 µl mit Proteinase-Inhibitoren versetzten RIPA-Puffer aufgenommen. Im Anschluss erfolgte der Aufschluss der Zellen zur Freilegung der Proteine durch eine 15-minütige Inkubation im Eisbad mit 15-sekündigem Vortexen alle 5 min. Durch eine anschließende 30-minütige Zentrifugation bei 17 000 g für 30 min bei 4 °C wurden zelluläre Rückstände pelletiert und die Proteine im Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Färbung bestimmt. Die Lagerung von Proteinlysaten erfolgte bei -80 °C.

### 3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration für das Western Blotting verwendet. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 bindet hierbei an die basischen Seitenketten der Proteine, wodurch sich die Absorption des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Gebundener Farbstoff kann so von nichtgebundenem abweichend gemessen werden. Verwendet wurde das Bio-Rad Protein Assay Reagenz, welches im Verhältnis 1/5 mit *A. dest.* verdünnt wurde. Damit eine unbekannte Proteinkonzentration gemessen werden konnte, musste eine Eichgerade mit definierten BSA-Konzentrationen erstellt werden. Diese wurde durch mehrere Verdünnungen des Albumin Standards in lichtdurchlässigen Küvetten angesetzt. Die Eichgerade wurde durch 6 Messpunkte (1; 2,5; 5; 10; 15 und 20 µg/ml Protein) gelegt und im Küvettenphotometer gespeichert. Das Programm (BRAD.micro: Messbereich 1,0 - 20,0 µg/ml) errechnete durch lineare Regression die entsprechende Proteinkonzentration. Für jede Messung wurde ein *Blank* benötigt, zu dem Anstelle der Probe 2 µl des Probenpuffers (in der Regel RIPA) gegeben wurde. Da RIPA-Puffer EDTA enthielt und die Messung störte, wurde dieser Einfluss durch den *Blank* minimiert. Für die Probenmessung wurden je 998 µl Bradfordreagenz in eine Küvette gegeben und mit 2 µl

Proteinlysat gemischt. Nach 10 min Inkubation wurde die Absorption des gebundenen Coomassie-Farbstoffes bei 595 nm gemessen.

### 3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch das Western Blotting werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts über ein SDS-Acrylamid-Gels aufgetrennt. Bei der Elektrophorese wandern geladene Makromoleküle in einem elektrischen Feld. Die SDS-Page bestand aus einem 5%igen Sammel- und, je nach kDa-Bereich der zu untersuchenden Proteine, einem 10 – 12%igen Trenngel. Die Proben eines Versuchsdurchlaufs wurden mit *A. dest.* auf den gleichen Proteingehalt in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt und mit 4-fach konzentriertem Laemmli-Puffer gemischt. Für die Gelbeladung wurden 15 - 25 µg Gesamtprotein eingesetzt. Proteine zeigen aufgrund von Größe, Faltung und Ladung ein abweichendes Laufverhalten im Gel, daher wurden sie für eine korrekte Auftrennung bei 95 °C für 10 min denaturiert. Das β-Mercaptoethanol im Probenpuffer reduziert die Disulfidbrücken der Proteine, wodurch diese in ihrer linearisierten Form bleiben. Das enthaltene SDS neutralisiert die Eigenladung der Proteine. Hierdurch werden die Proteine nach Anlegen des Stromflusses während der Elektrophorese nur aufgrund ihrer molekularen Größe aufgetrennt.

Zuerst wurde das Trenngel gegossen, welches die eigentliche Auftrennung ermöglichte, dann das Sammelgel, welches für eine einheitliche Front der Proteine im Gel sorgte. Gemeinsam mit den Proben wurde zur Zuordnung des Molekulargewichts ein Größenstandard aufgetragen, wie der Precision Plus Protein WesternC Standard (Bio-Rad). Die Proteine wanderten im elektrischen Feld von der Kathode (Minuspol, Geltaschen) zur Anode (Pluspol). Die Auftrennung wurde gestoppt, wenn die Proteine weit genug aufgetrennt waren. Im Anschluss erfolgte das Western Blotting.

### 3.2.4 Western Blotting

Das Western Blotting ermöglichte die semi-quantitative Analyse von Proteinen innerhalb eines Versuchsmodells. Die Proteine wurden durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen werden die Proteine auf der Membran immobilisiert und ein genaues Abbild der im SDS-Gel nach ihrer Molekulargröße aufgetrennten Proteine erreicht. Hierzu wurde die Membran zunächst im Transferpuffer für 5 min kalibriert. Das Sammelgel wurde abgetrennt und auf das Trenngel mit den enthaltenen Proteinen wurde die Nitrozellulose-Membran

platziert. Im Tank-Blot-Verfahren wurden alle Komponenten im Transferpuffer zusammengesetzt und die Proteinübertragung auf die Membran erfolgte im gleichen Transferpuffer in einem Tank-Blotter. Als Transferpuffer wurde der Towbin-Puffer (Towbin et al. 1992) verwendet, ein Tris-Glycin-Puffer, dessen pH-Wert bei 8,3 lag. Die Zugabe von SDS und Methanol erleichterte den Transfer der Proteine. Die Membran und das SDS-Gel wurden zwischen jeweils zwei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren (Whatman) gelegt und Luftblasen zwischen den Schichten vorsichtig herausgerollt und mit der Blottingkassette in die mit Transferpuffer gefüllte Western Blot Kammer geschoben. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 100 V wurden die Proteine maximal für 1 h bei 4 °C auf die Membran übertragen.

Transferpuffer	über Nacht	1 h	3 h
Towbin	25-40 V 40-80 mA	50-100 V 200-400 mA	25-50 V 100-200 mA

Die negativ geladenen Proteine wandern in Richtung Anode auf die Membran. Zur Kontrolle der Übertragung wurde die Membran mittels Ponceau-Rot für 2 min inkubiert und kurz mit *A. dest.* abgespült, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren. Die vollständige Entfärbung erfolgte mit TBS-T für 10 min unter Schütteln. Bei der Arbeit wurde darauf geachtet, dass die Membran nicht austrocknet.

### 3.2.5 Immunbiologische Proteindetektion

Bei dieser Methode erfolgte der immunbiologische Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulose-Membran durch Verwendung Protein-spezifischer Primärantikörper (s. 2.9.1.1). Die gegen das Ursprungstier, aus dem die Primärantikörper stammen (Maus, Kaninchen, Ziege usw.), gerichteten Sekundärantikörper waren mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelt (s. 2.9.1.4). Diese ermöglichte die Sichtbarmachung der Proteine als Banden auf der Membran. Damit unspezifische Bindungen der Antikörper minimiert wurden, erfolgte ein 60-minütiger Inkubationsschritt mit einer Blockierlösung bei Raumtemperatur (RT) (5 % BSA (w/v), 3 % - 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T). Bei spezifischen Antikörpern wurde für maximale Chemilumineszenzsignale auf das Blockieren verzichtet. Die Membran wurde mit dem Primärantikörper in 3 ml Blockierlösung 1:1000 verdünnt und, mit Ausnahme von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. GAPDH wurde 40 min – 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Die Antikörper wurden einzeln oder bei spezifischen Antikörpern, die gegen Proteine unterschiedlicher Größe gerichtet waren, im selben Ansatz inkubiert. Nach der Inkubation

wurde die Membran dreimal für 5 -10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Der Größenstandard wurde von der übrigen Membran abgetrennt und separat für die Detektion mit 1 µl Precision Protein™ StrepTactin®-HRP Konjugat inkubiert. Die Membran inkubierte 1 h mit dem Sekundärantikörper in einer 1:2 verdünnten Blockierlösung bei RT und wurde nachfolgend dreimal 5 - 10 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Detektion mit dem Clarity Western ECL Substrate Kit (Bio-Rad). Die Luminol- und Peroxidlösung wurden im Verhältnis 1:1 vermischt und 2 - 5 min auf die Membran gegeben. Bei der Meerrettich-Peroxidase (HRP) des Sekundärantikörpers handelt es sich um ein Reporterenzym, welches die Reduktion von Peroxiden katalysiert. Diese chemische Reaktion erzeugt Energie in Form von Licht (Chemilumineszenz). Die Reaktion wurde mit Hilfe des VersaDoc 4000 Systems (Bio-Rad) detektiert. Zur Normalisierung wurden die Haushaltsproteine GAPDH, HPRT1 (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1) und TBP (TATA-Bindeprotein) verwendet, um Beladungsunterschiede verrechnen zu können.

### **3.3 Zellbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Passagieren von humanen Karzinom-Zelllinien**

Die verwendeten adhärennten NEC-Zelllinien wurden in T-75er Zellkulturflaschen mit RPMI, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin in einem Inkubator bei 37 °C und mit 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Das CO<sub>2</sub> sorgte für die Stabilisierung des pH-Wertes. Die Zellen wurden zweimal pro Woche mit PBS gewaschen und durch Verdau der Oberflächenproteine mit 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung gelöst. Der Verdau wurde durch die gleiche Menge Medium neutralisiert, das Zellgemisch in ein 15 ml Polystyrenröhrchen überführt und bei 110 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Die verdünnten Zellen wurden in eine neue T-75er überführt. Die Zellen wurden so in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. *Knockdown* Zelllinien wurden zusätzlich mit Puro-mycin (Endkonzentration 2 µg/ml) als Selektionsmarker im Kulturmedium gehalten.

#### **3.3.2 Gefrierkonservierung von humanen Zelllinien**

Eine Lagerung oder Bevorratung von Zelllinien war über die Kryokonservierung bei -196 °C in Flüssigstickstoff möglich. Die Zellen wurden wie unter (s. 3.3.1) pelletiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet im Gefriermedium (90 % FBS und 10 % DMSO) aufgenommen und je nach Größe auf mehrere Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen wurden in speziellen Einfrierbehältern bei -80 °C über Nacht eingefroren. Die Behälter ermöglichten das gleichmäßige Einfrieren von Zellen um -1

°C/min. Am Folgetag wurden die Röhren in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.3.3 Auftauen von Gefrierkulturen

Die kryokonservierten Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 ml Falcon mit 5 ml Zellkulturmedium überführt. Zur Entfernung von DMSO-Rückständen wurden die Zellen 10 min bei 110 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am Folgetag wurde das Medium ausgetauscht, um DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen.

### 3.3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Trypanblau-Färbung verwendet. Da der Farbstoff durch die durchlässige Zellmembran toter und sterbender Zellen gelangt, werden diese sichtbar und vitale Zellen bleiben weiß. Für die Zählung wurde ein Aliquot aus der homogenen Zellsuspension entnommen und je nach Konfluenz im Verhältnis 1/4 - 1/10 mit Trypanblau verdünnt. Von dieser Suspension wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Die ungefärbten Zellen wurden in den vier Großquadranten gezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgt über folgende Formel:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \left(\frac{n}{4}\right) * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammerfaktor}$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} * \text{Gesamtvolumen}$$

Bei der Variablen n handelt es sich um die Menge der gezählten Zellen und 4 ist die Anzahl der Großquadrate. Der Verdünnungsfaktor entspricht der hergestellten Verdünnung der Zellen und der Kammerfaktor ergibt sich aus der Fläche (1 mm<sup>2</sup>) und Tiefe von 0,1 mm eines Großquadrates, also einem Volumen von 0,1 µl.

### 3.3.5 PCR zur Detektion von Mykoplasmen

Eine Kontamination mit Mykoplasmen hätte Versuchsergebnisse beeinflusst, daher war die regelmäßige Kontrolle der Zellkultur auf Befehl wichtig. Verwendet wurde das PCR Mykoplasma Test Kit I/C. Die Primer wiesen die 16S-rRNA der Mykoplasmen mittels PCR-Methode nach. Hierzu wurde 1 ml Medium nach 2 Tagen Zellkultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min bei 500 x g und RT zentrifugiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit dem Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß bei 14 000 x g für 15 min und RT. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 100 µl DNase-freies Wasser aufgenommen. Die Probe wurde für 10 min bei 95 °C

erhitzt. Das Kit enthielt Primer, dNTPs und Hot-Start Taq Polymerase. Die Komponenten wurden in 23  $\mu$ l Rehydratisierungspuffer gelöst. 2  $\mu$ l der Probe wurden zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Zu den Positiv- und Negativkontrollen des Kits wurden 2  $\mu$ l DNase-freies Wasser gegeben. Die DNA-Amplifikation erfolgte nach folgenden PCR-Schritten:

- 1) 95 °C                    2 min
- 2) 94 °C                    30 sek
- 3) 55 °C                    30 sek    wieder zu 2) für 39 Zyklen
- 4) 72 °C                    40 sek
- 5) 4 °C  $\infty$  halten bis die Proben entnommen werden

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Bandengröße der Positivkontrolle betrug 270 bp und die der Negativkontrolle 479 bp.

### **3.3.6 Einbringung von Fremd-DNA in humane Zelllinien**

#### **3.3.6.1 Transiente Transfektion**

Mit Hilfe der transienten Transfektion wurde fremde DNA oder RNA in lebende Zellen eingebracht, wobei diese Veränderung, im Gegensatz zur Transduktion, das Ursprungsgenom nicht verändert. Die transiente Transfektion wird mittels Lipofektation erreicht. Fremde Nukleinsäuren werden von einem Lipidtropfen aufgenommen und durch die Zellmembran transportiert. Für größere Konstrukte, wie Plasmide, wurde Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen™) eingesetzt und für kleine microRNA-Konstrukte Lipofectamine™ RNAiMAX Transfektionsreagenz. Es wurden keine Antibiotika verwendet, da diese in Kombination mit den Reagenzien letal gewesen wären. Die Zellen wurden daher vor der Durchführung gründlich mit PBS gewaschen.

Bei den verwendeten Plasmiden handelte es sich um doppelsträngige, autonom replizierende DNA-Moleküle, die auch an Tochterzellen weitergegeben werden, nach einigen Teilungen aber verlorengehen können. Da ein zusätzliches extrachromosomales Konstrukt repliziert werden muss, bedeutete dies mehr Stress für die Zelle. Nach Aufnahme des Konstrukts wurde das Transfektionsreagenz abgenommen.

In höheren Konzentrationen können Antibiotika schädlich für eukaryotische Zellen sein und werden daher als Selektionsdruck im Medium eingesetzt, damit das Plasmid erhalten bleibt. Die Plasmide verleihen den Zellen die nötige Resistenz für ihr Überleben.

##### **3.3.6.1.1 Reverse Transfektion**

Für diese Arbeit wurde die Reverse Transfektion angewendet. Als Sonderfall der gängigen transienten Transfektion unterscheidet sich die Reverse Transfektion durch das

zeitgleiche Aussähen der Zellen mit dem Transfektionsansatz. Die Zellen wurden im Medium und Transfektionsreagenz homogenisiert, bevor sie auf der jeweiligen Oberfläche anwuchsen. Hierdurch wurde die Wirkungsoberfläche des Transfektionsansatzes maximiert und die Transfektionseffizienz erhöht.

Für die Reverse Transfektion wurde im 6-Well die doppelte Menge NEC-Zellen in ihrem gewohnten Zellkulturmedium ohne Antibiotika verwendet (NEC-DUE1 2 Mio. Zellen/ml; NEC-DUE2 1,4 Mio. Zellen/ml). Bei den NEC-DUE2 war die Reverse Transfektion von Vorteil, da sich die Zellen schlecht vereinzeln ließen und im Zellhaufen abgeschirmt wurden. Die sonst vereinzelt traubenförmig-wachsenden NEC-DUE1 ließen sich dagegen dichter aussähen (s. 2.1.1).

#### **3.3.6.1.1 Reverse Transfektion mit FLAG-BIRC5 Plasmiden**

Bei den verwendeten Plasmiden handelte es sich um pcDNA3.1 mammalian Expressions-Vektoren der Firma GenScript mit CMV-Promoter, in die *BIRC5* und *FLAG* kloniert wurden. Diese *high-copy* Plasmide ermöglichten die Hochregulation von BIRC5 in humanen Krebszellen im Rahmen von Rescue- und Immunpräzipitation- (IP) Versuchen. Tag-Proteine werden für einen spezifischen Nachweis in der Immunhistochemie oder dem Western Blotting eingesetzt. Im Hinblick auf die IP ermöglichen sie eine Bindung des Zielproteins an Säulen oder an magnetische *Beads*, so dass der Großteil des Proteins für Proteininteraktionen frei ist. Aufgrund seiner Aminosäuresequenz (DYKDDDDK) wird FLAG auch als DYK bezeichnet. Als Kontrolle für die Transfektionsversuche wurden Leervektoren ohne *BIRC5* verwendet. Das Transfektionsergebnis wurde nach 72 h mittels Western Blot überprüft. Als Kontrolle diente der Leervektor. Für die Durchführung der Reversen Transfektion von Plasmiden wurde das Protokoll für die Transfektion mit Lipofektamine™ 3000 abgewandelt (Lipofectamine™ 3000 Reagent Protocol 2016). Die Plasmid-Konzentration entsprach 2 µg DNA pro 6-Well. Bei Verwendung größerer Mengen DNA wurde die Bildung von DNA-Verknäuelungen mit dem P3000 Reagenz beobachtet. Die P3000™ Reagenzmenge (2 µL/µg DNA) wurde je nach Plasmid-Konzentration angepasst und die Lipofectamine-Menge entsprach 7,5 µl. Der Ansatz wurde in serumfreiem Opti-MEM™ Medium (GIBCO™) hergestellt. Die einzelnen Komponenten wurden vorsichtig mit einer 1000er-Pipette gemischt, um Komplexbildungen nicht zu stören. Zuerst wurde das Lipofectamine mit Opti-MEM in einem eigenen Ansatz und in einem zweiten Ansatz die Plasmid-DNA verdünnt, bevor beides zusammengeführt wurde. Der Ansatz wurde 20 min im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden trypsinisiert, mit PBS gewaschen und im Zellkulturmedium ohne

Antibiotika verdünnt. Für eine bessere Überlebensrate wurde 3 % FCS zur Zellsuspension gegeben. Die Zellen sollten nicht durch zu viel FCS stimuliert werden, da Effekte sonst abgeblockt worden wären. Das Reagenz (250 µl pro Well) wurde in 6-Well gegeben und die Zellen im Medium (2750 µl pro Well) darauf verteilt. Während die Zellen anwuchsen, nahmen sie die Plasmide auf. Das Transfektionsreagenz wurde 72 h auf den Zellen belassen. Nachfolgend konnten Scratch-Assays, Protein- oder Gesamt-RNA-Isolationen erfolgen.

#### **3.3.6.1.1.2 Reverse Transfektion mit microRNA-Mimics und Inhibitoren**

Bei den verwendeten miRVana™ microRNA Mimics handelte es sich um kleine modifizierte doppelsträngige RNA-Moleküle, die endogenen pre-microRNAs ähnelten. Für eine hohe Spezifität wurde der Passagierstrang durch chemische Modifikation inaktiviert, damit nur der Leit-Strang Effekte erzielte (BioProbes 67. 2012). Die Inhibitoren waren einzelsträngig und blockierten endogene microRNAs direkt. Zur Synthese dieser Konstrukte verwendete die Firma Thermo Fisher die miRBase Sequenz-Datenbank (Version 17). Bei jeder Durchführung wurde parallel die mirVana™ microRNA Mimic Negative Control #1 verwendet. Die Negativkontrolle hatte eine einzigartige Sequenz, die keine der bekannten humanen, Maus- oder Ratten-Gene als Ziel haben sollte (BioProbes 67 2012). Gleiches galt für die mirVana™ microRNA Inhibitor Negative Control #1. Die Negativkontrollen dienten der Berechnung des Fold Changes. Mit ihrer Hilfe wurde der Einfluss des Transfektionsprozesses im Versuch berücksichtigt. Das Lipofectamine™ RNAiMAX wurde in Opti-MEM in einem eigenen Ansatz verdünnt und in einem zweiten Ansatz die Mimics bzw. Inhibitoren. Verwendet wurden 30 pmol des jeweiligen Mimics, bzw. der Kontrolle. Anschließend wurden beide Ansätze zusammengeführt, vorsichtig durch Pipettieren gemischt und für 15 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Pro Well wurden 250 µl des Gemischs ausgeteilt und die Zellen draufgegeben. Je nach Versuchsaufbau enthielt jedes Well 25 pmol Mimic bzw. Kontrolle und 7,5 µl Lipofectamine bei einem Gesamtvolumen mit Zellen von 3 ml. Für die Inhibitoren wurde die doppelte Menge 60 pmol (final pro Well 50 pmol) eingesetzt und entsprechend wurde auch die Lipofectamine™ RNAiMax Menge erhöht. Die Zellen wurden 1 - 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (NECs 3 Tage), wuchsen in dieser Zeit an und nahmen die Mimics bzw. Inhibitoren auf. Eine Verdünnungsreihe mit steigenden Konzentrationen der Mimics bzw. Inhibitoren und anschließender Beurteilung der Wirksamkeit auf die Ziel-Gene in qRT-PCRs oder Western Blots unterstützte die Bewertung der Wirksamkeit der Konstrukte. Zur Minimierung artifizierender Nebeneffekte

wurden Konzentrationen eingesetzt, deren Wirkung gut sichtbar und nicht maximal war. Nach der Inkubation konnten die Zellen für Western Blot Assays oder Gesamt-RNA-Isolation geerntet werden oder Scratch-Assays erfolgen.

### **3.3.6.2 Behandlung der Zellkultur mit YM155**

Zur Untersuchung der Funktion von BIRC5 wurde der Wirkstoff YM155 (Sepantronium Bromide) verwendet. Die Zelllinien NEC-DUE1, NEC-DUE2 und NEC-DUE3 wurden mit jeweils 30 nm und 100 nm YM155 im 6-Well behandelt. YM155 wurde zum Zellkulturmedium mit 2,5 % FCS und ohne Antibiotika gegeben. YM155 wurde nach Herstellerangaben für *in vitro* Versuche mit DMSO zu einer Stocklösung von 10 mM angesetzt. DMSO wurde daher entsprechend als Negativkontrolle verwendet. 3 Tage nach Behandlung der Zellen wurden diese zur RNA-Isolation geerntet.

### **3.3.7 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)**

Die Co-Immunpräzipitation diente dazu, Proteininteraktionen zu analysieren. Hierzu wurden Zellsuspensionen von nativen NEC-DUE1-Zellen geerntet. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 75 % direkt in RIPA-Puffer aus der Zellkulturschale abgeschabt. Die Zellen wurden unter Bedingungen gehalten, die einen bestmöglichen Nachweis der Proteine und ihrer Interaktionen ermöglichten. Zusätzlich konnte das gesuchte Protein mittels Expressionsplasmid hochreguliert werden. Protein-Tags wie FLAG ermöglichten eine spezifischere Bindung, da sie als artifizielle Konstrukte keine Kreuzreaktionen eingehen sollten. Für die Co-IP wurden monoklonale und polyklonale BIRC5-Antikörper verwendet (s. 2.9.1.2). Bei dem polyklonalen Antikörper handelte es sich um ein Antikörpergemisch, das gegen verschiedene Epitope von BIRC5 gerichtet war und so verschiedene Stellen binden konnte; dies galt aber auch für die Zahl möglicher unspezifischer Bindungen. Die Antikörper wurden an magnetische *Beads* gebunden, um das zu untersuchende Protein zu fixieren. Das so fixierte BIRC5 konnte mit anderen Proteinen im Lysat interagieren. War die Verbindung stabil genug, blieb die Proteininteraktion nach mehreren Waschschrritten erhalten und nicht gebundene Proteine und unspezifische Bindungen wurden entfernt. Dies ergab ein Proteingemisch mit potentiellen Bindungspartnern von BIRC5. Als Immunogen des monoklonalen BIRC5-Antikörpers (Cell Signaling, Invitrogen) diente ein synthetisches Peptid, korrespondierend zu Cystein 60 des humanen WT-BIRC5 (s. u. Einbuchstabencode rot). Der Antikörper hatte demnach in der Mitte des Proteins gebunden. Ein Antikörper sollte zur Bindung 15 Aminosäuren (AS) benötigen, die das Epitop bilden (*Immunology and*

*Evolution of Infectious Disease*. Frank 2002). Das bedeutet, dass C- und N-Terminus des Proteins für Proteininteraktionen frei waren.

BIRC5 Aminosäuresequenz (142aa) im Einbuchstabencode:

10	20	30	40	50
MGAPTLPPAW	QPFLKDHRIS	TFKNWPFLEG	CACIIPERMAE	AGFIHCPLEN
60	70	80	90	100
EPDLAQCFFC	FKELEGWEPD	DDPIEEHKKH	SSGCAFLSVK	KQFEELTLGE
110	120	130	140	
FLKLDREERAK	NKIAKETNNK	KKEFEETAKK	VRRAIEQLAA	MD

Bekannte AS für Proteininteraktionen (grün) (Datenbank UniProtKB 2022\_02):

Lysin-129 (K) Homodimerisation

Threonin-117 (T) Interaktion INCENP

Threonin -48 kritisch für mitotische and anti-apoptotische Funktion

Threonin -34 kritisch für anti-apoptotische Funktion

Für die Durchführung der Immunpräzipitation wurden für jede Probe 20 µl magnetische Dynabeads™ Protein G (Life Technologies™) in ein *Low Bind* 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Als Negativkontrolle wurde parallel das IgG des Tieres, aus dem der Antikörper stammt, verwendet. Hierdurch wurden unspezifische Bindungen an das IgG ausgeschlossen. Bei der Verwendung von TAG-Plasmiden wurde eine Leervektorkontrolle mitgeführt, um eine Bindung an das TAG auszuschließen. Die magnetischen *Beads* ermöglichten während aller Arbeitsschritte ein Fixieren der Proben in ihren Reaktionsgefäßen. Der Überstand wurde abgenommen und die *Beads* 3-mal mit 500 µl PBS gewaschen. Vom jeweiligen Antikörper wurden 2 µg in 300 µl PBS mit 0,02 % Tween gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden für 30 min bei 4 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach der Inkubation folgten 2 Waschschrte mit PBS. Das PBS wurde vollständig entfernt. Es wurden 0,5 ml 0,2 M Triethanolamine (pH 8,2) zu den *Beads* hinzugefügt und zweimal mit 0,5 ml 0,2 M Triethanolamine (pH 8,2) mit DMP (5,4 ml DMP pro ml Puffer) gewaschen. Die Reaktionsansätze wurden bei 4 °C über Nacht rotierend inkubiert. Nachfolgend wurde der Überstand entfernt und die mit Antikörpern gekoppelten *Beads* in 600 µl 50 mM Tris pH 7,5 für 15 min resuspendiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl PBS und 0,1 % BSA und zwei Waschschrte mit 200 µl PBS und 0,1 % BSA. Letztlich erfolgte die Aufnahme der *Beads* in 20 µl PBS und anschließend die Inkubation mit den Proteinlysaten. Hierzu wurden 500 µg Protein in 200 µl RIPA-Puffer mit Proteinkinaseinhibitoren auf die *Beads* gegeben und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Am Folgetag wurde der Überstand abgenommen. Sowohl ein Teil des anfänglichen Lysats als auch des Überstandes konnten für eine Überprüfung im Western Blotting verwendet werden. Die *Beads* wurden zweimal mit 1 ml RIPA-Puffer, dann mit 1 ml PBS gewaschen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dort

wurden sie erneut zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und der Überstand letztlich verworfen. Final wurden die gebundenen Proteine eluiert, indem die *Beads* mit 20 µl 1x SDS-Probenpuffer für 10 min bei 37 °C inkubiert wurden. Ein Viertel der Probe wurde zur Kontrolle auf einen Western Blot aufgetragen. Die Proben wurden zur Identifikation der Proteine im Massenspektrometer des BMFZ (Düsseldorf) analysiert.

### 3.3.8 Scratch-Assay (Wund-Assay)

Der Wund-Assay diente der Analyse des Migrationsverhaltens der NEC-Zellen nach der Transfektion mit microRNA-Mimics. Angewendet wurde die Reverse Transfektion. Die 6-Wellen sollten eine Konfluenz von 70 % erreichen, damit keine Wachstumsinhibition auftritt. Hierbei wurden die Eigenschaften der Zelllinien berücksichtigt. Die NEC-DUE1 (s. 2.1.1) wuchsen in getrennten Zellclustern, die zudem ihre Adhärenz verlieren konnten, weshalb diese Zelllinie für diesen Versuch nicht geeignet war.

Die NEC-DUE2 wuchsen geschlossener. Nach Durchführung eines möglichst senkrechten Scratches mit einer 10 µl Pipettenspitze wurden gelöste Zellen durch Waschen mit PBS entfernt und Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Dies entsprach dem Zeitpunkt h0 der mikroskopischen Aufzeichnung mit dem 10er Objektiv. Für jede Behandlung wurden 2 Wells angesetzt. Pro Well wurden bis zu 5 unterschiedliche Stellen an der Wunde für Folgemessungen markiert und im Abstand von 12 h dokumentiert. Eines der Wells wurde nach 72 h geerntet, um den Erhalt der Mimic/Inhibitor-Transfektion zu überprüfen. Das zweite Well wurde nach Beendigung der mikroskopischen Dokumentation geerntet, um die anhaltende Wirkung der Mimics/Inhibitoren bis zum Versuchsende zu ermitteln. Hierzu erfolgte eine Gesamt-RNA-Isolation mit enthaltenen microRNAs mit anschließender microRNA-Assay-qRT-PCR. Die Breite des Spaltes wurde alle 12 h an den verschiedenen Stellen gemessen. Die Weite des Spalts in µm wurde hierbei umgerechnet in Prozent Spaltschluss. Die Kontrolle entsprach hierbei 100 % Wachstum der Zellen im Spalt für die Berechnung des Spaltschlusses.

## 3.4 Statistik

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des t-Tests und des Mann-Whitney-U-Tests. Der Mann-Whitney-Test (nichtparametrisches, robustes Verfahren) wurde verwendet, wenn Voraussetzungen des t-Tests offensichtlich nicht erfüllt waren. Die Datensätze wurden dahingehend mittels grafischer Methoden auf Abweichungen von der Normalverteilung (Q-Q-Plots, Quantil-Quantil-Diagramm) und Ausreißer-Werte (Box-

Plots) überprüft. Ein Wert wurde als Ausreißer definiert, wenn er oberhalb von  $x_{0,75} + 1,5 \text{ IQA}$  (Interquartilabstand) oder unterhalb von  $x_{0,25} - 1,5 \text{ IQA}$  lag.

Es ist darauf hinzuweisen, dass den Tests unterschiedliche Nullhypothesen zugrunde liegen. Nullhypothesen besagen, dass kein Effekt nach Durchführung eines Experiments vorhanden ist, d.h. dass keine potentielle Differenz zwischen zwei Datenreihen festgestellt werden konnte. Die Nullhypothese des Mann-Whitney-U-Tests lautet, dass die Populationsverteilungen gleich sind (Hart 2001). Demgegenüber ist die Nullhypothese des t-Tests, dass die Populationsmittelwerte gleich sind.

Eine Schwierigkeit bei der Verwendung von Hypothesentests – insbesondere in Bezug auf die Interpretation von p-Werten – in dieser Arbeit sind die geringen Stichprobengrößen ( $n \leq 5$ ). Der t-Test wurde aber für kleine Stichproben entwickelt (Student 1908). Zudem zeigte sich in Simulationsstudien (mit Stichprobengrößenszenarien von  $n = 2$  –  $n = 5$ ), dass dieser Test befriedigende Ergebnisse sowohl hinsichtlich Testpower (zumindest bei großen Effekten), als auch Kontrolle von Typ 1- Fehlern (irrtümliche Ablehnung der Nullhypothese) liefert (de Winter 2019). Beim Mann-Whitney-Test wiederum ist zu berücksichtigen, dass die minimal möglichen p-Werte bei kleinen Stichproben über den üblichen Signifikanzschwellen liegen können, bspw. kann bei  $n_1 = 3$  und  $n_2 = 3$  die Signifikanzschwelle  $\alpha = 0,01$  nicht erreicht werden (vgl. etwa einschlägige Tabellen kritischer Prüfgrößen für unterschiedliche Stichprobenszenarien).

Bei Anwendung des einseitigen Tests ist das Vorzeichen der potenziellen Differenz vor der Durchführung eines Experiments und Tests bekannt. Die Differenz des Mittelwertes einer Datenreihe ist entweder geringer oder größer als der Mittelwert einer zweiten Datenreihe. Dies war bspw. bei der Überprüfung der microRNA-Array-Ergebnisse von Exiqon mittels eigenen microRNA-Assays der Fall (s. 4.2.4). Der microRNA-Array hat signifikante deregulierte microRNAs mit unterschiedlichen Vorzeichen gemäß ihrer Hoch- oder Herunterregulation geliefert. Sollte das Vorzeichen des Tests nach eigener Überprüfung anders orientiert gewesen sein als im Rahmen der Array-Analyse, wäre dieses Ergebnis als nicht-signifikant einzustufen.

Dem gegenüber steht die Anwendung des zweiseitigen Tests. Im Fall einer sich zwischen den Mittelwerten zweier Datenreihen ergebenden Differenz war das Vorzeichen der potenziellen Differenz unbekannt. Die potentielle Differenz wurde ungeachtet ihres Vorzeichens als signifikant angesehen.

Bei der Durchführung eines gerichteten Tests bestand die Intention darin, genau festzustellen, ob Populationsmittelwerte oder Populationsverteilungen zweier Datenreihen

eines Experiments ober- oder unterhalb der jeweils anderen lagen. Bei einem ungerichteten Test war lediglich die Feststellung der Differenz wichtig. In dieser Arbeit wurden überwiegend Effekte von Transduktions- (*Knockdown*) und Transfektionsexperimenten (Expressionsplasmiden, Mimics und Inhibitoren) überprüft. Diese bedurften der gerichteten statistischen Analyse, um dezidierte Aussagen über mögliche Effekte treffen zu können.

### 3.5 Nomenklatur

In dieser Arbeit wurden Gene entsprechend der allgemeinen Nomenklatur in Großbuchstaben und kursiv und die zugehörigen Proteine nur in Großbuchstaben dargestellt. Verwendet wurde die gängigste Bezeichnung nach HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee.

Die Bezeichnung microRNAs wurde verwendet, wenn allgemein auf diese eingegangen wurde. Bei der eindeutigen Benennung einer microRNA wurde die Kurzform miR verwendet (z. B. miR-124-3p). Bei allen hier untersuchten microRNAs handelte es sich um humane microRNAs. Auf den Zusatz hsa- (z.B. hsa-miR-124-3p) wurde verzichtet.

Bei der Bezeichnung GIPZ n.s. handelt es sich in dieser Arbeit immer um den GIPZ *non-silencing* Leervektoren, der keinen Protein-*Knockdown* (KD) bewirkte. Bei der Bezeichnung des KD, BIRC5-KD oder XIAP-KD handelt es sich immer um den GIPZ lentiviral shRNA (*short hairpin* RNA) Vektor induzierten XIAP- oder BIRC5-KD.

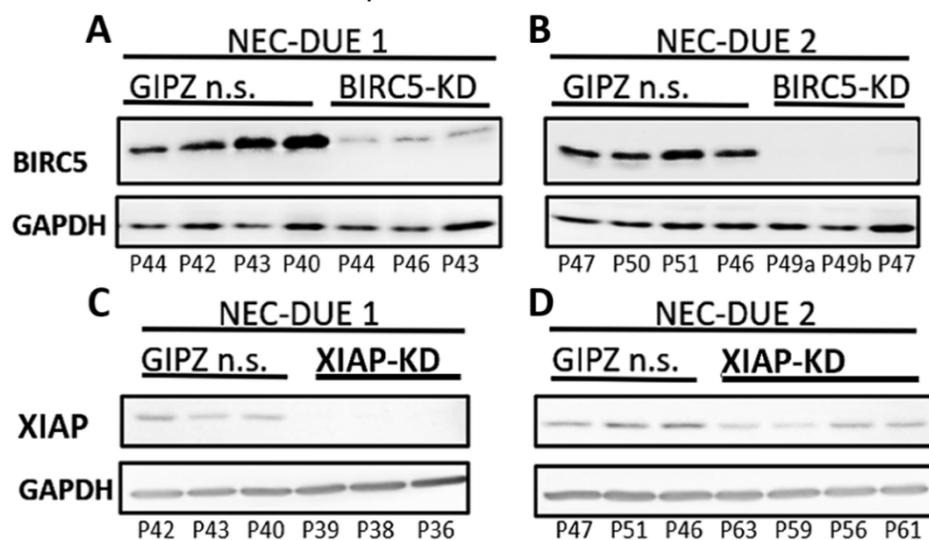
Bei der in dieser Arbeit untersuchten Krebserkrankung handelt es sich um die GEP-NEC (s. 1.1). Zur Vereinfachung wurde anstelle von GEP-NEC oft nur von NEC gesprochen. So wurden die GEP-NEC-Zelllinien als NEC-DUE bezeichnet (mit DUE - Düsseldorf).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Transduktion der NEC-DUE-Zellen

Diese Arbeit befasst sich mit dem Einfluss der IAPs BIRC5 und XIAP auf die Regulation von microRNAs. Zur Überprüfung dieser Zusammenhänge *in vitro* wurden die großzelligen GEP-NEC-Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 als Zellkulturmodell herangezogen (Krieg et al. 2014, s. 2.1.1). Diese Zelllinien standen mit einem GIPZ lentiviral shRNA (*short hairpin* RNA) Vektor induzierten XIAP- oder BIRC5-*Knockdown* (KD) und parallel mit entsprechenden GIPZ n.s. (GIPZ *non-silencing*) Leervektoren zur Verfügung. Die GIPZ n.s. NEC-Zellen dienten in allen Versuchen als Negativkontrolle, um den physiologischen Einfluss des Vektorkonstrukts während eines Versuchsdurchlaufs ausschließen zu können. Die Transduktion der Zelllinien wurde von Dr. S. Mersch im Rahmen der vorangegangenen Forschung etabliert (Dizdar et al. 2017). Zur mikroskopischen Kontrolle transduzierter Zellen verlieh der Vektor den Zellen ein TurboGFP-Reportersignal und eine Puromycin-Resistenz zur Anzucht ausschließlich transduzierter Zellen. Im Gegensatz zu einem *Knockout* (KO) wurde das Protein noch teilweise exprimiert.

Im ersten Schritt wurde daher die stabile Transduktion der Zellen über mehrere Passagen (P) mittels Western Blot überprüft.

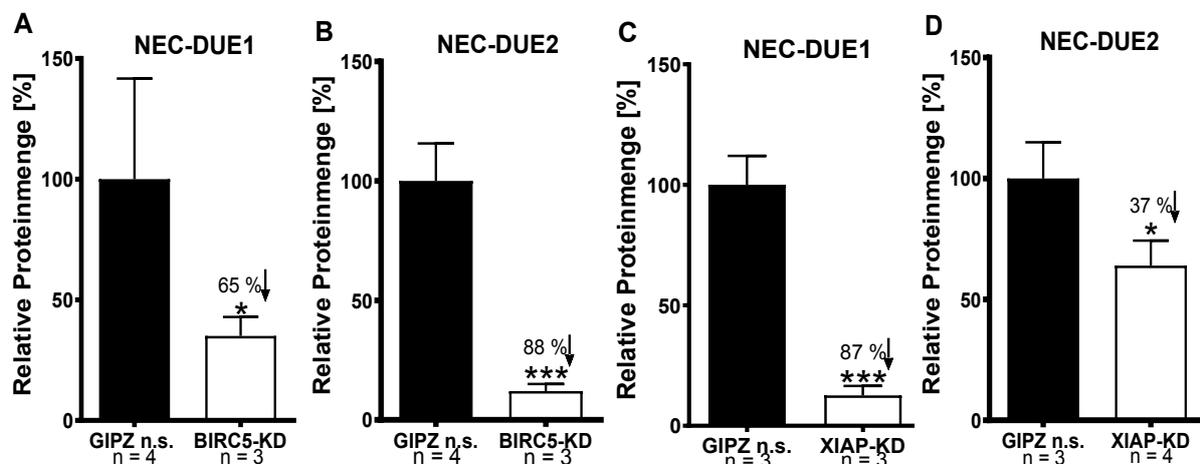


**Abb. 13 Western Blot Ergebnis des lentiviral induzierten BIRC5- und XIAP-KD in NEC-DUE1 und NEC-DUE2-Zellen.** Als Ladungskontrolle wurde das Haushalts-Protein GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) verwendet. GIPZ n.s. diente als Leervektorkontrolle und zeigte die native Expression der IAPs im Vergleich zum jeweiligen *Knockdown* (KD). Zu sehen ist die BIRC5-Expression in (A) NEC-DUE1 und (B) NEC-DUE2 im Vergleich zwischen GIPZ n.s. mit dem BIRC5-KD und die XIAP-Expression in (C) NEC-DUE1 und (D) NEC-DUE2 im Vergleich zwischen GIPZ n.s. mit dem XIAP-KD in unterschiedlichen Passagen P. Die genaue prozentuale Reduktion des jeweiligen Proteins ist in der folgenden Abb. 14 zu finden.

Die Western Blot-Ergebnisse der IAPs XIAP und BIRC5 zeigen in beiden Zelllinien eine sichtbare Herunterregulation durch den lentiviral induzierten *Knockdown* (KD).

Es folgte eine densitometrische Auswertung der Western Blot Banden. Beladungsunterschiede wurden über die Ladungskontrolle, das Haushalts- bzw. Normalisierungsprotein GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) (s. Abb. 13), herausgerechnet. GIPZ n.s. wurde hierbei als 100 %-Expression des nachzuweisenden Proteins gesetzt und die Dichte aller Banden entsprechend umgerechnet.

Nach graphischer Überprüfung der Datensätze mittels Q-Q-Plots auf Abweichungen von der Normalverteilung und Ausreißer durch Box-Plots wurde eine statistische Datenanalyse mittels ungepaarten t-Test vorgezogen (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 14 und in der Tab. 3 zusammengefasst.



**Abb. 14** Densitometrische Auswertung der Western Blot Banden zur Quantifizierung des *Knockdowns* (KD) von NEC-DUE1 BIRC5-KD (A) und XIAP-KD (C) und NEC-DUE2 BIRC5-KD (B) und XIAP-KD (D). Mittels Densitometrie wurde die Dichte der Western Blot Banden gemessen und nach Normalisierung mittels GAPDH mit GIPZ n.s. als 100 %-Proteinexpression entsprechend umgerechnet. Die Balkendiagramme stellen die relative Proteinmenge von GIPZ n.s. und BIRC5-KD bzw. XIAP-KD als Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung dar, wobei n die Anzahl der unterschiedlichen Passagen für den jeweils angewendeten t-Test wiedergibt. Die Prozentzahlen veranschaulichen die Herunterregulation, gekennzeichnet durch einen Pfeil. Die p-Werte sind wie folgt definiert: \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,005$  und \*\*\*  $\leq 0,0005$ .

**Tab. 3** Statistiken hinsichtlich *Knockdowns*

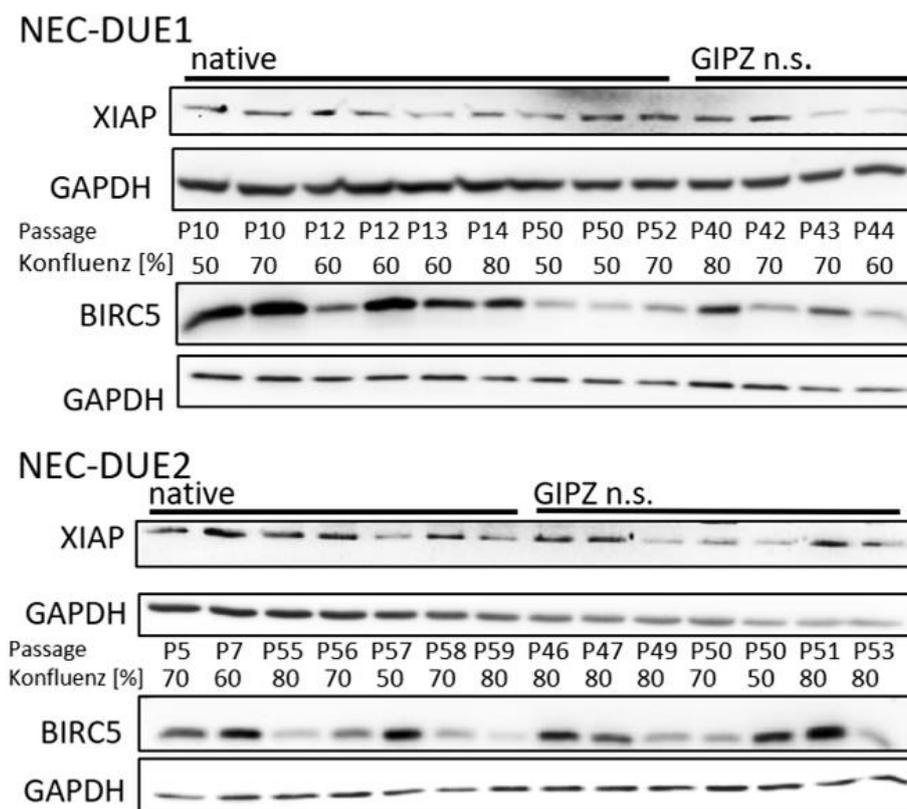
NEC-DUE1	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
BIRC5-KD	100	35,02	41,7	7,9	82,29	35,95	68,33	15,71	0,0481*	0,029	4/3
XIAP-KD	100	12,58	12,01	3,97	104,7	10,81	22,65	7,33	0,0003*	0,05	3/3
NEC-DUE2											
BIRC5-KD	100	12,04	15,7	2,98	95,91	11,95	28,51	5,95	0,0002*	0,0286	4/3
XIAP-KD	100	63,98	14,98	10,33	92,82	68,06	27,24	17,16	0,0126*	0,0286	3/4

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte einseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Definition der statistischen Signifikanz für den U-Test ist  $p \leq 0,05$ , bei geringer Stichprobenzahl ( $n = 3/n = 3$ ) kann der U-Test keinen geringeren p-Wert als 0,05 erreichen (s. 3.4). Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = GIPZ n.s., n2 = KD.

Für NEC-DUE1 ergab sich nach BIRC5-KD eine 66%ige (s. Abb. 14 A) und nach XIAP-KD durchschnittlich eine 87%ige (s. Abb. 14 C) Herunterregulation. Bei NEC-DUE2

bewirkte der KD eine Reduktion der relativen BIRC5-Expression um 88 % (s. Abb. 14 B) im Gegensatz zum XIAP-KD mit nur 37 % (s. Abb. 14 D). Die Verringerung der XIAP- und BIRC5-Proteinexpression war über mehrere Passagen messbar. Die Stärke des KD sagt nichts über die reale Menge exprimierten BIRC5 oder XIAP aus, da das Western Blotting semi-quantitativ ist.

Innerhalb der GIPZ n.s.-Proben der gleichen Zelllinie waren Schwankungen in der BIRC5-Expression erkennbar, obwohl die Zellen unter stabilen Zellkulturbedingungen gehalten wurden (s. Abb. 13). Die Schwankungen konnten nicht auf die Höhe der Passage zurückgeführt werden. Ein Vergleich der Banden der Western Blot Ergebnisse zeigte hohe und niedrige Passagen mit vergleichbarer BIRC5-Expression. Zu sehen ist dies bspw. in Abb. 13 A bei P40 bis P44 von NEC-DUE1 GIPZ n.s. und in der Abb. 15 bei einem Vergleich von P40 mit P43 von NEC-DUE1 GIPZ n.s. oder von NEC-DUE2 P5 und P7 mit P57.



**Abb. 15 Western Blot Ergebnis der XIAP- und BIRC5-Expression in Abhängigkeit von Konfluenz und Passage der nativen NEC- und GIPZ n.s. Zellen.** BIRC5 wird in ausdifferenzierten Zellen nur während der Zellteilung hoch-, sonst streng reguliert. In den NEC-Zellen war dagegen generell eine BIRC5-Überexpression messbar (s. 1.3.2). Zur Beurteilung von Beladungsunterschieden wurde GAPDH verwendet. Dargestellt wurden unterschiedliche Passagen (P) der jeweiligen Zelllinie und die zugehörige Konfluenz während der Zellkultur in [%]. Bei doppelten Passagen handelte es sich um Proben aus unterschiedlichen Zellkulturflaschen, die unterschiedlich lange gewachsen sind, wie bei P10 NEC-DUE1 (s. abweichende Konfluenz). Keine Probe wurde zweimal aufgetragen.

XIAP betreffend haben in Abb. 15 bei NEC-DUE1 (native) die P50 und P52 stärkere Banden als die jüngeren Passagen P13 und P14 und bei NEC-DUE2 (native) sind die Banden von P55 und P58 vergleichbar, die von P57 ist aber schwächer.

Da BIRC5 zellzyklusspezifisch reguliert wird (s. 1.3.2), könnte die verringerte BIRC5-Expression aufgrund von Kontaktinhibition zu einer verminderten Proliferation der Zelle geführt haben. Dieser Effekt wäre z. B. sichtbar in Abb.15 bei NEC-DUE2 native P5 bis P56. In beiden Zelllinien weisen niedrige Konfluenzen von 50 % eine ähnliche BIRC5-Expression auf wie hohe Konfluenzen von 80 %. Erkennbar ist dies bei den nativen NEC-DUE1 P10 mit einer Konfluenz von 50 %, P10 mit einer Konfluenz von 70 % und P14 mit einer Konfluenz von 80 %. Bei NEC-DUE2 GIPZ n.s. ist dies zwischen P50 mit einer Konfluenz von 50 % und P46, P47 und P51 mit einer Konfluenz von 80 % zu sehen. Andersherum haben Proben mit ähnlicher Konfluenz eine abweichende relative Proteinexpression, erkennbar bei einem Vergleich von NEC-DUE1 mit Konfluenzen von 60 % und NEC-DUE2 GIPZ n.s. mit Konfluenzen von 80 %.

Im Fall von XIAP in NEC-DUE2 betrug die Konfluenz bei P57 50 %, bei P55 80 %, die XIAP-Expression ist jedoch bei P55 stärker und bei P59 wiederum schwächer.

Es zeigt sich also insgesamt eine von der Passage der Zellen und ihrer Konfluenz unabhängige BIRC5-Expression.

Einleitend wurde eine enge Zusammenarbeit von XIAP und BIRC5 im Rahmen der Apoptoseinhibition beschrieben. BIRC5 soll hierbei einen stabilisierenden Einfluss auf XIAP haben (s. Abb. 7, 1.3.1). Allerdings wurde im Vorfeld der Probengewinnung keine Apoptose induziert, sondern vitale Krebszellen überprüft. Dennoch wurde geklärt, ob sich beide IAPs gegenseitig in ihrer Expression in den Zelllinien beeinflussten. Die Abb. 15 zeigt bereits eine Unabhängigkeit zwischen der Expression von BIRC5 und XIAP. Dies ist besonders gut erkennbar bei den NEC-DUE1 GIPZ n.s. Proben, die abwechselnd starke und schwache BIRC5-Banden zeigen, die XIAP-Expressionen sind aber vergleichbar. Bei den nativen NEC-DUE2 weisen Proben mit geringer BIRC5-Expression, wie P55, P56 und P58, dennoch eine vergleichbare hohe XIAP-Expression auf und obwohl bei P57 BIRC5 deutlicher exprimiert war, im Vergleich zu P55, erscheint die XIAP-Expression verringert.

Ein Zusammenhang von XIAP- und BIRC5-Expression wurde auch in Vorarbeiten in der Arbeit von Dizdar et al. (2017) zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der IAPs für die Tumorigenese der GEP-NEC überprüft und kann dort nachgelesen

werden. Die Abbildung dort zeigt, dass der KD von BIRC5 keinen Einfluss auf XIAP hatte und umgekehrt (s. Dizdar et al. 2017, Abb. 2 A, BIRC5 = SVV = Survivin).

Die unabhängige Expression von BIRC5 und XIAP war entscheidend für die weitere Beurteilung der Wirkungsweise beider Proteine in Folgeexperimenten.

BIRC5 kommt in mehreren Splicevarianten mit abweichender zellulärer Lokalisation und Funktion vor (s. 1.3.2). Da nicht bekannt war, ob BIRC5 eine Rolle für die microRNA-Regulation spielt und welche Splicevarianten beteiligt sein könnten, sollte geklärt werden, ob alle Splicevarianten in den Analysen nachweisbar wären.

Für das Western Blotting wurde ein polyklonaler Antikörper von Novus Biologicals eingesetzt. Als Immunogen zur Herstellung des Antikörpers wurde rekombinantes humanes BIRC5 (ganze Länge) verwendet (UniProt# O15392, Gen ID 332).

WT-BIRC5 (142 AS) hat ein theoretisches Molekulargewicht von 16,4 kDa mit einer Funktion in Zellteilung und Apoptoseinhibition. Die bekannteren Isoformen sind das zytoplasmatische Survivin-2B (165 AS mit 18,6 kDa) und das nukleäre Survivin- $\Delta$ Ex3 (137 AS mit 15,6 kDa) (Mahotka et al. 1999). Die WT-Form enthält 4 Exons, den Isoformen fehlt ein Exon und/oder sie enthalten ergänzend eine kürzere Version eines Exons. Hierdurch weichen sie in ihrem Molekulargewicht voneinander ab (Mahotka et al. 1999). Zwischen den Isoformen gibt es große Übereinstimmungen im Bereich der ersten 73 AS (s. u. blaue und violette Sequenzen unten). Survivin-2B enthält einen zusätzlichen Einschub und stimmt auch mit den hinteren 68 AS überein.

WT-BIRC5 (142 AS):

Blau = Übereinstimmung alle drei Splicevarianten

Violett = Übereinstimmung WT-BIRC5 und Survivin-2B

MGAPTLPPAW QPFLKDHRS TFKNWPFLG CACTPERMAE AGFIHCPTEN EPDLAQCFFC FKELEGWEPD  
DDPIEEHKKH SSGCAFLSVK KQFEELTGE FLKDRERAK NIAKETNNK KKEFEETAEK VVRAIEQLAA MD

Survivin-2B (165 AS):

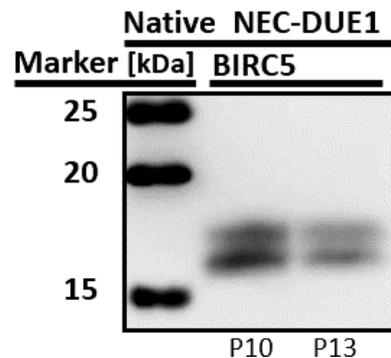
MGAPTLPPAW QPFLKDHRS TFKNWPFLG CACTPERMAE AGFIHCPTEN EPDLAQCFFC FKELEGWEPD  
DDPIGPGTVA YACNTSTLGG RGGRIREEHKKH SSGCAFLSVK KQFEELTGE FLKDRERAK NIAKETNNK  
KKEFEETAEK VVRAIEQLAA MD

Survivin- $\Delta$ Ex3 (137 AS):

MGAPTLPPAW QPFLKDHRS TFKNWPFLG CACTPERMAE AGFIHCPTEN EPDLAQCFFC FKELEGWEPD  
DDPMQRKPTI RRKNLRLRR KCAVPSSSWL PWIEASGRSC LVPEWLHHFQ GLFPGATSLPV GPLAMS

Der in den Analysen verwendete polyklonale Antikörper von Novus Biologicals sollte also theoretisch alle BIRC5-Splicevarianten nachweisen können.

Im Western Blot (s. Abb. 13) wurde BIRC5 bei GIPZ n.s. mit einer zusätzlichen, schwächeren unteren Bande nachgewiesen. Diese ist bei NEC-DUE2 am deutlichsten erkennbar. Aufgrund des oben beschriebenen geringen Unterschieds der Splicevarianten von nur 1 bis 2 kDa waren zusätzliche Banden nur in höher prozentigen Gelen und nach ausreichender Auftrennung erkennbar (s. Abb. 16).



**Abb. 16 Western Bot Ergebnis der BIRC5-Expression in nativen NEC-DEU1 Zellen.** Dargestellt ist das Ergebnis von zwei Passagen (P). WT-BIRC5 hat ein Molekulargewicht von 16,4 kDa, das nukleäre Survivin- $\Delta$ Ex3 ist mit 15,6 kDa kleiner und das zytoplasmatische Survivin-2B ist mit 18,6 kDa größer. Für die Herstellung der Proben im Rahmen des Western Blotting wurde generell Gesamtproteinlysate verwendet.

Bei den einzelnen Banden im Western Blot (s. Abb. 16) muss es sich nicht um unterschiedliche Splicevarianten gehandelt haben. Denkbar wäre auch eine posttranslationale Modifikation von BIRC5 durch Phosphorylierung (Wheatley et al. 2004).

Die Arbeit von Mahotka et al. (2002) verwendete den gleichen polyklonalen Antikörper zum erfolgreichen Nachweis der Splicevarianten Survivin- $\Delta$ Ex3, Survivin-2B und WT-BIRC5. Allerdings gab es eine Einschränkung Survivin- $\Delta$ Ex3 betreffend. Die Banden waren hier schwächer ausgefallen im Vergleich zu WT-BIRC5, da aufgrund des veränderten C-Terminus (s.o.) dem polyklonalen Antikörper weniger Epitope zur Bindung zur Verfügung standen (Mahotka et al. 2002). Wenn die verschiedenen BIRC5-Isoformen unter den vorhandenen Versuchsbedingungen exprimiert wurden, konnte der Antikörper diese nachweisen.

#### 4.1.1 Unterschiede zwischen den NEC-Zelllinien

Damit die Heterogenität des GEP-NEC-Krebstyps besser eingeschätzt werden konnte, wurden mehrere NEC-Zelllinien in der AG Krieg etabliert (Krieg et al. 2014, Dizdar et al. 2018). Eine erste Einsicht in genetische Aberrationen der Zelllinien lieferten aCGH-Daten (*Array Comparative Genomic Hybridization*). Wie sich CNA (Genkopiezahländerungen) auf die Anzahl der Genkopien auswirken, lässt sich auf diesem Weg nicht feststellen, da bei dieser Methode gleiche Mengen Referenz- und Probe-DNA verwendet werden und Krebszellen polyploid sein können (höherer DNA-Gehalt). Ein Gen-

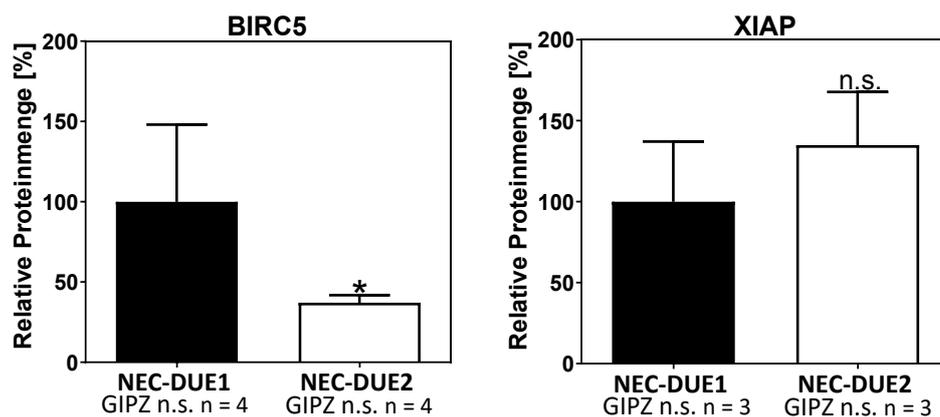
Zugewinn könnte zu erhöhter Transkriptionsaktivität und im Endeffekt mehr Protein führen. GEP-NEC weisen generell eine *BIRC5*-Überexpression auf (s. 1.1 und 1.3.2). Die Array-CGH-Analyse wurde von Dr. B. Möhlendick (Chirurgische Forschung, Uniklinik Düsseldorf) durchgeführt (s. Anhang Abb. VI). Die Daten zeigten, dass Primarius und Zelllinie der NEC-DUE2 einen Genkopieverlust von *BIRC5* aufwiesen. Im Gegensatz hierzu hatten NEC-DUE1 Primarius und Zelllinie einen Zugewinn. Ein *BIRC5*-Kopiezahlzugewinn betraf im damaligen Patientenkollektiv der AG Krieg ~57 % der NEC-Fälle. Eine Deletion von *BIRC5* wurde in ~4 % der Fälle gefunden (Dizdar et al. 2017, aCGH-Analyse Dr. Möhlendick). Diese Daten deckten sich z. T. mit größeren Datensätzen von NEC-Tumoren des Verdauungssystems (s. Anhang Abb. VII). Deletionen von *BIRC5* kamen demnach nur in seltenen Fällen vor. Bei der NEC-DUE2 handelte es sich also um einen seltenen Vertreter der NEC-Tumore.

Zugehörige IRS-Daten (*Immune Reactivity Score*), erhoben von Dr. L. Dizdar (s. Anhang Tab. III), belegten trotz der *BIRC5*-Deletion für den Primarius der NEC-DUE2 eine *BIRC5*-Überexpression. Nukleär wiesen die Primarien beider Zelllinien eine moderate (IRS = 6) *BIRC5*-Überexpression auf. Zytoplasmatisch hatte der NEC-DUE2 Primarius (IRS = 8) eine moderate, der NEC-DUE1 Primarius (IRS = 4) eine schwache *BIRC5*-Expression.

Die Daten von Dizdar et al. (2017) belegten, dass *XIAP* in ~38 % der NECs einen CNG hatte, den die Zelllinien aber nicht besaßen, und weiterführend, dass es für *XIAP* und *BIRC5* keine signifikante Korrelation zwischen CNA und Proteinlevel gab.

Die reale Proteinexpression der NEC-Zelllinien war wichtig für die Einschätzung der Reaktivität der IAPs. In den Western Blots waren *BIRC5* und *XIAP* gut nachweisbar exprimiert und es wurden Unterschiede zwischen beiden Zelllinien festgestellt. Da die Proben auf der gleichen Western Blot-Membran (s. Abb. 13) geblottet wurden, konnte nach Normalisierung des Proteingehalts mittels GAPDH ein direkter densitometrischer Vergleich der Proben von NEC-DUE1 und NEC-DUE2 GIPZ n.s. erfolgen. Die GIPZ n.s. Proben sollten die endogene *BIRC5*- und *XIAP*-Überexpression aufweisen, wie sie bei der Etablierung der Zelllinien festgestellt wurde (Krieg et al. 2014).

Die graphische Überprüfung der Datensätze mittels Q-Q-Plots auf Abweichungen von der Normalverteilung und Ausreißer durch Box-Plots legte eine statistische Datenanalyse mittels ungepaarten t-Test nahe (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 17 und in der Tab. 4 zusammengefasst.



**Abb. 17 Densitometrischer Vergleich der BIRC5- und XIAP-Expression in den Zelllinien.** NEC-DUE1 GIPZ n.s. exprimierte signifikant mehr BIRC5 verglichen mit NEC-DUE2 GIPZ n.s.. Die BIRC5-Expression erreichte durchschnittlich nur 37 % der NEC-DUE1 GIPZ n.s. BIRC5-Expression. Aufgrund der Übereinstimmung der Daten erfolgte die statistische Auswertung auch hier über den ungepaarten t-Test mit n unterschiedlichen Passagen (s. 4.1). Dargestellt sind die Mittelwerte als Balkendiagramm mit der zugehörigen Standardabweichung. Die p-Werte für die Signifikanz wurden wie folgt festgelegt: \*  $\leq 0,05$  und n.s.  $> 0,05$  = nicht signifikante Ergebnisse.

**Tab. 4 Statistiken zur IAP-Expression**

	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
BIRC5	100	37,15	48,03	4,64	82,92	35,85	84,68	8,35	0,04*	0,0286	4/4
XIAP	100	134,9	37,11	32,84	83,91	133,7	68,75	65,6	0,29*	0,4	3/3

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = NEC-DUE1, n2 = NEC-DUE2.

NEC-DUE1 GIPZ n.s. exprimierte um den Faktor 2,7-mal mehr BIRC5 als NEC-DUE2 GIPZ n.s. (s. Abb. 17). Aufgrund von Vorarbeiten, in denen der Proteingehalt beider IAPs auf mRNA- und Proteinebene in nativen NEC-DUE1 und NEC-DUE2 verglichen wurde, entsprach dieses Ergebnis, BIRC5 betreffend, den Erwartungen (s. Dizdar et al. 2017 Abb. 1 G bis J). Allerdings zeigten dort die nativen NEC-DUE2 auch eine signifikant höhere XIAP-Expression als NEC-DUE1.

Das Ergebnis in Abb. 17 passt auch zu der festgestellten unabhängigen Expression beider IAPs. Obwohl NEC-DUE2 GIPZ n.s. signifikant weniger BIRC5 exprimiert, unterscheidet sich der XIAP-Level nicht von dem der NEC-DUE1.

Die fast dreimal geringere BIRC5-Expression der NEC-DUE2 könnte mögliche Effekte abgeschwächt haben, bei einer vergleichenden Analyse von GIPZ n.s. mit BIRC5-KD Zellen. Bei einem relativ kleinen Stichprobenumfang (n = 3) werden große Effekte (Unterschied zwischen Proben Gruppen, hier NEC-DUE1 und NEC-DUE2) benötigt, um signifikante Ergebnisse zu zeigen (s. 3.4). NEC-DUE1 konnte daher vermutlich statistisch eindeutiger Ergebnisse liefern. Dies wäre auch ein erster Hinweis auf eine Konzentrationsabhängigkeit möglicher Effekte vom BIRC5-Gehalt.

## 4.2 MicroRNA-Array-Analyse der NEC-Zelllinien

Die initiale Annahme dieser Arbeit bestand darin, dass über einen XIAP/BIRC5-Komplex eine erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und hierdurch eine Regulation tumorrelevanter microRNAs in den Tumorzellen erreicht wurde (s. 1.3.3). Um diese Zusammenhänge zu überprüfen, wurden die NEC-Zelllinien mit lentiviral shRNA induziertem *Knockdown* (KD) von XIAP oder BIRC5 verwendet, der die Expression des jeweils anderen IAPs nicht beeinflusste (s.o. unter 4.1). Der mögliche Einfluss beider IAPs auf die microRNA-Regulation konnte also getrennt voneinander bewertet werden.

Es erfolgte zunächst die eigenständige Probengewinnung aus der Zellkultur. So wurden  $n = 3$  Passagen Gesamt-RNA mit enthaltenen microRNAs von NEC-DUE1 BIRC5- und XIAP-KD Proben mit zugehörigen  $n = 3$  Passagen der GIPZ n.s. (Kontrolle) isoliert (s. 3.1.15.1). Die Stichprobenzahl war minimal. Es wurde daher die GIPZ n.s. Proben betreffend auf eine ausreichend hohe Expression der IAPs geachtet (s. Abb. 13), damit die Differenz zwischen KD und Kontrolle und damit mögliche Effekte maximal waren. Diese Proben wurden nach Exiqon (Dänemark) zur microRNA-Array-Analyse geschickt. Die Array-Analyse überprüfte 1918 der derzeit anerkannten humanen microRNAs (hsa-miR nach miRBase 20.0, s. 3.1.15.2) und sollte so erste Hinweise zum microRNA-Status der Krebszellen nach KD von XIAP oder BIRC5 liefern. Mit dem Array wurden funktionelle microRNAs und keine der Vorstufen (pri-, pre-miR) untersucht.

### 4.2.1 Datenanalyse (Exiqon)

Exiqon führte sowohl eine Qualitätskontrolle der Proben als auch eine Datenanalyse durch. Matrix und traditionelle PCA-Plots (*Principal Component Analysis*) von Exiqon belegten, dass gemessene Unterschiede in der microRNA-Expression auf die abweichende Biologie zwischen GIPZ n.s. ( $n = 3$ ) und KD Proben ( $n = 3$ ) zurückzuführen waren. Diese Abweichung war die verringerte IAP-Expression durch den KD. Unerwünschte Störfaktoren, wie die Probenqualität, Lagerung und Versuchsdurchführung hatten kaum bis gar keinen Einfluss auf die microRNAs (s. Anhang Abb. I und Abb. II). Im PCA-Plot gruppieren die NEC-DUE1 GIPZ n.s. zusammen mit den NEC-DUE1 XIAP-KD (s. Anhang Abb. I) und die NEC-DUE1 BIRC5-KD bilden mit allen drei Passagen eine eigene Gruppe. Nur die BIRC5-KD Proben zeigten also aufgrund ihres biologischen Unterschieds eine messbare Varianz in ihrer microRNA-Expression.

Die Firma Exiqon hat nur microRNAs analysiert, die oberhalb eines festgelegten Schwellenwertes lagen (oberhalb unspezifischer Hintergrundsignale). Dieser wurde definiert als das 1,2-Fache des 25 %-Perzentils der Gesamtsignalintensität des Arrays.

Waren 20 % oder 2 Proben einer Datenreihe (von  $n = 3$ ) außerhalb der Schwelle wurde die microRNA nicht analysiert. Nach Schwellenwertfilterung galten 727 humane microRNAs in den Proben als nachweisbar. Hierbei wurden in den BIRC5-KD Proben signifikant mehr microRNAs detektiert, als in den GIPZ n.s. Zellen (s. Anhang Abb. III).

#### 4.2.2 Bewertung der microRNA-Expressions-Analyse in den NEC

Die microRNA-Arrays ermöglichten eine globale Analyse der microRNA-Expression nach BIRC5- und XIAP-KD. Um den Sachverhalt besser zu veranschaulichen, wurde eine eigene *Heatmap* anhand der Exiqon-Daten erstellt, die den Zusammenhang zwischen biologischem Unterschied (*Knockdown*) und Varianz (microRNA) veranschaulicht (s. Anhang Abb. IV). Die microRNA-Expressionsprofile der KD Proben wurden den zugehörigen GIPZ n.s. Proben gegenübergestellt. Die GIPZ n.s. standen stellvertretend für den Zustand nativer NEC-Zellen. Das Farbschema erleichtert den optischen Vergleich der gemessenen relativen Expressionslevel anhand des *Row Z-Scores* einer bestimmten microRNA zwischen allen Proben, gibt aber keinen Aufschluss über die Expressionsunterschiede zwischen den microRNAs. Negative Werte (rot) zeigen eine Herunterregulation der microRNA nach IAP-KD. Positive Werte (grün) stellen demnach eine Hochregulation dar. Bei den verwendeten Daten handelte es sich um die normalisierten  $\log_2$  Ratio-Werte. Zur Berechnung wurden die gemessenen Signale der microRNAs auf dem Array in einem Zweifarben-Setup zur Berechnung einer Fluoreszenz-Ratio quantifiziert (s. 3.1.15.1 und 3.1.15.3).

Die initiale Annahme lautete, dass eine aktivierende Wirkung eines XIAP/BIRC5-Komplexes auf NF- $\kappa$ B microRNAs reguliert. Da sowohl die erste BIR-Domäne (Interaktion mit TAB1/TAK1, Lu et al. 2007) als auch die zweite BIR-Domäne (bindet RIP2) an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt sind (Krieg et al. 2009), wurde vermutet, dass gerade XIAP der entscheidende Faktor sein könnte. Die Ergebnisse der Array-Analyse liefern aber keine signifikant dysregulierten microRNAs nach XIAP-KD, obwohl der KD in den NEC-DUE1 87 % erreichte (s. Abb. 13 C). Eine zusätzliche Überprüfung in den NEC-DUE2 durch die Firma Exiqon lieferte ebenfalls keine signifikanten Resultate.

Dagegen waren nach Vergleich von NEC-DUE1 BIRC5-KD mit GIPZ n.s. microRNAs signifikant dysreguliert. Die hier beobachteten Veränderungen in der microRNA-Expression konnten nur von der BIRC5-Herunterregulation herrühren.

Über den miRCURY LNA™ microRNA-Array wurden 727 humane microRNAs in den Proben gemessen. Exiqon führte eine Korrektur für multiples Testen der p-Werte nach

Benjamini und Hochberg durch. Dieses Korrekturverfahren ist üblich, bei simultaner Durchführung einer hohen Zahl statistischer Tests (Benjamini et al. 1995, s. 3.1.15.3). Nachfolgend waren 64 microRNAs nach BIRC5-KD signifikant dysreguliert (korrigierter p-Wert < 0,05), davon 21 microRNAs herunter- und 43 microRNAs hochreguliert (s. Anhang Abb. IV).

### 4.2.3 Auswahl der microRNAs für Folgeanalysen

Zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen BIRC5 und der im Array nachgewiesenen microRNA-Regulation wurde eine Auswahl geeigneter Kandidaten aus den nach BIRC5-KD dysregulierten microRNAs getroffen. Die Tab. I im Anhang listet die 20 (von 64) nach KD signifikant am stärksten differentiell exprimierten microRNAs auf (log<sub>2</sub> Fold Change und niedrigster p-Wert). Diese microRNAs zeigten den stärksten Effekt nach KD und waren daher für erste Folgeuntersuchungen am besten geeignet. Von den in Tab. I herunterregulierten 9 microRNAs gehörten 5 zu der let-7-Familie. Die miR-124-3p war signifikant am stärksten hochreguliert. Des Weiteren waren 3 der 4 Mitglieder des miR-24-1-Clusters unter den 20 signifikant deregulierten microRNAs (s. Anhang Tab. I). Zum miR-24-1-Cluster gehören die miR-24-3p, 23b-3p und 27b-3p. Die miR-3074 gehört ebenfalls zum Cluster, war aber nicht detektierbar. Cluster microRNAs werden gemeinsam abgelesen (s. 1.4). Die miR-3074 (Chromosom 9: 95086014-95086094 [-]) teilt sich aber den gleichen Gen-Abschnitt mit miR-24-3p (Chr9: 95086021-95086088 [+]), befindet sich aber auf dem *antisense* Strang.

Mit den Daten aus der folgenden Tab. 5 ließ sich eine mögliche biologische Bedeutung dieser microRNAs durch potentielle Zielgene besser einschätzen und die Zahl der Kandidaten für Folgeexperimente weiter eingrenzen. Gut nachweisbare und für die Krebsforschung relevante microRNAs sollten so priorisiert werden.

In Tab. 5 wurde nur ein Vertreter der let-7-Familie aufgeführt, da microRNA-Familien aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung ähnliche Zielgene regulieren (s. 1.4). Andere microRNAs wurden nicht aufgeführt, weil sie nicht differentiell genug exprimiert waren (logFC < 0,850, s. Anhang Tab. I) oder nach Informationen aus Datenbanken eine geringe Anzahl an Zielgenen insgesamt oder in den relevanten Signalwegen haben sollen. Die microRNAs des miR-24-1-Clusters wurden aufgelistet, da sie gemeinsam dereguliert waren und eine Vielzahl von tumorigenen Zielgenen regulieren sollen.

Tab. 5 Auswahl der in NEC-DUE1 hochregulierten microRNAs nach BIRC5-KD

miR	Zielgene Beispiele	KEGG Signalwege in Krebs hsa05200 531 Gene	KEGG Apoptose hsa04210 136 Gene	KEGG Zellzyklus hsa04110 124 Gene	EMT* 365 Gene	Zielgene gesamt
124-3p	<i>AKT2, AURKB, BCL2, BIRC2, CASP3, CDH2, CDH11, CDH12, CDK2, CDK4, CDK6, IL6, LIN28A, LIN28B, NFKB1, NRAS, MAPK1, MAPK14, MDM2, MMP2, RELA, SNAI1, SNAI2, STAT3, VIM, XIAP, ZEB2</i>	94	20	29	76	1890
24-3p	<i>AURKB, BCL2, BIRC3, BIRC6, CASP2, CASP3, CDK4, FASN, MAPK14, MAP3K14, MAP7, MMP2, MYC, NOTCH1/2, RELA, STAT2, TP53</i>	86	25	37	53	1770
23b-3p	<i>AKT2, BCL2, CASP3, CASP7, CDK6, MAPK1, MAPK9, MAP3K14, MDM2, MMP2, MYC, NOTCH1/2, STAT3, XIAP</i>	88	23	29	50	1541
27b-3p	<i>CASP8, MAPK1, MAPK3, MAP3K5, MAPK8, MAPK14, NRAS, PARP1, SNAI2, TP53</i>	0	21	27	60	1834
125b-5p	<i>CASP2, CDH11, IL6R, LIN28A, MAP3K11, STAT3,</i>	0	3	0	27	938
338-3p	<i>BIRC3, CA2, MDM2, TGFB3</i>	0	8	13	20	674
10b-5p	<i>CDK6, MDM2, TP53</i>	7	9	12	7	400
342-3p	<i>MDM2, PARP1</i>	23	6	12	22	555
10a-3p	<i>BIRC3, CDK6, MAPK9, MDM2, PRKDC</i>	24	7	10	5	426
let-7i-5p	<i>BIRC2, BIRC3, CASP3, CASP6, CDK2, CDK4, CDK6, FAS, MAPK1, MAPK8, MDM2, MYC, NRAS, STAT3, TP53</i>	87	23	31	47	1753
130a-3p	<i>CDK1, CDK6, MAP3K14, NFKB1, NRAS, PARP1, RELA, STAT3</i>	72	24	26	38	1490

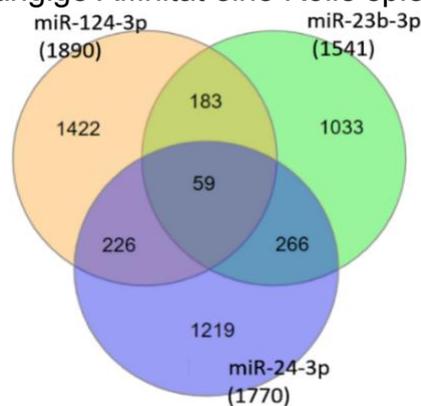
\* Die 365 EMT-Genen stammen von Gröger et al. (2012)  
Potentielle Ziel-Gene, die von mehreren microRNAs reguliert werden könnten, sind **fett** markiert.

Bestimmte Signalwege liegen im Fokus der Krebsforschung, darunter Apoptose (KEGG hsa04210), Signalwege in Krebs (KEGG hsa05200), Zellzyklus (hsa04110) und EMT (Gen-Liste Gröger et al. 2012). Die KEGG- (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Datenbank lieferte umfangreiche Informationen für die Signalwege und Gene verschiedenster Organismen.

Für die Zuordnung einer microRNA zu ihren Zielgenen wurde DIANA-mirPath v.3 genutzt. Hierbei handelte es sich um einen microRNA-Signalweg-Web-Server, der statistisch mit dem DIANA-microT-CDS Algorithmus arbeitete und aus experimentell validierten Ergebnissen aus der DIANA-TarBase Datenbank überprüfte, welche Zielgene eine microRNA regulieren könnte.

Die Tab. 5 verdeutlicht, dass microRNAs generell eine Vielzahl von Zielgenen regulieren können (s. 1.4) und zum anderen, dass es auch Überschneidungen zwischen den einzelnen microRNAs gibt (s. Abb. 18). Zu den nach BIRC5-KD hochregulierten Top-microRNAs mit den meisten krebisrelevanten Zielgenen gehören die miR-124-3p und die zum miR-24-1-Cluster gehörenden miR-24-3p und 23b-3p.

Die therapiebedingte Regulation von microRNAs mit einer hohen Anzahl krebserrelevanter Gene könnte größere Auswirkungen auf zellinterne, tumorigene Vorgänge haben als microRNAs mit wenigen Zielgenen und könnte (theoretisch) mehrere Bereiche (EMT, Apoptose, Zellzyklus) simultan abdecken. Diese microRNAs könnten allerdings unspezifischer in ihrer Wirkung sein und ungewollte Nebeneffekte erzeugen. Je nach Fall müsste ihre Wirksamkeit auf die Ziel-mRNA überprüft werden da zusätzliche Faktoren, wie ihre sequenzabhängige Affinität eine Rolle spielen (s. 1.4).



**Abb. 18 Venn-Diagramm der Überschneidung der Zielgene der 3 Top-microRNAs.** Die 3 Top-microRNAs sind miR-124-3p, 23b-3p und 24-3p. Die meisten Überschneidungen gibt es in KEGG-Signalwege in Krebs hsa05200 mit insgesamt 51 Genen, Zellzyklus hsa04110 mit 18 Genen, Apoptose hsa04210 mit 13 Genen und EMT mit 30 Genen. Ein Viertel der potentiellen Zielgene (Zielgene gesamt in Klammern) der miR-124-3p sollen auch von den anderen beiden microRNAs reguliert werden. Entsprechend sind es bei miR-24-3p und 23b-3p ein Drittel. Gene, die an den Signalwegen beteiligt und von den 3 microRNAs überschneidend reguliert werden sollen, sind in der Tab. 5 **fett** dargestellt (Eigene Abb. erstellt mit dem Programm InteractiVenn).

Die miR-124-3p wurde für weiterführende Analysen ausgewählt. Im Vergleich zu anderen microRNAs soll sie potentiell die größte Anzahl tumorrelevanter Zielgene regulieren. Im Vergleich zu den anderen in NEC-DUE1 gefundenen microRNAs (s. Anhang Tab. I) ist die Zahl bekannter Zielgene nach mirPath v.3 annähernd 3-mal höher. Sie ist größer als bei nicht gewebespezifischen microRNAs (Lim et al. 2005). Generell fördert die miR-124-3p die Differenzierung von Zellen und inhibiert die Proliferation (Ristori und Nicoli 2017). Diese Eigenschaften einer anti-tumorigenen microRNA sind gegensätzlich zum „onkofötalen“ (hohe biologische Relevanz als Onkogen und für proliferatives fötales Gewebe, s. 1.3.2) BIRC5 und machen die miR-124-3p relevant für potentielle Tumorthapien. Eine weitere Auffälligkeit war, dass die NEC-DUE1 eine Zelllinie mit GEP-NEC-Ursprung ist, die miR-124-3p sowie die miR-338-3p (Ludwig et al. 2016) aber als neuronale microRNAs bekannt sind. Die miR-124-3p soll zu den drei spezifischsten microRNA des Nervensystems zählen (Landgraf et al. 2007). Die neuronalen microRNAs miR-124-3p und miR-338-3p gehörten nach Exiqon Array-Analyse zu den drei am stärksten hochregulierten microRNAs nach BIRC5-KD.

Zwei der drei microRNAs des miR-24-1-Clusters, miR-24-3p und 23b-3p, wurden für

Folgeversuche ausgewählt, weil sie als Cluster microRNAs den Vorteil hatten, als Kontrolle füreinander dienen zu können. Beide microRNAs wurden aufgrund der für die Krebsforschung relevanteren Zielgene der miR-27b-3p vorgezogen (s. Tab. 5). Diese Clusters-microRNAs sollten nach Datenbankangaben über 1500 Zielgene haben. Dies wäre vergleichbar mit den tumorsuppressiven let-7 microRNAs, von denen die zwei am stärksten herunterregulierten Vertreter nachfolgend überprüft wurden.

Zusätzlich wurde die miR-125b-5p mit einbezogen. Sie wurde in verschiedenen Krebstypen als anti-tumorigen beschrieben und soll Proliferation, Apoptose und Tumorummunität beeinflussen (Wang et al. 2020).

### **Kurzzusammenfassung von Kapitel 4.2**

In 4.2 wurden die Testergebnisse der Exiqon microRNA-Array-Analyse explorativ dahingehend untersucht, über p-Wert-Berechnung Auffälligkeiten zu identifizieren. Der Fokus lag nicht auf einer Bestätigung der Nullhypothese. Die Kombination aus möglichst niedrigem p-Wert (p-Wert als *Surprise*-Index im Sinne seines Erfinders Ronald Fisher) und einer vergleichsweise hohen Deregulation wurde angewendet, um die hohe Zahl der signifikant deregulierten microRNAs (64) einzugrenzen. Als weiteres Kriterium wurde die Relevanz der einzelnen microRNAs für die Krebsforschung hinzugezogen. Dies führte zu der initialen Fokussierung auf 7 verschiedene Kandidaten microRNAs, die zur Bestätigung der Array-Ergebnisse nachfolgend eigenständig quantifiziert wurden: miR-124-3p, miR-24-3p, miR-23b-3p, miR-125b-5p, miR-338-3p, let-7i-5p und let-7g-5p.

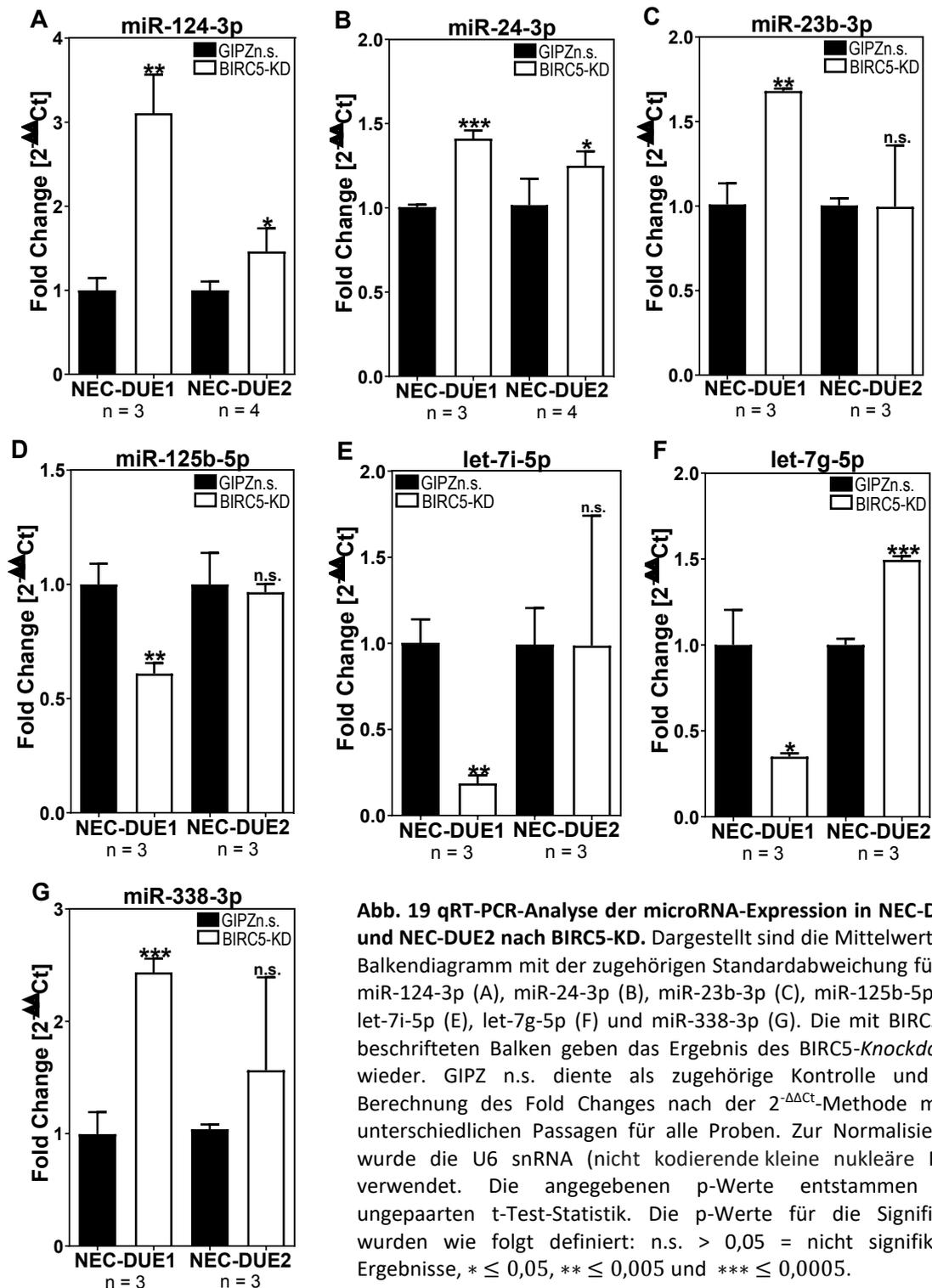
#### **4.2.4 Quantifizierung der Exiqon NEC-Array-Ergebnisse**

Die Bestätigung der Exiqon Array-Ergebnisse zur Überprüfung geeigneter BIRC5-abhängiger Kandidaten-microRNAs von NEC-DUE1 erfolgte mit den microRNA-Assays von Thermo Fisher Scientific mittels qRT-PCR. Wie im microRNA-Array wurden nur die funktionellen microRNAs gemessen. Generell wurden die qRT-PCR-Ergebnisse mittels einer nicht kodierende kleinen nukleären RNA (*small nuclear RNA*), die U6 snRNA, normalisiert. Ihre Expression blieb im Versuchsrahmen unverändert.

Die unter 4.2.3 ausgewählten microRNAs wurden zusätzlich in der NEC-DUE2 quantifiziert. Das Hinzuziehen der zweiten Zelllinie konnte weitere Rückschlüsse auf eventuelle biologische Zusammenhänge liefern. Zu erwarten war entweder eine gleichgerichtete Regulation aufgrund des gleichen Zelltyps oder Abweichungen aufgrund von

Unterschieden in der Biologie der Zellen. Diese Unterschiede bestanden im *BIRC5*-Status (s. Anhang Abb. VI) und der *BIRC5*-Expression (s. Abb. 17).

Die graphische Überprüfung der Datensätze mittels Q-Q-Plots auf Abweichungen von der Normalverteilung und Ausreißer durch Box-Plots favorisierte eine statistische Datenanalyse mittels ungepaarten t-Test (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in Abb. 19 und Tab. 6 zusammengefasst.



**Abb. 19** qRT-PCR-Analyse der microRNA-Expression in NEC-DUE1 und NEC-DUE2 nach BIRC5-KD. Dargestellt sind die Mittelwerte als Balkendiagramm mit der zugehörigen Standardabweichung für die miR-124-3p (A), miR-24-3p (B), miR-23b-3p (C), miR-125b-5p (D), let-7i-5p (E), let-7g-5p (F) und miR-338-3p (G). Die mit BIRC5-KD beschrifteten Balken geben das Ergebnis des BIRC5-Knockdowns wieder. GIPZ n.s. diente als zugehörige Kontrolle und zur Berechnung des Fold Changes nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode mit n unterschiedlichen Passagen für alle Proben. Zur Normalisierung wurde die U6 snRNA (nicht kodierende kleine nukleäre RNA) verwendet. Die angegebenen p-Werte entstammen der ungepaarten t-Test-Statistik. Die p-Werte für die Signifikanz wurden wie folgt definiert: n.s. > 0,05 = nicht signifikante Ergebnisse, \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,005 und \*\*\* ≤ 0,0005.

Tab. 6 Statistiken zur NEC-Array-Ergebnisse

NEC-DUE1	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
miR-124-3p	1	3,11	0,15	0,46	0,95	3,24	0,28	0,89	0,0016*	0,05	3/3
miR-24-3p	1	1,41	0,02	0,05	1	1,42	0,03	0,1	0,0002*	0,05	3/3
miR-23b-3p	1	1,68	0,12	0,013	0,95	1,68	0,22	0,03	0,0007*	0,05	3/3
miR-125b-5p	1	0,61	0,09	0,05	1,02	0,62	0,18	0,9	0,0026*	0,05	3/3
let-7i-5p	1	0,19	0,14	0,05	0,94	0,16	0,25	0,08	0,0006*	0,35	3/3
let-7g-5p	1	0,35	0,2	0,02	1,07	0,35	0,39	0,04	0,0054*	0,05	3/3
miR-338-3p	1	2,44	0,2	0,12	0,98	2,48	0,39	0,23	0,0004*	0,05	3/3
NEC-DUE2											
miR-124-3p	1	1,46	0,1	0,27	1,03	1,38	0,18	0,5	0,02*	0,014	4/4
miR-24-3p	1	1,25	0,16	0,08	1,02	1,24	0,28	0,16	0,04*	0,029	4/4
miR-23b-3p	1	1	0,04	0,36	1,01	0,91	0,08	0,71	0,97*	0,7	3/3
miR-125b-5p	1	0,97	0,14	0,04	0,96	0,95	0,27	0,07	0,7*	> 0,99	3/3
let-7i-5p	1	0,99	0,21	0,75	1,09	1,34	0,39	1,38	0,99*	0,7	3/3
let-7g-5p	1	1,5	0,04	0,02	1,01	1,5	0,07	0,03	0,0004*	0,2	3/3
miR-338-3p	1	1,57	0,04	0,83	1,04	1,57	0,06	1,17	0,46*	> 0,99	3/3

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte einseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Definition der statistischen Signifikanz für den U-Test ist  $p \leq 0,05$ . Aufgrund der geringen Stichprobenzahl ( $n = 3/n = 4$ ) kann der U-Test keinen geringeren p-Wert als 0.05 erreichen. Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = GIPZ n.s., n2 = BIRC5-KD.

Die Daten der Diagramme (s. Abb. 19) bestätigten die Array-Ergebnisse (Exiqon) der NEC-DUE1 für die Hochregulation der miR-124-3p, 338-3p, 24-3p, 23b-3p und die Herunterregulation der let-7 microRNAs. Die miR-125b-5p war nach eigener Analyse gegensätzlich reguliert, verglichen mit den Array-Ergebnissen (s. Abb. 19 D und Tab. I im Anhang). Auch in den hier dargestellten Analysen waren die miR-124-3p und 338-3p die am stärksten hochregulierten microRNAs nach BIRC5-KD. Die relative Expression, der Fold Change, der miR-124-3p ist für die NEC-DUE1 2,3-mal höher als für die NEC-DUE2 (s. Abb. 19 A). Die NEC-DUE2 betreffend konnte nur noch die miR-24-3p bestätigt werden (s. Abb. 19 B). Die let-7g-5p war im Vergleich zur NEC-DUE1 hoch- anstatt herunterreguliert (s. Abb. 19 F). Die miR-23b-3p, 125b-5p, let-7i-5p und miR-338-3p waren bei NEC-DUE2 nicht dereguliert (s. Abb. 19 C, D, E und G).

Der Grund für die schwächere bzw. fehlende Deregulation der microRNAs in der NEC-DUE2 könnte die nachgewiesene geringe Expression von BIRC5 im Vergleich zur NEC-DUE1 gewesen sein (s. Abb. 17) und, wie unter 4.1.1 erwähnt, ein Hinweis auf eine Konzentrationsabhängigkeit der microRNA-Regulation durch BIRC5.

Da ein genereller BIRC5-abhängiger Mechanismus der microRNA-Regulation gesucht wurde, kamen abweichend deregulierte microRNAs bei beiden Zelllinien für weitere Analysen zunächst nicht in Frage. Die microRNAs von Interesse blieben daher die

miR-124-3p und 24-3p, als BIRC5-beeinflusste microRNAs. Die miR-23b-3p wurde hinzugezogen, da sie mit der miR-24-3p clustert und sollte zumindest in NEC-DUE1 ähnliche Resultate liefern.

### 4.3 Situation in den Primärtumoren

Die ersten Ergebnisse einer IAP-abhängigen microRNA-Regulation wurden *in vitro* über das NEC-Zelllinienmodell ermittelt. Die Bedingungen in der Zellkultur sind kontrollierter als in einem Organismus. Daher wurde überprüft, ob vergleichbare microRNA-Expressionsmuster (s. 4.2.4) auch in GEP-NEC-Primärtumoren zu sehen waren. Tumorproben von GEP-NEC-G3-Patienten zeigten in immunhistochemischen Färbungen in der Mehrzahl der Fälle eine schwach positive BIRC5-Expression, sichtbar in den IRS-Daten von Dr. L. Dizdar (s. Anhang Tab. III). Dies ist für ausdifferenziertes Normalgewebe ungewöhnlich (s. 1.3.2). In 50 % der Fälle (n = 14) war eine schwache, in 36 % eine moderate bis starke Expression für nukleäres BIRC5 sichtbar und 14 % waren negativ. Zytoplasmatisches BIRC5 war in 78,6 % der Fälle schwach positiv und 7 % negativ. Diese BIRC5-Hochregulation könnte wie in den NEC-Zellen auch einen Einfluss auf die microRNA-Expression im Tumorgewebe gehabt haben. Für die Analyse von Primärtumoren standen in Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete (FFPE)-Patientenproben von NEC-Primarien des Colons (G3) zur Verfügung. Insgesamt konnten 11 Primärtumor- mit 7 Normalgewebeproben in ihrer microRNA-Expression verglichen werden. Das Material stammte aus der Pathologie des UKD und wurde eingehend von Dr. H. Mayringer (Pathologe UKD) zur Identifikation reinen Tumorgewebes beurteilt (s. 3.1.1). Ein Vergleich erfolgte mit dem korrespondierenden Normalgewebe von FFPE-Blöcken des gleichen Patienten, also mit gleichem Gewebsursprung und frei von Tumorzellen.

Die Gesamt-RNA mit enthaltenen microRNAs wurde eigenständig aus den FFPE-Proben isoliert und für eine microRNA-Array-Analyse nach Exiqon (Dänemark) geschickt (s. 3.1.15.1). Es erfolgten die gleichen Exiqon Qualitätskontrollen und Datenanalyse wie unter 4.2.1. (s. Anhang Abb. VIII). Die PCA-Plots zeigen, dass die gemessene abweichende microRNA-Expression zwischen Tumor- (TGW) und Normalgewebe (NGW) auf ihre abweichende Biologie (tumorigene Veränderungen) zurückzuführen war und nicht auf unerwünschte Störfaktoren (z.B. ein Einfluss der Probenlagerung). Insgesamt konnten nach Schwellenwertfilterung der Firma Exiqon ~880 humane microRNAs von insgesamt 2102 microRNAs auf dem Array gemessen werden. Die

NGW exprimierten im Durchschnitt mehr microRNAs, so waren bei den NGW ~850 und bei den TGW noch ~800 microRNAs (s. Anhang Abb. IX) messbar.

Da Patientenproben biologisch z. T. starke individuelle Abweichungen aufweisen können, wurden zunächst nur Proben aus dem Colon für eine gepaarte Array-Analyse verwendet, d.h. die jeweiligen TGW wurden mit dem NGW des gleichen Patienten verglichen. In einer zweiten gepoolten Analyse wurden TGW ohne zugehöriges NGW mit einbezogen, indem der Mittelwert aller vorhandenen NGW zur Berechnung des Fold Changes verwendet wurde. Mit den Daten von Exiqon wurden eigene *Heatmaps* mit unbeaufsichtigter hierarchischer Clusteranalyse mit Hilfe des *Complete-Linkage-Clusterns* und der euklidischen Distanzmessung erstellt (s. Anhang Abb. X und XI).

Die Cluster-Bäume der *Heatmaps* der gepoolten und gepaarten Analyse belegen eine Aufteilung der microRNA-Expressionsmuster der Proben in eine große Abzweigung mit ausschließlich NGW und eines mit TGW. Diese Analyse lieferte also microRNAs, die in den GEP-NEC aufgrund tumoriger Veränderungen dereguliert wurden. Die GEP-NEC sind relativ selten, weshalb die Patientenkohorte relativ klein war. Die Daten lieferten aber erste Einblicke. Die Colon-Kohorte enthielt nur den Primarius der NEC-DUE2 Ziellinie, da NEC-DUE1 zu den Magen-NECs zählt.

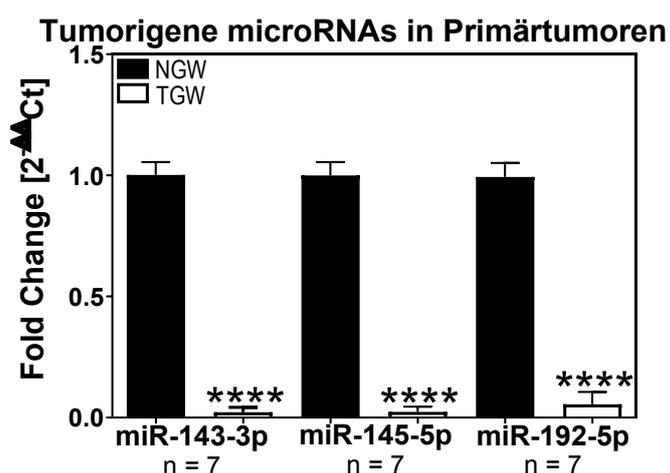
#### **4.3.1 Quantifizierung der microRNA-Array-Analyse der Primärtumorproben**

Die gepoolte und gepaarte microRNA-Array-Analyse der microRNA-Expressionsmuster der Primärtumorproben stimmen in großen Teilen miteinander überein (s. Anhang Abb. X, Abb. XI und Tab. II). Die Firma Exiqon verwendete bei ihren Analysen zunächst multiple t-Tests und wendet nachfolgend die Korrektur der p-Werte nach Benjamini und Hochberg an. Auf eine Kontrolle nach Benjamini-Hochberg (p-Wert-*Cutoff* 0,05) wurde verzichtet, da die hohe Zahl der nach t-Test signifikant deregulierten microRNAs (250 nach gepoolter, über 210 nach gepaarter Array-Analyse) eingegrenzt werden musste. Es wurden nur microRNAs gesucht, die den größten Effekt (höchste Signifikanz und Differenz, im Sinn seines Erfinders Ronald Fisher, p-Wert als *Surprise-Index*) im Vergleich zwischen TGW und NGW zeigten. In dieser Array-Analyse identifizierte microRNAs wären generell als tumorigen-dereguliert anzusehen (s. Anhang 7.2.7). Zusätzlich wurden für Folgeanalysen microRNAs gesucht, die mit 4.2.4 übereinstimmen. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Untersuchung einer BIRC5-beeinflussenden microRNA-Regulation (positive Immunhistochemie der Primärtumore, s. Anhang Tab. III).

Die Tab. II im Anhang listet die 21 signifikantesten (p-Werte aus multipltem t-Test) und am stärksten deregulierten ( $\log_2$  FC) microRNAs auf.

Die zum miR-143/145-Cluster gehörenden miR-145-5p und 143-3p und die miR-192-5p zählten zu den microRNAs, die den deutlichsten Effekt in allen TGW zeigten. In den Volcano Plots der gepoolten und gepaarten Analyse liegen sie unter den signifikantesten und am stärksten deregulierten microRNAs (s. Anhang Abb. XII). Das 143/145-Cluster gilt als Tumorsuppressor (Lei et al. 2017), wie die miR-192-5p (Xiao-Fang Zheng et al. 2016). Alle drei microRNAs wären von Interesse für die Tumorforschung und waren geeignete Kandidaten für eine eigenständige Überprüfung mittels Assays von Thermo Fisher auf die Korrektheit ihrer Expressionsvarianz (s. Abb. 20).

Wie bereits erwähnt erfolgte die statistische Datenanalyse mittels ungepaartem t-Test. Die Ergebnisse wurden in der folgenden Abb. 20 und zugehörige statistische Daten sind in der Tab. 7 aufgeführt.



**Abb. 20 Quantifizierung der tumorigenen microRNAs miR-143-3p, 145-5p und 192-5p in NEC-G3-FFPE-Primärtumoren.** Aufgrund der höheren Genauigkeit wurde im Rahmen einer gepaarten Analyse Tumorgewebe (TGW) mit dem Normalgewebe (NGW) des gleichen Patienten verglichen. Zur Normalisierung wurde die U6 snRNA verwendet. Die Berechnung des Fold Change erfolgte zwischen TGW und NGW nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte als Balkendiagramm mit der zugehörigen Standardabweichung. Die angegebenen p-Werte entstammen der ungepaarten t-Test-Statistik mit n verschiedenen Patientenproben. Die p-Werte wurden definiert als  $**** \leq 0,00005$ .

**Tab. 7 Statistiken zu microRNAs in Primärtumoren**

NEC-G3	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
miR-143-3p	1	0,02	0,05	0,02	1	0,01	0,11	0,03	< 0,0001*	0,0006	7/7
miR-145-5p	1	0,02	0,06	0,02	0,97	0,01	0,1	0,03	< 0,0001*	0,0006	7/7
miR-192-5p	1	0,06	0,06	0,05	1	0,04	0,11	0,09	< 0,0001*	0,0006	7/7

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = NGW, n2 = TGW.

Die Quantifizierung der microRNAs in den NEC-G3-Primärtumorproben ergab eine signifikante Herunterregulation der microRNAs des miR-143/145-Clusters im Vergleich zwischen TGW und NGW (s. Abb. 20). Sie war dreimal stärker als im Vergleich zur miR-192-5p und entsprach den Array-Ergebnissen (s. Anhang Tab. II).

Diese microRNAs sind aber nicht unter den deregulierten microRNAs nach BIRC5-KD der NEC-Array-Analyse zu finden (s. Anhang Abb. IV).

In der NEC-Array-Analyse (s. 4.2.4) wurden Tumorzellen mit BIRC5-KD verglichen mit den gleichen Tumorzellen ohne KD. Die Deregulation der microRNAs erfolgte durch die Reduktion von BIRC5. In der Primärtumor-Array-Analyse wurde jedoch NGW mit TGW verglichen. Die Deregulation dieser microRNAs war durch die tumorogene Biologie der Krebszellen erfolgt. Ein *Knockdown* kann konstant erzeugt und überprüft werden. Patientenproben können dagegen individuelle biologische Abweichungen untereinander aufweisen. Die IRS-Daten der Tumorproben bestätigen eine mindestens schwache BIRC5-Überexpression. Die Colon- und Rektum-NECs betreffend war nur ein Fall für nukleäres BIRC5 negativ (s. Anhang Tab. III). Insofern war der abweichende BIRC5-Status die biologische Gemeinsamkeit beider Array-Analysen. Die BIRC5-KD Zellen näherten sich durch die Herunterregulation von BIRC5 dem NGW an und die NEC-GIPZ n.s. entsprachen den nativen Tumorzellen des TGW.

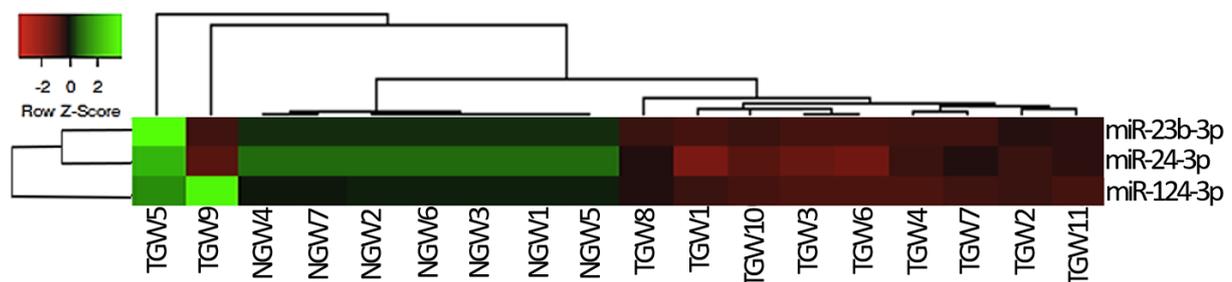
Wenn BIRC5 Einfluss auf die microRNA-Regulation hatte, sollten die BIRC5-KD microRNAs miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p aus der NEC-Array-Analyse (s. 4.2.4) in den Patientenproben dereguliert sein und zwar entsprechend der BIRC5-Hochregulation des TGW herunterreguliert. Auf den ersten Blick schien dies nicht der Fall, aber der Volcano Plot der gepoolten Array-Analyse (s. Anhang Abb. XII) zeigt durchaus bestätigende Daten. Die microRNAs des miR-24-1-Clusters, miR-27b-3p (p-Wert = 0,005), 23b-3p (p-Wert = 0,02) und 24-3p (p-Wert = 0,05) waren nach t-Test-Statistik durchaus dereguliert, die p-Werte waren im Vergleich zu den anderen microRNAs aber relativ hoch.

Aufgrund der von Exiqon durchgeführten p-Wert-Adjustierung für multiple Tests (Korrekturformel von Benjamini-Hochberg-Prozedur) haben die BIRC5-KD microRNAs bei einem korrigierten p-Wert von 0,05 den Signifikanztest nicht bestanden und galten demnach als nicht dereguliert in den Primärtumoren. Die Firma Exiqon legte aber eine andere Gewichtung auf die Array-Ergebnisse als diese Arbeit. Mit den

Hypothesentests sollten möglichst beste Kandidaten differentiell exprimierter microRNAs für Folgeanalysen identifiziert werden (s. p-Wert als Surprise-Index im Sinne seines Erfinders Ronald Fisher, 4.2.3 Kurzzusammenfassung).

Es erfolgte daher eine eigene Überprüfung der Expressionsvarianz der im Fokus stehenden BIRC5-KD microRNAs miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p in den Primärtumoren mittels qRT-PCR und Assays von Thermo Fisher Scientific. Für TGW ohne NGW wurde der Mittelwert aller NGW verwendet.

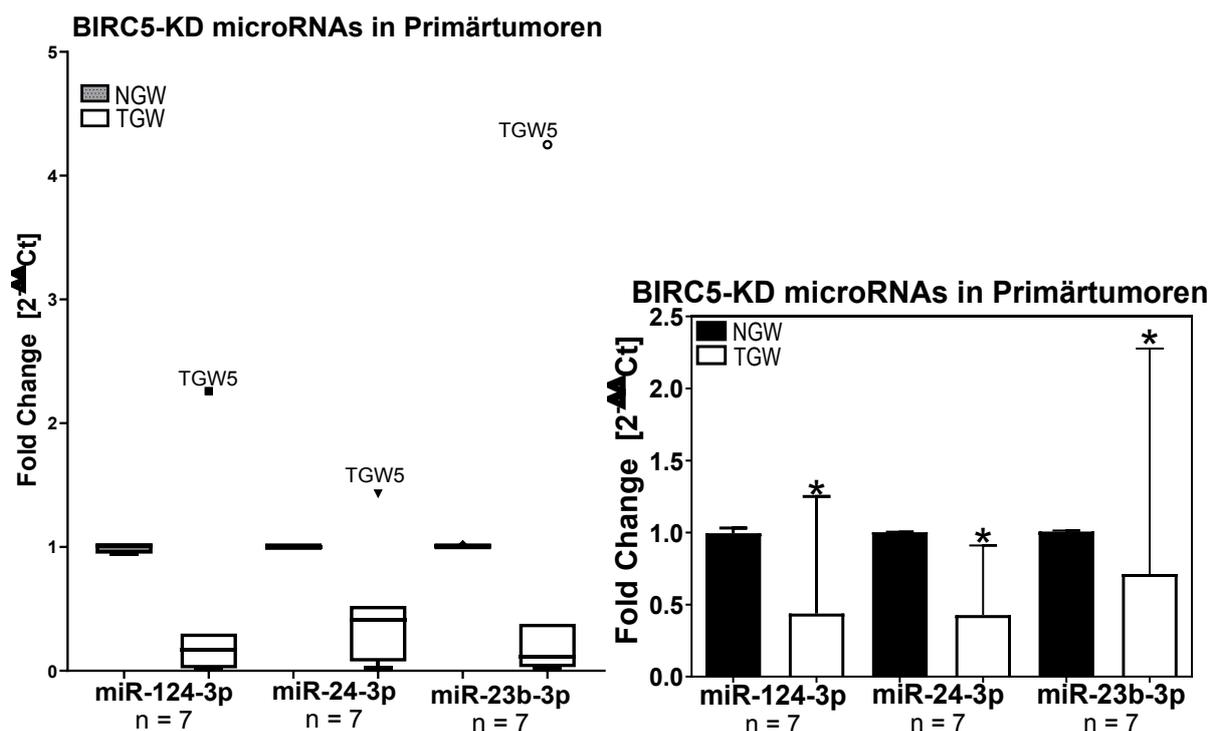
Mit den Fold Change-Werten wurde eine *Heatmap* mit allen  $n = 11$  Colon-TGW erstellt:



**Abb. 21 Heatmap der BIRC5-abhängigen miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p.** Die *Heatmap* enthält die Daten der BIRC5-KD microRNAs der Colon-Tumorgewebe- (TGW) Proben  $n = 11$  und Normalgewebe (NGW)  $n = 7$  Proben. Angewendet wurde die hierarchische Cluster-Analyse mit euklidischer Distanzmessung und Complete-Linkage-Methode. TGW5 ist der Primarius der NEC-DUE2. Für die Darstellung als Row Z-Score wurde der nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnete Fold Change verwendet. Programm Heatmapper.

Die *Heatmap* der BIRC5-abhängigen miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p verdeutlicht, dass die gemessenen Expressionen der jeweiligen microRNAs keine einheitliche Clustering in eine TGW- und NGW-Gruppe ergeben. In 9 Fällen wurden die microRNAs erwartungsgemäß durch BIRC5 in den Tumorzellen herunterreguliert. Die microRNAs sind im Fall des NEC-DUE2 Primarius TGW5 aber sichtbar hochreguliert. Im Fall von TGW9 ist die miR-124-3p hochreguliert (s. Abb. 21).

Für eine höhere Genauigkeit dieser Daten erfolgte eine gepaarte Analyse, das bedeutet, dass das TGW mit seinem korrespondierenden NGW in seiner microRNA-Expression verglichen wurde. Eine graphische Überprüfung mittels Q-Q-Plot ergab für die BIRC5-KD microRNAs keine Normalverteilung der Daten und eine Überprüfung mittels Box-Plot zur Ermittlung von Daten-Ausreißern befürwortete die Anwendung der Mann-Whitney-U-Statistik. Sie ist robuster gegenüber Ausreißern als der t-Test (s. 3.4). Die Ergebnisse sind der Abb. 22 und Tab. 8 zu entnehmen.



**Abb. 22 Quantifizierung von miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p in Colon-NEC-G3-Primärtumorproben.** In der gepaarten Analyse wurden Tumorproben (TGW) mit ihrem korrespondierenden Normalgewebe (NGW) verglichen. Dargestellt ist links ein Box-Plot zur Visualisierung der Datenausreißer. Es zeigt sich ein Ausreißer in jeder der drei microRNA-Analysen, bei denen es sich um die Probe TGW5 (NEC-DUE2 Primarius) handelt. Der Box-Plot zeigt den Median mit zugehöriger Standardabweichung der Datenreihen. Das Balkendiagramm rechts zeigt die Mittelwerte der Datenreihen mit der zugehörigen Standardabweichung. Es wurde daher die Statistik nach Mann-Whitney-U mit n verschiedenen Patientenproben angewendet. Sie ist robust gegenüber Ausreißern. Zur Normalisierung wurde die U6 snRNA verwendet. Der Fold Change wurde zwischen NGW und TGW nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet. Die p-Werte für die Signifikanz entsprechen  $* \leq 0,05$ .

**Tab. 8 Statistische Daten zu microRNAs in NEC-G3**

NEC-G3	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
miR-124-3p	1	0,44	0,04	0,81	1,01	0,17	0,08	0,28	0,095	0,0227*	7/7
miR-24-3p	1	0,43	0,003	0,48	1	0,41	0,004	0,45	0,008	0,0262*	7/7
miR-23b-3p	1	0,71	0,008	1,57	1	0,11	0,008	0,35	0,628	0,0262*	7/7

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des U-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = NGW, n2 = TGW.

Aufgrund von TGW5 (s. Abb. 22) wurden die Standardabweichungen der BIRC5-KD microRNAs miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p verglichen mit den 143/145-Cluster microRNAs zu hoch (s. Abb. 20). Dies war der Grund, warum diese microRNAs die Exiqon Array-Statistik nicht bestanden.

Im Rahmen der hier durchgeführten Mann-Whitney-U-Statistik (robuster gegenüber Ausreißern) waren die Ergebnisse allerdings signifikant und die überprüften microRNAs im TGW herunterreguliert. Nur bei TGW5 waren die überprüften microRNAs

hochreguliert (s. Abb. 21 und Abb. 22). Der Fold Change ist 17-fach höher für die miR-124-3p, 5,5-fach höher für die miR-24-3p und sogar über 30-mal höher für die miR-23b-3p bei einem Vergleich des Mittelwertes der anderen TGW mit TGW5. Derart abweichende Proben sind ein Grund, weshalb das Patientenkollektiv erweitert werden sollte.

Dies könnte das Ergebnis des microRNA-Expressionsmusters nach BIRC5-KD in der NEC-DUE2-Zelllinie erklären. Diese Besonderheit in der Biologie der NEC-DUE2 könnte den Effekt des BIRC5-KD in der Zelllinie abgeschwächt haben.

### 4.3.2 Magen-NEC-G3

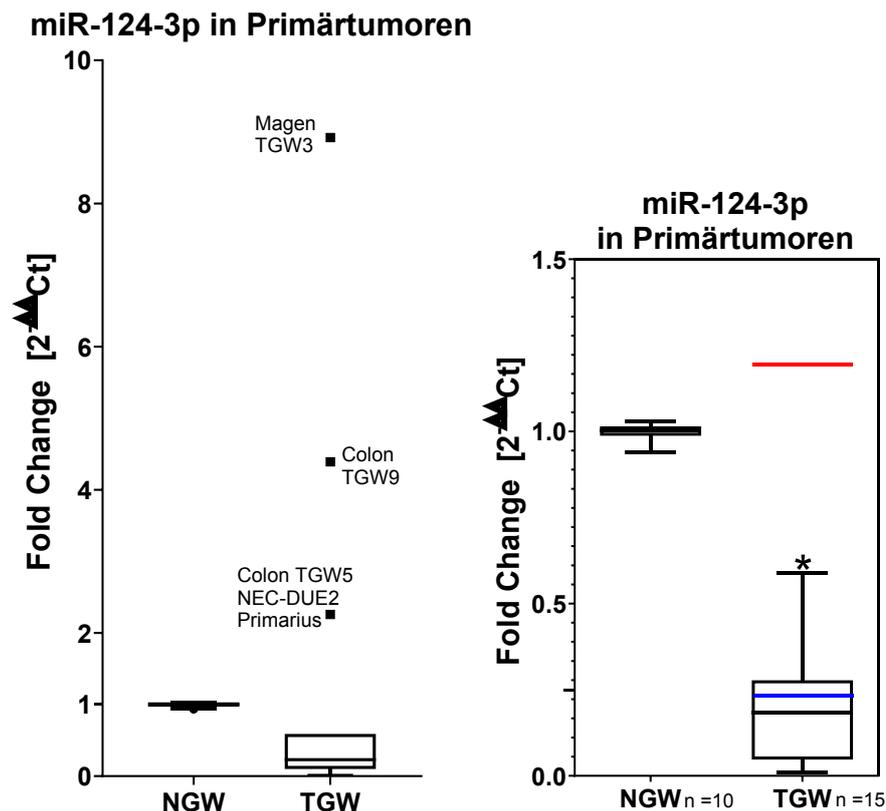
Da das Primärtumor-Kollektiv NEC-G3 mit 7 verschiedenen Patientenproben relativ klein war und nur die NEC-DUE2 zu den Colon-NECs gehört, wurden NEC aus dem Magen von 5 verschiedenen Patienten hinzugefügt. Zu den Proben gab es nur 3 Normalgewebe (IRS- und aCGH-Daten, s. Anhang Tab. III). Hierdurch konnte der NEC-DUE1 Primarius in die microRNA-Analysen miteinbezogen werden. Eingangs wurde nur die miR-124-3p mittels qRT-PCR überprüft, da sie bei den NEC-Array-Ergebnissen am stärksten dereguliert war (s. Abb. 19). Die Ergebnisse wurden zu den bisherigen Daten hinzugefügt.

**Tab. 9 Daten der Magen-Primärtumorproben**

Magen-NEC	miR-124-3p Fold Change [ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ]
NEC-DUE1 TGW 1	0,20
TGW2*	0,27
TGW 3*	8,92
TGW4*	2208,18
Colon NEC-DUE2 TGW5	0,01

Die Tab. 9 listet die qRT-PCR-Ergebnisse der Magen-NEC-G3-Primärtumorproben auf. Für Tumorgewebe (TGW) ohne Normalgewebe (NGW) wurde der Mittelwert der anderen Magen-NGW zur Berechnung des Fold Changes verwendet. Proben mit zugehörigem Normalgewebe wurden mit \* gekennzeichnet. Zugehörige IRS-Daten sind im Anhang Tab. III zu finden.

Die anschließende Analyse enthält die Daten von  $n = 15$  Tumorproben. Aufgrund des Ausreißers TGW5 (s. Abb. 22) und da ein Q-Q-Plot keine Standardnormalverteilung der Daten auch nach Hinzuziehen der Magen-NECs ergab, erfolgte die weitere statistische Analyse über Mann-Whitney-U (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in Abb. 23 und in Tab. 10 dargestellt.



**Abb. 23 Quantifizierung der microRNA-124-3p in Colon- und Magen-NEC.** In dieser Analyse sind insgesamt  $n = 15$  NEC-G3-Tumorproben enthalten, darunter die Primären der NEC-Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2. Magen-TGW4 wurde aufgrund des tausendfach höheren Wertes herausgenommen (s. Tab. 9). Der Box-Plot links zeigt den Median mit zugehöriger Standardabweichung zur Visualisierung der Datenausreißer. Die Tukey-Analyse zeigt auch hier, dass es drei stark abweichende Proben gibt. Für eine bessere Übersicht sind rechts diese Proben visuell nicht enthalten (alle Proben Mittelwert = rote Linie, Median = blaue Linie). Die Normalisierung erfolgt über die U6 snRNA. Die Statistik nach Mann-Whitney-U berücksichtigt  $n = 15$  Tumorproben (TGW) und  $n = 10$  Normalgeweben (NGW). Die Berechnung des Fold Changes erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Bei Proben ohne NGW wurde der Mittelwert der NGW verwendet. Die p-Werte für die Signifikanz entsprechen  $* \leq 0,05$ .

**Tab. 10 Statistiken zu microRNAs in Primärtumoren**

NEC-G3	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
miR-124-3p	1	1,19	0,03	2,4	1	0,23	0,03	0,49	0,8047	0,011*	10/15

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Aufgrund von Ausreißern wurde die Anwendung des U-Tests befürwortet (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = NGW, n2 = TGW.

Die Ergebnisse der miR-124-3p qRT-PCR in den Primären (s. Abb. 23) zeigen eine Herunterregulation in den Tumorgewebe um ca. 80 %. Die hohe Standardabweichung resultierte, neben der höheren Ungenauigkeit der Proben ohne eigenes Normalgewebe, aus der individuellen Biologie der TGW. Die BIRC5-Expression war nicht in allen Tumorproben identisch stark ausgeprägt (s. IRS-Daten, Anhang Tab. III).

Eine statistische Korrelationsanalyse nach Spearman könnte an dieser Stelle einen Zusammenhang zwischen BIRC5- und microRNA-Expression belegen. Es standen aCGH-Daten zur Verfügung, mit denen man einen Zusammenhang zwischen Genstatus und microRNA-Expression überprüfen könnte. Mit den IRS-Daten könnte eine Korrelation zwischen nukleärem oder zytoplasmatisch überexprimiertem BIRC5 überprüft werden. Die Tab. III im Anhang enthält hierzu alle zum Zeitpunkt vorhandenen Informationen. Sowohl die Anzahl der Proben ( $n = 15$ ) als auch ihre Diversität reichten aber für eine aussagekräftige Korrelationsanalyse nicht aus (s. Anhang Tab. III).

Die bisherigen Ergebnisse passen zu der Annahme, dass BIRC5 in den Tumorzellen denselben Effekt erzielt wie die NEC-GIPZ n.s.-Zelllinien im Vergleich zum BIRC5-KD. Ist BIRC5 in größeren Mengen vorhanden (wie in den NEC-Tumoren), wurden die BIRC5-KD microRNAs (miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p) herunterreguliert.

#### **4.4 Proof of Principle**

Im Anschluss erfolgte die Überprüfung der bisherigen Ergebnisse. Wenn BIRC5 tatsächlich der ausschlaggebende Faktor zur Regulation von microRNAs war, sollten die nachfolgenden Versuche dies bestätigen können. Hierbei wurden, wie in den vorangegangenen Analysen, ähnliche und gegenteilige Bedingungen geschaffen.

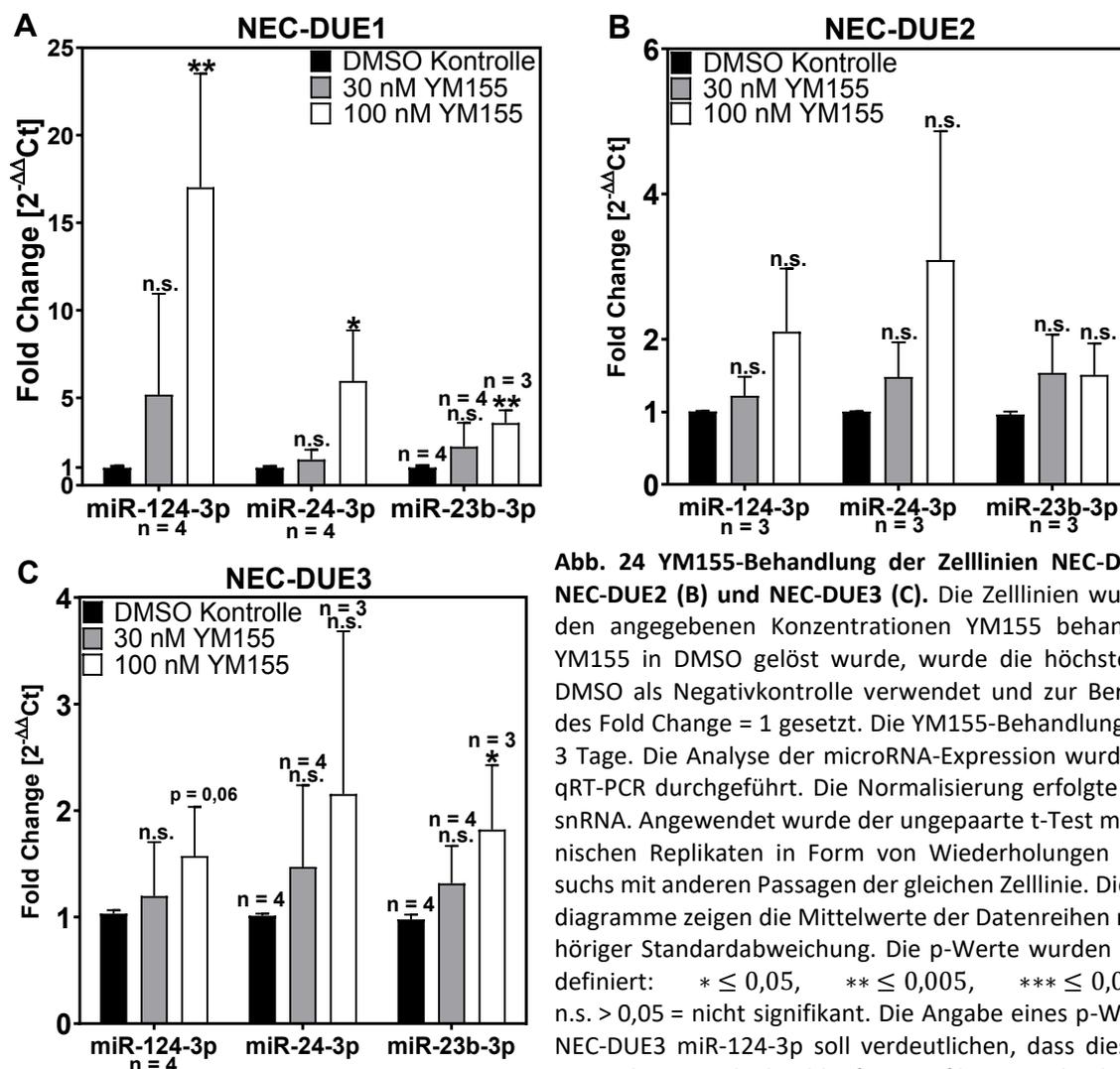
##### **4.4.1 YM155-Versuche**

Zur weiteren Bestätigung bisheriger Ergebnisse wurden Versuche mit dem Wirkstoff YM155 durchgeführt. YM155 (Sepantronium Bromide) galt als potenter BIRC5-Inhibitor (Voges et al. 2016, Nakahara et al. 2007). Die Arbeit von Hong et al. (2017) zeigte zusammenfassend allerdings, dass YM155 den Zellzyklus in der S-Phase blockierte und dadurch BIRC5 nicht heraufreguliert wurde. Der Effekt war also nicht spezifisch gegen BIRC5 gerichtet.

Arbeiten haben gezeigt, dass YM155 für diesen Zweck erfolgreich eingesetzt und BIRC5 effektiv herunterreguliert wurde (Andersson et al. 2017, Voges et al. 2016). Die Wirkung von YM155 auf NEC-DUE1 und NEC-DUE2 wurde auch in Vorarbeiten von Dizdar et al. (2017) nachgewiesen. BIRC5 wurde ab Konzentrationen von 100 bis 300 nM sichtbar im Western Blot herunterreguliert. XIAP war hiervon nicht betroffen, was wiederum die Ergebnisse der initialen Unabhängigkeit von XIAP und BIRC5 untermauert (s. 4.1).

Die miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p sollten nach YM155-Behandlung eine ähnliche Regulation zeigen, wie nach BIRC5-KD. Der Versuch wurde zur Überprüfung eines allgemein gültigeren Effektes in den NECs in der dritten NEC-DUE3-Zelllinie, die als kleinzellige GEP-NEC eingestuft wurde, durchgeführt. NEC-DUE1 und NEC-DUE2 zählen zu den großzelligen GEP-NEC (s. 2.1.1). Dies erfolgte mittels qRT-PCR. Nach den vorangegangenen Ergebnissen wurde bei den NEC-DUE2 ein schwacher bis kein Effekt auf die Regulation erwartet (s. Abb. 19).

Die Überprüfung der Datenreihen auf Normalverteilung mittels Q-Q-Plots und Ausreißern mittels Box-Plots erlaubte für die weiterführende statistische Analyse die Anwendung des ungepaarten t-Tests (s. 3.4). Die Ergebnisse sind den folgenden Abb. 24 und Tab. 11 zu entnehmen.



**Abb. 24** YM155-Behandlung der Zelllinien NEC-DUE1 (A), NEC-DUE2 (B) und NEC-DUE3 (C). Die Zelllinien wurden mit den angegebenen Konzentrationen YM155 behandelt. Da YM155 in DMSO gelöst wurde, wurde die höchste Menge DMSO als Negativkontrolle verwendet und zur Berechnung des Fold Change = 1 gesetzt. Die YM155-Behandlung dauerte 3 Tage. Die Analyse der microRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte über U6 snRNA. Angewendet wurde der ungepaarte t-Test mit n technischen Replikaten in Form von Wiederholungen des Versuchs mit anderen Passagen der gleichen Zelllinie. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der Datenreihen mit zugehöriger Standardabweichung. Die p-Werte wurden wie folgt definiert: \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,005$ , \*\*\*  $\leq 0,0005$  und n.s.  $> 0,05$  = nicht signifikant. Die Angabe eines p-Wertes bei NEC-DUE3 miR-124-3p soll verdeutlichen, dass dieser Wert mit mehr Versuchsdurchläufen signifikant werden könnte.

Tab. 11 Statistiken zur YM155-Behandlung

[miR-]	MW			SD			Mdn			IQA			t-Test		U-Test		SP
	n1	n2	n3	n1	n2	n3	n1	n2	n3	n1	n2	n3	n1/n2	n1/n3	n1/n2	n1/n3	n1/n2/n3
NEC-DUE1																	
124-3p	1	5,2	17	0,01	5,8	6,5	1	3	16	0,01	9,8	12,5	0,2*	0,003*	0,029	0,029	4/4/4
24-3p	1	1,5	6	0,01	0,6	2,9	1	1,2	6	0,01	0,9	5,4	0,15*	0,014*	0,029	0,029	4/4/4
23b-3p	1	2,2	3,6	0,02	1,4	0,7	1	1,7	4	0,04	2,4	1,3	0,13*	0,001*	0,029	0,057	4/4/3
NEC-DUE2																	
124-3p	1	1,2	2,1	0,01	0,3	0,9	1	1,2	1,7	0,01	0,5	1,6	0,23*	0,09*	0,7	0,1	3/3/3
24-3p	1	1,5	3,1	0,01	0,5	1,8	1	1,2	3	0,01	0,8	3,6	0,16*	0,11*	0,1	0,1	3/3/3
23b-3p	1	1,5	1,5	0,04	0,5	0,4	1	1,5	1,4	0,08	1,1	0,8	0,13*	0,09*	0,1	0,1	3/3/3
NEC-DUE3																	
124-3p	1	1,2	1,6	0,03	0,5	0,5	1	1	1,4	0,06	0,9	0,8	0,54*	0,06*	> 0,99	0,029	4/4/4
24-3p	1	1,5	2,2	0,02	0,8	1,5	1	1,1	1,3	0,03	1,2	2,7	0,28*	0,18*	0,029	0,057	4/4/3
23b-3p	1	1,3	1,8	0,05	0,4	0,6	1	1,2	1,6	0,07	0,6	1,1	0,11*	0,04*	0,029	0,057	4/4/3

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = DMSO, n2 = 30 nM, n3 = 100 nM.

Allgemein ließ sich eine Regulation der microRNAs innerhalb des YM155-Versuchs nur ab der Verwendung einer Konzentration von 100 nM bei den NEC-DUE1 erkennen. Das Versuchsergebnis nach YM155-Behandlung in NEC-DUE1 entsprach den vorangegangenen Ergebnissen der BIRC5-KD Analysen (s. Abb. 19). Auch hier hatte die miR-124-3p die stärkste Hochregulation (Fold Change = 17).

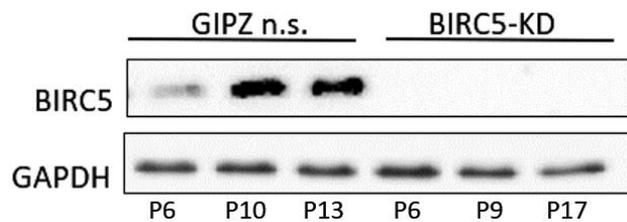
Die Zelllinie NEC-DUE2 lieferte erwartungsgemäß keine signifikante Regulation, da bereits die BIRC5-KD Versuche eine im Vergleich zu NEC-DUE1 geringe Hochregulation der microRNAs aufwiesen.

Die NEC-DUE3 betreffend ist zumindest die miR-23b-3p nach der YM155-Behandlung hochreguliert worden. Die miR-124-3p könnte nach weiteren Versuchsdurchläufen eine signifikante Hochregulation ergeben.

#### 4.4.2 Überprüfung einer Regulation in TT2609-C02 BIRC5-KD Zellen

Da noch eine weitere Zelllinie mit BIRC5-KD, die TT2609-C02 Zelllinie, zur Verfügung stand, wurde diese im Rahmen der BIRC5-abhängigen Regulation hinzugezogen. Hierbei handelt es sich um eine folliculäre Schilddrüsen-Krebszelllinie endokrinen Ursprungs. Sie wurde mit dem gleichen GIPZ lentiviral shRNA Vektor transduziert. Der Nachweis der Stabilität des BIRC5-KD wurde in unterschiedlichen Passagen überprüft. Sollten sich die gleichen microRNA-Regulationen zeigen wie in den NEC-Zelllinien, könnte dies für einen Mechanismus sprechen, der auch in anderen endokrinen Zellen wirkt. Zunächst wurde die Ausprägung des KD durch den Vergleich von BIRC5-KD

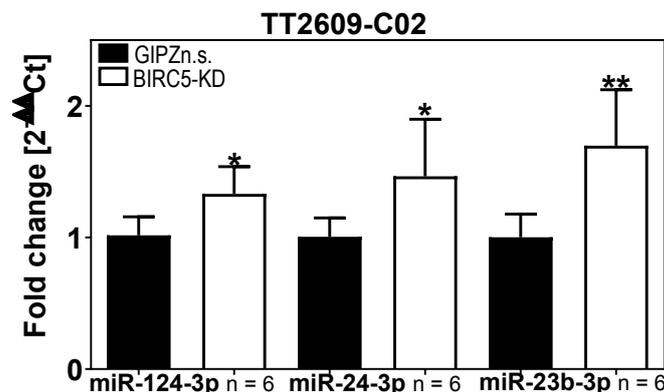
und GIPZ n.s. Kontrolle mittels Western Blot überprüft. Im Anschluss erfolgte die Überprüfung der microRNAs mittels microRNA-Assay qRT-PCR.



**Abb. 25 Überprüfung des BIRC5-KD mittels Western Blot in TT2609-C02, einer folliculären Schilddrüsenkrebszelllinie.** Überprüft wurden je 3 Passagen nach Transduktion mit dem GIPZ n.s. Leerplasmid und BIRC5-KD shRNA transduzierten Zellen (pGIPZ human shRNA lentiviral Plasmid). GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Das Western Blot Ergebnis der TT2609-C02 BIRC5-KD Zellen im Vergleich zu den GIPZ n.s. Zellen belegt den ausgeprägten KD von BIRC5 (s. Abb. 25).

Es folgte eine qRT-PCR mit microRNA-Assays von Thermo Fisher Scientific zur Analyse der Expression von miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p. Die Überprüfung der Datenreihen auf Normalverteilung mittels Q-Q-Plot und Ausreißern mittels Box-Plot erlaubte für die weiterführende statistische Analyse die Anwendung des ungepaarten t-Tests (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 26 und Tab. 12 aufgeführt.



**Abb. 26 Analyse von miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p nach BIRC5-KD in TT2609-C02.** Die Überprüfung erfolgte mittels qRT-PCR und microRNA-Assays. Zur Normalisierung wurde die U6 snRNA verwendet. Der Fold Change wurde zwischen GIPZ n.s. und BIRC5-KD berechnet. Die GIPZ n.s. Zellen stehen für die native BIRC5-Expression. Zur Berechnung der Statistik wurde der ungepaarte t-Test mit n technischen Replikaten in Form von anderen Passagen. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Datenreihen mit zugehöriger Standardabweichung. Die p-Werte für die Signifikanz entsprechen: \*  $\leq 0,05$  und \*\*  $\leq 0,005$ .

**Tab. 12 Statistiken zu TT2609-C02 nach BIRC5-KD**

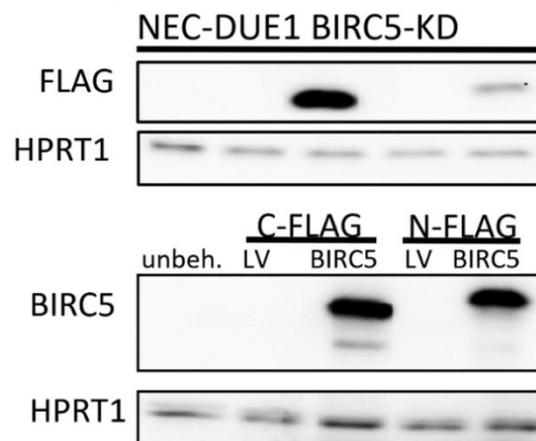
TT2609-C02	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
miR-124-3p	1	1,33	0,14	0,21	0,99	1,31	0,18	0,25	0,0115*	0,0087	6/6
miR-24-3p	1	1,47	0,14	0,43	1	1,23	0,17	0,83	0,03*	0,0087	6/6
miR-23b-3p	1	1,7	0,18	0,43	0,99	1,74	0,22	0,85	0,0041*	0,0087	6/6

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = GIPZ n.s., n2 = BIRC5

Nach erfolgter qRT-PCR ergab auch die folliculäre Schilddrüsen-Krebszelllinie TT2609-C02 nach BIRC5-KD eine ähnlich geartete Hochregulation der 3 Top-microRNAs miR-23b-3p, 24-3p und 124-3p, wie bei den anderen NEC-Zelllinien (s. Abb. 19).

#### 4.4.3 *Rescue*-Versuch mittels Plasmid Transfektion

Über die Transfektion mit einem BIRC5-Expressionsplasmid in NEC-DUE1 Zellen mit BIRC5-KD wurde die Umkehrung des KD erreicht. Hierdurch sollte sich eine umgekehrte Regulation der microRNAs ergeben. Die Plasmide erzeugten BIRC5 mit einem FLAG-Tag. Da die Art der BIRC5-vermittelten microRNA-Regulation unbekannt war, hätte ein Tag diesen Prozess beeinflussen können. Die Verwendung eines N- und eines C-terminalen FLAG-Tag könnte zusätzliche Hinweise für die Interaktion liefern.

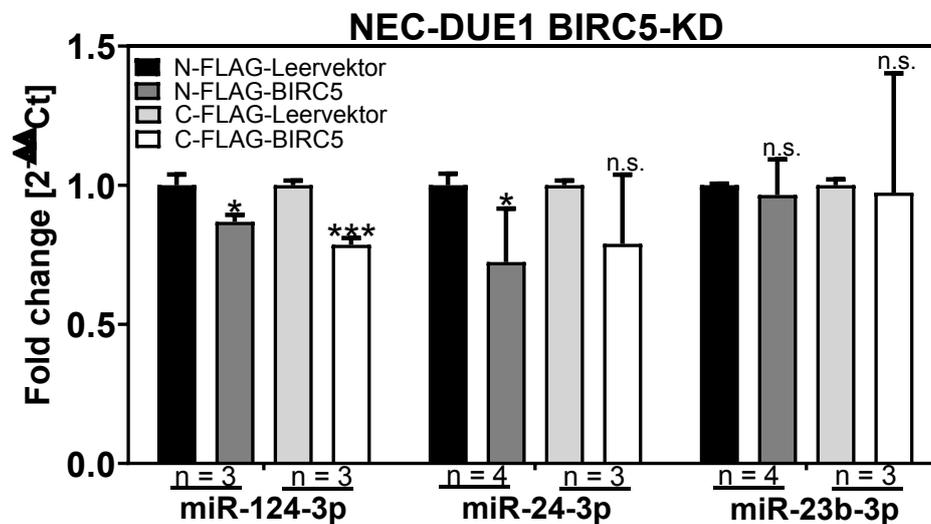


**Abb. 27 Western Blot Ergebnis der BIRC5-Expressionsplasmide.** Transfiziert wurden NEC-DUE1 BIRC5-KD Zellen. Als Normalisierungsprotein wurde HPRT1 verwendet, welches in NEC-Zellen ähnlich stabil exprimiert wurde wie GAPDH und sich aufgrund geringerer Signalintensität aber simultan mit anderen Antikörpern verwenden ließ. Der obere Blot zeigt die Expression des FLAG-Tags und der untere die BIRC5-Expression der gleichen Proben. N-FLAG = N-terminales FLAG, C-FLAG = C-terminales FLAG, LV = Leervektor.

Der Western Blot in Abb. 27 zeigt die erfolgreiche Hochregulation von BIRC5 in den KD Zellen. Die unbehandelten und die mit dem Leervektor transduzierten Zellen weisen keine sichtbare BIRC5-Expression auf.

Zur Darstellung von FLAG und BIRC5 wurden die gleichen Proben auf 2 Blots aufgetragen und einander gegenübergestellt. Die N-FLAG-Bande zeigt eine geringere Expression, die zugehörige BIRC5-Expression im zweiten Blot ist dagegen ähnlich zum C-FLAG-BIRC5-Plasmid überexprimiert. Eventuell konnte der FLAG-Antikörper nicht in gleichem Ausmaß an N-FLAG-BIRC5 binden, da er durch das Tag behindert wurde. Die Überprüfung der microRNA-Expression nach Transfektion mit einem BIRC5-Expressionsplasmid in NEC-DUE1 BIRC5-KD erfolgte mittels microRNA-Assays und qRT-PCR. Q-Q-Plot zur Überprüfung auf Normalverteilung und Box-Plot zur

Identifizierung von Ausreißern befürworteten eine weiterführende statistische Analyse mittels ungepaarten t-Tests (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in Abb. 28 und Tab. 13 aufgeführt.



**Abb. 28** qRT-PCR-Analyse der microRNA-Expression nach Transfektion mit BIRC5-Expressionsplasmiden von NEC-DUE1 BIRC5-KD Zellen. Verwendet wurde jeweils ein N-terminales und C-terminales FLAG-Tag BIRC5 mit korrespondierendem Leervektor als Kontrolle. Zur Normalisierung wurde die U6 snRNA verwendet. Zur Berechnung des Fold Change (FC) wurden die jeweiligen Leervektor-transfizierten Proben als native Expression auf 1 gesetzt. Für die Statistik wurde der ungepaarte t-Test mit n technischen Replikaten in Form von Wiederholungen des Versuchs mit anderen Passagen angewendet. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Datenreihen mit zugehöriger Standardabweichung. Die p-Werte für die Signifikanz entsprechen: n.s. > 0,05 = nicht signifikant, \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,005 und \*\*\* ≤ 0,0005.

**Tab. 13** Statistiken zur BIRC5-Plasmid-Transfektion

N-FLAG	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
miR-124-3p	1	0,87	0,04	0,03	0,99	0,9	0,08	0,05	0,008*	0,05	3/3
miR-24-3p	1	0,72	0,04	0,19	0,99	0,69	0,07	0,36	0,031*	0,014	4/4
miR-23b-3p	1	0,96	0,006	0,13	1	0,96	0,01	0,25	0,604*	0,5	4/4
C-FLAG											
miR-124-3p	1	0,79	0,02	0,02	0,99	0,78	0,03	0,05	0,0003*	0,05	3/3
miR-24-3p	1	0,79	0,02	0,25	0,99	0,89	0,03	0,47	0,22*	0,05	3/3
miR-23b-3p	1	0,97	0,02	0,43	1,01	0,89	0,04	0,85	0,92*	0,35	3/3

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte einseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = Leervektor, n2 = FLAG-BIRC5.

Durch die Überexpression von BIRC5 im Rahmen des *Rescue*-Versuchs wurden zwei der microRNAs herunterreguliert. Die miR-124-3p konnte durch beide Plasmide herunterreguliert werden, die miR-24-3p dagegen nur durch das N-terminale FLAG-BIRC5 (s. Abb. 28). Die Versuchsdurchläufe, insbesondere für die miR-23b-3p, lieferten teilweise hohe Standardabweichungen und damit keine Regulation.

## 4.5 Auswirkungen der microRNA-Regulation

Wie in der Einleitung (s. 1.3.2) beschrieben hat BIRC5 eine funktionelle Relevanz für die Regulation der Apoptose in den GEP-NEC (Dizdar et al. 2017). Bisher sprechen die Ergebnisse für einen Zusammenhang zwischen BIRC5- und microRNA-Expression. Die miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p könnten Zielgene regulieren, die für die Krebsforschung von Interesse wären (s. Tab. 5). Durch diese Zusammenhänge könnte BIRC5 weitere tumorfördernde Effekte erzeugen. Die aus Datenbanken und anderen Publikationen stammenden Zielgene müssen in den NEC-DUE-Zellen aber erst bestätigt werden. MiR-124-3p war in den NEC-DUE1 am stärksten und in den bisherigen Versuchen am deutlichsten messbar dysreguliert (s. Abb. 19), weshalb sie in den folgenden Versuchen auf ihre Wirkung überprüft wurde.

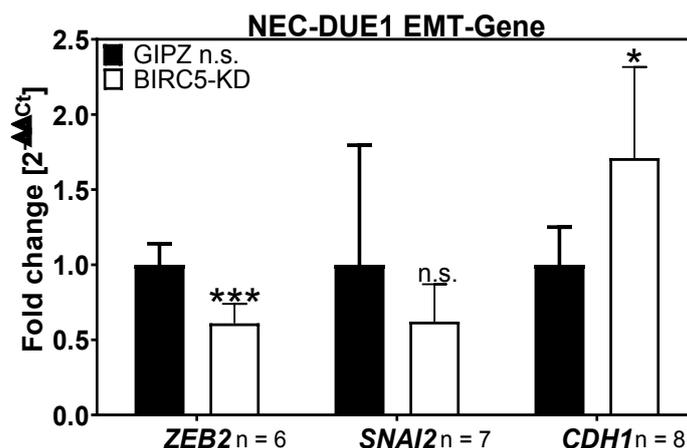
### 4.5.1 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschreibt den Phänotypwechsel einer Krebszelle, der die Voraussetzung für die Entstehung von Metastasen ist. Zellen mit epithelialen Eigenschaften bilden stabile Zell-Zell-Kontakte durch Expression von Adhäsionsmolekülen, wie CDH1 (E-Cadherin, *Calcium-Dependent Adhesion Protein*). Durch das Voranschreiten der EMT werden diese Proteine herunterreguliert.

Die miR-124-3p soll die Zielgene *ZEB2* (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2*) und *SNAI2* (SLUG, *Snail Family Transcriptional Repressor 2*) regulieren (s. Tab. 5). Beide Proteine sind transkriptionelle Repressoren des *CDH1*-Gens (Peinado et al. 2007, Wang et al. 2013, Long et al. 2005) und fördern auf diese Weise EMT. Eine Regulation beider Gene durch miR-124-3p wurde bereits in anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Liang et al. 2012, Ji et al. 2019).

Es erfolgte zunächst eine Überprüfung, ob diese Zielgene auch in den NEC-DUE1 nach BIRC5-KD dereguliert wurden. Da die miR-124-3p nach BIRC5-KD hochreguliert wurde, sollten im Gegenzug die mRNAs von *ZEB2* und *SNAI2* reduziert und *CDH1* nach BIRC5-KD hochreguliert werden.

Q-Q-Plot zur Überprüfung auf Normalverteilung und Box-Plot zur Identifizierung von Ausreißern befürworteten eine weiterführende statistische Analyse mittels ungepaar-tem t-Tests. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 29 und Tab. 14 dargestellt.



**Abb. 29 qRT-PCR-Analyse der EMT-Gene nach BIRC5-KD in NEC-DUE1.** In dieser Analyse werden BIRC5-KD Zellen in ihrer EMT-Genexpression mit GIPZ n.s. als Kontrolle verglichen. Die Berechnung des Fold Changes erfolgte über GIPZ n.s. (gleich 1 gesetzt). Zur Normalisierung wurden HPRT1 und TBP verwendet und aus den jeweiligen Werten für jede Probe der Mittelwert gebildet. Für die statistische Auswertung mit ungepaartem t-Test wurde der Versuch mit n Passagen als technische Replikate wiederholt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Datenreihen mit zugehöriger Standardabweichung. Die p-Werte wurden wie folgt definiert: n.s. > 0,05 = nicht signifikant, \* ≤ 0,05 und \*\*\* ≤ 0,0005.

**Tab. 14 Statistiken zu EMT-Genen nach BIRC5-KD**

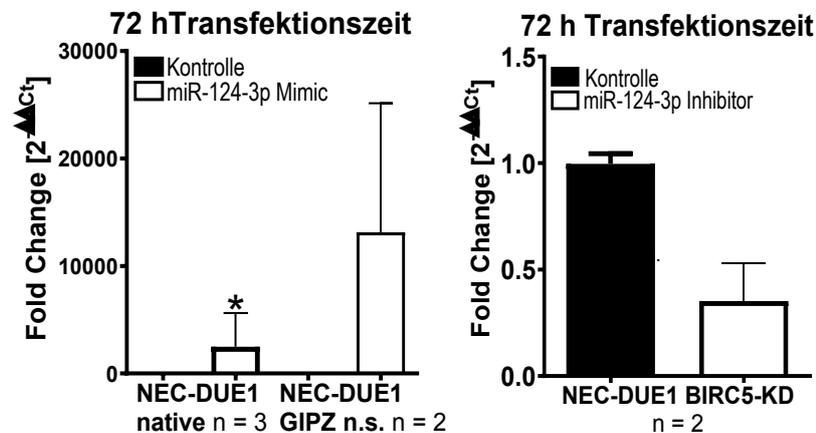
EMT	MW		SD		Mdn		IQR		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
ZEB2	1	0,61	0,14	0,13	0,99	0,65	0,24	0,25	0,0005*	0,0022	6/6
SNAI2	1	0,62	0,7	0,25	1	0,61	1	0,5	0,2522*	0,4353	7/7
CDH1	1	1,71	0,25	0,61	0,97	1,59	0,46	0,7	0,0051*	0,0019	8/8

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = GIPZ n.s., n2 = BIRC5-KD.

Diese erste Überprüfung von *CDH1* und seinen Inhibitoren in NEC-DUE1-Zellen mit BIRC5-KD im Vergleich zur GIPZ n.s. Kontrolle ergab eine gegen EMT gerichtete Regulation. Hierbei wurde nur ZEB2 nach BIRC5-KD herunterreguliert, was aber Auswirkung auf *CDH1* hatte, welches entsprechend hochreguliert war. Da der KD betrachtet wurde, sind neben der miR-124-3p noch weitere Faktoren (Proteine, microRNAs) dysreguliert, die auch einen Einfluss auf *ZEB2*, *SNAI2* und *CDH1* haben könnten.

Es wurde daher im nächsten Schritt überprüft, ob miR-124-3p tatsächlich selektiv *SNAI2* und *ZEB2* reguliert. MicroRNAs können durch entsprechende Mimics transient hoch- und mit entsprechendem Inhibitor herunterreguliert werden. Generell wurden die nativen und die GIPZ n.s. NEC-DUE-Zellen mit den Mimics transfiziert, um dem negativen Einfluss von BIRC5 und die BIRC5-KD wurde mit dem Inhibitor behandelt, um der Hochregulation der microRNAs, entgegenzuwirken. Die Reagenzien verblieben hierbei 72 h auf den Zellen (s. 3.3.6.1.1.2), danach erfolgte die RNA-Isolation und die Überprüfung der Wirkung der Mimics bzw. Inhibitoren mittels qRT-PCR.

Da keine Normalverteilung vorlag, wurde der ungepaarte einseitige Mann-Whitney-U-Test favorisiert. Der einseitige Test wurde angewendet, da durch Mimics eine Hochregulation bzw. durch Inhibitoren eine entsprechende Reduktion zu erwarten war (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in der Abb. 30 und Tab. 15 dargestellt.



**Abb. 30 Regulation der microRNA-124-3p nach Mimic- bzw. Inhibitor-Behandlung.** Das Transfektionsreagenz verblieb 72 h auf den Zellen. Bei der Mimic-Behandlung wurde der Fold Change mit der entsprechenden Mimic-Kontrolle (Kontrolle) berechnet und gleich 1 gesetzt. Die Inhibitoren wurden vergleichend mit der Inhibitor-Kontrolle dargestellt (rechts). Zur Normalisierung wurde die U6 snRNA verwendet. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Datenreihen mit zugehöriger Standardabweichung. Da keine Normalverteilung der Daten vorlag, wurde der ungepaarte einseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet (s. 3.4). Die p-Werte wurden wie folgt dargestellt: \*  $\leq 0,05$  und n.s.  $> 0,05$  = nicht signifikant.

**Tab. 15 Statistiken zur Transfektion**

NEC-DUE1	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
native	1	2489	0,09	3130	0,98	916,6	0,17	5637	0,24	0,05*	3/3

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte einseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des U-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = Kontrolle, n2 = Mimic/Inhibitor.

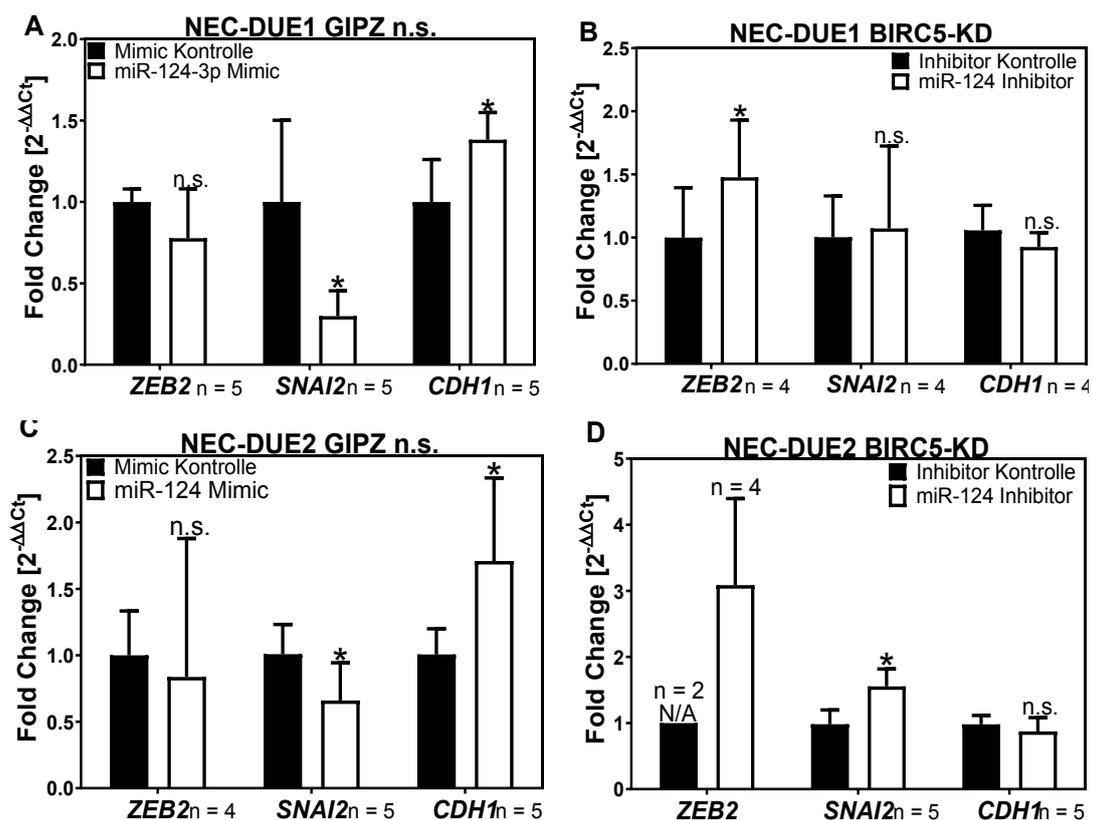
Die microRNA-Mimics führten zu einer Hochregulation der miR-124-3p in jedem einzelnen hier dargestellten Versuchsdurchlauf. Die Hochregulation in den jeweiligen Versuchsansätzen konnte dabei stark variieren, war so im Versuchsrahmen nicht gut einschätzbar und führte zu hohen Standardabweichungen. So war in einer von drei Analysen der mit Mimic-behandelten nativen NEC-DUE1 die miR-124-3p-Expression ca. 6-mal höher als bei den anderen.

Die Herunterregulation der miR-124-3p mittels Inhibitors erreichte im BIRC5-KD eine Reduktion von 62 % und 87 % (n = 2). Da eine Herunterregulation maximal gegen 0 gehen kann, fallen die Standardabweichungen geringer aus als bei der Mimic-Behandlung. Die Hochregulation könnte theoretisch unendlich erfolgen. Die voneinander abweichende Wirkung der Mimics wurde mit der Firma Thermo Fisher besprochen. Nach

Empfehlung sollte eine Überprüfung der microRNA-Expression nicht über Assays, sondern durch Analyse der microRNA-Zielgene erfolgen. Näheres ist im Abschnitt Diskussion näher beleuchtet (s. 5.6.1). Aus diesem Grund erfolgte die Überprüfung der erfolgreichen Transfektion mit Mimics und Inhibitoren in Folgeversuchen anhand ihrer Wirkung.

Zur Hochregulation von miR-124-3p wurden die GIPZ n.s. NEC-Zellen mit Mimics und die BIRC5-KD NEC-DUE-Zelllinien wurden mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt, um die dort hochregulierten microRNAs zu inhibieren. Die potentiellen Zielgene *ZEB2* und *SNAI2* wurden hierauf mittels qRT-PCR überprüft. Da sie Inhibitoren von *CDH1* sind, wurde dies ebenfalls überprüft.

Q-Q-Plots zur Überprüfung auf Normalverteilung und Box-Plots zur Identifizierung von Ausreißern befürworteten eine weiterführende statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U-Tests. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 und in Tab. 16 aufgeführt.



**Abb. 31** qRT-PCR-Analyse von *ZEB2*, *SNAI2* und *CDH1* in NEC-DUE nach (A und C) miR-124-3p Mimic- und (B und D) Inhibitorbehandlung. Die Fold Change-Berechnung erfolgte anhand der jeweiligen Mimic- bzw. Inhibitor-Kontrolle. Zur Normalisierung wurden TBP und HPRT1 eingesetzt und aus den jeweiligen Werten der Mittelwert berechnet. Die statistische Auswertung über den ungepaarten Mann-Whitney-U-Test der NEC-DUE1 (A und B) und NEC-DUE2 (C und D) erfolgte für die GIPZ n.s. und BIRC5-KD mit n unterschiedlichen Passagen, wobei *ZEB2* nicht in jedem Fall Messwerte zeigte (N/A), obwohl die empfohlenen Mengen cDNA für die qRT-PCR verwendet wurden. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Datenreihen mit zugehöriger Standardabweichung. Die p-Werte wurden wie folgt dargestellt: \*  $\leq 0,05$  und n.s.  $> 0,05$  = nicht signifikant.

Tab. 16 Statistiken zu EMT-Genen nach Mimic/Inhibitor-Behandlung

NEC-DUE1		MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
GIPZ n.s.		n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
ZEB2	1	0,78	0,08	0,3	1,03	0,65	0,14	0,43	0,151	0,0754*	5/5	
SNAI2	1	0,3	0,5	0,16	0,89	0,26	0,95	0,26	0,0175	0,0079*	5/5	
CDH1	1	1,38	0,26	0,17	1,04	1,47	0,5	0,29	0,0247	0,0278*	5/5	
BIRC5-KD												
ZEB2	1	1,48	0,39	0,45	0,97	1,62	0,74	0,81	0,1634	0,0143*	4/4	
SNAI2	1	1,07	0,33	0,65	1,22	1,31	0,6	1,14	0,6485	0,8557*	4/4	
CDH1	1	0,92	0,2	0,11	1,05	0,95	0,38	0,21	0,2872	0,2429*	4/4	
NEC-DUE2												
GIPZ n.s.		n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	t-Test	U-Test	SP n1/n2
ZEB2	1	0,84	0,33	1,04	0,88	0,48	0,57	1,85	0,7761			
SNAI2	1	0,66	0,22	0,28	1,01	0,65	0,43	0,47	0,0627	0,0278*	5/5	
CDH1	1	1,71	0,19	0,63	0,92	1,48	0,36	0,92	0,0431	0,0159*	5/5	
BIRC5-KD												
ZEB2	1	3,09	0	1,31	1	2,7	0	2,37	0,1008	0,0667*	2/4	
SNAI2	1	1,55	0,22	0,26	0,94	1,56	0,41	0,39	0,0057	0,0079*	5/5	
CDH1	1	0,87	0,13	0,21	0,98	0,69	0,26	0,36	0,3657	0,2738*	5/5	

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des U-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = Kontrolle, n2 = Mimic/Inhibitor.

Die miR-124-3p Mimic-Behandlung hat *SNAI2* signifikant in den GIPZ n.s. Proben beider Zelllinien im Rahmen der qRT-PCR reguliert (s. Abb. 31 A und C). Die Ergebnisse für *ZEB2* unterlagen dagegen zu starken Schwankungen. Nicht in allen Versuchsdurchläufen konnte eine ausreichende Herunterregulation erreicht werden. Dennoch scheint die zuverlässige Reduktion eines transkriptionellen Repressors, *SNAI2*, ausreichend gewesen zu sein, damit *CDH1* signifikant in beiden Zelllinien hochreguliert wird. *CDH1* ist kein direktes Ziel der miR-124-3p.

Für die BIRC5-KD Zellen konnte diesbezüglich in NEC-DUE1 BIRC5-KD nur bei *ZEB2* (s. Abb. 31 B) und in den NEC-DUE2 BIRC5-KD nur bei *SNAI2* (s. Abb. 31 D) eine signifikante Umkehr der Genexpression erreicht werden.

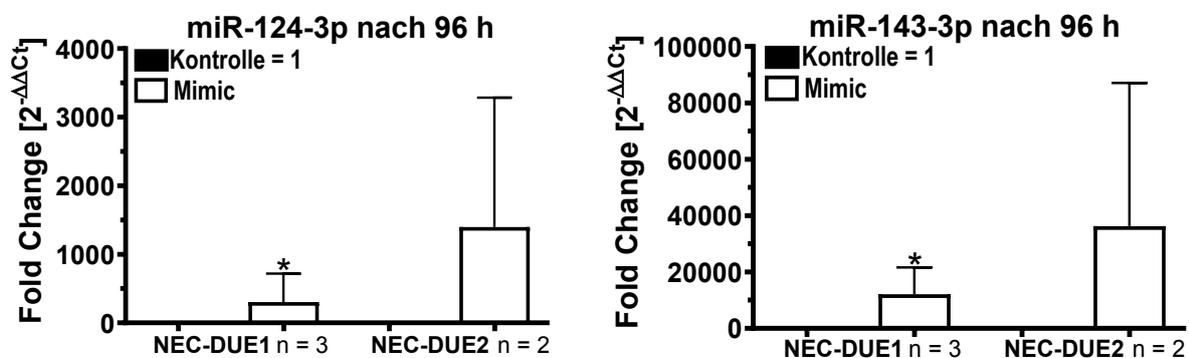
Die schwache bzw. unregelmäßige Wirkung der Inhibitoren im Vergleich zu den Mimics könnte an der unterschiedlichen Wirkungsweise beider Konstrukte liegen. Auf Näheres hierzu wird in der Diskussion eingegangen (s. 5.6.1).

Ob der Effekt der Mimic-Behandlung zur Regulation von EMT ausreicht, wurde nachfolgend mittels *in vitro* Wund-Assay überprüft.

#### 4.5.2 Wund-Assay (*in vitro* Scratch-Assays)

Wund-Assays dienen der Überprüfung der Migrationsfähigkeit von Zellen. Die NEC-Zellen wurden, zur Überprüfung des Einflusses auf die EMT-Gene und letztlich auf die Migrationsfähigkeit der Zellen, mit microRNA-Mimics der miR-124-3p transfiziert. Zum Vergleich wurde die miR-143-3p parallel mitgeführt. Sie wurde in den NEC-G3-Primärtumoren am signifikantesten und stärksten im Vergleich zu den Normalgeweben herunterreguliert (s. Anhang Tab. II). Das 143/145-Cluster gilt als Tumorsuppressor und ist vor allem beteiligt an der Regulation von EMT (Lei et al. 2017). Daher eignete sich die miR-143-3p Mimic zum Vergleich mit miR-124-3p. Das Transfektionsreagenz wurde mit den Mimics für 72 h auf den Zellen belassen und dann heruntergewaschen. Nach Durchführung des Kratzers befanden sich keine Mimics mehr im Zellmedium, sodass nur in den Zellen vorhandene microRNAs eine Wirkung erzielen konnten und artifizuell, in einem Zeitrahmen von 96 h, keine neuen microRNAs hinzugefügt wurden. Mittels qRT-PCR wurde überprüft, ob die microRNAs über den gesamten Zeitraum bis zur Beendigung des Scratch-Versuches nachweisbar hochreguliert waren.

Da die statistische Überprüfung keine Normalverteilung zeigte, erfolgte die weiterführende Analyse mittels ungepaarten einseitigen Mann-Whitney-U-Tests (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in der Abb. 32 und Tab. 17 aufgeführt.



**Abb. 32** Expression der miR-124-3p und 143-3p 96 h nach Mimic-Behandlung von NEC-DUE1 und NEC-DUE2. Der Fold Change wurde anhand der Kontrolle (auf 1 gesetzt), mit n Versuchsdurchläufen in NEC-DUE für die miR-124-3p und miR-143-3p Mimic-Behandlung berechnet. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Datenreihen mit zugehöriger Standardabweichung. Die p-Werte wurden wie folgt dargestellt: \*  $\leq 0,05$ .

**Tab. 17** Statistiken zu 96 h nach Mimic-Behandlung

NEC-DUE1	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
miR-124-3p	1	303	0,1	414,4	1	109	0,2	757,29	0,1378	0,05*	3/3
miR-143-3p	1	12104	0,1	9506	1	13938	0,2	18745	0,0461	0,05*	3/3

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte einseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte einseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des U-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = Kontrolle, n2 = Mimic.

Der einseitige Test hat mehr Power, da er einen Effekt nur in eine Richtung überprüft. Die Konsequenz, einen Effekt in der anderen Richtung zu übersehen, ist hier wenig relevant, da nur Fälle mit deutlich messbarer Hochregulation betrachtet wurden. Es soll nur ein Aspekt veranschaulicht werden, die Mimic-Hochregulation im Vergleich zur Mimic-Kontrolle. Die Mimic-Hochregulation lag bei NEC-DUE1 mit einem durchschnittlichen Fold Change von 300 weit über dem physiologischen Niveau des reinen endogenen microRNA-Gehalts, den die Kontrollen aufwiesen. Das artifizielle Konstrukt der Kontrolle sollte keinen Effekt auf die microRNAs gehabt haben.

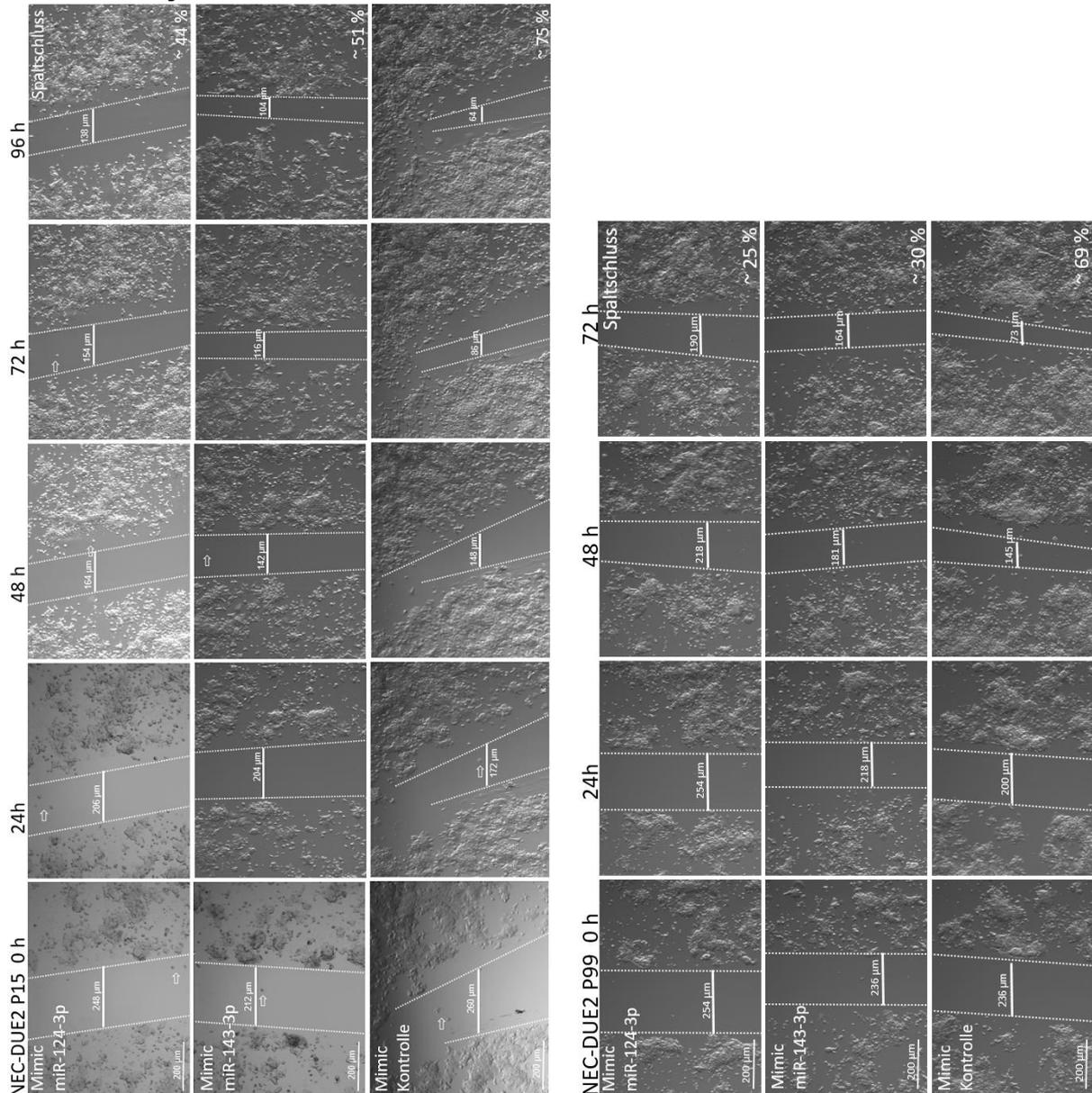
Auffällig waren in diesem Zusammenhang, wie in Abb. 30, dass einzelne Transfektionsversuche mit Mimics starken Expressionsunterschiede ausschließlich in positiver Richtung zeigten. D. h., dass der microRNA-Gehalt nicht in jedem Versuchsdurchlauf in einem vergleichbaren Maß zur Mimic-Kontrolle anstieg. Dies ist der Grund für die hohen Standardabweichungen bei einem statistischen Vergleich der Datenreihen. Diese vergleichsweise starke Hochregulation stellt eine Problematik dar, die in der Diskussion (s. 5.6.1) näher beleuchtet werden soll.

Die Abb. 32 belegt, dass in den hier untersuchten Fällen die verwendeten Mimics auch noch 96h nach Beendigung der Transfektion eine messbare Hochregulation von miR-143-3p und miR-124-3p erreichten. Theoretisch konnten die microRNAs bis Ende des Versuchsdurchlaufs Effekte in allen hier dargestellten Messungen verursachen.

Durch den nachfolgenden Wund-Assay wurde überprüft, ob die Mimic-Behandlung funktionell einen Effekt auf die Migrationsfähigkeit der NEC erzielte. Die Messung des Spaltschlusses in Prozent ermöglichte eine einheitliche Analyse der Ergebnisse, da es auch abweichend große Spalten vergleichbar machte.

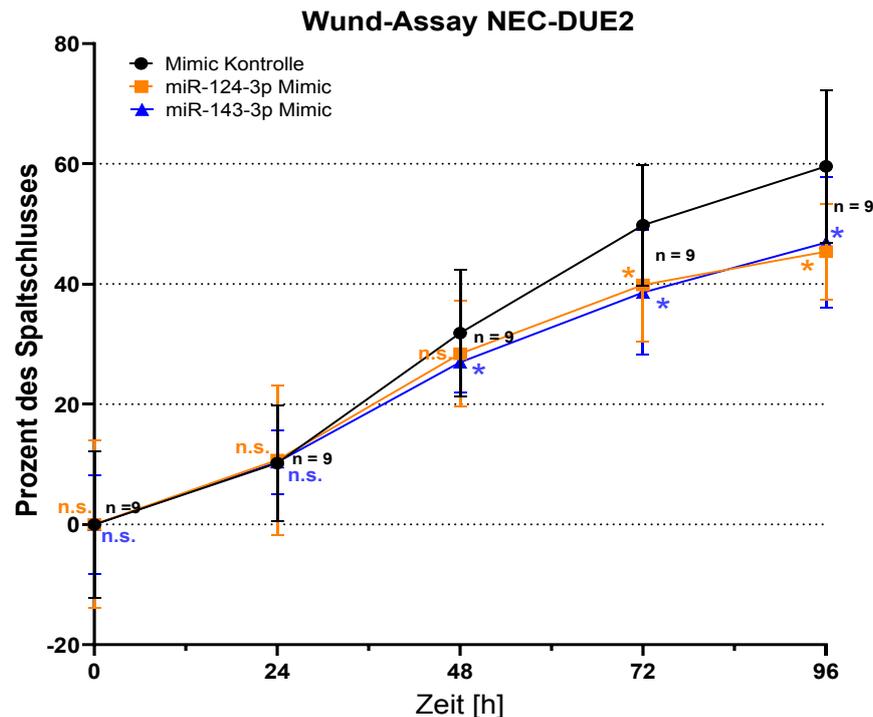
Der Versuch wurde dreimal mit der NEC-DUE1 durchgeführt. Aufgrund ihres Wachstumsverhaltens erwies sie sich aber als ungeeignet für den Wund-Assay. Die Zellen ließen sich zwar leichter vereinzeln und besser transfizieren als die NEC-DUE2, wuchsen aber nicht flächig und konnten sich während des Versuchsdurchlaufs durch Störungen (Transport) leicht ablösen (s. 3.3.8). Hierdurch konnten passiv ganze Zelltrauben in den Kratzer geschwemmt werden, wodurch die Beurteilung des eigentlichen Wachstums erschwert wurde. Die NEC-DUE2-Zelllinie wuchs flächiger und adhärenter, weshalb der Versuch mit dieser Zelllinie durchgeführt wurde.

## Wund-Assay NEC-DUE2



**Abb. 33 Mikroskopische Auswertung des Wund-Assays der NEC-DUE2.** Beurteilung des Einflusses der microRNAs-124-3p und 143-3p auf die Migrationsfähigkeit. Die Zellen wurden jeweils mit den zugehörigen Mimics behandelt und mit der Mimic-Kontrolle verglichen. Berechnet wurde der Spaltschluss, indem 0 h (Startpunkt der Messung) jeweils gleich 100 % gesetzt wurde. Hierbei handelt es sich um den Beginn der Messung. Der Weiße Pfeil markiert Zellen, die im Versuchsdurchlauf wieder verschwunden sind. Die Bilder wurden mit dem 10er Objektiv aufgenommen. Die Messungen für den Spaltschluss erfolgten an den immer gleichen Messpunkten zu den jeweiligen angegebenen Messzeiten. Dargestellt sind zwei Durchläufe mit zwei verschiedenen Passagen P. Die Dokumentation der P99 war einen Tag kürzer, als die der P15. Bei den Abbildungen handelt es sich um die auffälligsten Beispiele des Versuchsdurchlaufs und nicht um das durchschnittliche Ergebnis.

Die Messungen erfolgten an 9 verschiedenen Messpunkten in einem Zeitraum von 96h. Die Überprüfung der Datenreihen mittels Q-Q-Plot zeigte nicht in allen Fällen eine Normalverteilung. Ein Box-Plot mit allen Daten ergab keine Ausreißer (s. 3.4). Die weiterführende statistische Analyse und Visualisierung der Daten erfolgten mittels Punktdiagramm und Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests (s. Abb. 34). Die einzelnen Statistiken sind der Tab. 18 zu entnehmen.



**Abb. 34 Auswertung des Wund-Assays von NEC-DUE2 nach Behandlung mit miR-143-3p und miR-124-3p Mimics.** Gemessen wurden  $n = 9$  Messpunkte für jeden Zeitpunkt an jeweils identischen Positionen für die ungepaarte Mann-Whitney-U-Statistik. Der Beginn der Messung entspricht der Zeit  $h = 0$  auf der X-Achse (Startpunkt der Messung Abb. 33). Gemessen wurde der Spaltschluss in Prozent mit Zeit  $h = 0$  als 100%ige Öffnung. Die Behandlung mit miR-124-3p und 143-3p Mimics wurde mit der Mimic-Kontrolle verglichen, die für beide Mimics identisch war. Die Kontrolle zeigt das von den microRNAs unbeeinflusste Migrationsverhalten der Zellen. Das Punkt-Diagramm zeigt die Mittelwerte der Datenreihen mit der zugehörigen Standardabweichung. Die p-Werte wurden wie folgt dargestellt:  $*$   $\leq 0,05$  und n.s.  $> 0,05$  = nicht signifikant.

**Tab. 18 Statistiken zum Wund-Assay**

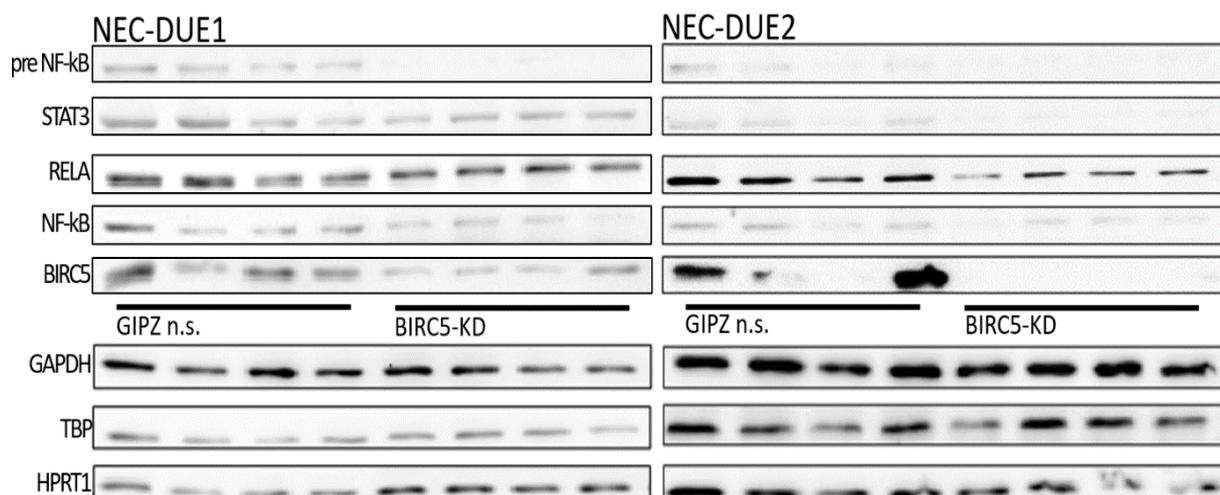
NEC-DUE2	MW			SD			Mdn			IQA			t-Test		U-Test		SP
	n1	n2	n3	n1	n2	n3	n1	n2	n3	n1	n2	n3	n1/n2	n1/n3	n1/n2	n1/n3	
0h	0	0	0	12	14	8	1	7	3	18	23	15	> 0,9999	> 0,9999	0,983*	0,648*	9/9/9
24h	10	11	10	10	13	5	12	14	10	15	23	8	0,9256	0,9635	0,5318*	0,32*	9/9/9
48h	32	28	27	11	9	5	34	30	25	15	10	8	0,4661	0,2295	0,2089*	0,0242*	9/9/9
72h	50	40	39	10	9	10	49	40	40	18	17	19	0,0463	0,0338	0,0377*	0,0165*	9/9/9
96h	60	45	47	13	8	11	56	47	48	18	17	15	0,0119	0,0367	0,01*	0,0172*	9/9/9

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des U-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = Kontrolle, n2 = miR-124-3p und n3 = miR-143-3p Mimic.

Die Beobachtungen im Rahmen des Wund-Assays sprachen dafür, dass die miR-124-3p und 143-3p einen Einfluss auf die Migration der NEC-DUE2-Zellen hatten. Die Migrationsfähigkeit war hierbei um ca. 20 % bei beiden microRNAs gegenüber der Kontrolle reduziert (s. Abb. 34). Es wurde ein annähernd identischer Effekt erzielt, obwohl nach Abb. 32 bis zum Endpunkt des Versuchs mehr miR-143-3p-Moleküle in den Zellen hätten vorhanden sein müssen als miR-124-3p. Die Überprüfung der von den Mimics verursachten microRNA-Hochregulation (s. Abb. 32, Tab. 18) ergab im Durchschnitt eine 40-mal höhere miR-143-3p-Expression.

### 4.5.3 Bestätigung von microRNA-124-3p Zielgenen

MicroRNAs können eine Vielzahl an Zielgenen regulieren, insbesondere im Fall der miR-124-3p (s. Tab. 5). Bekannt sind nach Datenbankrecherche u. a. *RELA* (RELA Proto-Onkogen, NF- $\kappa$ B Untereinheit), *NF- $\kappa$ B1* (*Nuclear Factor Kappa B* Untereinheit 1, P50) und *STAT3* (*Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*). Die entsprechenden Proteine wurden vielfach im Rahmen der Krebsforschung untersucht (s. 1.3.3). Die Proteinexpression der Zielgene wurde im Western Blot zunächst in unbehandelten NEC-DUE BIRC5-KD im Vergleich zur GIPZ n.s. Kontrollen überprüft. Erwartungsgemäß sollte im Vergleich nach BIRC5-KD die miR-124-3p hochreguliert und die mRNA-Expression der Zielgene herunterreguliert werden. Dieser Prozess sollte sich bis auf Proteinebene auswirken, um für die Zelle relevante Effekte zu erzeugen. Zur Normalisierung wurden GAPDH, HPRT1 (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1) und TBP (TATA-Bindeprotein) verwendet.



**Abb. 35 Western Blot Ergebnis potentieller Zielgene der miR-124-3p.** Überprüft wurden die Proteine der Zielgene STAT3, RELA (P65) und NF- $\kappa$ B (P50) in den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 GIPZ n.s. im Vergleich zum BIRC5-KD. Die Vorläuferform von NF- $\kappa$ B ist pre NF- $\kappa$ B. Zur Beurteilung vergleichbarer Proteinmengen wurden die Normalisierungproteine GAPDH, TBP und HPRT1 verwendet.

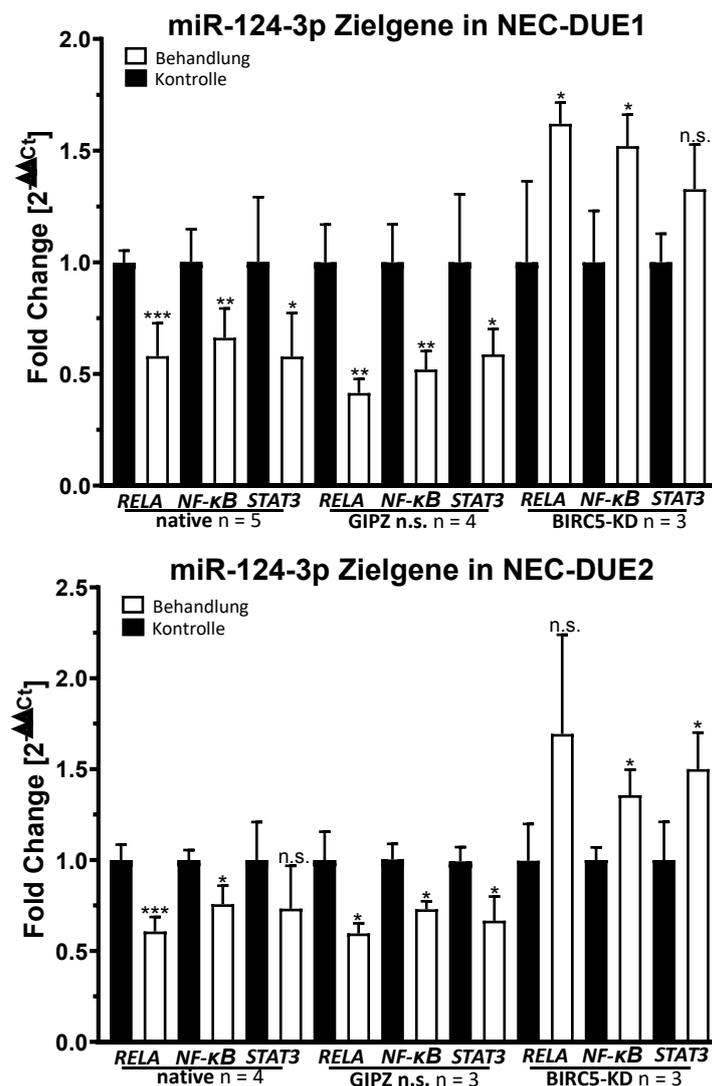
Für pre NF- $\kappa$ B1 ist in beiden Zelllinien, NEC-DUE1 und NEC-DUE2, eine Verringerung der Proteinexpression im BIRC5-KD im Vergleich zur GIPZ n.s. Kontrolle im Western Blot erkennbar. Bei NEC-DUE2 ist ebenfalls eine verringerte Expression von STAT3 und RELA gut erkennbar. Bemerkenswert ist, dass bei NEC-DUE1 sich auf Höhe von RELA eine Doppelbande befindet, die beim BIRC5-KD fehlt (s. Abb. 35).

### 4.5.4 Mimic- und Inhibitorversuche zur Validierung der Zielgene

Die vorausgegangenen Ergebnisse zeigen z. T. einen Zusammenhang zwischen BIRC5-Regulation und der Regulation bestimmter Proteine. Es fehlt noch der Nachweis, dass die miR-124-3p der regulierende Faktor dieser Zielgene war. Hierbei sollte

der Einfluss nicht nur auf die mRNA-Ebene beschränkt sein, sondern sich bis auf die Proteinebene ausgewirkt haben. Hierzu wurden weitere Mimic- und Inhibitorversuche durchgeführt. Eine Überprüfung der Deregulation der Zielgene erfolgte auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR und Proteinebene mittels Western Blot.

Q-Q-Plots zur Überprüfung auf Normalverteilung und Box-Plots zur Identifizierung von Ausreißern befürworteten eine weiterführende statistische Analyse mittels ungepaarten t-Tests (s. 3.4). Die Ergebnisse sind der folgenden Abb. 36 und die Statistiken sind der Tabelle 19 zu entnehmen.



**Abb. 36 qRT-PCR-Analyse der Zielgene der miR-124-3p.** Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression der Zielgene *RELA*, *NF-kB* und *STAT3* nach Behandlung der Zellen mit Mimics oder Inhibitoren der miR-124-3p analysiert. Die nativen und GIPZ n.s. NEC-DUE-Zellen wurden mit Mimics behandelt, da in diesen Zellen im Vergleich zum KD die microRNA herunterreguliert war. Für den BIRC5-KD wurde ein Inhibitor verwendet, da nach BIRC5-KD diese microRNA hochreguliert wurde.

Die Normalisierung erfolgte für jedes Zielgen über die drei Normalisierungsgene GAPDH, TBP und HPRT1. Aus den resultierenden Fold Changes, berechnet zwischen Kontrolle (Mimic-/Inhibitorkontrolle) und der zugehörigen Behandlung (Mimic/Inhibitor), wurde der Mittelwert berechnet. Analysiert wurden n verschiedene Versuchsdurchläufe mit unterschiedlichen Passagen und in die ungepaarte t-Test-Statistik miteinbezogen. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der Datenreihen mit der zugehörigen Standardabweichung. Die p-Werte wurden wie folgt dargestellt: n.s. > 0,05 = nicht signifikant, \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,005 und \*\*\* ≤ 0,0005.

Tab. 19 Statistiken zu EMT nach Mimic/Inhibitor-Behandlung

NEC-DUE1		MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
native	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2				
RELA	1	0,58	0,05	0,15	1,02	0,65	0,11	0,23	0,0003*	0,0079	5/5	
NF- $\kappa$ B	1	0,66	0,15	0,13	1,01	0,67	0,24	0,25	0,0047*	0,0079	5/5	
STAT3	1	0,58	0,29	0,20	0,88	0,6	0,56	0,31	0,0264*	0,0238	5/5	
GIPZ n.s.												
RELA	1	0,42	0,17	0,06	1	0,42	0,31	0,12	0,0006*	0,0286	4/4	
NF- $\kappa$ B	1	0,52	0,17	0,08	1,03	0,55	0,33	0,15	0,0023*	0,0286	4/4	
STAT3	1	0,59	0,3	0,11	0,91	0,63	0,55	0,19	0,0443*	0,0286	4/4	
BIRC5-KD												
RELA	1	1,62	0,36	0,1	0,87	1,63	0,69	0,19	0,0458*	0,05 <sup>1</sup>	3/3	
NF- $\kappa$ B	1	1,52	0,23	0,14	1,08	1,54	0,44	0,28	0,0291*	0,05 <sup>1</sup>	3/3	
STAT3	1	1,33	0,13	0,2	1,03	1,34	0,25	0,4	0,0758*	0,05 <sup>1</sup>	3/3	
NEC-DUE2		MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
native	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2				
RELA	1	0,61	0,09	0,08	0,98	0,62	0,16	0,15	0,0005*	0,0286	4/4	
NF- $\kappa$ B	1	0,76	0,05	0,1	1	0,78	0,11	0,19	0,0058*	0,0286	4/4	
STAT3	1	0,73	0,21	0,24	1,03	0,79	0,4	0,44	0,141*	0,1143	4/4	
GIPZ n.s.												
RELA	1	0,6	0,16	0,06	1,08	0,6	0,28	0,11	0,0135*	0,05 <sup>1</sup>	3/3	
NF- $\kappa$ B	1	0,73	0,09	0,04	1,02	0,75	0,17	0,08	0,008*	0,05 <sup>1</sup>	3/3	
STAT3	1	0,67	0,08	0,13	0,97	0,7	0,15	0,26	0,0214*	0,05 <sup>1</sup>	3/3	
BIRC5-KD												
RELA	1	1,7	0,2	0,55	0,88	1,44	0,35	1	0,1069*	0,05 <sup>1</sup>	3/3	
NF- $\kappa$ B	1	1,36	0,07	0,14	1,03	1,35	0,13	0,28	0,0169*	0,05 <sup>1</sup>	3/3	
STAT3	1	1,5	0,21	0,2	0,91	1,59	0,39	0,37	0,0407*	0,05 <sup>1</sup>	3/3	

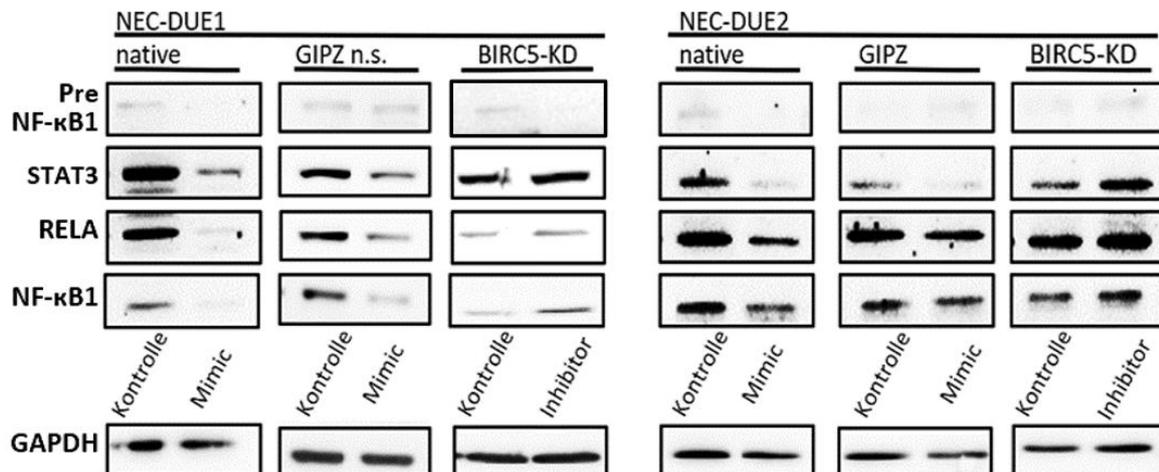
Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige und einseitige<sup>1</sup> (aufgrund der geringen Stichprobenzahl) Mann-Whitney-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = Kontrolle, n2 = Mimic/Inhibitor.

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen generell in beiden Zelllinien, sowohl den nativen als auch GIPZ n.s., dass die miR-124-3p Mimic die hier untersuchten Zielgene *RELA*, *NF- $\kappa$ B* und *STAT3* signifikant herunterregulierte. Dies entsprach der erwarteten Wirkung der endogenen microRNA. Einzige Ausnahme ist *STAT3* bei den nativen NEC-DUE2. *RELA* und *NF- $\kappa$ B* sind zwischen beiden nativen Zelllinien annähernd gleichwertig herunterreguliert. Bei GIPZ n.s. sind die Unterschiede in der Reduktion zwischen NEC-DUE1 und NEC-DUE2 *STAT3* betreffend gleichwertig, *RELA* und *NF- $\kappa$ B* betreffend in NEC-DUE1 jeweils um das 1,4-Fache stärker herunterreguliert.

Die Inhibition der endogenen microRNA durch die ansprechenden miR-124-3p Inhibitor-Konstrukte in den BIRC5-KD Zellen bewirkte die erwartete Heraufregulation der Zielgene, mit Ausnahme von *STAT3* in den NEC-DUE1 BIRC5-KD und *RELA* in den NEC-DUE2 BIRC5-KD.

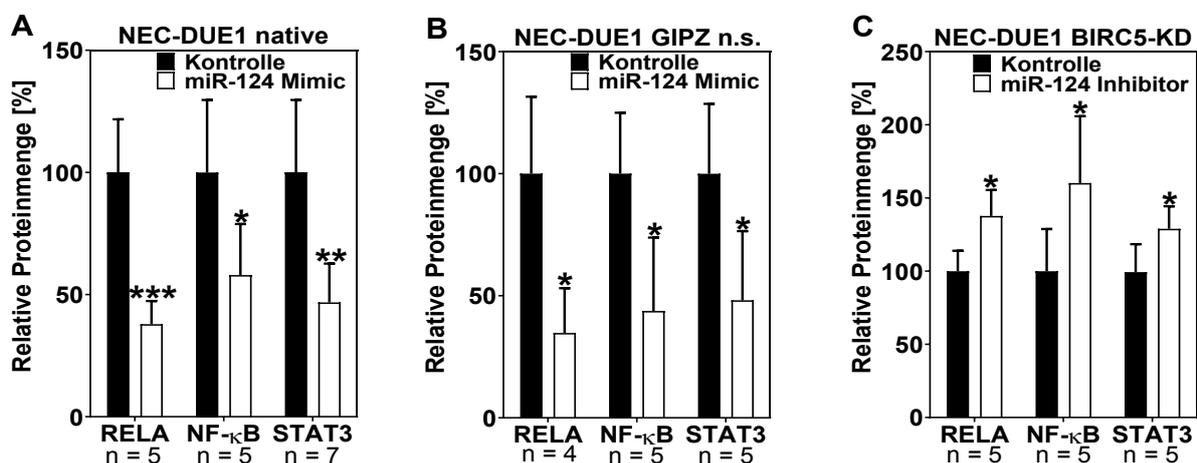
Zusammenfassend regulierte die miR-124-3p auf ihrer funktionellen Ebene die mRNAs von *RELA*, *NF- $\kappa$ B* und *STAT3*.

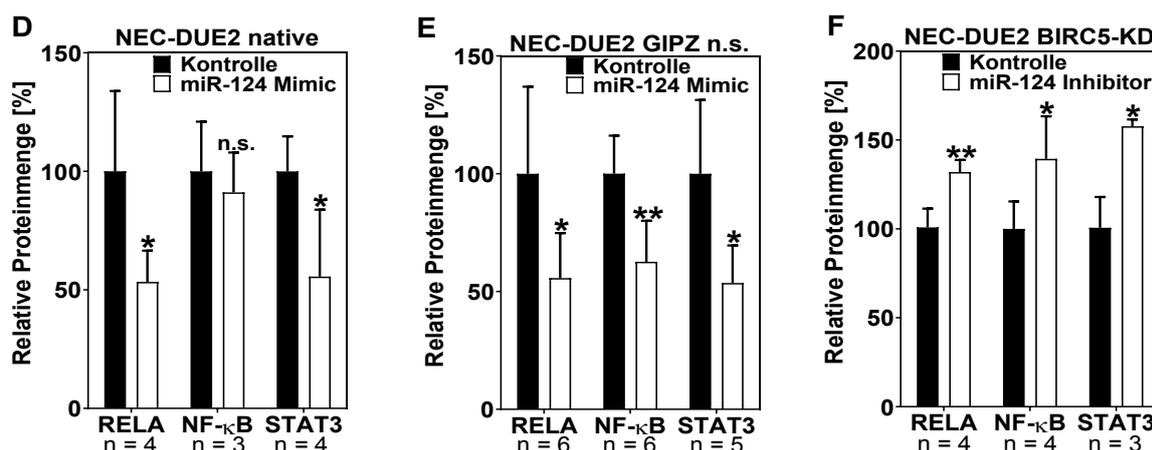
Anschließend sollte überprüft werden, ob sich diese Regulation bis auf die Proteinebene auswirkt. Hierzu wurden NEC-DUE1 und NEC-DUE2 mit den entsprechenden Mimics und Inhibitoren behandelt. Es folgten die Proteinisolierung und die Analyse der Proben mittels Western Blotting.



**Abb. 37** Western Blot Ergebnis nach miR-124-3p Mimic- und Inhibitorbehandlung von NEC-DUE1 und NEC-DUE2. Überprüft wurden Proteine potentieller Zielgene der miR-124-3p. Als Normalisierungsprotein wurde GAPDH verwendet. Die nativen und GIPZ n.s. Zellen wurden mit den Mimics aufgrund ihrer miR-124-3p-Herunterregulation und die BIRC5-KD Zellen wegen ihrer Hochregulation mit dem Inhibitor behandelt (s. Abb. 19).

Die densitometrische Auswertung von Western Blot Banden ermöglicht eine Umrechnung der Werte in eine prozentuale, relative Proteinmenge, die verschiedene Versuchsdurchläufe vergleichbar macht. Die Überprüfung auf Normalverteilung und das Fehlen von Ausreißern befürworteten eine statistische Analyse mittels ungepaarten t-Tests (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in Abb. 38 und die Statistiken in Tab. 20 zusammengefasst. Auf die Auswertung der Vorläuferform pre-NF- $\kappa$ B wurde verzichtet, da das entscheidende funktionelle Endprodukt NF- $\kappa$ B ist.





**Abb. 38** Densitometrie der Western Blot Ergebnisse der NEC-DUE1 miR-124-3p Mimic- (A und B) und Inhibitorbehandlung (C) und NEC-DUE2 Mimic- (D und E) und Inhibitorbehandlung (F). Überprüft wurden potentielle Zielgene der miR-124-3p nach Mimic- und Inhibitor-Behandlung der NEC-DUE-Zelllinien auf Proteinebene mittels Western Blotting. Als Kontrolle wurden die Zellen mit der zugehörigen Mimic- bzw. Inhibitor-Kontrolle transfiziert. Die Behandlung wurde mit mehreren Passagen als technische Replikate n der angegebenen Zelllinien durchgeführt. Als Normalisierungsprotein wurde GAPDH verwendet (s. Abb. 37). Die gemessene Dichte der Western Blot Banden wurde als jeweilige relative Proteinmenge [%] im Vergleich zur Kontrolle (100 %) umgerechnet und ist eine relative Mengenangabe. Die statistische Auswertung der Proben erfolgte mit dem ungepaarten t-Test. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der Datenreihen mit der zugehörigen Standardabweichung. Die p-Werte wurden wie folgt definiert: \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,005$ , \*\*\*  $\leq 0,0005$  und n.s.  $> 0,05$  = nicht signifikant.

**Tab. 20** Statistiken zu EMT nach Mimic/Inhibitor-Behandlung

NEC-DUE1	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
native											
RELA	100	37,86	21,75	9,5	110,9	41,79	33,65	14,65	0,0004*	0,0079	5/5
NF-κB	100	58	29,67	20,86	98,45	65,27	57,82	33,44	0,0321*	0,0317	5/5
STAT3	100	46,8	29,64	15,89	103,1	46,72	46,06	19,16	0,0013*	0,0006	7/7
GIPZ n.s.											
RELA	100	34,79	31,52	18,33	94,76	39,03	58,6	34,04	0,0117*	0,0286	4/4
NF-κB	100	43,78	24,97	30,05	87,33	47,78	46,43	57,89	0,0123*	0,0079	5/5
STAT3	100	48,13	28,62	28,34	99,06	53,52	46,15	46,07	0,0205*	0,0159	5/5
BIRC5-KD											
RELA	100	128,3	18,98	16,51	96,47	131,2	35,68	31,1	0,0362*	0,0556	5/5
NF-κB	100	160,2	28,74	45,67	96,19	155,5	49,74	83,8	0,0372*	0,0317	5/5
STAT3	100	129	19,06	15,36	100,2	124	33,54	27,1	0,0268*	0,0317	5/5
NEC-DUE2											
native											
RELA	100	53,37	33,89	13,14	87,54	54,36	58,92	24,9	0,0426*	0,0286	4/4
NF-κB	100	91,15	20,97	16,79	91,44	82,39	39,23	29,95	0,5986*	0,4	3/3
STAT3	100	55,59	14,79	28,24	102,6	46,42	27,83	50,7	0,0317*	0,0571	4/4
GIPZ n.s.											
RELA	100	55,68	36,93	19,15	88,98	58,70	69,62	28,75	0,0261*	0,0152	6/6
NF-κB	100	62,61	16,17	17,41	96,8	60,8	22,98	34,32	0,0032*	0,0043	6/6
STAT3	100	53,6	31,31	15,95	93,04	49,61	53,12	29,52	0,0184*	0,0159	5/5
BIRC5-KD											
RELA	100	132	10,57	6,8	102,8	130,2	19,54	12,5	0,0026*	0,0286	4/4
NF-κB	100	139,4	15,42	23,98	99,67	138,3	29,86	46,3	0,0328*	0,0571	4/4
STAT3	100	157,7	17,32	3,81	106	159,9	33,31	6,7	0,0051*	0,1	3/3

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitiger Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = Kontrolle, n2 = Mimic/Inhibitor.

Es zeigte sich nach Behandlung der NEC-Zellen mit miR-124-3p Mimics eine allgemeine Herabregulation der relativen Proteinexpression der vermuteten Zielgene (s. Abb. 38). Die NEC-DUE1 betreffend wurde RELA sowohl in den nativen Zellen als auch den GIPZ n.s. am stärksten im Vergleich zur Kontrolle reduziert, und zwar auf eine Expression unter 40 %. STAT3 wurde in beiden auf knapp unter 50 % reduziert (s. Abb. 38 A und B, Tab. 20). Die Expression von NF- $\kappa$ B lag nur bei GIPZ n.s. mit ca. 44 % unterhalb von 50 % (s. Abb. 38 B). Andersherum zeigte sich nach Gabe des Inhibitors eine Heraufregulation der drei Proteine nach Western Blotting, die für NF- $\kappa$ B mit 160 % den höchsten Wert erreichte (s. Abb. 38 C).

Im Vergleich zu den nativen und GIPZ n.s. NEC-DUE1 war die relative Proteinmenge bei den entsprechenden NEC-DUE2 in geringerem Maße reduziert worden. Bei den nativen und GIPZ n.s. der NEC-DUE2 lag die relative Proteinexpression von RELA und STAT3 zwischen ca. 53 % und 56 % (s. Abb. 38 D und E, Tab. 20). NF- $\kappa$ B wurde bei den nativen Zellen nicht reguliert und erreichte bei GIPZ n.s. 63 % im Vergleich zur Kontrolle. Im Fall von NEC-DUE2 BIRC5-KD erreichte STAT3 mit 158 % die stärkste Hochregulation (s. Abb. 38 F).

Zusammenfassend kann durch die Ergebnisse beider Zelllinien festgestellt werden, dass miR-124-3p generell die mRNAs der hier untersuchten Zielgene reguliert und dies auch Auswirkungen auf die Proteinebene hat.

Ausstehend bleibt noch die Überprüfung, inwieweit dies Einfluss auf die Vitalität der Zellen in Verbindung mit einer möglichen Behandlung hat. Denkbar wären hierzu Kombinationsversuche mit microRNA-Mimics und YM155.

#### **4.6 Analyse der BIRC5-vermittelten microRNA-Regulation**

Die vorausgegangenen Versuche liefern bisher wichtige Hinweise, dass die BIRC5-Expression und die Regulation bestimmter microRNAs zusammenhängen und Einfluss auf relevante tumorigene Gene haben.

Wie könnte BIRC5 den beobachteten Effekt erreichen?

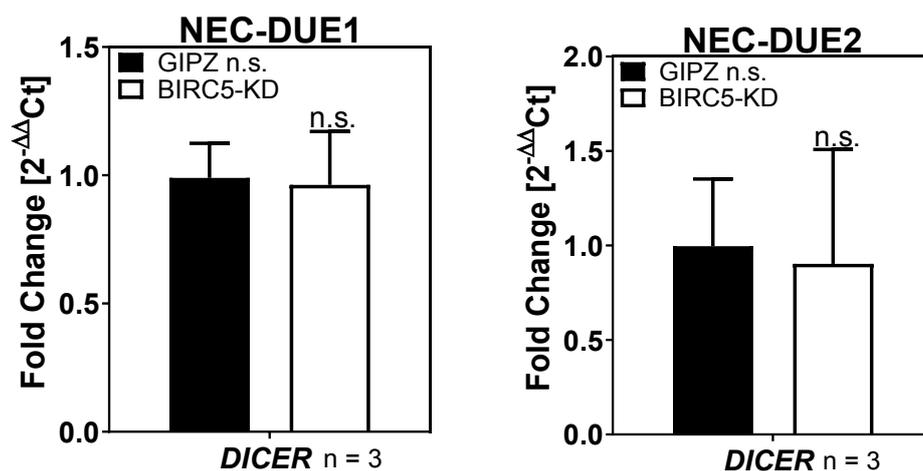
Einen ersten Erklärungsansatz lieferte die Gruppe um Andersson et al. (2017). Die Gruppe untersuchte mononukleäre Leukozyten von 144 Patienten mit rheumatoider Arthritis. Patienten mit erhöhter Expression aller drei BIRC5-Isoformen, WT-BIRC5, Survivin-2B und Survivin- $\Delta$ Ex3 (s. 1.3.2), wurden mit einer globalen Reduktion der microRNA-Expression in Verbindung gebracht. Diese Beobachtung wurde mittels YM155-Behandlung (10 nM über 1 und 3 Tage) überprüft. Die so induzierte BIRC5-Inhibition führte zu einer globalen Hochregulation von microRNAs. Nachfolgend

überprüfte die Gruppe mittels qRT-PCR, ob eine Änderung der BIRC5-Expression Proteine beeinflusst, die an der microRNA-Prozessierung beteiligt sind. Hierzu gehören DICER, DGCR8 und DROSHA und ADAR (*Adenosine Deaminase RNA Specific*) (s. 1.4). Das Ergebnis war, dass DICER nach BIRC5-Inhibition um das 5-Fache hochreguliert wurde. Die Funktion von DICER liegt in der generellen pre-microRNA-Prozessierung im Zytoplasma, was zu der von Andersson et al. (2017) festgestellten globalen Hochregulation von microRNAs nach BIRC5-Inhibition durch YM155 passte. Die anschließende Chromatin-Immunpräzipitations-Analyse sollte zeigen, dass BIRC5 die Promoterregion von DICER bindet und somit als Transkriptionsfaktor (TF) fungiert.

#### 4.6.1 DICER-Versuch

Die Veränderungen in der microRNA-Expression wurden in dieser Arbeit ebenfalls über eine Reduktion von BIRC5 durch den lentiviral induzierten KD beobachtet. Aus diesem Grund wird in den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 die Genaktivität von *DICER* mittels qRT-PCR nach BIRC5-KD überprüft. Sollte BIRC5 als TF *DICER* regulieren, sollte die verringerte BIRC5-Expression einen Einfluss zeigen.

Q-Q-Plots zur Überprüfung auf Normalverteilung und Box-Plots zur Identifizierung von Ausreißern befürworteten eine weiterführende statistische Analyse mittels ungepaarten t-Tests (s. 3.4). Die Ergebnisse sind der Abb. 39 und Tab. 21 zu entnehmen.



**Abb. 39** qRT-PCR-Analyse von *DICER* nach BIRC5-KD in NEC-DUE1 und NEC-DUE2. Verwendet wurden die Proben, die zur Array-Analyse geschickt wurden (s. Abb. 13). Der Fold Change wurde berechnet, indem der Mittelwert aller GIPZ der jeweiligen Zelllinie gleich 1 gesetzt wurde. Die Normalisierung erfolgte mit den Normalisierungsgenen *HPRT1* und *TBP*, aus denen der Mittelwert zur Berechnung des finalen Fold Changes verwendet wurde. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der Datenreihen mit der zugehörigen Standardabweichung. Angewendet wurde der ungepaarte t-Test. Nicht signifikante Ergebnisse = n.s. > 0,05.

**Tab. 21 Statistiken zur Regulation von *DICER***

<i>DICER</i>	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
NEC-DUE1	1	0,96	0,14	0,21	0,98	1	0,27	0,41	0,8574*	> 0,9999	3/3
NEC-DUE2	1	0,9	0,36	0,6	0,98	0,75	0,71	1,18	0,829*	> 0,9999	3/3

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Überprüfung auf Normalverteilung befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = GIPZ n.s., n2 = BIRC5-KD.

Die qRT-PCR zeigte keine Hochregulation von *DICER* nach BIRC5-KD, obwohl im Fall von NEC-DUE1 die gleichen Proben verwendet wurden, die eine signifikante Dereglulation von microRNAs erreichten (s. 4.2.4).

Es musste also andere direkte oder indirekte Interaktionspartner von BIRC5 geben haben, welche die Synthese der microRNAs beeinflussen können.

#### 4.7 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Mögliche BIRC5-Bindungspartner können mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) und anschließender Proteomanalyse im Massenspektrometer des BMFZ (Biologisch Medizinisches Forschungszentrum Düsseldorf) gefunden werden. Gesucht wurden Interaktionspartner von BIRC5, die an der Regulation der microRNA-Biosynthese beteiligt sein könnten oder diese beeinflussen.

Die Probengewinnung mittels IP wurde selbstständig mit der NEC-DUE1-Zelllinie durchgeführt, da diese die höchste BIRC5-Expression hatte (s. Abb. 17). Die Messung im Massenspektrometer erfolgte im BMFZ, durchgeführt von Dr. G. Poschmann.

##### 4.7.1 Endogene BIRC5-IP

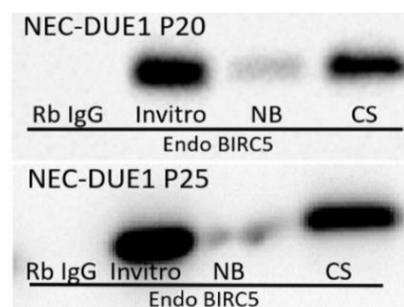
Bei der endogenen BIRC5-IP erfolgte keinerlei artifizielle Hochregulation des Proteins, da dies unerwünschte Störfaktoren und unnatürliche Proteininteraktionen hervorgerufen hätte. Im Rahmen der IP gab es zur Optimierung mehrere Möglichkeiten.

BIRC5 musste in höchstmöglicher Konzentration vorhanden sein, damit es in ausreichender Menge an den Antikörpern band und unspezifische Proteinbindungen diese nicht überlagerten. Da BIRC5 vom Zellzyklus beeinflusst wird, mussten die Zellen proliferativ sein und sich nicht im Wachstum inhibieren.

Die Spezifität des für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörpers (AK) ist entscheidend, weshalb sowohl mono- als auch polyklonale Antikörper überprüft wurden. Die verwendeten monoklonalen Antikörper banden in einem mittleren Abschnitt von BIRC5 (Cystein 60 des humanen WT-BIRC5). Der C- und N-Terminus von BIRC5

waren frei für Interaktionen mit potentiellen Bindungspartnern (s. 3.3.7), die schließlich co-präzipitiert wurden. Der polyklonale Antikörper war gegen mehrere Epitope eines Proteins gerichtet. Änderungen des pH-Wertes des PBS-Waschpuffers sollten unspezifische Bindungen minimieren. Die Fraktionierung von Proteinlysaten ermöglichte die Anreicherung nukleärer Proteine oder von Membranproteinen gegenüber plasmatischen Proteinen.

Die Probenmessung im Rahmen der Massenspektrometrie erfolgte im BMFZ der HHU. Die Proben wurden dort auf ein Silbergel aufgetragen und von Verunreinigungen befreit. Im Silbergel sind Banden, die der Größe des BIRC5-Monomers entsprechen, auf Höhe von ~17 kDa zu finden. Die Fraktionierung der Proteinlysate lieferte im Vergleich zum Gesamtproteinlysate keine besseren Resultate (s. Anhang Abb. XIII). Für die massenspektrometrische Messung wurden Proben ausgewählt, die die deutlichste BIRC5-Bande zeigten.



**Abb. 40 Western Blots der BIRC5-Pärzipitation der Proben für die Massenspektrometrie.** Die Western Blots zeigen das Ergebnis der endogenen (Endo) BIRC5-IP von 2 NEC-DUE1 Passagen (P) und der drei verwendeten Antikörper. Die Antikörper von Invitrogen (Invitro) und Cell Signaling (CS) sind monoklonal und der von Novus Biologicals (NB) polyklonal. Bei der Rb IgG handelt es sich um die IgG-Kaninchen Kontrolle.

Die Massenspektrometrie (Tandem-Massenspektrometrie MS/MS) diente der Identifikation der in einer Probe enthaltenen Proteine anhand der Intensitätsspektren ihrer Peptidfragmente. Die Normalisierungsprozedur MaxLFQ (*generic Label-Free Quantification Technology*, Jürgen Cox et al. 2014) der gemessenen Intensitäten ermöglicht es, verschiedene Durchläufe direkt quantitativ miteinander zu vergleichen (zugänglich in der *MaxQuant Computational Proteomics Plattform*).

BIRC5 wurde in n = 8 IP-Durchläufen mit sowohl poly- als auch monoklonalen Antikörpern nachgewiesen (s. Anhang Abb. XIV). Der endogene BIRC5-Gehalt der Proben konnte nicht weiter erhöht werden. Es wurden nach IP auch Proteine mit höheren Intensitäten als BIRC5 gemessen. Zu diesen gehörten Histone, Tubuline, Myosine und Hitzeschockproteine und ATP-Synthase Untereinheiten, die in hohen Mengen in Zellen vorkommen. Proteine mit höheren Intensitäten können diese nicht nur durch

Bindung an BIRC5, sondern auch durch Bindung an andere Proteine und die Kaninchen IgGs des Antikörpers erreicht haben. Ein Abgleich der Ergebnisse mit der Negativ-Kaninchen IgG-Kontrolle identifizierte unspezifische Proteinbindungen. Proteine, die wiederum mit diesen unspezifischen Proteinen interagierten, würden in der IgG-Kontrolle ebenfalls Intensitäten liefern. Da BIRC5 nicht an die IgG-Kontrolle band (s. Abb. 40 und Anhang Abb. XIV), wurden diese Proteine aus der Analyse herausgenommen und als Bindungspartner ausgeschlossen. Schwache Kreuzreaktionen von Proteinen mit dem Kaninchen IgG könnten vernachlässigt werden, wenn die Intensitäten nach BIRC5-Bindung sichtbar höher ausfallen. Dies kann mittels Signifikanztest und entsprechenden Wiederholungen der Messungen überprüft werden. Hierzu standen aber noch nicht genug Messungen zur Verfügung. Es wurde aber eine *Heatmap* mit den bisherigen Intensitätsdaten der massenspektrometrischen Messungen (LFQ normalisierte Intensitäten) erstellt. BIRC5 ist in dieser *Heatmap* das Protein mit dem höchsten normalisierten Intensitätswert, d.h. es wurde am stärksten gebunden. Einige Proteine wurden aufgrund einer möglichen Relevanz für diese Arbeit trotz Signalen in der IgG-Kontrolle mit in der *Heatmap* aufgeführt. Z.T. handelt es sich hierbei um bereits bekannte BIRC5-Bindungspartner, die zum Vergleich mitgeführt wurden (s. 4.8.1). IP-Durchläufe des gleichen Antikörpers wurden gemittelt, wodurch sich 3 verschiedene IP-Ansätze je Antikörper ergeben haben (s. Anhang Abb. XIV). Das Farbschema der *Heatmap* wurde durch Anwendung des *Row Z-Score* (Reihen Z-Wert) erreicht. Er zeigt die Varianz der gemessenen Intensität für jedes gebundene Protein zwischen den einzelnen IP-Ansätzen und der IgG-Kontrolle. In den *Heatmaps* entspricht Grün einer starken Bindung und Gelb einer geringen Bindung im Rahmen der BIRC5-Co-IP.

#### 4.7.2 Massenspektrometrische Analyse

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie mit endogenem BIRC5 lieferten nicht die bekanntesten microRNA-regulierenden Proteine. Hierzu gehören RNA-Polymerase II, DROSHA, DGCR8, Exportin-5 und DICER (s. 1.4).

Bereits diskutierte BIRC5-Bindungspartner wie XIAP, DIABLO oder Aurorakinasen konnten ebenfalls nicht im Rahmen der Co-IP detektiert werden. Eine Erklärung ist u. a. in den Versuchsbedingungen zu finden. Die Zellen wurden im vitalen Arbeitsmodus geerntet. Sie waren weder apoptotisch, noch wurden sie in der Zellteilungshase synchronisiert. Generell werden Proteininteraktionen nachgewiesen, indem Bedingungen erzeugt werden, die für den vermuteten Bindungspartner auch relevant sind. Aus

diesem Grund wurden die Zellen unter den Bedingungen für die IP geerntet, wie sie auch für die initiale microRNA-Array-Analyse vorlagen (s. 4.2), und in der die signifikant deregulierten microRNAs gemessen wurden (in normal arbeitenden Zellen).

Erwartungsgemäß wurden in der Co-IP die Cyclin Dependent Kinase 1 CDK1 (Chandele et al. 2004, Fortugno et al. 2002), Proteine mit ATPase-Aktivität, dazu gehört das Hitzeschockprotein HSP90AA1 (*Heat Shock Protein 90kDa Alpha, Cytosolic, Class A Member 1*, Fortugno et al. 2003, Plescia et al. 2005) und Proteine mit GTPase-Aktivität, wie Tubulin TUBA1A und TUBA3E (Mita et al. 2008) und die RAN-GTPase (RAN, *Member RAS Oncogene Family*, Xia et al. 2008, Guvenc et al. 2013) identifiziert. Die Interaktion von BIRC5 mit GTPasen und ATPasen ist also bereits untersucht worden und lässt sich im Co-IP-Ergebnis wiedererkennen (s. Anhang Abb. XIV).

Die potentiellen BIRC5-Bindungspartner, die nicht an die IgG-Kontrolle gebunden haben, stellen die vielversprechendsten Kandidaten dar. Einige Bindungspartner zeigten eine schwache Bindung an IgG, sind aber bereits bekannt, wie RAN-GTPase und HSP90AA1. Mögliche neue Bindungspartner von Interesse benötigen eine Bestätigung in weiterführenden Analysen, wie zusätzliche IP-Durchläufe.

Dennoch ist auffällig, dass eine Vielzahl an ATP-bindenden Proteinen identifiziert wurde. Hierzu gehören die DEAD-Box Helikasen DDX24, DDX39A, DDX39B, DDX5, EIF4A3 (DDX48), wie erwähnt HSP90AA1 und MCM5 (*Minichromosome Maintenance Complex Component 5*).

Die Ergebnisse aus den IPs wurden zur besseren Bewertung der identifizierten Proteine bezüglich ihrer Funktion und Verbindung zu BIRC5 mit Daten aus unterschiedlichen Onlinedatenbanken abgeglichen.

**Tab. 22 Einordnung der Co-IP Proteine in Signalwege**

Homo sapiens - Signalwege	Proteine aus der BIRC5-IP
hsa04210 Apoptose (3)	BIRC5, TUBA1A, TUBA3E
hsa03040 Spliceosom (4)	DDX5, DDX39B, EIF4A3, HNRNPU
hsa05200 Signalwege in Krebs (2)	BIRC5, HSP90AA1
hsa03013 Transport Zellkern Zytoplasma (4)	DDX39B, EIF4A3, RAN, XPOT
hsa04110 Zellzyklus (2)	CDK1, MCM5
hsa03015 mRNA-Kontroll-Signalweg (3)	DDX39B, EIF4A3, TARDBP
Zellteilung (6)	BIRC5, CDK1, HNRNPU, RAN, TUBA1A, TUBA3E

Die Tab. 22 ordnet die Proteine aus der *Heatmap* (s. Anhang Abb. XIV) KEGG-Signalwegen zu. Nach bisherigem Kenntnisstand hat BIRC5 eine Rolle in Zellteilung und Apoptose (s.1.3.2).

**Tab. 23 Mögliche Bindungspartner aus Datenbanken**

Datenbank	Proteine
GPS-Prot, IMEx, BioGRID, UniProtKB, STRING	AURKB, AURKC, BECN1, <b>BIRC5</b> , <b>RAN</b> , XPO1
GPS-Prot, BioGRID, UniProtKB, STRING	CDCA8, DIABLO, INCENP, LAMTOR5
GPS-Prot, IMEx, UniProtKB, STRING	<b>CDK1</b>
GPS-Prot, BioGRID, STRING	AIP, BIRC2, BIRC3, CASP3, CASP7, CCDC102A, CDK2, CDK4, ELAVL1, EVI5, F2RL1, FBXL7, HBZ, HDAC6, <b>HSP90AA1</b> , KCNJ6, LAMTOR4, MDC1, MED22, MED29, MED8, PPP1CC, PRKDC, PYCARD, SSC5D, USF2, USP9X, XRCC6

Die Tab. 23 fasst die in den Datenbanken BioGRID 4.4, STRING 11.0, GPS-Prot 3.3.0, IMEx 1.4.11 und UniProtKB (Version 01.28.2021) aufgeführten BIRC5-Proteinbindungspartner zusammen. **Fett** gekennzeichnet sind Proteine, die auch in der BIRC5-IP gefunden wurden.

Die Onlinedatenbanken verwenden unterschiedliche Quellen wie Publikationen, Literatur und computergestützte Analysen.

Die Datenbank STRING 11.0 verwendet mehrere Quellen, um die Wahrscheinlichkeit von Proteininteraktionen vorauszusagen:

- 1) Vorkommen - Proteininteraktionen in anderen Spezies
- 2) Auftreten - Wahrscheinlichkeit, dass Proteine gleicher Funktion und Vorkommen im selben Signalweg gemeinsam exprimiert werden und ein ähnliches phylogenetisches Profil haben.
- 3) *Fusion-fission Events* - fusionierte Gene sind mit höherer Wahrscheinlichkeit funktionell verbunden.
- 4) (konservierte) Co-Expression von Genen
- 5) Informationen aus Publikationen
- 6) andere Datenbanken

UniProtKB (Version 01.28.2021) verwendet Daten aus der Literatur mit computergestützten Analysen von Proteinsequenzen der internationalen Nukleinsäure-Sequenz Datenbank Kollaboration - INSDC.

Die Tab. 23 stellt die Schnittmenge der BIRC5-Proteinbindungspartner aus unterschiedlichen Datenbanken zusammen und soll nochmal zusammenfassen, an welchen Prozessen BIRC5 beteiligt ist. Darunter sind bekannte Bindungspartner, die bereits hinlänglich in der Literatur bestätigt wurden (s. 1.3.1 und 1.3.2). Diese Informationen sollen lediglich bei der Einschätzung der eigenen Ergebnisse aus der Co-IP helfen. So wird nochmals bestätigt, dass BIRC5 in Prozessen der Zellteilung, Chromosomentrennung, G2/M-Transition, Ausbildung des Spindelapparats, negativer Regulation der Apoptose und der positiven Regulation der Proliferation beteiligt ist (s. 1.3.2). Ob jedes Protein aus Tab. 23 wirklich Bindungspartner von BIRC5 ist, muss erst im eigenen Versuchsmodell unter den relevanten Bedingungen (Apoptose, Hitzeschock, Zellteilung, s. o.) überprüft werden. Diese Prozesse wurden in den Zellen, die für die IP-Versuche verwendet wurden, aber nicht induziert. Nicht jede der aufgeführten Interaktionen ist also zu jedem Zeitpunkt oder unter allen Bedingungen messbar. Die wahrscheinlichsten Bindungspartner sind Proteine, die in der Mehrzahl der Datenbanken vorkommen (s. Tab. 23, 5-4 verschiedene Datenbanken). Allerdings gibt es hierbei auch oft eine Überschneidung der Quellen, aus denen die Daten stammen.

In den Datenbanken wurden auffällige BIRC5-Bindungspartner gefunden, die eine erste Verbindung zu der microRNA-Prozessierung (s. 1.4) zulassen. Dazu gehören die RAN-GTPase und HSP90AA1. Sowohl die RAN-GTPase als auch HSP90 sind allgemein am Transport von pre-microRNAs aus dem Zellkern in das Zytoplasma der Zelle und die Beladung des RISC-Komplexes beteiligt.

#### 4.7.3 Lokalisation der microRNA-Regulation

Die Regulation der microRNA-Biogenese ist vom Gen, über die Prozessierung im Zellkern, dem Export bis hin zur Integration in den RISC-Komplex im Zytoplasma möglich. Die Umwandlung der pri-microRNAs zur pre-microRNAs ist einer der initialen wichtigen Schritte der post-transkriptionellen microRNA-Biogenese im Zellkern (s. 1.4). Entscheidend dafür ist der Mikroprozessor. Er ist ein Komplex, der im Wesentlichen aus DROSHA und DGCR8 besteht und von Co-Faktoren, darunter RNA-Bindungsproteine (RBPs), unterstützt wird. Diese beeinflussen selektiv die microRNA-Prozessierung (Creugny et al. 2018).

Die Arbeit von Treiber et al. (2017) untersuchte im Fall der Regulation von microRNA-Subpopulationen 180 RNA-Bindungsproteine (RBPs). Darunter waren ATPasen, zu denen Helikasen wie die DEAD-Box (DDX) Proteinfamilie gehören. Sie spielen bei der microRNA-Prozessierung eine sehr selektive Rolle. Es wurden 5 DDX-Proteine, darunter DDX5, DDX39A, DDX39B, DDX24 und EIF4A3 (DDX48) in der Co-IP identifiziert (s. Anhang Abb. XIV). MCM5 ist ebenfalls eine Helikase.

Weitere RNA-assoziierte Proteine sind die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (HNRNPs) bzw. HNRNP-homologe Proteine, die auch mit dem Mikroprozessor interagieren. Es wurden PCBP2 (*Poly (RC) Binding Protein 2*), HNRNPU (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U*), TARDBP (*TAR DNA Binding Protein*) und KHSRP (*KH-Type Splicing Regulatory Protein*) in den IPs identifiziert. TARDBP und KHSRP sind auch als Transkriptionsfaktoren von microRNA-Genen interessant (s. Anhang Tab. IV) und gehören zu den bekannteren RBPs im Bereich der microRNA-Prozessierung (Treiber et al. 2017).

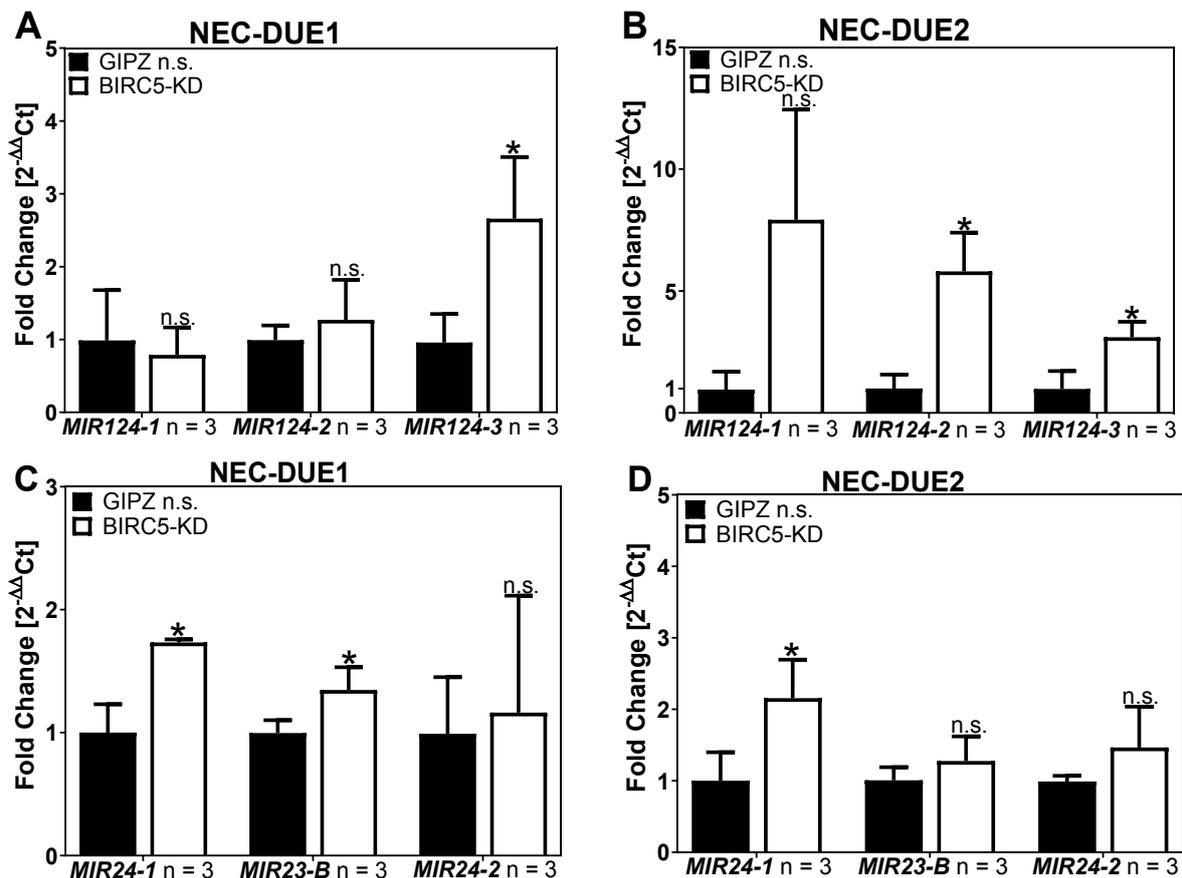
Nach Abgleich der Co-IP-Ergebnisse mit der Untersuchung von Treiber et al. (2017) wurden noch weiter übereinstimmende RBPs gefunden, die zu einer RBP-Gruppe gehören, die die gleichen microRNA-Subpopulationen reguliert. Diese entsprechen MARS (Methionyl-TRNA Synthetase1) und DARS (Aspartyl-TRNA Synthetase1) (s. Anhang Abb. XIV).

Die Vielzahl an RBPs, die in den IP-Ergebnissen gefunden wurden und mögliche BIRC5-Bindungspartner sein könnten, sprechen für einen selektiven Prozess der microRNA-Regulation im Zellkern. Diese Art der Regulation müsste bereits auf Ebene der pri-microRNA-Prozessierung mittels qRT-PCR nachweisbar sein.

#### 4.7.4 Pri-microRNA-Assays

Die pri-microRNA-Assays ermöglichen die Überprüfung der Lokalisation der BIRC5-vermittelten GIPZ-microRNA-Regulation im Zellkern mittels qRT-PCRs. Von der NEC-DUE1 wurden die gleichen Proben verwendet, die auch im microRNA-Array die starke Deregelung der microRNA-124-3p aufwiesen (s. Abb. 19).

Q-Q-Plots zur Überprüfung auf Normalverteilung und Box-Plots zur Identifizierung von Ausreißern befürworteten eine weiterführende statistische Analyse mittels ungepaar-tem t-Test. Die Ergebnisse sind in der Abb. 41 und der Tab. 24 zu entnehmen.



**Abb. 41** qRT-PCR-Analyse der pri-microRNAs von NEC-DUE-Zellen nach BIRC5-KD. Die Assays enthielten Primer für die 3 Gen-Loci der pri-miR-124: *MIR124-1* Chromosom 8p23.1, *MIR124-2* 8q12.3 und *MIR124-3* 20q13.33 (A bis B) und Assays für die 2 Gen-Loci der pri-miR-24: *MIR24-1* Chromosom 9q22.32, der pri-miR-23b: *MIR23B* beinhaltet (und *MIR27B* und *MIR3074*) und *MIR24-2* 19p13.12. Die Berechnung des Fold Changes erfolgte anhand des Mittelwertes der zugehörigen GIPZ n.s. Proben, die gleich 1 gesetzt wurden. Die Normalisierung erfolgte über HPRT1 und TBP. Nach Berechnung des jeweiligen Fold Changes wurde der Mittelwert gebildet. Für die Statistik wurde der ungepaarte t-Test mit n technischen Replikaten in Form verschiedener Versuchsdurchläufe mit unterschiedlichen Passen verwendet. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der Datenreihen mit der zugehörigen Standardabweichung. Die p-Werte wurden wie folgt definiert: \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,005$  und nicht signifikante Ergebnisse = n.s.  $> 0,05$ .

Tab. 24 Statistiken zur pri-microRNA

NEC-DUE1											
MIR124	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
MIR124-1	1	0,8	0,69	0,38	0,85	0,58	1,36	0,66	0,6831*	0,5	3/3
MIR124-2	1	1,3	0,2	0,55	1,1	1,21	0,35	1,09	0,4574*	0,35	3/3
MIR124-3	1	2,7	0,39	0,85	0,97	2,35	0,78	1,6	0,0342*	0,05	3/3
MIR24/MIR23B											
MIR24-1	1	1,7	0,23	0,03	1,08	1,73	0,44	0,05	0,0054*	0,05	3/3
MIR23B	1	1,35	0,11	0,19	1	1,4	0,21	0,36	0,0469*	0,05	3/3
MIR24-2	1	1,16	0,46	0,95	0,83	0,64	0,88	1,67	0,7903*	0,5	3/3
NEC-DUE2											
MIR124	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2			
MIR124-1	1	7,9	0,74	4,52	0,67	6,22	1,39	8,55	0,0579*	0,05	3/3
MIR124-2	1	5,8	0,57	1,59	1,19	4,93	1,1	2,79	0,0079*	0,05	3/3
MIR124-3	1	3,1	0,74	0,64	0,62	2,8	1,35	1,16	0,0196*	0,05	3/3
MIR24/MIR23B											
MIR24-1	1	2,16	0,4	0,54	0,81	2,02	0,73	1,05	0,0405*	0,05	3/3
MIR23B	1	1,28	0,18	0,35	1,07	1,18	0,35	0,67	0,2977*	0,2	3/3
MIR24-2	1	1,47	0,08	0,57	1,02	1,42	0,15	1,14	0,2257*	0,2	3/3

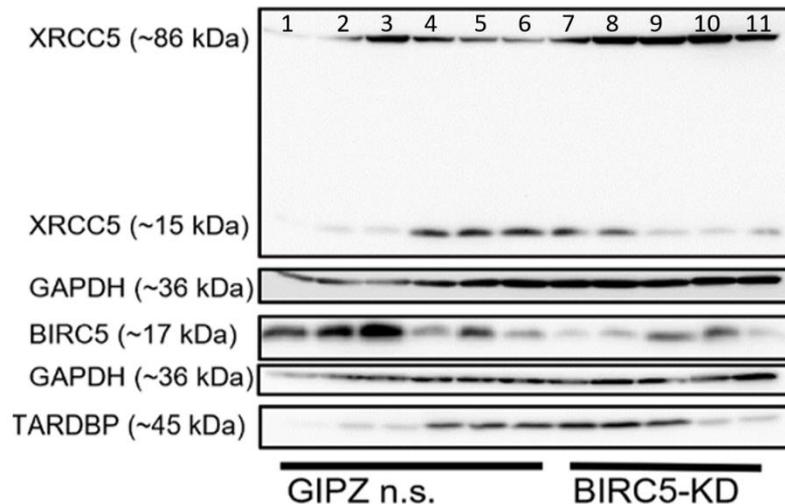
Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte einseitige (aufgrund der geringen Stichprobenzahl) Mann-Whitney-Test (U-Test). Die Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung und Ausreißer befürwortet die Anwendung des t-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = Kontrolle, n2 = Mimic/Inhibitor.

Die Ergebnisse der pri-microRNA-Assays für die pri-miR-124 zeigen eine signifikante Regulation des Gen-Locus *MIR124-3* bei beiden Zelllinien nach BIRC5-KD (s. Abb. 41 A und B). Bei NEC-DUE2 ist auch GEN-Locus *MIR124-2* vermehrt exprimiert worden. Die Ergebnisse der pri-microRNA-Assays für die pri-miR-24 zeigen eine signifikante Regulation des *MIR24-1* Gen-Locus bei beiden Zelllinien (s. Abb. 41 C und D). Die pri-miR-23b ist nur bei NEC-DUE1 signifikant (s. Abb. 41 C). Da miR-24-3p und 23b-3p in NEC-DUE1 BIRC5-KD signifikant dereguliert waren, entsprach die gleichgerichtete Regulation von *MIR24-1* und *MIR23B* den Erwartungen und für eine selektive Regulation im Zellkern.

#### 4.7.5 Vergleich der TFs in NEC-DUE1 GIPZ n.s. mit BIRC5-KD

Die pri-microRNA-Assays zeigten eine signifikante Regulation des Genlocus *MIR124-3* und *MIR24-1* in NEC-DUE1 und NEC-DUE2. Mögliche Transkriptionsfaktoren (TF) dieser microRNA-Gene könnten TARDBP und die Helikase XRCC5 (Ku80) sein (s. Anhang Tab. IV). Für eine erste Überprüfung wurde ein möglicher Einfluss von BIRC5 auf die Expression der Proteine mittels Western Blot und Gesamtproteinlysate der NEC-DUE1 herangezogen. Wenn BIRC5 diese TFs beeinflusst, könnte eine Veränderung des Proteingehalts der TFs nach BIRC5-Reduktion erkennbar sein. BIRC5 wird in den

verwendeten GIPZ n.s. und BIRC5-KD Proben jeweils nicht gleich stark exprimiert. Für eine erste Überprüfung mussten nur genügend Proben mit divergierender BIRC5-Expression für einen Vergleich vorhanden sein, damit Parallelen zu den Proteinexpressionsmustern der TFs gezogen werden konnten.



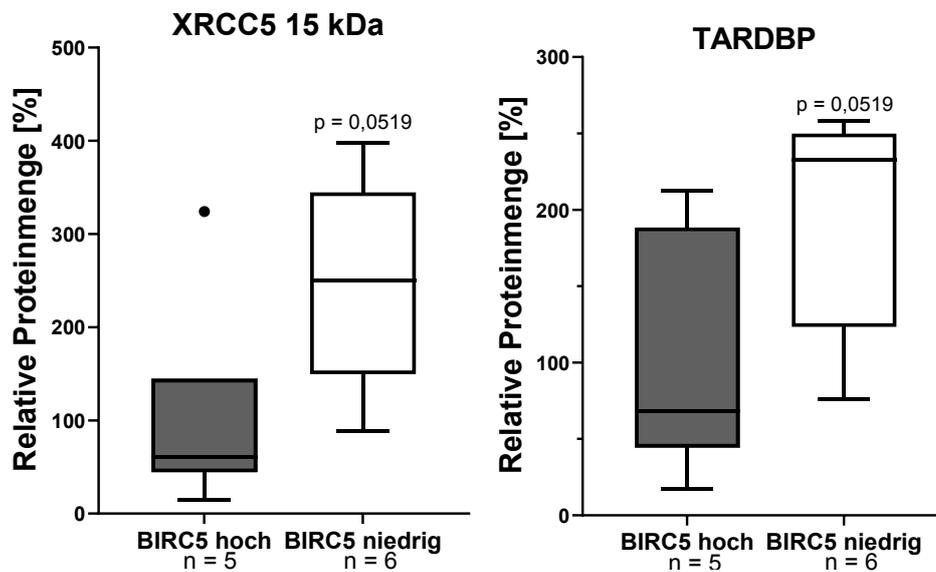
**Abb. 42 Western Blot Ergebnis zum Nachweis der XRCC5- und TARDBP-Expression in NEC-DUE1 GIPZ n.s. und BIRC5-KD Proben.** Zur Normalisierung wurde GAPDH eingesetzt. TARDBP und BIRC5 wurden auf einer zweiten Membran mit den gleichen Proben inkubiert.

Das Ergebnis von XRCC5 zeigt bei Proben mit hoher BIRC5-Expression stärkere Banden bei 86 kDa. In den ersten beiden Spalten des XRCC5 Blots ist der Proteingehalt geringer (s. GAPDH), die Bande für XRCC5 müsste also deutlicher sein. Bemerkenswert ist eine zweite XRCC5 Bande bei 15 kDa. Dieses Fragment schien vermehrt bei geringerem BIRC5-Gehalt aufzutreten und entspricht in Größe dem XRCC5 C-Terminus. Der verwendete Antikörper war gegen den C-Terminus gerichtet, weswegen das Spaltprodukt detektiert werden konnte. Ein Proteolyseversuch mit Trypsin konnte dieses Fragment erzeugen (Lehman et al. 2008). Die Bande 5 passt allerdings nicht zu den Beobachtungen.

Der Western Blot von TARDBP ergab keine eindeutige BIRC5-abhängige Regulation. Vier Banden mit schwacher BIRC5-Expression zeigen aber entsprechend deutliche TARDBP-Banden. Dies würde für eine erhöhte TARDBP-Expression nach BIRC5-Reduktion sprechen. Die Banden 5, 9 und 11 unterstützen dies jedoch nicht.

Da die GAPDH-Banden Schwankungen zeigen, wurden die XRCC5 15 kDa und TARDBP Bande densitometrisch ausgewertet. Hierzu wurden die Beladungsunterschiede mit GAPDH verrechnet. Der Mittelwert der Proben mit hohem BIRC5-Level (Banden 1 bis 3, 5, 9 und 10) wurde als 100 % Expression für XRCC5 15 kDa und TARDBP gesetzt. Q-Q-Plots zur Überprüfung auf Normalverteilung und Box-Plots zur Identifizierung von Ausreißern befürworteten eine weiterführende statistische Analyse

mittels ungepaartem Mann-Whitney-U-Test. Die Ergebnisse sind der Abb. 43 und der Tab. 25 zu entnehmen.



**Abb. 43 Densitometrie der XRCC5-Bande bei 15 kDa und TARDBP in NEC-DUE1.** Gegenübergestellt wurden Proben mit hoher (Banden 1 bis 3, 5, 9 und 10) gegenüber niedriger BIRC5-Expression (Banden 4, 6-8 und 11) im Western Blotting. Die dargestellten Box-Plots zeigen den Median mit zugehöriger Standardabweichung zur Visualisierung von Datenausreißern. Der Box-Plot (links) zeigt einen Ausreißer (Punkt). Alle Daten ergeben nach zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test einen p-Wert von 0,052. Wird dieser Ausreißer aus der Statistik herausgenommen, ist  $p = 0,008$ . Die Daten von TARDBP (rechts) haben keinen Ausreißer.

**Tab. 25 Statistiken zu TFs**

	MW		SD		Mdn		IQA		t-Test	zweiseitig U-Test	einseitig U-Test	SP n1/n2
	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2				
XRCC5 15 kDa	100	248	112	113	61	250	100	195	0,0585	0,0519*	0,026	5/6
TARDBP	100	196	78	75	68	233	144	127	0,0684	0,0519*	0,026	5/6

Gezeigt werden der parametrische ungepaarte zweiseitige Student 's t-Test (t-Test) und der nichtparametrische ungepaarte zweiseitige bzw. einseitige Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Die Normalverteilung spricht für den U-Tests (gekennzeichnet durch \*). Signifikante Ergebnisse sind grau markiert. Mdn = Median, SD = Standardabweichung, MW = arithmetisches Mittel, IQA = Interquartilabstand, SP = Stichprobenzahl, n1 = BIRC5 hoch, n2 = BIRC5 niedrig.

Die densitometrische Auswertung zeigt, dass mit sinkender BIRC5-Expression die Menge des Spaltproduktes von 15 kDa von XRCC5 zunahm (ohne Ausreißerwert  $p$ -Wert = 0,008, s. Abb. 43). Es könnte ein Zusammenhang zwischen der Degradation von XRCC5 und dem BIRC5-Gehalt bestanden haben. Ob dies tatsächlich zutrifft, müsste im nächsten Schritt mittels Co-IP und weiteren Western Blots bestätigt werden. Eine Bestätigung von XRCC5 als TF der microRNA-Gene steht ebenfalls noch aus und kann u. a. mit XRCC5-Expressionsplasmiden in Kombination mit qRT-PCRs zum Nachweis der microRNA-Expression untersucht werden. Damit XRCC5 in die bisher beobachteten Zusammenhänge passt, müsste es als transkriptioneller Repressor

nach Überexpression betroffene microRNAs herunterreguliert werden. Umgekehrt würde nach BIRC5-KD XRCC5 reduziert und die microRNAs hochreguliert.

TARDBP könnte ebenfalls TF von microRNA-Genen sein (s. Anhang Tab. IV). Seine Rolle ist schwer einschätzbar, da es viele Funktionen ausübt, die eine microRNA-Prozessierung positiv oder negativ beeinflussen könnten. Als transkriptioneller Repressor beeinflusst es die mRNA-Stabilität und ist auch am Splicing-Prozess beteiligt (UniProtKB 2022\_02). Als transkriptioneller Repressor von *MIR124-3* würde allerdings eine Reduktion von TARDBP eher passen, da die microRNA nach BIRC5-KD hochreguliert war. Die Rolle von TARDBP müsste also ebenfalls weiter, z. B. über Expressionsplasmide, überprüft werden.

## 5 Diskussion

Die aggressive Untergruppe der GEP-NEN, die GEP-NECs (Grad 3), sind aufgrund ihres schnellen Wachstums, ihrer hohen Proliferationsrate und der Bildung von Fernmetastasen nach wie vor klinisch eine schwer zu behandelnde Tumorerkrankung. Kritisch ist vor allem ihr schlechtes Ansprechen auf zytotoxische Medikamente (Fazio et al. 2013). Eines ihrer Hauptmerkmale ist, wie bei Krebserkrankungen allgemein, die Umgehung der Apoptoseinduktion. Die bekanntesten Antagonisten hierzu stellen die Mitglieder der IAP-Familie BIRC5 und XIAP dar. Aufgrund ihrer Rolle als IAP und in Bereichen der Regulation rezeptorvermittelter Signalwege, Zellteilung und Metastasierung rückten sie oft in den Fokus der Krebsforschung (Krieg et al. 2009, de Almagro und Vucic 2012, Garrison et al. 2010, Dizdar et al. 2017, Mehrotra et al. 2010). Die Vorarbeiten von Dizdar et al. (2017) haben gezeigt, dass gerade XIAP und BIRC5 entscheidende Akteure bei der Modulation der Zellproliferation und des Tumorwachstums sind. Ihre funktionelle Bedeutung konnte für die GEP-NEC nachgewiesen werden (s. 1.1.1). Allerdings könnte beiden Proteinen in diesem Rahmen noch eine unterschiedliche Gewichtung zukommen.

Das kleinste IAP-Mitglied BIRC5 besitzt nur eine funktionelle BIR-Domäne und spielt eine große Rolle bei der Zellteilung (s. 1.3.2). BIRC5 wird im Rahmen der Apoptoseinhibition mittlerweile nur eine sekundäre Rolle zugeschrieben. Gelangt Smac/DIABLO aus den Mitochondrien in das Zytoplasma wird XIAP inhibiert und die Apoptosekaskade aufrechterhalten (Du et al. 2000, Verhagen et al. 2000, Galluzzi et al. 2018). BIRC5 stabilisiert XIAP durch Bildung eines XIAP/BIRC5-Komplexes (Jaiswal et al. 2015) (s. 1.3.1 und 1.3.2).

XIAP ist als der potenteste intrinsische Apoptoseinhibitor bekannt, da es als einziges IAP Caspasen direkt inhibiert (Fulda und Vucic 2012, Eckelman et al. 2006) (s. 1.3.1). Zusätzlich verfügt XIAP im Gegensatz zu BIRC5 über drei funktionelle BIR-Domänen. Mit ihrer Hilfe übt es auch eine Funktion in Signaltransduktionsprozessen aus. Durch die Interaktion mit dem TAB1/TAK1 Komplex (Lu et al. 2007) der BIR1-Domäne und der Bindung von RIP2 mit der BIR2-Domäne (Krieg et al. 2009), kommt es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (s. 1.3.1).

NF- $\kappa$ B wiederum steht funktionell in Verbindung mit inflammatorischen Signalwegen und begünstigt die Entstehung von Krebs (DiDonato et al. 2012). Demnach erhält ein positiver inflammatorischer Feedback Loop den malignen Phänotyp und sichert die Tumorigenese und das Überleben von Krebszellen (Ma et al. 2011, Iliopoulos et al.

2009). NF- $\kappa$ B aktiviert hierbei das RNA-Bindungsprotein (RBP) LIN28B, welches wiederum die Prozessierung anti-tumorigener let-7 microRNAs herunterreguliert, wodurch IL6 in Folge hochreguliert und NF- $\kappa$ B weiter verstärkt aktiviert wird (Viswanathan et al. 2008).

Fügt man die oben genannten Vorgänge zusammen, ergibt sich so die Möglichkeit, dass ein XIAP/BIRC5-Komplex krebsrelevante microRNAs regulieren könnte. Diese Möglichkeit einer neuen Funktion beider IAPs im Rahmen der Tumorigenese der NEC-Krebserkrankung sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Für die ersten *in vitro* Untersuchungsansätze standen mehrere Zelllinien als neuroendokrines Karzinom-Zelllinienmodell zur Verfügung.

### 5.1 NEC-Zellkulturmodell

Für den ersten Schritt zur Untersuchung *in vitro* wurde ein geeignetes Zellkulturmodell herangezogen. Die GEP-NEC Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 wurden in Vorarbeiten eingehend etabliert (Krieg et al. 2014). Eine charakteristische Eigenschaft der NEC ist die Überexpression der hier im Fokus stehenden IAPs BIRC5 und XIAP. Dies geht u. a. aus qRT-PCR-Analysen, Western Blots und immunhistochemischen Färbungen hervor und gilt für die Zelllinien sowie für NEC-G3 Primärtumorproben, die auch für diese Arbeit verwendet wurden (Dizdar et al. 2017).

Die deutliche Expression beider IAPs, aber insbesondere von BIRC5, ist eine wichtige Besonderheit der Krebszellen, da es normalerweise in gesunden, ausdifferenzierten Zellen adulten Gewebes streng reguliert und nur während der Zellteilung hochreguliert wird (s. 1.3.2). Zellen, die krankheitsrelevante Proteine von sich aus überexprimieren, bieten neben ihrer Rolle im Rahmen der Erkrankung (s. 1.1.1 bis 1.3.2), eventuell auch einen nicht artifiziell manipulierten Ansatz für die Untersuchung erweiterter Funktionen dieser Proteine. Die Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 sind aber entartete Zellen mit vielfältigen genetischen Aberrationen (nur teilweise sichtbar in den aCGH-Daten, Krieg et al. 2014) und weichen daher biologisch von normalen Zellen des gleichen Typs ab. Die biologische Allgemeingültigkeit für die wildtypische (gesunde) Zellfunktion der in dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge bleibt daher fraglich.

Jede Art von Überexpression (hier IAPs) kann allerdings zu einer Fehllokalisierung des betreffenden Proteins im Vergleich zum unbehandelten bzw. gesunden Zustand führen und damit zu unüblichen neuen Funktionen. Dies ist ein Effekt, der für die Tumorigenese von Zellen sehr relevant ist. Bspw. gelangt der normalerweise in der Plasmamembran befindliche EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) in den Zellkern

und begünstigt die Krebsentstehung (Wang et al. 2015). Im Gegensatz zur artifiziellen Überexpression (Expressionsplasmid) sind die betroffenen Proteine aber tatsächlich in biologisch funktionierende (vorteilhafte) zelluläre Vorgänge integriert. Wäre dieser Umstand von Nachteil für die Zelle, würde dies zellulären Stress verursachen. Die Zelle könnte nicht proliferieren und würde zugrunde gehen (Rice et al. 2017, Shah et al. 2013, Bolognesi und Lehner 2018). Die Transfektion von Zellen, Behandlung mit Substanzen oder Genkopiezahlveränderungen zur Hochregulation eines Proteins bedeutet immer einen immensen Eingriff in das biologische System der Zelle (Vavouri et al. 2009, Tang and Amon 2013, Makanae et al. 2013, Stoebel et al. 2008). Die Überexpression von XIAP und BIRC5 ist aber definitiv vorteilhaft für die hochproliferativen NEC (Dizdar et al. 2017). Im Hinblick auf eine verbesserte Therapierbarkeit stellt sich die Frage, wie weit dieser Vorteil geht und welche Schwachpunkte es gibt, an die eine mögliche Therapie ansetzen kann.

Das NEC-Zellkulturmodell wurde also als BIRC5- und XIAP-Überexpressionsmodell verwendet, um eine neue Funktion beider IAPs für die NEC-Tumorigenese zu untersuchen. Dies wurde initial mittels *Knockdown* (KD) der zu untersuchenden Proteine analysiert. Nach den bisher dargelegten Informationen wurde eingangs erwartet, dass insbesondere XIAP den größten Einfluss ausüben würde.

## 5.2 *Knockdown* (KD) der IAPs in NEC-DUE-Zelllinien

Über einen shRNA-induzierten KD wurden BIRC5 und XIAP in den zwei NEC-Zelllinien getrennt herunterreguliert. Ein *Knockout* von BIRC5 wäre für Zellen, Organe und den gesamten Organismus kritisch und letal (Lens et al. 2003, Carvalho et al. 2003, Rajagopalan und Balasubramanian 2002, Yue et al. 2008, Speliotes et al. 2000, Martini et al. 2016, Wheatley und Altieri. 2019, Uren et al. 2000). Nach KD wuchsen die Zellen weitestgehend normal im Rahmen der Zellkultur mit 5 % FCS (s. 1.3.2).

Die mit dem GIPZ n.s. Leervektor transduzierten Zellen dienten als Kontrolle (LV, Negativkontrolle) und sollten die native NEC-Biologie widerspiegeln.

Der KD sollte effektiv genug sein, um sichtbare Auswirkungen von der molekularen bis hin zur zellulären Ebene zu haben. Hierzu haben die Ergebnisse der Arbeit von Dizdar et al. (2017) gezeigt, dass die KD Zellen ein signifikant vermindertes Wachstum im *In-vivo*-Modell zeigten. Sowohl der XIAP- als auch der BIRC5-KD haben also eine biologische Relevanz, die in der gängigen Zellkultur aber nicht zum Tragen kam.

Die Ausprägung des jeweiligen KD im Vergleich zur GIPZ n.s. Kontrolle wurde auf Proteinebene mittels Western Blot bestätigt (s. 4.1 Abb. 13 und Abb. 14).

Hierbei konnte gewährleistet werden, dass beide IAPs repräsentativ nachgewiesen werden können. Dies betrifft vor allem BIRC5 mit seinen unterschiedlichen Splicevarianten, von denen nicht bekannt war und welche relevant für die hier untersuchten Prozesse sein könnten. BIRC5 kommt in unterschiedlichen Kompartimenten und Splicevarianten mit leicht abweichendem Molekulargewicht vor (s. 1.3.2). Es sollten möglichst alle Splicevarianten nachweisbar sein, insofern sie unter den gegebenen Umständen exprimiert werden. Sonst hätte der Verursacher eines Effekts nicht ausgemacht werden können. Der für das Western Blot-Verfahren und die spätere Co-IP verwendete polyklonale Antikörper war in der Lage, BIRC5 generell nachzuweisen. Zum einen sind die bekannten Splicevarianten (WT-BIRC5, Survivin-2B und Survivin- $\Delta$ E3) in den ersten 72-Aminosäuren ihrer Sequenz identisch (s. 4.1), zum anderen wurde der gleiche Antikörper auch in einer weiteren Arbeit zum Nachweis der bekannten Splicevarianten von BIRC5 verwendet (Mahotka et al. 2002).

Die Western Blot Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die gute Nachweisbarkeit beider IAPs in den Zelllinien (s. 4.1, Abb. 13 und Abb. 15). Es waren hierbei Schwankungen in der Expression erkennbar, diese ließen sich aber weder auf das Alter, die Passage der Zellen, noch auf die Konfluenz zurückführen (s. Abb. 15). Da BIRC5 aber in gesunden Zellen vom Zellzyklus beeinflusst wird, wurden die Zellen für eine bestmögliche Expression möglichst proliferativ gehalten. Die Ursache für die Schwankungen in der Proteinexpression lässt sich somit schwer ermitteln. Denkbar wären Stressfaktoren, eine Mischung aus Stimulation und Hemmung der Zellen untereinander, hervorgerufen durch das insel- und traubenartige Wachstum.

XIAP und BIRC5 bilden Heterodimere und BIRC5 wurde als Beschützer von XIAP beschrieben (s. 1.3). Daher lag die Vermutung nahe, dass mindestens die Expression von BIRC5 Einfluss auf den XIAP-Gehalt haben könnte.

Damit die Funktion beider IAPs besser beurteilt werden konnte, war es essentiell festzustellen, dass der KD des einen Proteins keinen Einfluss auf das andere Protein hatte. Nur so konnte eine unabhängige Wirkungsweise der Proteine untersucht werden. Die Western Blot Ergebnisse zeigten, dass eine Reduktion von BIRC5 keinen negativen Effekt auf die XIAP-Expression hat und umgekehrt (s. Abb. 15, Abb. 17 und Dizdar et al. 2017). Beide Proteine konnten also unabhängig voneinander in ihrer Wirkung analysiert werden. Aufgrund des NF- $\kappa$ B-aktivierenden und eventuell microRNA regulierenden XIAP/BIRC5-Komplexes ist diese Information wichtig. Beide Proteine

könnten daran beteiligt gewesen sein, aber nur XIAP besitzt die BIR-Domänen zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (s. 1.3.1).

Zwischen beiden Zelllinien gibt es einige Unterschiede, weshalb eine Zelllinie für bestimmte Analysen besser geeignet war als die andere. Auf genetischer Ebene ist die NEC-DUE2 ein Sonderfall der GEP-NEC, da sie einen Genkopieverlust von *BIRC5* aufweist, aber dennoch *BIRC5* überexprimierte (s. 4.1.1, Anhang 7.1.5 und Tab. III). Ein Genkopieverlust tritt in 2,5 % der NEN, NET und NEC auf (s. Anhang Abb. VII). Bei einem Vergleich der Zelllinien zeigte sich, dass die NEC-DUE1 fast 3-mal mehr *BIRC5* exprimierte (s. Abb. 17). Die XIAP-Expression betreffend gab es keinen signifikanten Unterschied, allerdings war der KD bei NEC-DUE1 stärker (s. Abb. 14).

Es wurde daher initial die NEC-DUE1 im Rahmen des microRNA-Arrays bezüglich ihrer microRNA-Expression analysiert. Der Expressionsunterschied zwischen KD und Kontrollen sollte maximal sein, damit mögliche Effekte ebenfalls maximal und messbar (signifikant) waren. Die Array-Analyse sollte zeigen, ob die veränderte Expression des jeweiligen IAP das microRNA-Expressionsmuster in den Krebszellen im Vergleich zu Zellen mit nativer IAP-Expression verändert.

### 5.3 MicroRNA-Array-Ergebnisse

Der microRNA-Array konnte von 1918 aus miRBase bekannten humanen microRNAs maximal 720 humane microRNAs tatsächlich in den NEC analysieren (s. 4.2.1). Nicht jede microRNA wird in jedem Zelltyp und unter allen physiologischen Bedingungen exprimiert. Jede microRNA reguliert ihr eigenes Set an Genen und wird daher nicht zu jedem Zeitpunkt von der Zelle benötigt, genau wie im Fall der Proteinexpression. Jeder Zelltyp hat ein funktionsbedingtes Proteinexpressionsmuster, das auch durch extrinsische Signale (bspw. Stress, Inflammation) und intrinsische Signale (bspw. Hormone und zellinterne Vorgänge wie Mitose) verändert wird. Entsprechend muss die microRNA-Expression moduliert werden (Treiber et al. 2017, Choudhury und Michlewski 2012, Connerty et al. 2015, Lin und Gregory 2015).

Die Datenanalyse zur microRNA-Array-Analyse von Exiqon (s. Anhang 7.1.1) zeigte zunächst eine Clusterung der Proben entsprechend ihres biologischen Unterschieds, der Ursache, die den am stärksten messbaren Einfluss auf die microRNA-Expressionsveränderungen (Variation) hatte. Hierbei grenzte sich das *BIRC5*-KD-Cluster von den übrigen GIPZ n.s.- und XIAP-KD Proben ab. Der *BIRC5*-KD hatte den größten Effekt auf bestimmte microRNAs. Unerwünschte Störfaktoren (Probenqualität, Lagerung, Durchführung) haben keinen oder kaum Einfluss (s. Anhang Abb. I).

Überraschenderweise lieferte der XIAP-KD in den Array-Ergebnissen keine auffällig veränderte microRNA-Expression, obwohl der XIAP-KD in der NEC-DUE1 87 % erreichte (s. Abb. 14). Auch eine Überprüfung in den NEC-DUE2 lieferte keine signifikanten Ergebnisse.

Nach eingangs vermuteter Verbindung von NF- $\kappa$ B und XIAP wurde mindestens eine Hochregulation der let-7-microRNA-Familienmitglieder nach XIAP-KD erwartet. Eine XIAP-Deregulation schien aber keinen Einfluss auf den zuvor erwähnten inflammatorischen Feedback Loop in Verbindung mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und LIN28B zu haben (s. 1.3.3). LIN28B ist ein RNA-Bindungsprotein, welches die Prozessierung der let-7 microRNAs inhibiert hätte (Iliopoulos et al. 2009).

Der microRNA-Array zeigte ein anderes Ergebnis für den BIRC5-KD. Vergleicht man die globale Anzahl unterschiedlicher microRNAs zwischen NEC-DUE1 GIPZ n.s. und BIRC5-KD (1918 humane microRNAs), waren global nach Reduktion von BIRC5 durchschnittlich signifikant ca. 150 microRNAs (~ 9 %) mehr messbar exprimiert (s. Anhang Abb. III). Nach microRNA-Array-Analyse waren letztlich nach BIRC5-KD insgesamt 64 humane microRNAs signifikant dysreguliert, davon 21 microRNAs herunterreguliert und 43 microRNAs hochreguliert (s. Anhang Abb. IV, Tab. I).

Da der XIAP-KD keine Auswirkungen auf die microRNA-Regulation hatte, sollten sich die Ergebnisse nach BIRC5-KD zu diesen Proben genau so verhalten, wie zu den GIPZ n.s. Proben in den NEC-DUE1. Eine entsprechende *Heatmap* der 34 signifikantesten deregulierten humanen microRNAs im Vergleich zwischen BIRC5-KD und XIAP-KD zeigt auch weitestgehend Übereinstimmungen mit den bisherigen Ergebnissen (s. Anhang Abb. V und Abb. IV), nur die miR-125b-5p, 488-3p und 660-5p sind hier nicht signifikant dereguliert.

Zur Bestätigung der Array-Ergebnisse mit Hilfe von microRNA-Assays wurden die für die Krebsforschung relevantesten microRNAs ausgewählt (s. 4.2.3 und Tab. 5). Ausgewählt wurden Kandidaten, die eine hohe Anzahl an Zielgenen in relevanten Signalwegen hatten und am stärksten differentiell dereguliert waren (s. p-Wert als Surprise-Index 4.2.3 Ende Kurzzusammenfassung).

Besonders auffällig waren 6 Mitglieder der let-7 Familie im Array nach BIRC5-KD einheitlich in den NEC-DUE1 herunterreguliert (s. Anhang Abb. IV). Die let-7 Mitglieder werden erwähnt, da sie bekannte Tumorsuppressoren sind (Balzeau et al. 2017, Trang et al. 2009, Chershev et al. 2019). Ihre Deregulation wurde zwar erwartet, war aber offenbar nicht durch die Verbindung zwischen XIAP, welches NF- $\kappa$ B aktiviert und

LIN28B erfolgt. Zudem hätte sich eine Hochregulation der let-7 zeigen müssen, da die Inhibition durch LIN28B reduziert worden wäre (s. Abb. 8).

Die Wirkung von microRNAs ist aber auch kontextabhängig und muss im Zusammenspiel mit anderen Faktoren betrachtet (Chershev et al. 2019) und für jeden Zelltypen neu überprüft werden. So wurden Fälle (ösophagealer Krebs, akute promyelozytäre Leukämie und Ovarkrebs) beschrieben, in denen sonst anti-tumorigene microRNAs Invasion, Migration und gerade aggressive Tumore förderten. Hierzu gehören die let-7b, 7c und 7f, die auch in NEC-DUE1 nach BIRC5-KD herabreguliert waren.

Eine Überprüfung in den NEC-DUE2 zeigte keine Dysregulation von let-7i-5p und eine gegenteilige Regulation von let-7g-5p (s. Abb. 19), weshalb diese microRNAs zur Überprüfung eines allgemeinen Prozesses in den NEC ungeeignet waren.

Die Ergebnisse der Array-Analyse zeigen weitere Auffälligkeiten. Die miR-124-3p war die mit Abstand am stärksten dysregulierte microRNA. Der Fold Change war ca. 1,4-mal höher als der der nächsthöheren miR-342-3p. Danach folgten nur noch Fold Changes, die nur noch halb so hoch waren. Die miR-124-3p wird gewebespezifisch in verschiedenen Gehirngeweben exprimiert (Ludwig et al. 2016). Sie wurde als die dritt-spezifische microRNA des Nervensystems eingestuft (Landgraf et al. 2007). Während der Neurogenese wird sie nur schwach in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert. Ihre Expression erhöht sich dann schrittweise und reichert sich letztlich in ausdifferenzierten Neuronen an (Deo et al. 2006, Coolen und Bally-Cuif 2015). Sie fördert die Differenzierung von Zellen und inhibiert die Proliferation (Ristori und Nicoli 2017). Dies sind Eigenschaften, welche die miR-124-3p zu einer guten anti-tumorigenen microRNA machen. Diese Eigenschaften stellt sie damit in Opposition zu dem „onkofötalen“ BIRC5, welches bedeutend ist für embryonales, proliferatives Gewebe. Die miR-124-3p konnte in beiden Zelllinien bestätigt werden. Das Ergebnis fiel für die NEC-DUE2 nur etwa halb so stark aus. Sie blieb aber die am stärksten hochregulierte microRNA.

Die ebenfalls neuronale miR-338-3p gehörte zu der drittstärkst exprimierten microRNA in NEC-DUE1 nach BIRC5-KD. Sie ist an der Differenzierung von Progenitorzellen zu Gliazellen beteiligt, während die ebenfalls signifikant hochregulierte miR-23b-3p an der Differenzierung zu Neuronen beteiligt ist (Rajman und Schrott 2017). Die Hochregulation mehrerer microRNAs mit neuronaler Funktion schien für neuroendokrine Zellen aus Colon und Magen zudem ungewöhnlich. Die mit miR-23b-3p geclusterte miR-24-3p und miR-27b-3p waren ebenfalls im Array hochreguliert. Die mit ihnen geclusterte miR-3074 war nicht messbar. Sie teilt sich den gleichen Gen-Abschnitt mit der

microRNA miR-24-3p, befindet sich aber auf dem antisense DNA-Strang, weshalb vermutlich die 24-3p bevorzugt abgelesen wurde.

Geclusterte microRNAs werden in einem langen RNA-Molekül mit mehreren Haarnadel-Elementen (mehreren pri-microRNAs) transkribiert und unter dem gleichen Promoter abgelesen (polycistronische microRNAs). Hierdurch zeigen sie ein co-abhängiges Expressionsmuster (O'Brien et al. 2018, Truscott et al. 2016). Die gleichförmige Regulation geclusterter microRNAs wäre daher ein erster Hinweis dafür, dass der BIRC5-abhängige Regulationsmechanismus am Beginn der microRNA-Biogenese greift. Nachgestellt hätten die einzelnen Cluster-microRNAs noch auf andere Art reguliert werden können, dies war aber offenbar nicht der Fall.

Diese microRNAs konnten in den NEC-DUE1 erwartungsgemäß bestätigt werden. In den NEC-DUE2 war dagegen nur die miR-24-3p signifikant hochreguliert. Die schwächeren Ergebnisse der NEC-DUE2 lassen sich mit der geringen BIRC5-Expression im Vergleich zur NEC-DUE1 erklären. Der BIRC5-Expressionsunterschied zwischen KD und GIPZ n.s. war für NEC-DUE1 extremer. Dies könnte auf eine Abhängigkeit zu der Menge vorhandener BIRC5-Moleküle hindeuten (Konzentrationsabhängigkeit). In jedem Fall sprechen die bisherigen Daten aus dem Zelllinienmodell für eine rein BIRC5-abhängige microRNA-Regulation.

Die Zelllinien sind Abkömmlinge aus Metastasen des jeweiligen Primärtumors. Zwischen beiden gab es aber auf zytogenetischer Ebene keine oder nur geringe Unterschiede. Beide wurden im Rahmen der Etablierung der Zelllinien aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften (neurosekretorische Granula) und Marker (Synaptophysin und Chromogranin A) nach ENETS und WHO-Klassifikation als großzellige NEC identifiziert (Krieg et al. 2014). Bei der NEC-DUE1 handelte es sich um eine Lebermetastase eines Magen-NEC und bei NEC-DUE2 um eine perikolische Lymphknotenmetastase eines Colon-NEC (s. 3.1.1). Aufgrund der zuvor beschriebenen funktionellen Bedeutung von BIRC5 für die NEC-Tumorigenese (Dizdar et al. 2017), wurden auch Primärtumorproben auf ihre microRNA-Expression hin überprüft. Dies machte Sinn, wenn zugrunde gelegt wurde, dass BIRC5 in den Primärtumorproben hochreguliert war und im korrespondierenden Normalgewebe vergleichend herunterreguliert. Die KD Zellen näherten sich durch die Reduktion von BIRC5 dem Normalgewebe an.

Bei einem Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe wurde erwartet, dass microRNAs, die anti-tumorigene Gene inhibieren, in den Krebszellen verstärkt exprimiert wurden und microRNAs, die Onkogene regulieren, reduziert. Eine

Überschneidung tumorabhängiger microRNAs mit BIRC5-regulierten microRNAs wäre in Bezug auf neue Tumorthapien ein neuer Ansatzpunkt.

#### **5.4 Überprüfung der NEC-Primärtumorproben**

Die GEP-NEC sind eine seltene und heterogene Tumorentität (Niederle et al. 2010). Insgesamt standen 11 NEC-G3-Primärtumorproben und 7 Normalgewebeproben (FFPE) für eine microRNA-Array-Analyse zur Verfügung.

Da Patientenproben biologisch individuelle Abweichungen aufweisen können, wurden in einer ersten Analyse zunächst nur Proben aus dem Colon betrachtet. Zusätzliche Faktoren können epigenetisch Einfluss auf die microRNA-Gene oder microRNA-Prozessierung ausüben, wie ein veränderter Selektionsdruck für die Tumorzellen aufgrund der abweichenden Lokalisation durch das umliegende Gewebe (andere Hormone, Blutversorgung, Entzündungsreaktionen, Stressfaktoren, extrinsische Signale). Diese Faktoren sind bei Tumoren aus einem ähnlicheren Umfeld geringer.

Die gepaarte Analyse der microRNA-Array-Ergebnisse (s. Anhang Abb. XI) verglich ausschließlich Tumorgewebe eines Patienten mit seinem korrespondierenden Normalgewebe. Diese Analyse lieferte 80 signifikant deregulierte microRNAs. Von diesen waren 48 microRNAs im Tumorgewebe herunterreguliert. Zusätzlich wurde die gepaarte Analyse mit einer gepoolten Analyse verglichen, wodurch die Genauigkeit beider Analysen überprüft werden konnte. In der gepoolten Analyse, die auch Tumore ohne zugehöriges Normalgewebe enthielt, wurden 118 signifikant deregulierte microRNAs gemessen (s. Anhang Abb. X).

Diese Untersuchung liefert erste Hinweise auf die gegebene microRNA-Deregulation in NEC (Colon), müsste aber für ein weitergehendes Verständnis ausgeweitet werden. Die NEC-Colon-Kohorte enthält auch nur den Primarius der NEC-DUE2 Ziellinie, da NEC-DUE1 zu den Magen-NECs zählt.

Bei einem Vergleich der globalen Menge der microRNAs zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe waren signifikant ca. 50 microRNAs im Tumorgewebe nicht mehr messbar. Dies entspricht 5,6 % der gesamten messbaren humanen MicroRNAs (s. Anhang Abb. IX).

Die Volcano Plots erleichtern die Visualisierung der microRNAs mit der größten Abweichung ( $\log_2$  FC) zwischen Tumor- und Normalgewebe, verglichen mit der Höhe ihres p-Wertes (s. Anhang Abb. XII). Die Ergebnisse der gepaarten und gepoolten Analysen sind letztlich sehr ähnlich. Überschneidend signifikant dysregulierte microRNAs sind im Anhang Tab. II einzusehen.

Der explorative Fokus der Primärtumor-Array-Analyse lag auf den differenziell am stärksten dysregulierten microRNAs, die bereits eine bekannte Verbindung zu Krebserkrankungen hatten (im Sinn von Fisher p-Wert als Surprise-Index). Zu den auffälligsten microRNAs gehören die miR-143-3p und 143-5p (miR-143-Duplex) und 145-5p und 145-3p (miR-145-Duplex). Alle vier microRNAs waren in den Primärtumoren herunterreguliert, wobei die miR-143-3p und 145-5p zu den am stärksten herunterregulierten microRNAs der gepaarten Analyse zählten (s. Anhang Tab. II). Der miR-143-Duplex ist insgesamt mit beiden microRNAs relevant für die Krebszelltransformation von Lungenkrebs (Sanada et al. 2019) und Magenkrebs (Wu et al. 2013). Dies ist interessant, da der Passagierstrang der meisten pre-microRNAs oft degradiert und nur der Leitstrang aufgrund seiner sequenzabhängigen Stabilität bevorzugt in RISC eingebaut wird (s. 1.4). Der miR-145-Duplex (Tumorsuppressor) ist relevant im Fall von Plattenepithelkarzinom (Mataki et al. 2016) und Lungenkrebs (Misono et al. 2018). Die bekannten Tumorsuppressoren miR-143-3p und 145-5p bilden darüber hinaus das miR-143/145-Cluster, welches in Krebs die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) reguliert (Lei et al. 2017). Die gleichförmige Regulation geclusteter microRNAs weist auf Einflüsse im Rahmen der NEC-Tumorigenese hin, die die Gen-Expression von microRNAs regulieren. Entscheidend ist, dass microRNAs während ihres gesamten Prozessierungswegs vom Gen bis zum funktionellen miR-RISC-Komplex reguliert werden können (s. 1.4). Diese Regulation betrifft scheinbar nicht die maturierten, funktionellen miR-143-3p oder 145-5p. Sie werden nicht nachträglich selektiv reguliert. Zu den am stärksten herunterregulierten microRNAs nach der Array-Analyse (niedrigster p-Wert und höchster log<sub>2</sub> FC in positiver oder negativer Richtung, s. Anhang Tab. II) gehörten neben den miR-143-3p und 145-5p, die miR-4328 und 195-5p. MiR-4328 spielt eine Rolle bei der Regulation von BCL2 (B-Zell Lymphoma 2) (Tang et al. 2020). Die miR-192-5p ist ebenfalls ein Tumorsuppressor (Xiao-Fang Zheng et al. 2016). Sie gehört zur miR-192/215-Familie (im Array: miR-192-5p, 194-3p, 194-5p), bestehend aus miR-192, miR-194 und miR-215, die positiv durch TP53 reguliert werden (Pichiorri et al. 2010). Weitere microRNAs wie miR-133a-3p (Hua et al. 2021, Kong et al. 2021) und miR-1-3p inhibieren ebenfalls Krebswachstum (Wang et al. 2018, Li et al. 2018). Es zeigt sich also, dass in den NEC gleich mehrere anti-onkogene microRNAs herunterreguliert wurden.

Nachfolgend wurden einige diese tumorabhängigen microRNAs miR-143-3p, 145-5p und 192-5p in den Primärtumorproben mittels entsprechender Assays quantifiziert.

Diese microRNAs würden sich aufgrund ihrer Relevanz zur Untersuchung eines generellen Ansatzes zum Verständnis der Tumorigenese der Colon-NEC eignen.

Diese Arbeit fokussiert sich jedoch auf einen möglichen Zusammenhang zwischen BIRC5- und microRNA-Regulation. Die in der vorangegangenen Array-Analyse untersuchten miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p (BIRC5-abhängige microRNAs) waren aber in den NEC-Primärtumoren nicht in dem Ausmaß dereguliert, wie erhofft.

Die Volcano Plots zeigen, dass die Cluster-24-microRNAs (miR-23b-3p, 27b-3p und 24-3p) sogar herunterreguliert wurden (s. Anhang Abb. XII). Dies passte zu dem Umstand, dass BIRC5 in den NEC-Primären hochreguliert war. Das Problem bestand in ihrem relativ hohen p-Wert, weshalb sie im Rahmen der Exiqon-Statistiken (Benjamini-Hochberg-Prozedur) nicht Bestand hatten.

Im Hinblick auf die BIRC5-Expression und die genannten Vorkenntnisse kann man davon ausgehen, dass im ausdifferenzierten, gesunden Normalgewebe BIRC5 streng reguliert und nur während der Zellteilung hochreguliert wird (G2/M) (s. 1.3.2). Bei Tumoren kann dagegen BIRC5 auch in der Interphase exprimiert werden (Stauber et al. 2007). Immunhistochemische Färbungen von GEP-NEN-Patienten (n = 77) zeigten eine erhöhte BIRC5-Überexpression, insbesondere in aggressiven GEP-NEC (Dizdar et al. 2017). Der Zustand zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe war daher vergleichbar mit BIRC5-KD Zelllinie zu GIPZ n.s. Zelllinie. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass nicht alle Patienten BIRC5 in gleichen Konzentrationen exprimierten. Wie die IRS-Daten zeigen, war der BIRC5-Level zwischen den Patientenproben nicht identisch (s. Anhang Tab. III) und die geringe Expression von BIRC5 in bestimmten Patientenproben könnte ein Faktor gewesen sein, der die Stärke der microRNA-Regulation beeinflusste und innerhalb der Datenreihen zu höheren Standardabweichungen führte. Dies wären aber auch gleichzeitig ein Hinweis auf eine mögliche Abhängigkeit vom BIRC5-Level. Weitere Abweichungen entstehen durch die bereits erwähnte Individualität der Patientenproben.

Die Bedingungen im Patientenmaterial waren weniger kontrolliert als bei *in vitro* Versuchen, sind aber für die Untersuchung der NEC-Tumorerkrankung relevanter. Zudem war die Kohorte relativ klein, sodass Datenausreißer einen größeren Einfluss hatten. Aus diesem Grund erfolgte eine anschließende Quantifizierung der miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p (BIRC5-abhängige microRNAs) in den Primärtumorproben und eine Darstellung in einer gesonderten *Heatmap* (s. Abb. 21).

Die *Heatmap* der eigens quantifizierten BIRC5-abhängigen microRNAs

veranschaulicht per Farbschema die relativen Expressionslevel der eigens validierten microRNAs im Vergleich zum Normalgewebe (s. Abb. 21). Die Ergebnisse zeigen keine einheitliche Herunterregulation der microRNAs im Tumorgewebe, sondern zwei deutlich abweichende Proben (TGW5 = NEC-DUE2 Primarius und TGW9).

Für eine genauere Analyse erfolgte eine gepaarte Analyse der BIRC5-abhängigen microRNAs (s. Abb. 22). Hierbei ergab die statistische Prüfung auf Datenausreißer, dass es sich bei dem Primarius der NEC-DUE2 gerade in Bezug auf die BIRC5-abhängigen microRNAs um einen solchen handelte. Die robustere Mann-Whitney-U-Statistik zeigte die signifikante Herunterregulation der BIRC5-abhängigen microRNAs.

Damit auch der Primarius der NEC-DUE1 überprüft werden konnte, wurden Magen-NEC-G3 Primärtumorproben in die Analyse der miR-124-3p miteinbezogen und das Kollektiv auf zumindest 15 Tumorproben erweitert. Da die miR-124-3p bisher die höchst messbare Deregulation zeigte, wurden hier die deutlichsten Ergebnisse erwartet. Die Analyse zeigte hier drei Datenausreißer, darunter der Primarius der NEC-DUE2. Insgesamt ergab sich aber eine signifikante Herunterregulation der miR-124-3p im Tumorgewebe um ca. 80 % (s. Abb. 23).

Demnach gab es in den Colon-NEC tumorabhängige microRNAs (miR-143-3p und 145-5p) und von der (je nach Patienten) BIRC5-Expression abhängige microRNAs (miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p).

Die Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen BIRC5-Status und microRNA-Expression war aufgrund der geringen Größe der Kohorte nicht möglich (s. 4.3.2 unten). Ergebnisse aus Vorarbeiten (Dizdar et al. 2017) lieferten maximal einen schwachen bis mäßig positiven Zusammenhang zwischen Gen-Kopie-Status (aCGH-Daten) und den IRS-Daten nukleären BIRC5. Gerade die NEC-DUE2 bzw. ihr Primarius ist ein Beispiel dafür, dass trotz Gen-Deletion BIRC5 überexprimiert wurde (s. Anhang Tab. III). Die IRS-Daten der Primarien, erhoben von Dr. L. Dizdar, belegten für NEC-DUE2 und NEC-DUE1 eine moderate Expression von nukleärem BIRC5 und für NEC-DUE2 sogar für zytoplasmatisches BIRC5. Es wäre denkbar, dass das Protein verstärkt in das Zytoplasma geschleust wurde. Hierzu besitzt BIRC5 ein nukleäres Exportsignal (NES, Hu et al. 2017). Eine Amplifikation von *BIRC5*, wie im Fall der NEC-DUE1, wurde in ca. 46 % der Fälle von NEC des Verdauungssystems bzw. 25 % der großzelligen NEC festgestellt und eine Deletion in nur 2,5 % der Fälle (s. Anhang Abb. VII), weshalb die NEC-DUE2 einen Sonderfall darstellt. Die Überexpression war damit weniger abhängig von der Anzahl vorhandener *BIRC5*-Kopien, sondern wurde

anderweitig aufrecht gehalten (z. B. positive transkriptionelle Regulation).

### **5.5 Überprüfung einer BIRC5-abhängige microRNA-Regulation**

Zur Bestätigung der bisherigen Sachlage wurden Versuche mit dem BIRC5-Inhibitor YM155 durchgeführt. YM155 ist nicht BIRC5-spezifisch (s. 4.4.1). In NEC-DUE1 und NEC-DUE2-Zelllinien wurde seine Wirkung getestet, wobei BIRC5 zuverlässig herunterreguliert wurde, die XIAP-Expression war davon nicht betroffen (Dizdar et al. 2017). Dies bestätigt erneut die unter 4.1 gezeigte Unabhängigkeit von XIAP und BIRC5.

Die BIRC5-abhängigen microRNAs (miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p) zeigten nach YM155-Behandlung eine ähnliche Regulation wie nach dem BIRC5-KD in NEC-DUE1 (vergleiche Abb. 19 und Abb. 24). Insbesondere die miR-124-3p war auch hier die am stärksten hochregulierte microRNA. Die Ergebnisse lassen auch eine Konzentrationsabhängigkeit erkennen. Für NEC-DUE2 ergab sich keine messbare Deregulation. Der Versuch mit der dritten Zelllinie NEC-DUE3, die zu den kleinzelligen NEC gehört, bestätigt eine Regulation für miR-23b-3p. Die Ergebnisse für miR-124-3p könnten nach weiteren Versuchsdurchläufen signifikant werden und würden dann auf einen für NEC allgemein gültigen Prozess hindeuten (s. Abb. 24). Hohe Standardabweichungen innerhalb der Daten entstanden vermutlich aufgrund der erhöhten Toxizität von YM155 für die Zellen. Es wurde oft beobachtet, dass sich Zellen aufgrund von Stress bei Konzentrationen oberhalb von 100 nM nach 3 Tagen ablösten. Wenn die Zellen vermehrt Stressfaktoren ausgesetzt sind oder in Apoptose übergehen, beeinflusst dies zusätzlich (ungewollt) den microRNA-Gehalt. Zusätzliche Versuchsdurchläufe oder ein spezifischerer BIRC5-Inhibitor könnten weitere signifikante Ergebnisse liefern.

Die Arbeitsgruppe von Andersson et al. (2017) untersuchte auch einen Zusammenhang zwischen BIRC5 und der Regulation von microRNAs. Zur Bestätigung ihrer Beobachtungen wurde ebenfalls ein YM155-Versuchsansatz genutzt (10 nM bis zu 3 Tage). Untersucht wurden humane Leukozyten, die zuvor mit ConA (Concanavalin A, ein Lymphozytenmitogen) zur chemischen Stimulation der Proliferation behandelt wurden, da diese (anders als die NEC) keine generelle BIRC5-Überexpression aufweisen. Die Zellen wurden in der Mitose-Phase, in der BIRC5 hochreguliert wird, synchronisiert. Zwar wurde auch die Leukozyten-Kontrollgruppe mit ConA behandelt, aber das Wechselspiel von ConA-Stimulation und YM155-Behandlung und damit der Einfluss auf die microRNA-Prozessierung ist schwer abschätzbar. ConA bewirkt mehr als eine selektive BIRC5-Hochregulation. Es erfolgt eine Induktion des MAPK-Signalwegs,

wodurch die Mitose eingeleitet wird. Zusätzlich bewirkt YM155 mehr als eine BIRC5-Reduktion, denn der Zellzyklus wird in der S-Phase blockiert (Hong et al. 2017).

Nach der YM155-Behandlung stellte Andersson et al. (2017) letztlich eine Reduktion der BIRC5-Transkription um 64 bis 81 % fest, die die drei Splicevarianten WT-BIRC5, Survivin 2B und Survivin  $\Delta$ Ex3 gleichermaßen betraf. Die Herunterregulation von BIRC5 führte zu einer Hochregulation einer großen Zahl verschiedener microRNAs, die über 3 Tage anhielt.

Der von Andersson et al. (2017) verwendete microRNA-Array konnte potentiell die Expression von 2565 microRNA-Genen überprüfen, 18 % (463) davon wurden letztlich in den Leukozyten als messbar eingestuft. Eine graduelle Erhöhung der microRNA-Expression nach 3 Tagen wurde bei 50 % dieser microRNAs (~230) registriert und 6 % (~30) waren sogar herunterreguliert. Es wäre denkbar, dass diese graduell regulierten microRNAs stressbedingt durch das YM155 hochreguliert wurden. Die Schlussfolgerung von Andersson et al. (2017) war, dass BIRC5 global die Biogenese von microRNAs reguliert. Es könnte aber auch lediglich eine Stressantwort gewesen sein.

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit (s. 5.3). Von den nach BIRC5-KD im Rahmen der microRNA-Array-Analyse maximal messbaren 720 humanen microRNAs waren ~9 % dereguliert, von denen 33 % herunterreguliert und 67 % hochreguliert waren (s. Anhang Abb. IV, Tab. I). Dies spricht eher für einen selektiven Mechanismus, der nur ein Set bestimmter microRNAs betrifft.

Die Kombination aus ConA- und YM155-Behandlung (Stress), einschließlich des anderen Zelltyps, kann ausschlaggebend für eine anders geartete microRNA-Regulation gewesen sein.

Hinzu kommt, dass die für diese Arbeit verwendeten NEC-Zellen im Rahmen der normalen Zellkultur ein Gemisch aus mitotischen, apoptotischen und überwiegend Interphase-Zellen bildeten. Gerade für Letztere ist die post-transkriptionelle Regulation durch microRNAs relevanter, denn der Einfluss der microRNAs auf die Proteinbiosynthese ist hier am größten und entscheidender für die Vitalität der Zellen. Die mitotische Kondensation der Chromosomen stört dagegen die Transkription von Genen. In dieser Phase ist die Proteinbiosynthese der Zellen stark verringert. Es verbleibt zwar eine geringe Transkriptionsaktivität von Genen, die für die Teilung wichtig sind und für die Phase danach (Formierung von Membrankomponenten und Zelladhäsion), aber zellspezifische Gene werden in der G1-Phase abgelesen (Palozola et al. 2017, Strzyz 2017).

In dieser Arbeit erfolgte die Reduktion von BIRC5 über einen KD, während die Überexpression von BIRC5 durch tumorigene, krankheitsrelevante Einflüsse gegeben war. Die Zellen wurden nicht in einer bestimmten Phase fixiert. Prozesse konnten weiterhin ablaufen. Im Hinblick auf ein besseres Verständnis und Therapierbarkeit der NEC-Erkrankung ist der normale Arbeitsmodus der Zellen entscheidend.

Mit der TT2609-C02 stand noch eine weitere Zelllinie mit lentiviralem BIRC5-KD zur Verfügung. Sie wurde zur Überprüfung der BIRC5-abhängigen microRNAs herangezogen (s. 4.4.2). Die TT2609-C02 sind endokrine Krebszellen mit anderem Organursprung. Diese follikuläre Schilddrüsen-Krebszelllinie zeigte nach BIRC5-KD ebenfalls eine Hochregulation von miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p (s. Abb. 26). Es könnte sich also um einen nicht nur auf die NEC beschränkten Mechanismus handeln.

Da bisher die Reduktion von BIRC5 diese microRNAs hochregulierte, sollte im Rahmen eines Umkehrversuchs (*Rescue*-Versuchs) das genaue Gegenteil erreicht werden. Eine Hochregulation von BIRC5 sollte zu einer Verminderung der BIRC5-abhängigen microRNAs in NEC-DUE1 BIRC5-KD Zellen führen. Dies wurde über eine Transfektion mit einem BIRC5-Expressionsplasmid erreicht. Die verwendeten Plasmide erzeugten jeweils BIRC5 mit einem N-FLAG-Tag oder C-FLAG-Tag, da der Mechanismus der beobachteten BIRC5-vermittelten microRNA-Regulation nicht bekannt war. Anhand der Ergebnisse ließe sich feststellen, ob eventuell der C- oder N-Terminus relevanter für den beobachteten Effekt war. Das FLAG-Tag ist zwar klein (addiert ca. 1 kDa zum Protein), könnte aber Proteininteraktionen und Faltungen negativ beeinflussen, sodass diese vermindert oder gar nicht zustande kommen. Die Ergebnisse zeigen eine effektive Herunterregulation der miR-124-3p sowohl für N-FLAG- als auch C-FLAG-BIRC5, wobei die Reduktion für C-FLAG 8 % stärker war. Die miR-24-3p konnte dagegen nur durch das N-FLAG-BIRC5 reguliert werden. Dies könnte ein erster Hinweis für eine höhere funktionelle Relevanz des BIRC5-C-Terminus sein, da mit N-FLAG-BIRC5 zwei microRNAs reguliert wurden. Es könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die microRNAs mit unterschiedlichen Mechanismen reguliert wurden, da die miR-124-3p durch beide Varianten reduziert wurde (s. Abb. 28). Denkbar wäre eine Beteiligung der BIR-Domäne, die 18 Aminosäuren Abstand zum N-Terminus hat (s. Abb. 44) und durch das Tag eventuell funktionell nicht in dem Ausmaß gestört wurde. Die C-terminale  $\alpha$ -Helix könnte dagegen leichter in ihrer Funktion durch molekulare Veränderungen behindert worden sein (s. 1.3.2 und Abb. 5).

## 5.6 Rolle der microRNAs in NEC

Die Hochregulation von BIRC5 hat bereits Vorteile für die Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps der NEC. Die Tumorigenese führt aber zu erheblichen Störungen innerhalb der Zelle. Dies verursacht malignen Stress. Darunter fallen Defekte während der Chromosomentrennung, genomische Instabilität, ein anaerober Metabolismus aufgrund von Hypoxie (Warburg Hypothese) und inflammatorische Prozesse. Diese Signale würden in normalen Zellen zur Einleitung des Zelltods führen, da apoptotischen Signale überwiegen (Kaczanowski 2016). BIRC5 wirkt dem entgegen. Zusätzlich ermöglicht es den Tumorzellen, sich trotz genetischer Defekte weiter zu teilen (s. 1.3.2). Da BIRC5 selektiv microRNAs regulierte, erfolgte die Einschätzung ihrer Eignung für weiterführende Versuche und ihre Bedeutung für die Tumorigenese der NEC. Dies erfolgte im Rahmen ihrer Auswahl (s. 4.2.3). Ein wichtiges Kriterium sind die Zielgene dieser microRNAs. MicroRNAs sind in den meisten Fällen negative transkriptionelle Regulatoren der Genexpression. Für eine potentielle Tumorthherapie sind Onkogene, die durch heraufregulierte microRNAs direkt negativ reguliert werden, von größerer Bedeutung. Denkbar wären auch anti-Onkogene, die vermehrt aktiviert werden können, weil inhibitorische Proteine in ihrer Expression durch microRNAs verringert werden. Der umgekehrte Fall wären anti-tumorigene Gene, die hochreguliert werden, weil ihre regulierenden microRNAs nach BIRC5-Reduktion vermindert exprimiert werden. Die in NEC-DUE1 stark herabregulierten let-7 (n = 6) schienen nur für diese Zelllinie relevant zu sein, weniger für NEC allgemein (s. Abb. 19 und Anhang Abb. IV). Es macht für den malignen Zelltyp Sinn, mehrere Mitglieder einer microRNA-Familie gleichermaßen zu regulieren, da microRNA-Familien ähnliche Zielgene aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit regulieren. Die let-7 werden daher oft relativ prominent in Krebszellen dereguliert (Brennecke et al. 2005, Chirshv et al. 2019). In den NEC-G3-Array-Ergebnissen war nur die let-7e-5p dereguliert (s. Anhang Abb. X), diese aber wiederum nicht bei NEC-DUE1 (s. Anhang Abb. IV).

Die microRNA-130a-3p war eine der stärksten herunterregulierten microRNAs nach BIRC5-KD, in den NEC-G3-Tumorproben (BIRC5-Überexpression) war sie allerdings ebenfalls herunterreguliert (s. Anhang Tab. I und Anhang Abb. XI).

MicroRNAs können eine Vielzahl an Genen regulieren, da sie sequenzspezifisch an unterschiedliche mRNAs binden (s. 1.4). Hierbei sind bestimmte microRNAs potenter als andere und haben eine besonders hohe Zahl an Zielgenen. Eine Dysregulation einer dieser microRNAs könnte größere Auswirkungen auf die Zelle haben. Ob die

Qualität entscheidender als die Quantität ist, muss je nach Fall und Genen, die tatsächlich reguliert werden, überprüft werden. Das heißt, dass die Genregulation auch tatsächlich Auswirkungen haben muss und nicht kompensiert wird. Bei der Vielzahl von Genen, die manche microRNAs regulieren, steigt auch die Möglichkeit ungewollter Nebenwirkungen, also eine unerwünschte Regulation von Genen. Eine erste Überprüfung der Zielgene in den KEGG Signalwegen in Krebs (KEGG hsa05200), Apoptose (KEGG hsa04210), EMT und Zellzyklus (hsa04110) ergab erste Hinweise, welche microRNAs in welchen Bereichen der Krebsforschung vielversprechender waren (s. Tab. 5). Im Hinblick auf eine mögliche Krebstherapie könnte eine solche microRNA mehrere krebsrelevante Signalwege und tumorwachstumsfördernde Gene gleichzeitig regulieren. Im Vergleich zu anderen microRNAs sollen die drei microRNAs miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p die größte Anzahl an Zielgenen in den krebsrelevanten Bereichen regulieren. Im Fall der miR-124-3p ist die Gesamtzahl an Zielgenen größer als bei vielen anderen microRNAs und bekanntermaßen größer als bei nicht gewebespezifischen microRNAs (Lim et al. 2005). Im Vergleich zu miR-338-3p und 342-3p (2 der Top 3 hochregulierten microRNAs, s. Anhang Tab. I) ist die Zahl bekannter Zielgene annähernd 3-mal höher (s. Tab. 5). Gerade im Bereich KEGG Signalwege in Krebs und EMT hat diese microRNA die meisten Zielgene. Interessanterweise haben miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p diverse Überschneidungen in den Zielgenen, die sie regulieren (s. Abb. 18). Allgemein gibt es die meisten Überschneidungen in KEGG Signalwege in Krebs (hsa05200). Die Überschneidungen der miR-124-3p mit den anderen beiden microRNAs betrifft gut ein Viertel ihrer Zielgene, bei miR-23b-3p und 24-3p sind es je ein Drittel.

Die neuronal gewebespezifische, anti-tumorigene miR-124-3p wird insgesamt als äußerst auffällig eingestuft.

### 5.6.1 Epithelial-mesenchymale Transition - EMT

Die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein wichtigster Bereich der Tumorforschung, da die Auswirkungen aufgrund der Raumforderung der Metastasen je nach Lage verheerend für den Patienten werden können. Die EMT beschreibt den Phänotypwechsel einer Krebszelle und bildet die Voraussetzung zur Entstehung von Metastasen. Epitheliale Zellen bilden stabile Zell-Zell-Kontakte über Adhäsionsmoleküle, die zur Überprüfung der EMT als Markerproteine herangezogen werden. Hierzu gehört CDH1 (E-Cadherin, *Calcium-Dependent Adhesion Protein*, Epithelial). Gerade die miR-124-3p soll Zielgene im Bereich der EMT regulieren (s. Tab. 5), hierzu gehören

*ZEB2* (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2) und *SNAI2* (*SLUG*, Snail Family Transcriptional Repressor 2). *SNAI2* und *ZEB2* wurden als Zielgene der miR-124-3p in anderen Arbeitsgruppen bereits nachgewiesen (Liang et al. 2012, Ji et al. 2019). Beide Proteine inhibieren bekanntermaßen die Promotorregion von *CDH1* und fördern so EMT. Daher erfolgte zunächst eine Überprüfung der genannten Mitspieler in BIRC5-KD NECs im Vergleich zu den GIPZ n.s.. Da die miR-124-3p nach BIRC5-KD in den NEC-DUE1 am stärksten dysreguliert war, sollte eine Verringerung der *CDH1*-Inhibitoren sichtbar sein. Diese erste Überprüfung zeigte eine gegen EMT gerichtete Regulation durch Reduktion von *ZEB2* mit signifikanter Erhöhung von *CDH1* (s. Abb. 29). Nach BIRC5-KD wurde die mRNA von *CDH1* offenbar deutlich hochreguliert. In diesen BIRC5-KD Proben waren, wie unter 4.2 festgestellt, natürlich noch weitere microRNAs und auch Proteine, im Vergleich zu GIPZ n.s. dereguliert, die ergänzende oder entgegengerichtete Effekte erzeugt haben könnten. Das Ergebnis spiegelte den Gesamteinfluss des BIRC5-KD auf die EMT-Verschiebung wider. Dies könnte Einfluss auf die Invasivität von Krebszellen haben.

Anschließend wurde selektiv überprüft, ob mRNAs (Wirkungsbereich der microRNA) von *ZEB2* und *SNAI2* tatsächlich von miR-124-3p allein reguliert wurden. Als einziger Faktor wurde nur diese microRNA in den Zellen in ihrer Expression verändert, mit Mimics (AgomiRs) zur Hochregulation und Inhibitoren (AntagomiRs) zur Reduzierung. Es wurde zu Beginn der Versuchsreihe die transiente Wirkung der Mimics und Inhibitoren überprüft (s. Abb. 30). Später wurde von diesem Nachweis Abstand genommen (Erklärung s. 5.6.2). In jedem Versuchsdurchlauf wurde eine Hochregulation der microRNA durch die Mimics erreicht, die jedoch unterschiedlich stark ausfiel, sichtbar an den hohen Standardabweichungen. Hierbei wurden die von der Firma empfohlenen Konzentrationen von Reagenzien verwendet, in Kombination mit der Reversen Transfektion. Zusätzlich ist fraglich, ob eine 2000- oder 10 000-fache Erhöhung der microRNA-Konzentration nicht zu extrem für das Zellgefüge ist, da sie weit über das physiologische Maß hinausgeht. Dagegen erreichten die Inhibitoren in einzelnen Versuchsdurchläufen eine Reduktion um 62 % und 87 % (s. Abb. 30). Durch die Inhibitoren kann die Reduktion des Zielmoleküls (microRNA) nur gegen Null gehen. Eine Hochregulation ist dagegen rein theoretisch unendlich möglich.

Die verwendeten Mimics (AgomiRs) und Inhibitoren (AntagomiRs) unterscheiden sich erheblich in ihrer Wirkungsweise. Die Zelle stößt aber aufgrund erheblicher Störungen ihrer internen Abläufe an ihre Grenzen, ähnlich wie bei der artifiziellen Hochregulation

von Proteinen durch Plasmide (Vavouri et al. 2009, Tang and Amon 2013, Makanae et al. 2013, Stoebel et al. 2008).

Des Weiteren wirken die Mimics direkter als die Inhibitoren. Die Inhibitoren sind einzelsträngig und blockieren die endogenen microRNAs. Das bedeutet, dass sie mit den Ziel-mRNAs konkurrieren. Eine microRNA, die eine mRNA gebunden hat, kann auch nicht inhibiert werden, bis diese wieder frei ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine microRNA auf ein Inhibitor-Molekül trifft, muss daher hoch genug sein. Die Wirkung der Inhibitoren ist außerdem irreversibel. Ein Inhibitor-Molekül bindet eine microRNA. Die Mimics sind dagegen doppelsträngige Oligonukleotidmoleküle, die in RISC eingebaut werden, um ihre Funktion genauso auszuüben wie endogene microRNAs. Sie addieren ihre Wirkung im Grunde zu den bereits vorhandenen microRNAs hinzu. So gesehen, unterscheidet sich der Mimic-Duplex vom endogenen Duplex nur durch den synthetischen Passagierstrang. Die synthetische Sequenz soll keine Funktion ausüben. Die Sequenz des Leitstrangs ist dagegen identisch mit dem endogenen Strang (BioProbes 67 2012). MicroRNAs haben je nach Sequenz und Zelltyp eine ganz unterschiedliche Fluktuation. Die Halbwertszeit von Leitsträngen kann hierbei bis zu einem Tag und länger betragen, während Passagierstränge maximal nur wenige Stunden vorhanden sind. Die Stabilität der microRNAs im RISC-Komplex erhöht sich um das 100-Fache (Marzi et al. 2016, Kingston und Bartel 2019). Dies Abläufe gelten daher vermutlich auch für die Mimics.

Der Engpass der gesamten microRNA-Biogenese und Funktion ist die microRNA-RISC-Komplexbildung (Reichholf et al. 2019, Herzog et al. 2017, Treiber et al. 2019, Zlotorynski 2019). Da die Bindung der microRNA an ihr Ziel in den meisten Fällen nicht komplementär ist, erfolgt keine AGO2-vermittelte Spaltung und Degradation von Ziel und microRNA. Dies bedeutet, dass die microRNA intakt bleibt und wiederverwertet werden kann. Ein microRNA-Molekül kann so bis zu 50 Ziel-Transkripte regulieren (Haley und Zamore 2004, Baccarini et al. 2011). Das heißt, eine sehr potente microRNA mit hoher Halbwertszeit hat größere Auswirkungen als eine eventuell streng regulierte microRNA, die schneller degradiert wird. Das Ausmaß der Mimic-Wirkung ist dementsprechend schwer abzuschätzen. Dies kann auch eine Erklärung für die geringe Wirkung der Inhibitoren sein, obwohl die eingesetzte Konzentration im Vergleich zu den Mimics doppelt so hoch war.

Zur Überprüfung der EMT-Gene wurden die NEC-DUE BIRC5-KD Zellen mit den Inhibitoren behandelt, da die miR-124-3p nach KD hier hochreguliert war. In NEC-DUE1

war *ZEB2* und *SNAI2* nur in den NEC-DUE2 signifikant hochreguliert (s. Abb. 31). Die Wirkung der Inhibitoren hatte vermutlich im Fall der miR-124-3p nicht ausgereicht, um die Zielgene in beiden Zelllinien gleich zu regulieren. Trotz Blockierung einiger microRNA-Moleküle waren noch genügend frei, um der Inhibition entgegenzuwirken. Hierzu passt der Versuchsansatz von Baccarini et al. (2011), die zeigen konnten, dass, obwohl die microRNA-Biogenese gestoppt wurde, die Ziel-mRNA nicht im erwarteten Ausmaß zunahm. Hieraus schloss man, dass vorhandene microRNAs (noch) ausreichten, um die mRNAs abzufangen. Die Effektivität der Inhibition ist vermutlich abhängig von der Halbwertszeit der microRNA.

Eine weitere Erklärung wäre, dass nach BIRC5-KD weitere *SNAI2* und *ZEB2* regulierende microRNAs dereguliert wurden, die der späteren Inhibitorbehandlung entgegenwirken (s. Anhang Abb. IV). *SNAI2* und *ZEB2* sollen auch von miR-218-5p (Shi et al. 2017) und miR-193a-3p (Takahashi et al. 2017) reguliert werden. Dass nach Änderung nur einer microRNA letztlich doch ein Effekt sichtbar war, könnte auf den großen Einfluss und die Bedeutung der miR-124-3p für die EMT hindeuten.

Bei der Verwendung der microRNA-Mimics in den NEC-DUE GIPZ n.s. Zellen waren die Ergebnisse erwartungsgemäß eindeutiger. Hier zeigte sich generell eine signifikante Regulation von *SNAI2* mit Auswirkungen auf *CDH1*, welches im Endeffekt signifikant hochreguliert wurde (s. Abb. 31). *SNAI2* konnte damit als Zielgen der miR-124-3p bestätigt werden.

### 5.6.2 Validität der microRNA-Assays

Die microRNA-Assays (Thermo Fisher) dienen der Überprüfung der relativen microRNA-Expression mittels qRT-PCR. Ihre Funktionalität sollte näher beleuchtet werden. Der direkte Nachweis der microRNAs-Expression nach Verwendung von Mimics und Inhibitoren wurde von der Firma nicht empfohlen. Der Nachweis der Mimic-vermittelten microRNA-Hochregulation sollte durch entsprechende Assays mittels qRT-PCR keine Aussagekraft haben. Stattdessen wurde empfohlen, die Expression/Translation der Zielgene als Indiz zu verwenden. Denn die Menge exogener microRNA soll nichts darüber aussagen, ob diese auch funktional sind (Thomson et al. 2013). Dies ist aber vielleicht genau der Punkt, der gerade Mimics leichter bzw. vertrauenswürdiger im Rahmen ihrer Verwendung macht. Wie bereits erwähnt (s. 5.1), können bei enormer Überexpression (Expressionsplasmid) artifizielle Nebeneffekte erzeugt werden. MicroRNAs arbeiten aber nur als Teil des RISC-Komplexes. Es können

nur so viele microRNAs genutzt werden, wie RISC-Moleküle zur Verfügung stehen. Die Funktionalität exogener microRNAs über ihre Zielgene zu belegen, ist im Fall von wenig bekannten microRNAs problematisch. Man bräuchte ein bereits im verwendeten Versuchsmodell validiertes Zielgen als Positivkontrolle.

Es wird weiter argumentiert, dass die Zuführung exogener microRNAs über Feedbackmechanismen zu einer Reduktion endogener microRNAs führte. Umgekehrt konnte die Zuführung von Inhibitoren zu einer Hochregulierung der endogenen microRNAs führen (Thomson et al. 2013). Dieser Effekt kann in allen streng regulierten Systemen auftreten. Das zelluläre System ist nicht starr, sondern versucht im physiologischen Gleichgewicht zu bleiben (negative oder positive Feedbackloops). Daher sollte nur die mRNA- oder Proteinebene bewertet werden, da der Effekt nur durch (tatsächlich) funktionale microRNAs/Mimis ausgelöst worden sein konnte. Hierbei erfolgte der Vergleich mit der Negativkontrolle, einer konstruierten nicht funktionellen microRNA.

Thomson et al. (2013) zeigte, dass nach Mimic-Behandlung eine hohe Zahl an microRNA-Molekülen in der qPCR gemessen wurde. Diese überstiegen ein Vielfaches der endogenen microRNA (>1000-Fache, s. Abb. 30). Diese seien aber weitestgehend nutzlos, da diese exogenen doppelsträngigen microRNAs in ihrer Masse gar nicht an RISC gebunden wurden und damit auch nicht funktionell waren. Stattdessen wurden sie in Vesikeln abgelagert, wo ARGO-Proteine sie nicht mehr erreichen konnten.

Natürlich konnten nur so viele microRNAs eingebaut werden, wie RISC- bzw. ARGO-Moleküle zur Verfügung standen, die aber nicht hochreguliert wurden. Der Überschuss an microRNA-Molekülen lagerte sich letztlich in Aggregaten innerhalb der Zellen ab. Es gibt also eine natürliche Grenze dafür, wie viele microRNAs überhaupt wirken können. Möchte man die Wirkung von microRNAs über das physiologische Maß hinaus erhöhen, müsste man ein ARGO-RISC-microRNA-Konstrukt verwenden. Ein derartiger Komplex (s. Abb. 9) wäre aber sehr groß, um in eine Zelle eingebracht zu werden. Die Menge exogen zugeführter und in RISC eingebauter microRNA wurde mittels Immunpräzipitation bei Thomson et al. (2013) überprüft. Die Menge der microRNAs soll der endogener microRNAs entsprechen haben. Die Lokalisation von exogenen microRNAs in Vesikeln und Lysosomen wurde anhand von fluoreszierender siRNA überprüft. Leider wurde nicht gezeigt, dass die fluoreszenzgekoppelte siRNA tatsächlich genauso effektiv wie die native siRNA in ARGO eingebaut wurde. Es stellt sich auch die Frage, wie schädlich die microRNA-Aggregatbildung für die Zelle war.

Damit nicht unnötig viele Komponenten für einen Mimic- oder Inhibitorversuch

verbraucht werden, sollten initial Wirkungskurven erstellt werden. Ab einer bestimmten Konzentration lässt sich schließlich keine höhere Wirkung mehr erreichen und bei den meisten Nachweisversuchen (neue Zielgene) ist das Erreichen eines sichtbaren, signifikanten Effekts ausreichend und kein maximaler Effekt. Auf diese Weise sollte der Stress durch eventuelle Aggregatbildung verringert werden. Für diese Arbeit wurden nachfolgende Mimic- bzw. Inhibitortransfektionen über ihre Wirkung beurteilt.

### **5.6.3 Migration von Tumorzellen als Teil der EMT**

Die Migrationsfähigkeit von Zellen ist eine Folge der EMT. Durch die Behandlung der NEC-Zellen mit miR-124-3p Mimics soll im Rahmen von Wund-Assays überprüft werden, ob eine Änderung des microRNA-Gehalts Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten hat. Eine weitere bekannte EMT-regulierende microRNA, die miR-143-3p, wurde zum Vergleich parallel mitgeführt. Diese microRNA war in den Primärtumorproben der Colon-NECs, gemeinsam mit miR-145-5p, am auffälligsten herunterreguliert (s. Anhang Tab. II und Abb. XI). Das miR-143/145-Cluster gilt als Tumorsuppressor und ist vor allem an der Regulation von EMT beteiligt (Lei et al. 2017).

Die initiale Überprüfung des microRNA-Gehalts nach transienter Reverser Transfektion der Zellen mit den jeweiligen Mimics zeigte selbst nach 96 h noch eine Hochregulation der microRNAs (auch wenn keine Aussage über deren Funktionalität getroffen werden konnte). Die Hochregulation der miR-124-3p, ist selbst im schwächsten Durchlauf mehr als 20-fach höher, als der endogene Gehalt der Kontrolle (s. Abb. 32). Die microRNAs konnten demnach bis Versuchsende ihre Funktion ausüben.

Die NEC-DUE2 war aufgrund ihres Wachstumsverhaltens für diesen Versuch besser geeignet, als die NEC-DUE1 (s. 2.1.1 und Abb. 10).

Der Vergleich beider EMT-regulierender microRNAs ergab abschließend einen deutlichen und signifikanten Einfluss auf die Migration der Zellen nach 96 h (s. Abb. 33 und Abb. 34). Die Ergebnisse zeigen, dass die miR-124-3p einen Einfluss auf die Migration der NEC-Zellen hatte. Obwohl nach Überprüfung der microRNA-Hochregulation durch die Mimics (s. Abb. 32), die miR-143-3p durchschnittlich höher reguliert wurde als die miR-124-3p, ist der gemessene Effekt auf die NEC sehr ähnlich. Dies könnte bestätigen, dass der in der qPCR gemessene Gehalt keine Aussage über die Wirkung liefert und der limitierende Faktor der RISC-Komplex ist. Dieser Migrationsversuch liefert nur einen ersten Einblick. Notwendig sind weiterführende Invasionsassays und In-vivo-Versuche, die aufzeigen könnten, ob mit miR-124-3p und miR-143-3p behandelte NEC-Tumore schlechter metastasieren können. Da die miR-124-3p nicht nur EMT-

relevante Gene reguliert, sondern bis ~1900 Zielgene, wurden weitere, für die Krebsforschung relevante Gene überprüft.

#### 5.6.4 Bestätigung weiterer Zielgene der microRNA-124-3p

Weitere für die Krebsforschung interessante Zielgene sind *RELA* (RELA Proto-Onkogen, NF- $\kappa$ B-Untereinheit), *NFKB1* (*Nuclear Factor Kappa B Subunit 1*, P50, NF- $\kappa$ B1) und *STAT3* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) (s. Tab. 5). NFKB1 (P50) und RELA (P65) sind 2 von 5 Mitgliedern der NF- $\kappa$ B-Proteinfamilie. NFKB1 muss proteolytisch aus einer Vorläuferform (pro-Form, P105) gespalten werden. Alle Familienmitglieder können Homo- und Heterodimere bilden, die eine inaktive Form, lokalisiert durch Bindung an I $\kappa$ B (Inhibitoren von NF- $\kappa$ B), im Zytosol bilden. NFKB1 funktioniert als transkriptioneller Repressor, kann aber durch Dimerisierung mit RELA zu einem transkriptionellen Aktivator werden. Obwohl NF- $\kappa$ B als Teil der Immunantwort Krebszellen durch Rekrutierung von zytotoxischen Immunzellen eliminiert, spielt es eine krebsfördernde Rolle in Verbindung mit inflammatorischen Prozessen. Die konstitutive Aktivität von NF- $\kappa$ B fungiert als Überlebensfaktor, da es Apoptose inhibiert und Proliferation stimuliert. Im Rahmen von chronischen Inflammationsprozessen kommt es zu einer positiven Verstärkung zwischen STAT3 und NF- $\kappa$ B. Beide Transkriptionsfaktoren regulieren gemeinsam anti-apoptotische und Zellzyklus-relevante Zielgene und rekrutieren sich gegenseitig zu Promotoren relevanter Gene (Hoesel und Schmid 2013). Diese Eigenschaften machen diese drei Proteine zu einer äußerst funktionalen Tumorigenesemaschinerie, die durch miR-124-3p gehemmt werden könnte.

Im BIRC5-KD der NEC-DUE1 war die miR-124-3p am stärksten hochreguliert. Ein erster Vergleich zwischen unbehandelten BIRC5-KD und GIPZ n.s. auf Proteinebene zeigt den gesamten Einfluss aller deregulierten microRNAs nach BIRC5-KD in NEC-DUE1 auf die untersuchten Proteine. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Verminderung der Vorläuferform von NFKB1 (pre-NFKB1, P105), für NFKB1 ist das Ergebnis schwächer, da eventuell noch Moleküle vorhanden waren. STAT3 und RELA weisen bei NEC-DUE2 die deutlichste Reduktion auf. In den GIPZ n.s. Proben der NEC-DUE1 ist auch eine RELA-Doppelbande erkennbar, die bei den NEC-DUE1 BIRC5-KD nicht auftrat und bei NEC-DUE2 nicht sichtbar ist (s. Abb. 35). Nach BIRC5-KD ließ sich also ein Einfluss auf NF- $\kappa$ B und RELA feststellen.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die miR-124-3p diese Zielgene überhaupt regulieren konnte, indem sie als einziger Faktor über Mimics und Inhibitoren in ihrer

Expression verändert wurde. Es wurde also der eigentliche Wirkungsbereich der microRNA betrachtet, die mRNA der Zielgene (s. Abb. 36).

*NF-κB*, *RELA* und *STAT3* betreffend waren in den mit Mimics behandelten Zellen jeweils eine deutlich signifikante Herunterregulation der mRNAs für beide Zelllinien sichtbar, mit nur einer Ausnahme von *STAT3* in den NEC-DUE2. Auch nach Verwendung der Inhibitoren zeigte sich die erwartete signifikante Heraufregulation der entsprechenden mRNA-Populationen für *RELA* und *NF-κB*, mit Ausnahme von *STAT3* in NEC-DUE1 BIRC5-KD und *RELA* in NEC-DUE2 BIRC5-KD. Auf mRNA-Ebene fand somit eine Regulation der Zielgene durch miR-124-3p statt (s. Abb. 36). Die Frage war nun, ob diese Manipulation des mRNA-Gehalts Einfluss bis zur Proteinebene hatte.

Das Western Blot Ergebnis zeigt die Proteinexpression der untersuchten Zielgene von miR-124-3p nach Behandlung mit den Mimics und Inhibitoren (s. Abb. 37). Die densitometrische Auswertung fasst hierzu mehrere Western Blot Durchläufe zusammen (s. Abb. 38). Die Proteinexpression der Zielgene war für die NEC-DUE1 sowohl im Rahmen der Mimic- als auch der Inhibitorbehandlung signifikant für erstere herunter- bzw. für zweitere heraufreguliert. Die NEC-DUE2 zeigte die gleichen Ergebnisse mit Ausnahme von NF-κB bei den nativen Zellen. Eine Überexpression der miR-124-3p hatte also eine Reduktion der Proteinexpression der Zielgene zur Folge. Ihre Inhibierung führte dagegen zu einer Erhöhung der Proteinmengen in beiden Zelllinien. Die Mimic-Wirkung bei NEC-DUE2 erschien hierbei schwächer mit einer durchschnittlichen Regulation der Zielgene (Ausnahme NF-κB) auf 56 % verglichen mit NEC-DUE1, wo der Proteingehalt effektiv im Durchschnitt auf 42 % gesenkt wurde (Ausnahme NF-κB bei den nativen 58 %).

Nachfolgende Versuche müssten nun aufzeigen, inwieweit der Einfluss der miR-124-3p die Vitalität oder die Überlebensfähigkeit der NEC-Zellen und Tumore beeinflusst. Aufgrund ihrer Rolle in EMT und auffälligen Herunterregulation sollten auch die tumorabhängigen miR-143- und miR-145-Duplexe im Rahmen einer Co-Behandlung der Tumorzellen überprüft werden. Eine Kombination mit neuen oder gängigen Therapiemethoden (Chemotherapeutika) ist ebenfalls möglich. In Leberkrebs (hepatozelluläres Karzinom) konnte so eine Sensitivierung der Tumore gegenüber dem Wirkstoff Sorafenib (Proteinkinaseinhibitor) erreicht werden (Dong et al. 2022). Im gleichen Krebstyp bewirkte die miR-124-3p eine Verminderung der Invasivität und Metastasierung der Krebszellen (Majid et al. 2020).

Diese Arbeit bestätigt im Rahmen der Regulation von EMT über *ZEB2* und *SNAI2* und

der NF- $\kappa$ B-STAT3-Achse die funktionale Bedeutung der miR-124-3p als Tumorsuppressor und damit als vielversprechenden Kandidaten im Bereich von Krebstherapien. Da die Regulation von microRNAs in Abhängigkeit zu BIRC5 entdeckt wurde, ist für ein besseres Verständnis der Zusammenhänge noch die Frage offen, wie BIRC5 überhaupt dazu in der Lage sein kann.

### 5.7 Suche nach dem microRNA-Regulationsmechanismus über BIRC5

Die vorangegangenen Ergebnisse haben gezeigt, dass ein verminderter BIRC5-Gehalt zur Deregulation von microRNAs führte. Die Ergebnisse der microRNA-Array-Ergebnisse nach BIRC5-KD sprechen für einen selektiven Mechanismus, da nur bestimmte microRNAs dereguliert waren. Außerdem zeigten sich Populationen gegenteilig regulierter microRNAs. BIRC5 könnte, neben seinen anderen Funktionen auch auf diese Weise Krebswachstum unterstützen, da einige der betroffenen microRNAs krebssrelevante Gene regulieren (z. B. miR-124-3p). Es stellt sich die Frage, welche Proteininteraktionen dies ermöglichen konnten.

Eine mögliche Erklärung untersuchte die Gruppe um Andersson et al. (2017). Diese vermuteten allerdings einen globalen microRNA-Regulationsmechanismus. BIRC5 soll hierbei das Protein DICER (*Helicase with RNase Motif, RNA helicase motif containing a DEXH box*) negativ regulieren. DICER ist entscheidend für die abschließende Prozessierung der microRNAs im Zytoplasma und den korrekten Einbau des Leitstrangs in den AGO-Komplex unter Zuhilfenahme der Chaperonmaschinerie (Hitzechockproteine *Heat Shock Protein 90*- HSP90 und HSC70/HSPA8- *Heat Shock Cognate 71 KDa Protein*) und RNA-Bindungsproteine (RBPs, darunter TARDBP, *TAR DNA Binding Protein*). Eine Manipulation von DICER muss global Auswirkungen auf microRNAs haben (s. 1.4) (Song und Rossi 2017, Paturi und Deshmukh 2021).

Obwohl die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit einen selektiveren Mechanismus befürworten, wurde eine mögliche Verbindung zu DICER überprüft. Die gleichen BIRC5-KD Proben, die auch für die Array-Analyse verwendet wurden und dort signifikante Ergebnisse gezeigt hatten, wurden auf eine Deregulation von *DICER* überprüft (s. Abb. 39). Dies entsprach insofern dem Versuchsansatz von Andersson et al. (2017), als diese den Zusammenhang ebenfalls über eine Reduktion der BIRC5-Expression mittels YM155-Behandlung analysierten, die zu einer Hochregulation von DICER führte. Da die NEC-DUE1 bisher die robusteste microRNA-Deregulation aufwies, hätte hier eine signifikante Heraufregulation von *DICER* sichtbar sein müssen. *DICER* wurde nach BIRC5-KD aber nicht signifikant hochreguliert (s. Abb. 39).

Nachfolgend konnte die Gruppe von Andersson et al. (2017) nachweisen, dass BIRC5 an den *DICER*-Promotor mittels Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) bindet. Bei der Verwendung von Überexpressionssystemen besteht immer die Möglichkeit, dass diese artifizielle Umstände erzeugen, die unter normalen Bedingungen *in vivo* sowohl zeitlich als auch räumlich nicht auftreten können. Für die ChIP wurde Chromatin von Concanavalin A stimulierten Leukozyten verwendet. Die Frage ist also, ob der *DICER*-Promoter auch im normalen Arbeitsmodus der Zelle (G1-Phase) für BIRC5 erreichbar gewesen wäre, denn die Leukozyten befanden sich vermehrt in Zellteilung.

Die NEC-DUE-Proben befanden sich in dem Zustand, indem die microRNA-Deregulation nach BIRC5-KD auch beobachtet wurde – in der G<sub>0</sub>-Phase der Krebszellen. Die Synthese von RISC-Komplexen während der Zellteilung sollte nicht derart relevant sein, wie während der Phase des Zellzyklus, in der die Gen-Transkription und Proteinsynthese und damit die Regulation von mRNAs hauptsächlich stattfinden. Die Möglichkeit einer BIRC5-vermittelten globalen microRNA-Biogeneseregulation über die Inhibierung des *DICER*-Promoters erschien aufgrund der Datenlage dieser Arbeit unwahrscheinlich. Es wurde daher weiter nach einem selektiveren Mechanismus und anderen Bindungspartnern gesucht.

### 5.7.1 Co-Immünpräzipitation – Co-IP

Die Suche nach BIRC5 Bindungspartnern, die an der Regulation der microRNA-Biogenese beteiligt sein könnten, wurde mittels Co-Immünpräzipitation (Co-IP) und anschließender Identifikation der Proteine mittels Proteomanalyse im Massenspektrometer (BMFZ, HHU) angegangen.

Die beste Ausgangslage für die Co-IP lieferte die NEC-DUE1-Zelllinie, da diese zuverlässig endogenes BIRC5 exprimiert (s. Abb. 17). Die Proben wurden aus der gängigen Zellkultur, aus vitalen, unbehandelten Zellen gewonnen. Dies entsprach dem gleichen Zustand, in dem die BIRC5-beeinflusste microRNA-Regulation festgestellt wurde (s. 4.2.4). Proteine, die hieran beteiligt waren, sollten unter den gleichen Bedingungen nachgewiesen werden. Nur so wurde der normale Arbeitsmodus der Zelle betrachtet und damit auch die Interaktionen, die BIRC5 in dieser Phase bevorzugt einging. In der Interphase findet der Hauptteil der Proteinbiosynthese statt. Hier hätte eine BIRC5-vermittelte microRNA-Regulation den größten Einfluss gehabt. Die NEC-DUE1 sind Krebszellen, d. h., dass die BIRC5-vermittelte microRNA-Regulation relevant für das Krebswachstum bzw. die Aufrechterhaltung der Tumorvitalität war.

Proteininteraktionen mit ausschließlich endogen exprimiertem BIRC5 waren die am wenigsten manipulierte Co-IP-Variante. Eine artifizielle Hochregulation mittels Expressionsplasmid hat zwar den Vorteil, gesuchte Proteine in großen Mengen zu erzeugen, die Menge potentieller Bindungspartner wird aber nicht erhöht. Diese Methode erzeugt zusätzlichen Stress für die Zelle, da ein fremdes, zusätzliches, künstliches Konstrukt eingebracht wird und Ressourcen verbraucht werden, um das Protein verstärkt zu synthetisieren (Rice et al. 2017, Shah et al. 2013, Bolognesi und Lehner 2018). Das innere Gefüge der Zelle wird gestört. Die Folgen einer Überexpression eines bestimmten Proteins für die Zelle sind demnach schwer abschätzbar. Es könnten Interaktionen zustande kommen, die so *in vivo* nicht stattfinden (Vavouri et al. 2009, Tang und Amon 2013, Makanae et al. 2013, Stoebel et al. 2008).

Für die Analyse der gewonnenen massenspektrometrischen Daten wurde die Normalisierung über MaxLFQ (Normalisierungsprozedur MaxLFQ *generic label-free quantification technology*, Cox et al. 2014) verwendet. Sie ermöglichte den relativen quantitativen Vergleich aller Co-IP-Durchläufe.

Die Expression von endogenem BIRC5 war im Rahmen der Co-IP- und späteren Proteomanalyse insgesamt ausreichend. Allerdings gab es auch Proteine mit deutlich höheren Intensitäten als BIRC5 (s. Anhang Abb. XIV), die durch eine Bindung an das Kaninchen IgG des Antikörpers zu Stande kamen. Diese unspezifische Kreuzreaktion wird durch das Mitführen der entsprechenden IgG-Kontrolle im Rahmen der Co-IP ausgeschlossen. Die IP-Ergebnisse (s. Anhang Abb. XIV) und Western Blots zeigten, dass BIRC5 nicht an Kaninchen IgGs gebunden hat (s. Abb. 40). Zu den unspezifisch gebundenen Proteinen gehörten Histone, Tubuline, Myosine, Hitzeschockproteine und ATP-Synthase-Untereinheiten, die in hohen Mengen in Zellen vorkommen. Bindungspartner dieser Proteine würden wiederum Intensitäten bei der IgG-Kontrolle aufweisen. Unspezifische IP-Ergebnisse wurden so identifiziert und aus der Analyse herausgenommen. Die in der *Heatmap* dargestellten Proteine waren in ihren Intensitäten geringer als BIRC5- Ausnahme Histon H3.2 (HIST2H3A) (s. *Column Z-Score*, Anhang Abb. XIV). Proteine mit Intensitäten in der Kontrolle wurden in der *Heatmap* dargestellt, wenn sie als Bindungspartner von BIRC5 bereits bekannt waren oder nur eine geringe Bindung an die IgG-Kontrolle zeigten. Diese Proteine müssen über weitere Co-IPs (n = 5) in Verbindung mit einer Prüfung auf Signifikanz bestätigt werden (s. 4.7.1, S. 122). Die Resultate der endogenen BIRC5-IP n = 8 wurden mit der KEGG-Pathway-Analyse abgeglichen. Es zeigte sich, dass erwartungsgemäß einige potenzielle

Bindungspartner im Bereich Zellzyklus, Zellteilung, Apoptose und Signalwegen in Krebs einzuordnen sind (s. Tab. 22). Aufgrund der bekannten anti-apoptotischen Eigenschaften und der Funktion im Rahmen der Zellteilung wurden diese Bindungspartner erwartet. Darunter fallen CDK1 (*Cyclin Dependent Kinase 1*) und MCM5 (s. Anhang Abb. XIV). Andere bekannte BIRC5-Bindungspartner wurden nach Datenbankrecherche nicht identifiziert (s. Tab. 23).

Im Fall des IAPs XIAP haben die eingangs dargestellten Western Blot Ergebnisse bereits gezeigt, dass der BIRC5-KD keinen Einfluss auf die XIAP-Expression hatte (s. Abb. 5). Die Arbeit von Arora et al. (2007) diskutierte hierzu einen XIAP-XAF1 Komplex (XAF1 = *X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-associated factor 1*). Ohne XAF1 konnte keine direkte Interaktion zwischen BIRC5 und XIAP beobachtet werden. Der XIAP-XAF1-BIRC5-Komplex führt letztlich zu Degradation von BIRC5 und fördert Apoptose. Die Arbeit von Zumbrägel et al. (2017) liefert weitere Daten, dass BIRC5 physisch nicht mit XIAP interagiert oder einen Effekt auf dessen Funktion hat, weder in Anwesenheit noch Abwesenheit von Smac/DIABLO.

Im Fall von Smac/DIABLO und BIRC5 wurden Expressionsplasmide zur Hochregulation in Zellen (Pavlyukov et al. 2011) oder GST-Fusionskonstrukte eingesetzt (Guvenc et al. 2012). Arora et al. (2007) identifizierten Probleme mit GST-Tags (Eckelman et al. 2006), denn diese übertrugen artifizielle Eigenschaften auf BIR-Domänen durch ihre Neigung zur Oligomerisierung. Hierdurch kam es zu unnatürlichen Interaktionen. Bei der Untersuchung einer BIRC2- und BIRC5-Interaktion wurden die Zellen ebenfalls mit Expressionsvektoren beider Proteine transfiziert, um ausreichende Mengen der Proteine zu erzeugen (Soo-A Jung et al. 2015).

Im Bereich der Zellteilung sind Borealin, INCENPIN und Aurora B diskutierte Bindungspartner (Jeyaprakash et al. 2007, Klein et al. 2006, Noton et al. 2006). BIRC5 bildet mit den chromosomalen Passagier-Proteinen einen Komplex (CPC). Bestandteil dieses Komplexes sind unter anderem Aurora B und Borealin (HDAsra-B/CDCA8) (Rosa et al. 2006, Adams et al. 2001, Gassmann et al. 2004, Sampath et al. 2004). Arbeiten, die diese Interaktionen nachwiesen, verwendeten Substanzen zur Synchronisation der Zellen. Aphidicolin ist ein reversibler Inhibitor der eukaryotischen DNA-Replikation und blockiert die Zellen in der frühen S-Phase. Colcemid hemmt die Mitose während der Metaphase durch Inhibition der Formierung der Teilungsspindel. Die Zelle reguliert die relevanten Proteine entsprechend hoch, was deren Nachweis ermöglicht.

Es zeigt sich also, dass bestimmte Interaktionen erst dann nachgewiesen werden können, wenn die notwendigen Bedingungen vorherrschen und potentielle Interaktionspartner auch in ausreichenden Mengen vorhanden sind. Gerade Prozesse wie Apoptose und Zellteilung werden streng reguliert.

Der CPC-Komplex ist wichtig für die bipolare Spindelformation während der Zellteilung (Rosa et al. 2006). Entscheidend ist aber, dass für diesen Prozess nicht ausschließlich BIRC5, sondern der BIRC5-RAN-Komplex relevant ist (RAN-GTPasen, *GTP-Binding Nuclear Protein Ran*). Der BIRC5-RAN-Komplex reguliert und stabilisiert die Mikrotubuli während der Spindelformation durch Rekrutierung von RAN-Effektormolekülen, darunter TPX2 (*Targeting Protein For Xklp2, TPX2 Microtubule Nucleation Factor*). BIRC5 ist aber nur in der Lage, mit Hilfe von RAN, TPX2 zu rekrutieren (Xia et al. 2008, Canovas et al. 2008). Deletion von RAN-GTPase führt zu ähnlichen mitotischen Defekten wie eine Inhibition von BIRC5 (Rosa et al. 2006, Boudhraa et al. 2020). TPX2 wurde nicht in der IP gefunden.

Die RAN-GTPase zeigte eine hohe Präsenz mit einer deutlichen Signalintensität in den IPs mit monoklonalem Antikörper von Invitrogen. Im Vergleich hierzu ist die Intensität für den polyklonalen Antikörper (Novus Biologicals – NB) eher gering, liegt aber über der IgG-Kontrolle (s. Anhang Abb. XIV). Des Weiteren ermöglicht BIRC5 die Rekrutierung des CPC an das Zentromer über Histon H3 (Kelly et al. 2010, Du et al. 2012). Histon H3.2 (HIST2H3A) wurde in der Co-IP nachgewiesen (s. Anhang Abb. XIV).

Die bekannte Funktion von BIRC5 im Bereich der Zellteilung kann also in den Co-IP-Ergebnissen z.T. wiedergefunden werden (s. Tab. 5). GTPasen und ATPasen sind bereits untersuchte Interaktionspartner von BIRC5, wobei eine Bindung an die enzymatische Domäne erfolgt (Fortugno et al. 2003). Diese Bindungspartner wären damit realistisch (s. Anhang Abb. XIV).

Es wurden verschiedene Hitzeschockproteine, wie HSP90AA1, in den BIRC5-Co-IPs identifiziert, die allerdings in vielen Fällen an die IgG-Kontrolle gebunden haben (s. Anhang Abb. XIV). Bei der Überprüfung der Proteininteraktionen von Chaperonen werden Zellen generell einer Inkubation bei 42 °C, einer erhöhten, aber nicht letalen Hitzebelastung, ausgesetzt. Hierdurch werden Hitzeschockproteine verstärkt exprimiert, um denaturierte Proteine wieder korrekt zu falten (Fortugno et al. 2003). Dieser Prozess ist evolutionär sehr alt und hochkonserviert und erfolgt u. a. bei Fieber (Feder und Hofmann 1999). HSP90 und HSP60 werden in den meisten Säugerzellen aber auch bei normalen Temperaturen exprimiert.

Die Problematik der Co-IP ist, dass sie sehr von der Spezifität des zum Nachweis verwendeten Antikörpers abhängig ist. Zudem ist sie eher dazu geeignet, stabile und starke Interaktionen nachzuweisen. Während der Durchführung kann der gesuchte Interaktionspartner wieder verloren gehen und an seine Stelle andere Proteine gelangen. Derzeit gängige Methoden zum Nachweis von Proteininteraktionen bieten außerdem keinen störungsfreien Ansatz. Hierzu gehört die Verwendung von Fusionsproteinen (Tags für Co-IP, Yeast two-hybrid, Luciferase Assays) und *Crosslinking*. Alle sind mehr oder weniger invasiv und verändern die zu untersuchenden Proteine (Fusionsprotein). Zur Verbesserung der Co-IP-Ergebnisse könnte ein N- und ein C-terminales Tag in parallelen Ansätzen verwendet werden, damit ein Abschnitt des Proteins unverändert bleibt. Dies würde die Spezifität erhöhen und die Ergebnisse können mit den bisherigen Resultaten verglichen werden.

Der polyklonale NB Antikörper hatte in den hier dargestellten Versuchen die höchste Spezifität zur Bindung von BIRC5. Er bindet in einem mittleren Abschnitt von BIRC5, so dass C- und N-Terminus des Proteins für Proteininteraktionen frei waren (s. 3.3.7). Die gesuchte Proteininteraktion könnte aber auch gerade diesen Bereich von BIRC5 benötigen. Für eine nicht-invasive Verbesserung der Co-IP-Ergebnisse könnten andere Antikörper verwendet werden, die am C- oder N-Terminus binden oder weitere BIRC5-überexprimierende Tumortypen überprüft werden. Sie müssten weitaus höhere Mengen BIRC5-exprimieren, um eindeutigere Ergebnisse zu liefern.

### **5.7.2 Diskussion der BIRC5-abhängigen microRNA-Regulation**

Die bisherigen Ergebnisse sprechen für eine selektive Regulation bestimmter microRNAs, die während der microRNA-Biogenese erreicht werden kann. Gesucht wurde ein plausibler Mechanismus, an dem BIRC5 unter Beteiligung anderer Proteine diese Funktion erfüllen könnte.

MicroRNAs durchlaufen auf ihrem Prozessierungsweg zahlreiche Stellen, an denen sie reguliert werden. Ihre Biogenese beginnt im Zellkern mit der Transkription der primicroRNA aus ihrem Gen, läuft weiter über die Verarbeitung im Mikroprozessor-Komplex, dem Export der pre-microRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma, bis hin zur Integration in den RISC-Komplex. Involviert sind zahlreiche regulatorische Proteine und Mechanismen (Treiber et al. 2017).

Die IP-Ergebnisse lieferten in Verbindung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen Hinweise für realistische Bindungspartner der BIRC5-beeinflussten microRNA-Biogenese. Es sind BIRC5-Interaktionspartner bekannt, die auch an der microRNA-

Prozessierung beteiligt sind (s. 1.3.2 und 4.7.4). Zu nennen sind die bereits erwähnte Verbindung zur RAN-GTPase (Xia et al. 2008, Xia, Canovas et al. 2008), die am Transport der microRNAs aus dem Zellkern beteiligt ist und die Interaktion mit ATPasen, zu denen Hitzeschockproteine und Helikasen gehören. Insgesamt wurden im Rahmen der BIRC5-Co-IP 5 verschiedene DDX-Proteine (DEAD-Box Helikasen) gefunden (s. Anhang Abb. XIV). Eine Bindung von BIRC5 wurde an DDX5 (DEAD-Box Helikase 5, P68, ATP-abhängige RNA Helikase), DDX39A, DDX39B (DEAD-Box Helikase 39A und 39B), DDX24 (DEAD-Box Helikase 24) und EIF4A3 (DDX48, *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A3*) festgestellt.

Die Bindung an Hitzeschockprotein HSP90AA1 (s. Anhang Abb. XIV) ist bekannt. Der BIRC5–HSP90 Komplex ist notwendig für den korrekten Ablauf der Mitose und den mitochondrialen Zweig der Apoptose (Fortugno et al. 2003, Plescia et al. 2005). Die Verbindung zu microRNAs besteht darin, dass HSP90 an der Beladung des AGO-Komplexes (RISC-Komplex) mit dem microRNA-Duplex (Zytoplasma) beteiligt ist (s. 1.4), einem der späteren Schritte der microRNA-Biogenese.

Für eine selektivere Regulation kommt die Prozessierung der pri-microRNAs über den Mikroprozessor-Komplex in Frage, einem der frühesten Prozessierungsschritte im Zellkern (s. 1.4). Der Mikroprozessor-Komplex besteht unter anderem aus DROSHA und DGCR8. In diesem Zusammenhang ist bereits eine ganze Bandbreite an regulatorischen Proteinen, die RNA-Bindungs-Proteine (RBP), bekannt – z. B. LIN28B. Die Arbeit von Treiber et al. (2017) gibt hierzu einen Einblick in das Ausmaß von RBPs, die nachweislich microRNAs regulieren. Überprüft wurden Lysate aus 11 verschiedenen humanen Krebszelllinien (darunter Prostata-, Lungen-, Brust-, Kolorektalkrebs und Melanoma) und 72 verschiedenen pre-microRNAs. Gefunden wurden 180 Proteine (RNA-bindende Proteine wie Helikasen, hnRNPs, tRNA Ligasen), die u. a. an die *Loop*- oder *Stem*-Sequenz binden und so spezifisch nur bestimmte microRNA-Subpopulationen regulieren. Entsprechend wurden nach Abgleich mit der BIRC5-IP TARDBP, KHSRP, DDX5, DARS und MARS als selektive microRNA regulierende RBPs identifiziert (s. Anhang Abb. XIV).

Insbesondere Helikasen können an der Veränderung der pri-microRNA-Struktur oder Aktivität des Mikroprozessors beteiligt sein. DDX5 entwindet doppelsträngige RNAs als Teil des DROSHA-Komplexes (Hong et al. 2013, Janknecht 2010). DDX17 ist mit DDX5 am nächsten verwandt (Moy et al. 2014). Beide DDX-Proteine haben einen positiven Einfluss auf die microRNA-Regulation einer Sub-Population (Dardenne et al.

2014, Fukuda et al. 2007, Treiber et al. 2017). In einer basalen Brustkrebszelllinie führte die Reduktion von DDX5 zur Herunterregulation von 41 microRNAs (Wang et al. 2011).

Würde man einen hemmenden Einfluss von BIRC5 auf DDX5 annehmen, waren hierzu entsprechend 8 microRNAs nach BIRC5-KD in den Array-Ergebnissen hochreguliert, unter ihnen die miR-24-3p und 27b-3p des miR-24-1 Clusters und miR-301a, 99b, 10a, 103a, 18a und 18b (s. Anhang Abb. IV).

DDX5 und DDX17 erfüllen in Verbindung mit TP53 auch eine tumorsuppressive Funktion in Colonkrebs. Diese entsteht durch Regulation des miR-145- und miR-143-Duplizes (Suzuki et al. 2009), die in den NEC-G3-Primärtumorproben (BIRC5-Überexpression) zu den am deutlich herunterregulierten microRNAs gehörten (s. Anhang Tab. II). Diese tumorrelevanten Zusammenhänge könnten DDX5 und DDX17 zu einem interessanten Ziel machen, insbesondere wenn sich der Verdacht eines möglichen Einflusses von BIRC5 durch weitere IP-Versuche bestätigen lässt.

Ein weiteres Beispiel zur selektiven microRNA-Regulation sind die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs). Identifiziert wurden HNRNPU, TARDBP (homolog zu HNRNPs), KHSRP und PCBP2 (s. Anhang Abb. XIV). Nach Treiber et al. (2017) ist an der Prozessierung der pri-microRNA zur pre-microRNA KHSRP beteiligt. Dieses Protein ist eine Schlüsselkomponente des Mikroprozessor-Komplexes und bindet selektiv den terminalen *Loop* bestimmter pri-microRNAs, vorzugsweise mit kurzen G-reichen Abschnitten. KHSRP ist ein positiver Regulator der microRNA-Prozessierung (Trabucchi et al. 2010). TARDBP ist ebenfalls ein positiver Regulator durch Bindung UG-reicher Sequenzen im *Loop* und unterstützt die Prozessierung von pre-miR-143 (Connerty et al. 2015). Im Zellkern fördert es die Prozessierung durch Interaktion mit DROSHA und zytoplasmatisch mit dem DICER-Komplex (Kawahara et al. 2011). Die miR-143-3p war in den Tumorproben prägnant herunterreguliert (s. Anhang Tab. II).

Es gibt also eine Vielzahl an Proteinen, die mit dem Mikroprozessor-Komplex interagieren und pri-microRNA-Subpopulationen regulieren. Die Selektivität kommt durch die abweichenden *Loop*- und *Stem*-Sequenzen zustande. BIRC5 könnte in diesem Zusammenhang in den NEC-Tumorzellen RBPs regulieren und so ein pro tumorigenes microRNAs-Expressionsmuster beeinflussen. Im nächsten Schritt müsste die Interaktion dieser Proteine in weiteren Co-IP-Versuchen (Gegen-Co-IP) bestätigt werden. Denkbar wären immunhistochemische Färbungen zur Bestätigung der

Bindungspartner im gleichen zellulären Kompartiment oder FRET (Förster-Resonanzenergietransfer, FITC Fluoresceinisothiocyanat) zur Sichtbarmachung der Proteininteraktion.

### 5.7.3 Hinweise zur Art der Bindung

BIRC5 ist mit 142 AS (16,5 kDa) ein kleines Protein mit nur einer N-terminalen BIR-Domäne und einer C-terminalen langen alpha-Helix. Daher stellt sich die Frage, wie realistisch es ist, dass BIRC5 neben seinen bisher bekannten Funktionen in Apoptose und Zellteilung noch weitere ausführen könnte.

Der *Rescue*-Versuch mit einem BIRC5-Expressionsplasmid in NEC-DUE1 BIRC5-KD lieferte hierzu erste Hinweise.

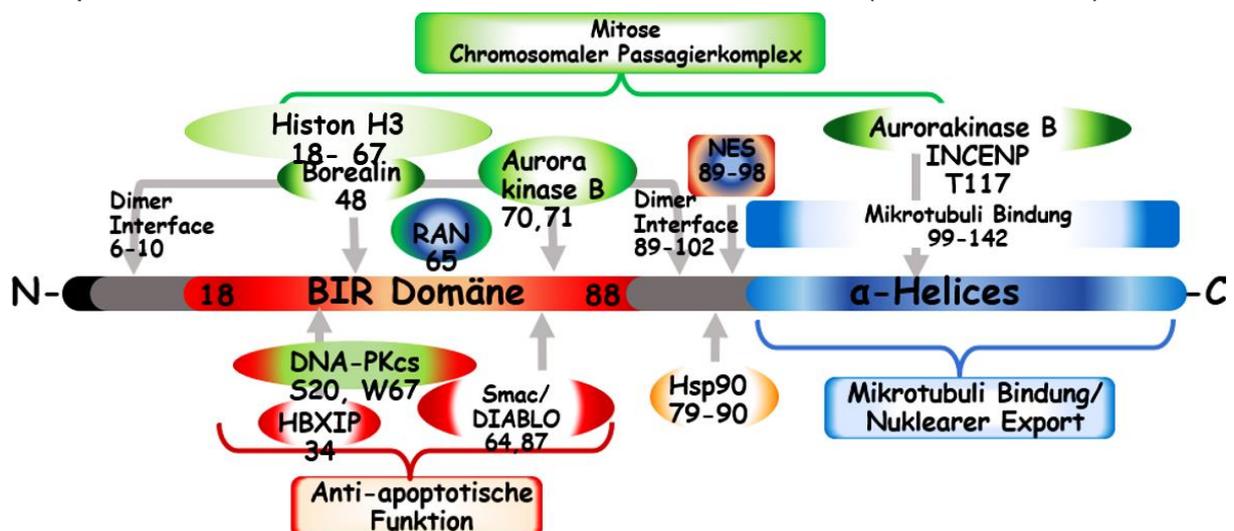
Bei Hochregulation von N-FLAG-BIRC5 waren sowohl miR-124-3p als auch 24-3p reduziert worden. C-FLAG-BIRC5 hatte nur miR-124-3p herunterreguliert, aber 8 % effektiver (s. Abb. 28). Dies könnte für unterschiedliche Regulationsmechanismen sprechen, an denen unterschiedliche Abschnitte von BIRC5 beteiligt waren. Wurde die C-terminale alpha-Helix manipuliert, betraf dies nicht so gravierend die Regulation von miR-124-3p, aber die der miR-24-3p konnte nicht erfolgen. An der Regulation von miR-124-3p könnte die etwas vom N-Terminus entfernte BIR-Domäne beteiligt gewesen sein, die durch die FLAG-Manipulation nicht in dem Ausmaß betroffen war.

Das FLAG-Tag ist klein und addiert nur ca. 1 kDa zum Protein dazu. Dies erkennt man im Western Blot an 2 Banden, wobei die untere Bande dem endogenen BIRC5 entspricht (s. Abb. 27). Das Tag könnte die molekularen Wechselwirkungen beeinflussen und damit die Primärstruktur und die Faltung des Proteins (Sekundär- und Tertiärstruktur) verändern.

Bereits bekannte Bindungspartner geben weitere Hinweise. Eine der wichtigsten Aufgaben von BIRC5 betrifft den geordneten Ablauf der Chromosomentrennung während der Zellteilung. Der chromosomale Passagierkomplex (CPC-Komplex) besteht aus einem Abschnitt zur Bindung an das Zentromer der Chromosomen und einem Kinaseabschnitt (Aurorakinase B). Beide Abschnitte werden durch INCENP verbunden. Der Lokalisationsteil besteht aus dem N-Terminus von INCENP, der  $\alpha$ -Helix von BIRC5 und Borealin, die ein Dreihelixbündel bilden. Dieses Bündel verbindet auch die BIR-Domäne mit dem C-Terminus von Borealin. Borealin besetzt das Dimer-Interface, mit dem BIRC5 seine schmetterlingsförmigen Homodimere bildet (Carmena et al. 2012). Aurora B phosphoryliert BIRC5 an Threonin 117, wodurch Borealin binden kann

(Wheatley et al. 2004). Verschiedene Mutationen der BIR-Domäne verhindern die Rekrutierung des CPC an das Zentromer (s. Abb. 44). BIRC5 ermöglicht diese Bindung über den N-Terminus von phosphoryliertem Histon H3 (Kelly et al. 2010, Du et al. 2012). Lokale pH-Veränderungen können die BIRC5-Histon H3-Interaktion beeinflussen (Niedzialkowska et al. 2012). Die pH-Einstellungen können daher großen Einfluss auf IP-Ergebnisse haben.

Darüber hinaus gibt es noch weitere bekannte Interaktionspartner. Die BIR-Domäne von BIRC5 bindet die N-terminale ATPase-Domäne von HSP90, wodurch diese für andere Interaktionen blockiert wird. Erwähnenswert ist, dass diese Bindung nur mit perfekt gefaltetem BIRC5 möglich zu sein scheint (Fortugno et al. 2003). Im Fall der RAN-GTPase erfolgt die Bindung im Bereich der Aminosäure 55 bis 70 (s. Abb. 44). Die COOH alpha-Helix zwischen Aminosäure 71 bis 142 interagiert mit Borealin und INCENP (Xia et al. 2008, Canovas et al. 2008). Die BIR-Domäne bildet auch einen Komplex mit der N-Terminale Domäne von Smac/DIABLO (Sun et al. 2005).



**Abb. 44 Schematische Darstellung der BIRC5-Domänen mit Proteininteraktionen.** Zu den Bindungsstellen für Proteininteraktionen gehören das N-terminale Dimer Interface (Aminosäure (AS)-Reste 6-10 und 89-102) mit der BIR-Domäne und die alpha-Helix. Bindungspartner sind u. a. Histon H3, DNA-abhängige Proteinkinasen (DNA-PKcs), LAMTOR5 (HBXIP), Smac/DIABLO (AS-Reste 64 und 87), HSP90 (AS-Reste 79-90) und Mikrotubuli (AS-Reste 99-142). Die Zahlen geben besondere AS-Positionen wieder, die z. T. nach Mutation Auswirkung auf die dargestellte Bindung hatten (UniProt 2021). BIRC5 besitzt ein nukleäres Exportsignal (NES) (AS-Reste 89 - 98), T= Threonine, S= Serin, W= Tryptophan (Vorlage nach Hu et al. 2017)

Die Aminosäurereste S20 und W67 der BIR-Domäne sind entscheidend für die Bindung der katalytischen PI3K-Domäne von DNA-PKcs (DNA-abhängige Proteinkinasen) zur Bildung eines Heterotetramerkomplexes. Der Komplex besteht aus der DNA-PK PRKDC (*XRCC7, Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit*), dem Heterodimer XRCC6-XRCC5 (*X-Ray Repair Cross Complementing 5/6, Ku-Herterodimer*) und BIRC5. Die Komplexbildung erhöht die Kinaseaktivität und Reparaturkapazität

(Güllülü et al. 2021, Reichert et al. 2011). Dies zeigt, dass eine Interaktion von BIRC5 mit ATPasen bzw. Helikasen über die N-terminale BIR-Domäne stattfinden kann.

#### 5.7.4 Überprüfung der Lokalisation der microRNA-Regulation

Für die Eingrenzung des von BIRC5 beeinflussten Mechanismus zur microRNA-Regulation ist es von Vorteil, dass die Vorläuferform, die pri-microRNA, sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Lokalisation (Zellkern gegenüber Zytoplasma), von der funktionellen microRNA abweicht. Die pri-microRNA ist das früheste und längste Konstrukt der microRNA-Biogenese. DROSHA als Teil des Mikroprozessor-Komplexes (Zellkern) spaltet die flankierenden einzelsträngigen Sequenzen ab, wodurch die pre-microRNA entsteht (Treiber et al. 2017). Die pre-microRNA hat daher keinerlei Sequenzunterschiede zur pri-microRNA. Die verwendeten pri-microRNA-qPCR-Assays konnten aber die pri-microRNA über Sequenzen (500 bp-Region) neben der eigentlichen Haarnadelstruktur selektiv binden und so nachweisbar machen (s. 1.4, Quelle: Sanger miRBase *Data Repository*). Dies ermöglichte auch die Überprüfung einzelner pri-microRNAs innerhalb eines Clusters. Die miR-124-3p hat 3 Gen-Loci (*MIR124-1* Chromosom (Chr) 8, *MIR124-2* Chr8 und *MIR124-3* Chr20) und die miR-24-3p 2 Gen-Loci (*MIR24-1* Chr9 und 2 Chr19).

Die Analyse der pri-microRNA-Regulation in beiden NEC-Zelllinien zeigte für die pri-miR-124-3 und pri-miR-24-1 eine signifikante Hochregulation. Zusätzlich war auch die pri-miR-124-2 in NEC-DUE2 und in NEC-DUE1 die pri-miR-23b signifikant hochreguliert (s. Abb. 41).

*MIR24-1* und *MIR23B* gehören zusammen mit *MIR27B* zum gleichen Cluster. Zu einem Cluster gehören microRNA-Gene, die innerhalb von proteinkodierenden Genen oder nicht-kodierenden Regionen von Transkriptionseinheiten (*Transcription Unit*, TU) aneinandergrenzen. Cluster-microRNAs werden in der gleichen Orientierung transkribiert und sind weder untereinander durch eine TU, noch durch eine anders orientierte microRNA getrennt (Dubitzky et al. 2013). Das miR-24-1 Cluster ist intronisch (Chr9), es gibt aber noch das intergenische miR-23a-27a-24-2 Cluster (Chr19), aus dem die zweite, sequenzidentische miR-24-3p entspringt. Cluster-microRNAs sind polycistronisch. Bei Fehlern der schrittweisen Faltung der microRNAs des Clusters oder negativer Modifikation einer pri-microRNA im Cluster werden nachfolgende pri-microRNAs nicht weiterverarbeitet (Creugny et al. 2018).

Im Rahmen des microRNA-Arrays wurden entsprechend nach BIRC5-KD in den NEC-

DUE1 die miR-24-3p, 27b-3p und 23b-3p signifikant hochreguliert (s. Anhang Abb. IV). In den NEC-DUE2 nur miR-24-3p, da der Effekt nicht differentiell genug war aufgrund der geringen Stichprobengröße und des geringeren BIRC5-Gehalts im Vergleich zu NEC-DUE1 (s. Abb. 17 und Abb. 19).

Im Array wurde auch die miR-23c hochreguliert (s. Anhang Abb. IV). Sie (*MIR23C* ChrX) weicht durch das Fehlen einer Base von der miR-23b nur wenig ab (s. Anhang Tab. X). In der Haarnadelstruktur der miR-23c gibt es keine weitere microRNA und sie gehört zu keinem Cluster. Von den microRNAs des anderen Clusters war nicht eine in den Array-Ergebnissen nach BIRC5-KD signifikant dereguliert, passend hierzu war *MIR24-2* auch nicht dereguliert (s. Abb. 41).

Im Rahmen der pri-microRNA-Quantifizierung stellte sich zunächst die Frage nach ihrer allgemeinen Aussagekraft. Wurde die pri-microRNA nicht messbar hochreguliert, die nachfolgende microRNA dagegen schon, kann dies an einer erhöhten Verweildauer der microRNA im RISC-Komplex (Zytoplasma) liegen. Andersherum muss die Hochregulation einer pri-microRNA nicht die Anzahl funktioneller microRNAs erhöhen. An der Prozessierung oder dem Transport sind weitere Proteine beteiligt, die nicht ausreichend vorhanden gewesen sein könnten (Volk und Shomron 2011). Da Cluster-microRNAs untereinander Sequenzunterschiede aufweisen, kann eine selektive Regulation von Cluster-microRNAs nachfolgend im Zytosol erfolgen. RNA-Bindungsproteine (RBPs) binden sequenzspezifisch und beeinflussen den Einbau in RISC und die Selektion des funktionellen Stranges.

Eine negative Manipulation der DICER-Prozessierung kann zu erhöhten pri-microRNA-Mengen führen, da sie langsamer abgebaut werden (Treiber et al. 2017). Andersherum müsste bei unveränderter Transkription der pri-microRNAs, der pri-microRNA-Gehalt sinken, wenn ihre post-transkriptionelle Prozessierung steigt (Volk und Shomron 2011). Demnach wird angenommen, dass BIRC5 die Transkription der microRNA-Gene nicht, aber die weitere Prozessierung positiv beeinflusst, würde die pri-microRNA nach KD herunterreguliert. Bei einem negativen Einfluss von BIRC5 würde die pri-microRNA hochreguliert. Es wurden sowohl pri-microRNAs (s. Abb. 41) als auch die entsprechenden funktionellen microRNAs im Zytosol nach BIRC5-KD hochreguliert (miR-124-3p, 24-3p und 23b-3p).

Wird angenommen, dass BIRC5 einen positiven Einfluss auf die Transkription von microRNA-Genen hat, würden die pri-microRNAs nach KD in jedem Fall herunterreguliert werden. Im gegensätzlichen Fall einer Inhibition von microRNA-Genen durch

BIRC5, wären nach BIRC5-KD die pri-microRNAs hochreguliert.

Letztlich wurde eine selektive microRNA-Regulation und ein positiver Effekt des BIRC5-KD sowohl auf die pri-microRNAs pri-miR-124-3 und pri-miR-24-1 als auch deren zugehörigen funktionellen microRNAs festgestellt.

Zwei große Faktoren kamen hierfür in Frage. Zum einen Transkriptionsfaktoren (TFs), die selektiv microRNA-Gene über konventionelle TF-Bindungsstellen beeinflussen (Wang et al. 2017), und zum anderen eine Vielzahl an RNA-Bindungsproteinen (RBPs), die durch direkte Bindung an pri-microRNAs oder an Mikroprozessormoleküle die Prozessierungseffizienz von Subpopulationen regulieren (Creugny et al. 2018, Treiber et al. 2017). Dies zeigt, wie komplex die microRNA-Regulation sein kann. Die direkteste Regulation wäre eine Inhibition der Transkription der microRNA-Gene oder eines RBPs durch BIRC5.

### 5.7.5 RNA-Bindungsproteine

Die RNA-Bindungsproteine (RBPs) binden spezifische Sequenzen, s.g. RBMs (RNA-Bindungsmotive) der microRNAs. Dies ermöglicht die Regulation von microRNA-Subpopulationen (van Kouwenhove et al. 2011). Die pri-microRNA bietet hierzu den doppelsträngigen *Stem*, einzelsträngigen terminalen *Loop* und einzelsträngige flankierende Regionen neben der Haarnadel an (s. Abb. 9). Bestimmte Abschnitte verbessern die Prozessierungseffizienz. Der Mikroprozessor kann über das UG-Motiv an der Basis von *Loops* und ein GUG/UGU-Motiv im Bereich der apikalen *Loop*-Struktur pri-microRNA-Haarnadeln von anderen RNA-Strukturen unterscheiden (Connerty et al. 2015, Treiber et al. 2017, Denzler und Stoffel 2015, s. Anhang Tab. VI). Des Weiteren gibt es bei 60 % der pri-microRNAs ein CNNC-Motiv *downstream* neben der Haarnadel. Das *Mismatch* GHG-Motiv kann an Position 7-9 auftreten, ausgehend vom Übergang zur Haarnadelstruktur am 3'-Arm der pri-microRNA. Die Position 8 ist ungepaart und nie ein G, wobei die flankierenden Positionen oft eine starke G-Paarung aufweisen (s. Anhang pri-miR-125a, Tab. VI). MicroRNA-*Stems* mit einer Basenpaarlänge von 35 bp werden bevorzugt prozessiert (Denzler und Stoffel 2015, Fang und Bartel 2015).

RBPs modulieren auf vielfältige Art die microRNA-Prozessierung. Die DEAD-Box Helikase DDX17 bindet als Untereinheit des Mikroprozessors an die 3'-flankierenden Sequenzen der Haarnadel. DDX5 entwindet ATP-abhängig den *Stem*, wodurch die pri-microRNA durch den Mikroprozessor erst weiterverarbeitet werden kann. HNRNPA1 fördert die Prozessierung bestimmter microRNAs, indem es den *Loop* lockert und der

Mikroprozessor besser binden kann. HNRNPA1 und KHSRP konkurrieren um G-reiche Abschnitte im *Loop* von pri-let-7a. HNRNPA1 kann so bestimmte microRNAs fördern und andere inhibieren. Lin28A ist ein Beispiel für eine negative Regulation und blockiert den *Loop* von let-7-microRNAs (Connerty et al. 2015). Mitglieder der FET-Proteinfamilie, darunter FUS (Fused-in-Sarcoma), regulieren eine microRNA-Subpopulation durch Rekrutierung des Mikroprozessors. Andere RBPs spielen eine Rolle bei der weiteren Prozessierung der pre-microRNA und verbessern die Spaltung durch DICER, wie TARDBP (Connerty et al. 2015). Weitere Beispiele und ihre soweit bekannten bzw. vermuteten Bindungssequenzen sind dem Anhang Tab. V zu entnehmen.

Eine Vielzahl der Interaktionen zwischen Proteinen und pri-microRNAs findet im Bereich des apikalen Loops statt. RBPs fungieren sowohl als Aktivatoren als auch Repressoren und stehen in Konkurrenz um Bindungsstellen. Dies ermöglicht ein gewebe- bzw. zell-spezifisches microRNA-Expressionsprofil und eine Regulation als Antwort auf Umwelteinflüsse (Treiber et al. 2017, Connerty et al. 2015, s. Anhang Tab. V).

Im Hinblick auf die Krebsentstehung bzw. den Erhalt des tumorigenen Phänotyps könnte eine entsprechende tumorfördernde RBP-Expression auch in den NEC vorliegen. BIRC5 könnte in diesem Rahmen modulierend eingreifen, fördert letztlich OncomiRs und hemmt tumorsuppressive microRNAs. Die nach BIRC5-KD signifikant deregulierten microRNAs (s. Abb. 19 und Anhang Abb. IV) könnten übereinstimmende RBMs aufweisen, die den beobachteten Effekt erklären könnten. Bekannte microRNA-Sequenzen bzw. RBMs wurden hierzu zusammengetragen (s. Anhang Tab. V, Tab. X und Tab. XI) und die hierzu passenden Sequenzen in den pri-microRNAs farblich markiert. Diese RBMs sind rein spekulativ, machen aber strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen den microRNA sichtbar. Selbst wenn entsprechende RBMs in der pri-microRNA-Sequenz vorhanden sind, muss in jedem Einzelfall überprüft werden, ob eine Interaktion auch tatsächlich stattfindet (Treiber et al. 2017). Eine Überprüfung kann mittels IP des RBPs mit anschließendem Nachweis der microRNA erfolgen. *Knockdown*-Experimente oder der Einsatz von Expressionsplasmiden der betreffenden RBPs können zeigen, ob diese tatsächlich einen Einfluss auf die microRNA-Expression im Rahmen der qRT-PCR haben.

Zwischen den hochregulierten microRNAs nach BIRC5-KD waren übereinstimmende Strukturen erkennbar (s. Anhang Tab. X). Diese microRNAs zeigen vermehrt Sequenzabschnitte, die RBMs für die RBPs KHDRBS3 (*KH RNA Binding Domain Containing, Signal Transduction Associated 3*), FUS und KHSRP anbieten könnten.

Die allgemeinen pri-microRNA-Erkennungssequenzen (GUG/UGU-Motiv) im apikalen *Loop* sind ebenfalls gut vertreten, wodurch diese microRNAs generell effizienter prozessiert werden könnten. Die herunterregulierten microRNAs zeigen dagegen mögliche Bindungsstellen für ELAVL1, MSI2 (*Musashi RNA Binding Protein 2*) und MBNL1 (*Muscleblind Like Splicing Regulator 1*). Es wird vermutlich noch weitere RBPs geben sowie sekundäre Effekte durch deregulierte potente microRNAs oder Proteine, die das RBP-Expressionsmuster beeinflussen.

BIRC5 könnte eine negative Rolle ausüben, wie bei der Blockierung der ATPase-Domäne von HSP90. Positive RBPs würden durch BIRC5 inhibiert und der BIRC5-KD führt zu hochregulierten microRNAs (miR-124-3p). Im Fall von ELAVL1 und MSI2, die negativen Regulatoren sind, würde dies die Herunterregulation der let-7 erklären. Nach BIRC5-KD würden diese nicht mehr inhibiert.

Von den aktivierenden RBPs wurden KHSRP und DDX-Proteine in der BIRC5-IP gefunden (s. Anhang Abb. XIV). Einige dieser Proteine kommen auch als Transkriptionsfaktoren (TFs) der microRNA-Gene in Frage.

### 5.7.6 Transkriptionsfaktoren von microRNA-Genen

Transkriptionsfaktoren (TFs) von microRNA-Genen ermöglichen die wohl individuellste Regulation von microRNAs über ihre Gene. Dies beinhaltet Promoter, Enhancer, Repressoren oder andere genregulierende Elemente. Die Gen-Regulation kann allerdings komplex sein. Gene können mit anderen Genen und durch einen weit entfernten Enhancer oder Repressor reguliert werden. Mögliche Kandidaten liefert die Datenbank GeneHancer (*Database of genome-wide Enhancer-to-Gene and Promoter-to-Gene associations Version 4.8*), die mit den IP-Ergebnissen abgeglichen wurden. Allgemein werden microRNAs durch die RNA-Polymerase II (POLR2A) transkribiert, die an den Promoter nahe der microRNA-kodierenden DNA-Sequenz bindet. Die Tab. IV im Anhang zeigt mögliche TFs der hier untersuchten microRNA-Gene. Bei allen bindet POLR2A an die microRNA-kodierende DNA-Sequenz, die dann zur Haarnadelstruktur der pri-microRNA transkribiert wird (Creugny et al. 2018). In der IP-Auswertung wurden TFs gefunden, die nach GeneHancer in Frage kommen.

TARDBP ist ein hnRNP-ähnliches Protein, dessen Funktion die Regulation der Transkription, pre-mRNA-Splicing und translationale Regulation umfasst. Gemeinsamkeiten mit BIRC5 hat es im Bereich embryonaler Entwicklung, Apoptose und Zellteilung. Des Weiteren spielt es eine Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen, wie der

Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), frontotemporale lobäre Degeneration (FTLD) und auch bei der microRNA-Biogenese (Warraich et al. 2010).

XRCC5 könnte aufgrund seiner Verbindung zu XRCC6 und PRKDC ebenfalls relevant sein. Als ATP-abhängige Helikasen könnten XRCC5 und XRCC6 durchaus von BIRC5 inhibiert werden. Sie stabilisieren sich gegenseitig und bedingen einander für ihre Funktion im Rahmen der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (Kovalchuk 2016, Chen et al. 1996). Auch wurde eine Interaktion von BIRC5 mit DNA-PKcs bereits beschrieben. BIRC5 ist Teil des Heterotetramerkomplexes aus der DNA-PK PRKDC (XRCC7) und dem Heterodimer XRCC6-XRCC5 (Güllülü et al. 2021). Sollte BIRC5 PRKDC oder XRCC6 negativ beeinflussen, könnte dies Auswirkungen auf XRCC5 haben. Die Bindung war im Rahmen der BIRC5 Co-IP vielleicht nicht stabil genug für eindeutigere Resultate.

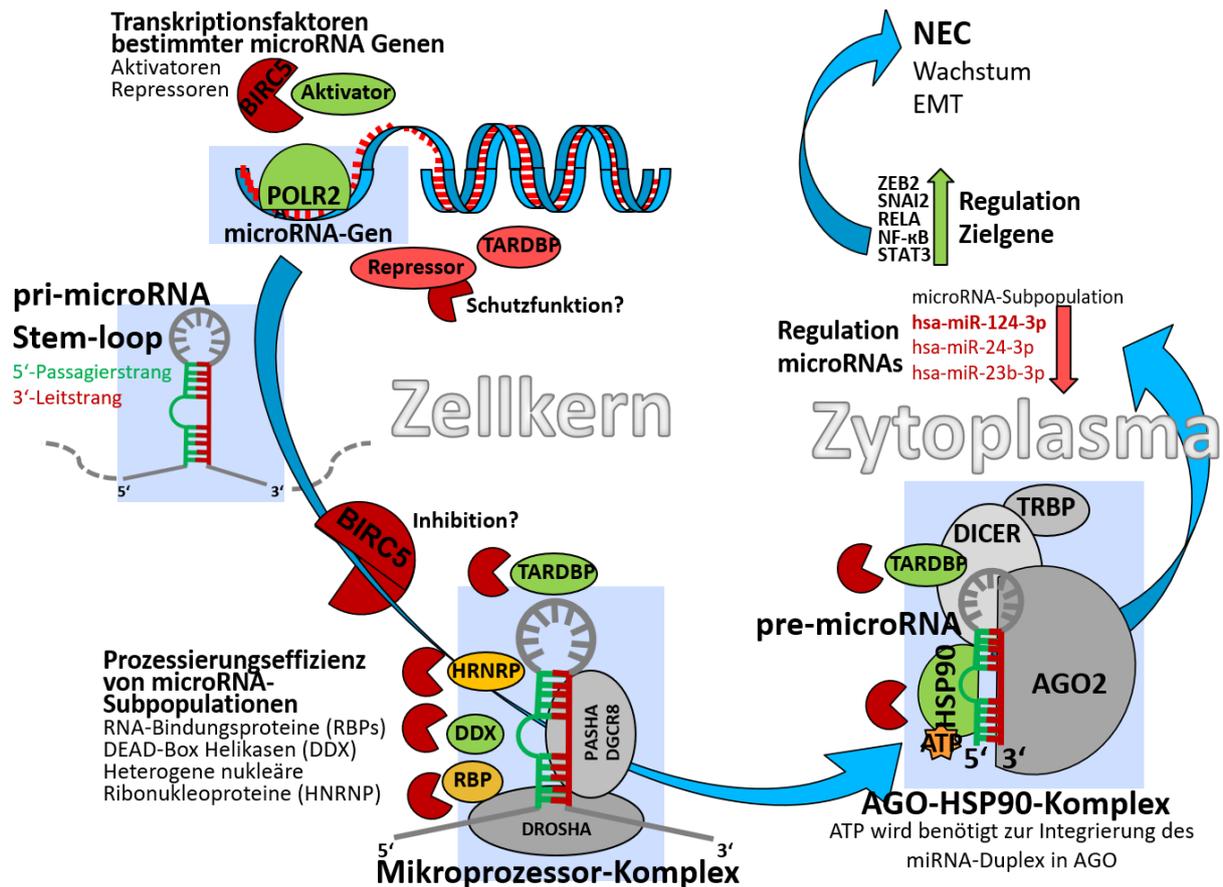
Ein Abgleich der TFs von microRNA-Genen der signifikanten pri-microRNA-Ergebnisse (s. Abb. 41, Anhang Tab. IV) liefert TARDBP und XRCC5 als mögliche Kandidaten. Da Daten zu ZEB2 vorhanden waren, konnte dieses miteinbezogen werden. Die Ergebnisse (s. Abb. 29) haben bereits gezeigt, dass ZEB2 nach BIRC5-KD reduziert wurde. Da miR-124-3p *ZEB2* als Zielgen hat, wäre dies ein positiver Feedback Loop, da ZEB2 wie für *CDH1* ein Repressor ist. XRCC5 ist generell als Aktivator bekannt (UniProtKB Version Feb. 2021). XRCC5 und TARDBP können als transkriptionelle Repressoren fungieren (Chung et al. 1996, Ohno et al. 2009, Camara-Clayette et al. 1999, Emde et al. 2015, UniProtKB Version Feb. 2021).

Eine vergleichende Western Blot Analyse der Expression beider Proteine nach BIRC5-KD liefert weitere interessante Informationen (s. Abb. 42). Im Fall von TARDBP ist überraschend eine tendenzielle Hochregulation ( $p = 0,052$ ) nach BIRC5-KD sichtbar (s. Abb. 43). Mit TARDBP als Repressor wäre dies widersprüchlich zur beobachteten Hochregulation von miR-124-3p (und der pri-microRNA), in diesem Fall liefern aber die ALS-Forschung und das Ergebnis von XRCC5 mögliche Hinweise. Im gesunden Zustand ist TARDBP hauptsächlich im Nukleus lokalisiert. Das Protein besitzt hierzu ein nukleäres Lokalisationssignal. Im Rahmen der Erkrankung wurde die Bildung von Aggregaten im Zytoplasma dokumentiert, in denen TARDBP nicht funktionell ist, nicht degradiert wird und sich anhäuft (Prasad et al. 2019). Verschiedene ALS-Varianten zeigen eine umfangreiche Verringerung von microRNAs in Verbindung mit zellulärem Stress. Die Inhibition von TARDBP führte jedoch zur Erholung von microRNA-Leveln. Interessant ist vor allem der Verweis auf die Sensitivität der DICER-Aktivität gegenüber zellulärem

Stress, der nicht nur Motorneurone, sondern alle Gewebe unter chronischem Stress betrifft (Emde et al. 2015). Gerade der Stressfaktor ist bei Tumorzellen gegeben. BIRC5 könnte TARDBP vor der Aggregatbildung im Zytoplasma schützen, was zur Herunterregulation von microRNAs führt. Dies könnte in den BIRC5-KD Zellen immunhistochemisch überprüft werden. Es müsste ein Lokalisationsshift vom Zellkern zum Zytoplasma von TARDBP sichtbar sein. Eine Schutzfunktion könnte auch für XRCC5 der Fall sein. Gerade nach BIRC5-KD zeigte sich im Western Blot ein auffälliges Spaltprodukt mit einer Größe von ca. 15 kDa (s. Abb. 42), das in seiner Größe dem C-Terminus von XRCC5 entspricht und nur nachgewiesen werden konnte, weil der Antikörper gegen diesen gerichtet ist. Ohne BIRC5 wurde XRCC5 degradiert und vermehrt dieses Spaltprodukt gebildet. Es ist aber noch zu klären, ob XRCC5 als Repressor oder Aktivator für microRNA-Gene fungiert oder sogar einen Repressor rekrutiert (Camara-Clayette et al. 1999). Dies müsste ebenfalls mit Expressionsplasmiden oder einem XRCC5-KD überprüft werden.

Dies sind sehr komplexe Zusammenhänge, die noch viele Fragen offenlassen und zusätzlicher Analysen bedürfen, die für diese Arbeit zu umfangreich wären. Potentielle microRNA-Gen Repressoren (TARDBP, XRCC5 und ZEB2) müssten jeweils bestätigt werden. Dies gilt auch für den positiven oder negativen Einfluss von RBPs (DDX5 und DDX17). Zu diesem Zeitpunkt kann man RBMs der BIRC5-abhängigen microRNAs nur schwer beurteilen, da jeder einzeln überprüft werden müsste. Weitere BIRC5-Co-IPs müssen mögliche Bindungspartner noch bestätigen. Bisher kommen zwei im Zellkern lokalisierte Mechanismen für die beobachtete BIRC5-abhängige selektive microRNA-Regulation in Frage, zum einen die Regulation von TFs und zum anderen die Regulation von RBPs der betroffenen microRNAs.

Vermutlich handelt es sich bei der BIRC5-abhängigen microRNA-Regulation nicht um den einen Mechanismus. Die Vielzahl der noch offenen und möglichen Regulationswege und das selektive und diverse microRNA-Expressionsmuster nach BIRC5-KD deuten darauf hin. Eine Zusammenfassung der vermuteten BIRC5-abhängigen microRNA-Regulation ist in Abb. 45 dargestellt. BIRC5 wird in fötalem Gewebe natürlich hochreguliert. Im Rahmen der Embryogenese würden diese regulatorischen Mechanismen den Einfluss von BIRC5 auf hierin involvierte Gene (während natürlich ablaufender EMT bei Organentwicklung) erhöhen. So wurde nachweislich miR-124-3p reguliert, die eine große Rolle für die Differenzierung von Neuronen und EMT spielt und daher auch für die Krebsentwicklung relevant geworden ist.



**Abb. 45 Schematische Zusammenfassung der vermuteten BIRC5-abhängigen microRNA-Regulation.** BIRC5 könnte über RBPs, darunter Helikasen, wie DDX-Proteine oder hnRNPs die pri-microRNA-Prozessierung positiv oder negativ beeinflussen. BIRC5 könnte auch Transkriptionsfaktoren, wie TARDBP oder die ATP-abhängige Helikase XRCC5, regulieren und so Einfluss auf die Transkription von microRNA-Genen nehmen. TFs und RBPs sprechen für eine selektive microRNA-Expression. BIRC5 ist dazu in der Lage ATPase-Domänen (z. B. HSP90) zu inhibieren. Die Wirkungsweise von BIRC5 könnte auch positiv sein und durch Interaktion den Bindungspartner stabilisieren. Grün markierte Proteine stellen positive, Hellrot markierte Proteine negative Regulatoren der microRNA-Biogenese dar und Gelb markierte Proteine können beides bewirken. Die schematische Darstellung wurde eigenständig erstellt.

## 5.8 MicroRNA-Expressionsmodulation als medizinische Therapie

BIRC5 hätte durch die Funktion der microRNA-Regulation die Möglichkeit, ein tumorigenes microRNA-Expressionsprofil in den NEC aufzubauen. Im Hinblick auf eine mögliche Behandlung der NEC könnte man nun eine Kombination aus BIRC5-Inhibitoren und Substanzen einsetzen, die eine tumorsuppressive microRNA-Expression unterstützen. Im Rahmen von *in vitro* Versuchen ist dies über Mimics oder Inhibitoren leicht zu erreichen, die sich z. T. auch in *in vivo* Mausmodellen einsetzen lassen. In solchen initialen Versuchsmodellen lässt sich die Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung auf die Vitalität der Tumorzellen und Metastasierung überprüfen.

Die Therapie von Tumorpatienten ist aber sehr viel kritischer. Die ideale Methode zur therapeutischen Anwendung von microRNA müsste diese vor Degradation durch den

Organismus schützen. Die Aufnahme dürfte nur durch Tumorzellen erfolgen und ohne eine Immunantwort auszulösen. Die intratumorale Injektion von Mimics, Inhibitoren und Vektoren ist die effektivste und direkteste Methode. Hier ist die Position des Tumors der kritische Faktor (Trang et al. 2011, Halle et al. 2016). Sowohl die Stabilität als auch Effektivität von microRNAs kann durch chemische Modifikation der 2'-OH-Gruppe der Ribose (z.B. 2'-O-Methyl) erhöht werden (Davis et al. 2006). Als Überträgersystem kommen lentivirale Vektoren in Frage, die ihre DNA in das Wirtsgenom integrieren. Sie unterscheiden aber nicht zwischen gesunden und Krebszellen, was zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann. Nicht virale Plasmide (Nanopartikel, Polymer-basierte Vektoren, Calciumphosphat-Vehikel, Gold-Nanopartikel) sind durch ihre geringere Immunreaktion besser geeignet (Yin et al. 2014, Forterre et al. 2020), sind aber aufgrund ihrer geringeren zellulären Aufnahme, schnellen Degradation, Aufnahme in Endosomen und renalen Ausscheidung weniger wirksam oder aufgrund schlechter biologischer Verwertbarkeit und Kompatibilität toxisch. Eine natürlichere Alternative bieten Exosomen (extrazelluläre Vesikel), die auch vom körpereigenen endosomalen System gebildet werden. Sie schützen eingebettete microRNAs während des Transports im Blutstrom vor Degradation. Allerdings gestaltet sich die Massenproduktion und die Beladung der Exosomen noch als schwierig (Forterre et al. 2020). Selbst wenn die microRNA an ihrem Wirkungsort ankommt, bleibt das Problem der Spezifität der Zielgenregulation. Eine microRNA, wie die miR-124-3p, reguliert eine Vielzahl potentieller Zielgenen. Daher ist die Gefahr von Nebenwirkungen auch hier immer noch groß. Sowohl die microRNA als auch ihr Überträgersystem erzeugen eine Vielzahl an Unwägbarkeiten, die in klinischen Studien eingehend untersucht werden müssen.

## 6 Schlussfazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben eine BIRC5-beeinflusste und XIAP-unabhängige microRNA-Regulation gezeigt. Hierbei lieferten zunächst microRNA-Array-Analysen von großzelligen GEP-NEC-Zelllinien und GEP-NEC-Primärtumorproben Anhaltspunkte, die eine Deregulation einer microRNA-Subpopulation unterstützen. Nach BIRC5-Reduktion wurde nur eine Subpopulation von microRNAs herunter- und andere hochreguliert. Die stärkste dysregulierte miR-124-3p und die Cluster-microRNAs miR-24-3p sowie 23b-3p wurden in weiterführenden Versuchen als BIRC5-abhängig in den großzelligen NEC-Zelllinien und einer follikularen Schilddrüsen-Krebszelllinie.

Es wurden Hinweise gefunden, dass BIRC5 diese Regulation über einen Vermittler mit ATPase-Domänen erreichen könnte. Bekanntermaßen kann BIRC5 ATPase-Domänen über die N-terminalen BIR-Domänen besetzen (Fortugno et al. 2003). Nach Transfektion mit Expressionsplasmid lieferten C-terminales und N-terminales FLAG-Tag unterschiedliche Ergebnisse. Für die miR-124-3p war die Regulation mit C-FLAG-BIRC5 etwas effizienter, während miR-24-3p nur durch N-FLAG-BIRC5 reguliert wurde, was auf unterschiedliche Mechanismen und Bindungspartner hindeuten könnte. Durch erste Co-IP-Ergebnisse wurde bisher eine Bindung von BIRC5 an ATPasen, insbesondere Helikasen (DDX5), HNRNPs oder hnRNP-ähnliche Proteine (KHSRP und TARDBP) und andere RBPs (DARS und MARS) identifiziert, die eine selektive microRNA-Regulation ermöglichen würden. Diese Bindungspartner bedürfen aber noch einer weiteren Bestätigung.

Derzeit kommen mehrere Möglichkeiten der BIRC5-vermittelten Regulation in Frage:

- 1) Im Fall der RBPs könnte deren Inhibition durch BIRC5 eine Subpopulation von pri-microRNAs positiv oder negativ beeinflussen. Dies betrifft vor allem die Prozessierung durch den Mikroprozessor-Komplex im Zellkern.
- 2) Die direkteste Regulation der microRNAs konnte über ihre Gene durch transkriptionelle Repressoren oder Aktivatoren erfolgen. Überprüft wurden hierzu die Gene von miR-124-3p und des miR-24-Clusters, zu denen Datenbanken die TFs TARDBP, XRCC5 und ZEB2 lieferten. Hierbei fehlt jedoch der Nachweis, ob diese TFs diese Gene tatsächlich regulieren und ob sie als Repressoren oder Aktivatoren fungieren.

- 3) Auch besteht die Möglichkeit einer positiven, stabilisierenden Funktion von BIRC5. Western Blot Ergebnisse zeigten die Bildung eines Spaltproduktes von XRCC5 in Abwesenheit von BIRC5 und eine Reduktion von ZEB2.

Der Einfluss möglicher TFs und RBPs auf die microRNA-Expression muss noch weiter überprüft werden. Auch steht der Nachweise der Interaktion von BIRC5 mit Vertretern der DDX-Proteine, als vielversprechendste Ziele, noch aus.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie komplex die microRNA-Biogenese und ihre Regulation ist. Diese Prozesse sind notwendig zur Anpassung der microRNA-Expression und Proteinexpression an zelluläre Aufgaben und zur adäquaten Reaktion auf innere und äußere Reize. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Regulation der microRNA-Biogenese über TFs oder RBPs ermöglichen allerdings auch eine pro-tumorigene Modulation des Proteingefüges. In Krebszellen kann so ein höchst individuelles microRNA-Expressionsmuster erzeugt werden, das die Aufrechterhaltung des tumorigenen Phänotyps fördert. Im Hinblick auf eine mögliche Therapierbarkeit ergeben sich weitere Ansatzpunkte. Anti-tumorigene microRNAs könnten EMT und Proliferation weiter hemmen, was sie interessant für Kombinationstherapien macht. Allerdings erweisen sich diese aufgrund fehlender nebenwirkungsfreier Applikationssysteme noch als ungeeignet.

## 7 Anhang

### Anhangsverzeichnis

7.1	Analysen zu 4.2 MicroRNA-Array-Analyse des BIRC5-KD (Exiqon) .....	177
7.1.1	PCA-Plots des microRNA-Arrays (Exiqon) .....	177
7.1.2	Dotplot der messbaren microRNAs (Exiqon) .....	177
7.1.3	<i>Heatmaps</i> zur microRNA-Array-Analyse der NEC-DUE1-Zelllinie (Exiqon) .....	178
7.1.4	Differentiell exprimierte microRNAs nach BIRC5-KD (Exiqon) .....	180
7.1.5	Unterschiede zwischen den NEC-Zelllinien .....	181
7.2	Analysen zu 4.3 Array-Analyse der NEC-G3-Primätumorproben (Exiqon) .....	182
7.2.1	PCA-Plots der NEC-G3-Primätumorproben (Exiqon) .....	182
7.2.2	Dotplot der messbaren microRNAs (Exiqon) .....	183
7.2.3	<i>Heatmaps</i> zu der microRNA-Array-Analyse der Patientenproben (Exiqon) .....	183
7.2.4	<i>Heatmap</i> der gepoolten microRNA-Array-Analyse (Exiqon) .....	184
7.2.5	<i>Heatmap</i> der gepaarte microRNA-Array-Analyse (Exiqon) .....	185
7.2.6	Volcano Plots zu den Patientenproben (Exiqon) .....	186
7.2.7	Differentiell exprimierte microRNAs der NEC-G3 Primärtumoren (Exiqon) .....	187
7.2.8	IRS und aCGH-Daten der NEC-G3-Primärtumore .....	188
7.2.9	Transkriptionsfaktoren (TF) von microRNA Genen .....	188
7.3	Analyse der Massenspektrometrie (BMFZ) .....	189
7.3.1	Silbergel zur Bewertung der Proben für die Massenspektrometrie (BMFZ) .....	189
7.3.2	<i>Heatmaps</i> der BIRC5-Co-IP-Ergebnisse .....	190
7.3.3	Tabellen von RNA-Bindungsproteine (RBP) zu den Co-IP-Ergebnisse .....	191

### Anhang Abbildungsverzeichnis

Abb. I	Matrix PCA-Plot zur NEC-DUE1 microRNA-Array-Analyse (Exiqon) .....	177
Abb. II	Traditioneller PCA-Plot der NEC-DUE1 (Exiqon) .....	177
Abb. III	Dotplot-Diagramm der gemessenen microRNAs (Exiqon) .....	178
Abb. IV	Heatmap der microRNA-Array-Analyse von NEC-DUE1 GIPZ n.s. und NEC-DUE1 BIRC5-KD (Exiqon). ..	179
Abb. V	Heatmap der microRNA-Array-Analyse von NEC-DUE1 BIRC5-KD mit XIAP-KD (Exiqon) .....	180
Abb. VI	Array-CGH-Analyse der NEC-Zelllinien .....	181
Abb. VII	Datensätze von NEC, NEN und NET des Verdauungssystems und großzelligen NEC (Progenetix) .....	181
Abb. VIII	Traditioneller PCA-Plot und Matrix PCA-Plot der FFPE-NEC-G3-Patientenproben (Exiqon). .....	182
Abb. IX	Dotplot-Diagramm der gemessenen unterschiedlichen microRNAs (Exiqon) .....	183
Abb. X	Heatmap der gepoolten microRNA-Array-Analyse der TGW und NGW (Exiqon) .....	184
Abb. XI	Heatmap der gepaarten microRNA-Array-Analyse der TGW und NGW (Exiqon) .....	185
Abb. XII	Volcano Plots zu der gepoolten und gepaarten FFPE-NEC-G3 microRNA-Array-Analyse (Exiqon) .....	186
Abb. XIII	Silbergel zur Bewertung der Proben für die Massenspektrometrie (BMFZ) .....	189
Abb. XIV	Heatmaps der BIRC5-Co-IP-Ergebnisse nach Massenspektrometrie der Proben .....	190

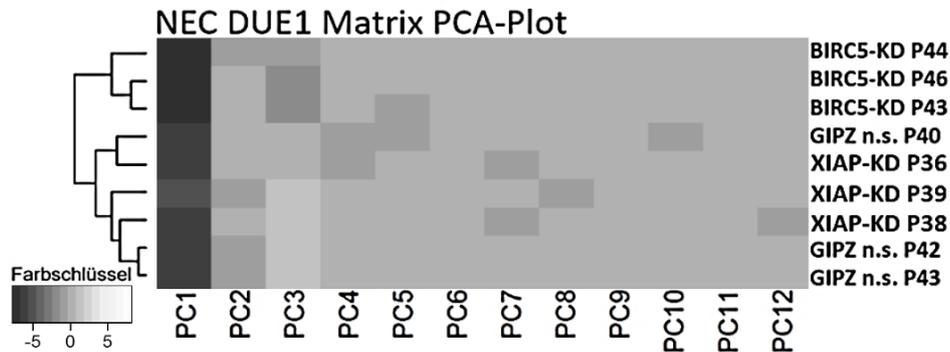
### Anhang Tabellenverzeichnis

Tab. I	MicroRNAs nach BIRC5-KD in NEC-DUE1 .....	180
Tab. II	MicroRNAs in NEC-G3 Primärtumoren .....	187
Tab. III	IRS und aCGH-Daten der einzelnen NEC-Tumorproben .....	188
Tabelle IV	Transkriptionsfaktoren (TF) von microRNA Genen .....	188
Tabelle V	MicroRNA-Biogenese relevante RNA-Bindungsproteine und ihre Bindungsstellen .....	191
Tabelle VI	Allgemeine Strukturen zur Erkennung von microRNAs .....	192
Tabelle VII	RBP KHSRP, PUM2 und HNRNPH1 pri-microRNA-Bindung .....	192
Tabelle VIII	RBP ELAVL1, MSI2 und SRSF1/9 mögliche pri-microRNA-Bindungsstellen .....	193
Tabelle IX	Mögliche pri-microRNA-Bindungsstellen des RBP FUS .....	193
Tabelle X	Hochregulierte microRNAs nach BIRC5-KD mit möglichen RBMs .....	194
Tabelle XI	Herunterregulierte microRNAs Nach BIRC5-KD mit möglichen RBMs .....	194

## 7.1 Analysen zu 4.2 MicroRNA-Array-Analyse des BIRC5-KD (Exiqon)

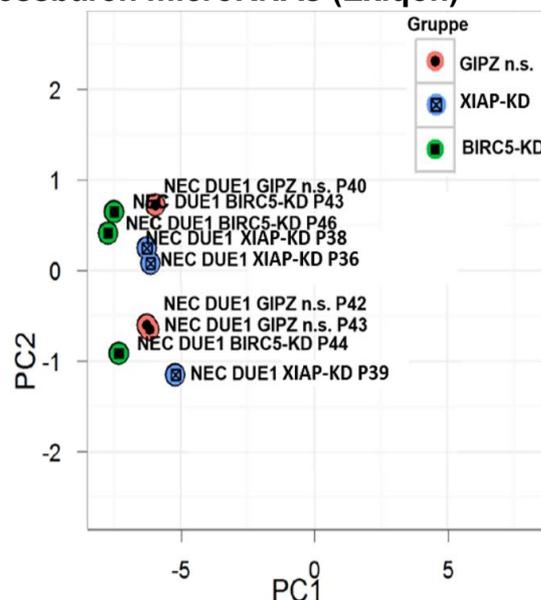
Der Array wurde mit dem miRCURY LNA™ microRNA *Hi-Power Labeling Kit* gefärbt (Hy3™/Hy5™ duales Farbdesign). Bei den in den Analysen verwendeten Daten der Firma Exiqon handelt es sich um die nach dem (Lowess Regressionsalgorithmus) normalisierten log2 Ratio-Werte (Hy3™/Hy5™ duales Farbdesign, s. 3.1.15.1),

### 7.1.1 PCA-Plots des microRNA-Arrays (Exiqon)

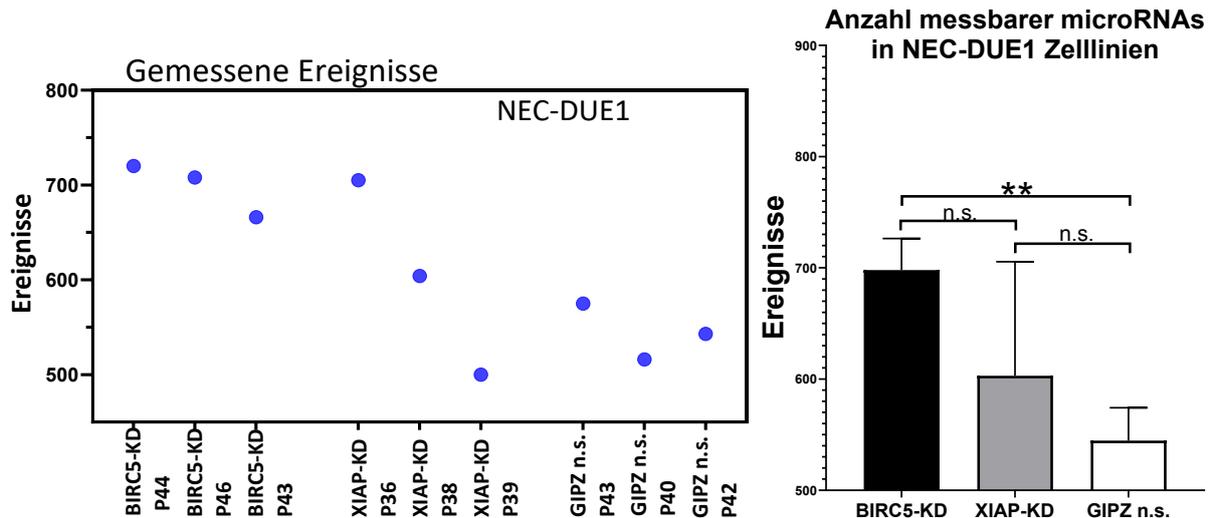


**Abb. I Matrix PCA-Plot zur NEC-DUE1 microRNA-Array-Analyse (Exiqon).** Der Matrix PCA-Plot (*Principal Component Analysis*, Hauptkomponentenanalyse) zeigt Muster zwischen unabhängigen Faktoren eines Probenpools. Diese Faktoren können biologisch oder technisch beeinflusst sein. PC1 und PC2 beschreiben eine Variation aufgrund z. B. der Biologie der Proben oder unterschiedlicher Behandlungen. PC3 und höher beschreiben grundlegende, weniger variable Faktoren, darunter Probenherstellungsbedingungen, Operator und Lagerungszeit. Zusätzlich ist eine hierarchische Clusteranalyse der microRNAs mit *Complete-Linkage*-Methode und euklidischer Distanzmessung dargestellt. Für den Matrix PCA-Plot wurde die Analyse auf alle Proben und auf die 50 microRNAs mit der größten Standardabweichung angewendet. Hierbei wurden die normalisierten log2 Ratio-Werte verwendet. Der Mittelwert der zentrierten Variable aller Proben wurde auf Null gesetzt und die Abweichung aller Proben wurde vor der Analyse auf 1 skaliert. PCA= *Principal Component Analysis*, P = Passage, KD = *Knockdown*, n.s. = *non-silencing* (Abb. von Exiqon).

### 7.1.2 Dotplot der messbaren microRNAs (Exiqon)



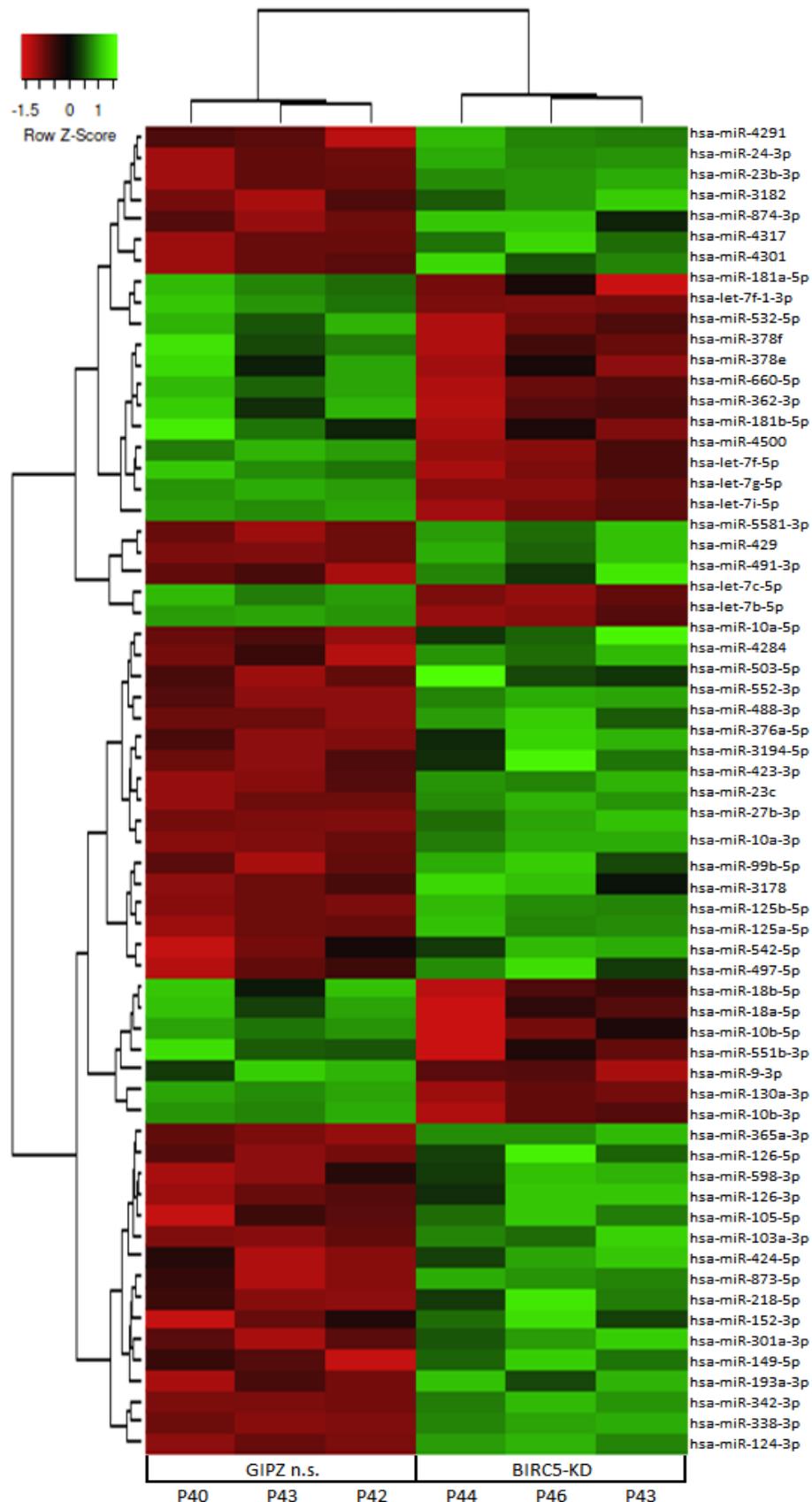
**Abb. II Traditioneller PCA-Plot der NEC-DUE1 (Exiqon).** Die Hauptkomponentenanalyse (PCA, *Principal Component Analysis*) wurde auf alle Proben mit den 50 microRNAs mit der größten Varianz angewendet. Die Proben bilden schwache Cluster aufgrund ihrer abweichenden Biologie (PC1 und PC2). Es wurde die normalisierte log2 Ratio der Daten verwendet und diese auf Null zentriert (der Durchschnittswert aller Proben wurde auf 0 gesetzt und so skaliert, dass sie eine einheitliche Varianz aufweisen (Varianz auf 1 skaliert). P = Passage, KD = *Knockdown*, GIPZ n.s. = *non-silencing* (Abb. von Exiqon).



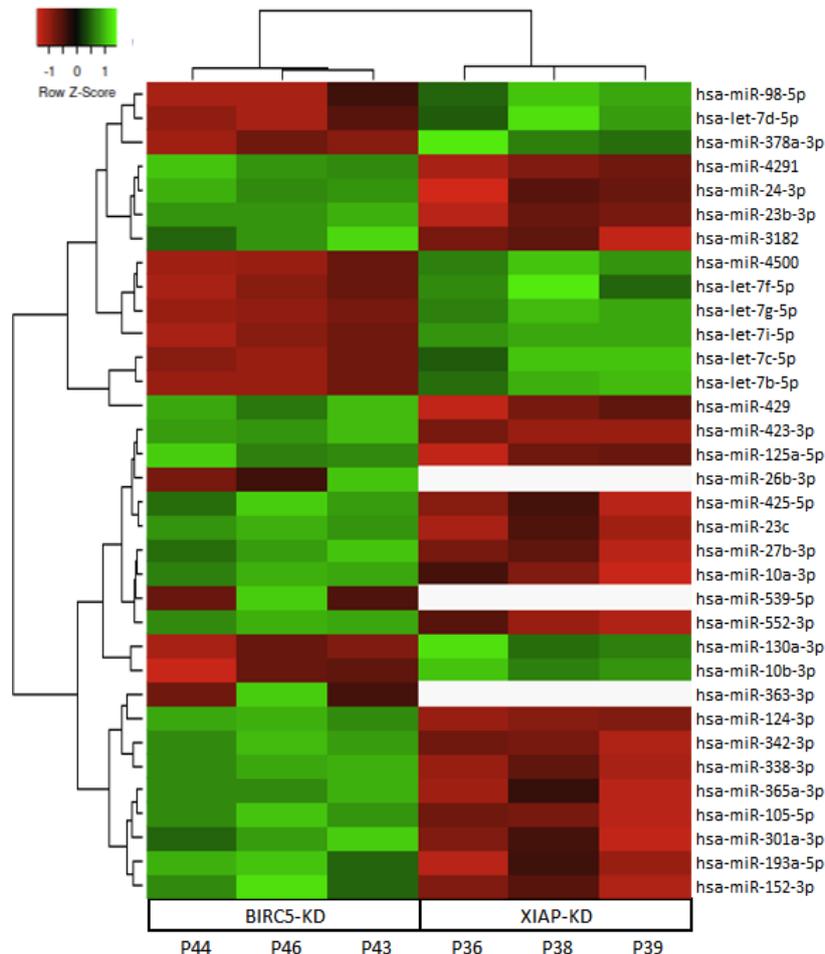
**Abb. III Dotplot-Diagramm der gemessenen microRNAs (Exiqon).** Dargestellt sind humane microRNAs (hier Ereignisse), die oberhalb des Schwellenwertes des Arrays für die jeweilige Probe detektierbar waren. Möglich war insgesamt die Detektion von 2097 verschiedenen im Menschen vorkommenden microRNAs. Der Schwellenwert der Detektion der microRNAs wurde individuell berechnet, als das 1,2-Fache des 25-igsten Perzentil der globalen Signalintensität des *Slides*. MicroRNAs mit Intensitäten oberhalb des Schwellenwertes in weniger als 2 der Proben wurden aus dem Datensatz ausgeschlossen. Insgesamt waren maximal 727 humane microRNAs messbar. Biologisch identische Proben, wie die unterschiedlichen Passagen des jeweiligen *Knockdowns* (KD) oder der GIPZ n.s. (technische Replikate), sollten eine ähnliche Gesamtzahl an microRNAs zeigen. Nach Exiqon liegen die gemessenen microRNAs im erwarteten Bereich und sind für alle Proben gut vergleichbar. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung. Der BIRC5-KD zeigt signifikant mehr messbare humane microRNAs, im Vergleich zu den GIPZ n.s. Passagen. P= Passage, KD= *Knockdown*, GIPZ n.s.= *non-silencing*. Statistik: Student's t-Test. Die p-Werte für die Signifikanz wurden wie folgt oberhalb der Standardabweichung dargestellt: \* $\leq 0,05$ , \*\* $\leq 0,005$ , \*\*\* $\leq 0,005$  und n.s. = nicht signifikant (eigene Abb. nach Daten von Exiqon).

### 7.1.3 Heatmaps zur microRNA-Array-Analyse der NEC-DUE1-Zelllinie (Exiqon)

Nach erfolgter microRNA-Array-Analyse wurden die Daten der Firma Exiqon verwendet, um eigene *Heatmaps* zu erstellen, die eine besser angepasste Visualisierung der für diese Arbeit relevanten Expressionsverhältnisse zwischen den Proben ermöglichen. Für die Analyse wurden die normalisierten (Lowess Regressionsalgorithmus) log<sub>2</sub> Ratio-Werte von Exiqon verwendet (Hy3™/Hy5™ duales Farbdesign, s. 3.1.15.1). Der log<sub>2</sub> Fold Change wurde berechnet, indem der Mittelwert MW der Kontrolle (GIPZ n.s.) vom MW der BIRC5-KD-Proben subtrahiert wurde. Jede Reihe repräsentiert eine signifikant dysregulierte microRNA (p-Werte korrigiert nach Benjamini-und-Hochberg, Korrektur für multiples Testen) und jede Spalte eine Probe. Das Farbschema veranschaulicht den relativen Expressionslevel einer microRNA über alle Proben als *Row Z-Score*: Rot ist ein Expressionslevel unterhalb (Herunterregulation der microRNA) und grün ein Expressionslevel oberhalb (Hochregulation der microRNA) des Durchschnitts. Hierdurch ist die Varianz der Expression der jeweiligen microRNA über alle Proben einschätzbar. Der *Row Z-Score* liefert keine Informationen für einen Vergleich der Regulation der microRNAs untereinander. Für die hierarchische Clusteranalyse wurde die *Complete-Linkage*-Methode gemeinsam mit der euklidischen Distanzmessung angewendet. Es waren bis zu 727 humane microRNAs mit dem miRCURY LNA™ microRNA-Array analysierbar. Zur eigenen Erstellung der *Heatmaps* wurde das Online-Programm Heatmapper (Babicki et al. 2016) verwendet.



**Abb. IV Heatmap** der microRNA-Array-Analyse von NEC-DUE1 GIPZ n.s. und NEC-DUE1 BIRC5-KD (Exiqon). Jede Reihe repräsentiert eine signifikant dysregulierte microRNA und jede Spalte eine Probe. Rot ist ein Expressionslevel unterhalb und grün ein Expressionslevel oberhalb des Durchschnitts. Der Cluster-Baum der microRNAs befindet sich links und oben der Cluster-Baum der Proben. Nach BIRC5-KD waren 64 microRNAs signifikant dysreguliert (korrigierter p-Wert  $\leq 0,05$ ), 21 microRNAs herunter- und 43 microRNAs hochreguliert. Hsa = *homo sapiens*, P = Passage, KD = *Knockdown*, GIPZ n.s. = *non-silencing* (eigene Abb. mit Daten von Exiqon, Programm: Heatmapper (Babicki et al. 2016)).



**Abb. V Heatmap der microRNA-Array-Analyse von NEC-DUE1 BIRC5-KD mit XIAP-KD (Exiqon).** Dargestellt sind die 34 signifikantesten Ergebnisse nach ungepaarter t-Test-Statistik ( $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ). Für die Analyse wurden die normalisierten  $\log_2$  Ratio-Werte von Exiqon verwendet. Links ist der microRNA Cluster-Baum und oben ist der Proben-Cluster-Baum dargestellt. Rot ist ein Expressionslevel unterhalb des Durchschnitts und grün ein Expressionslevel oberhalb des Durchschnitts (*Row Z-Score*). Hsa = *homo sapiens*, P = Passage, KD = *Knockdown*, GIPZ n.s. = *non-silencing* (eigene Abb. mit Daten von Exiqon, Programm: Heatmapper (Babicki et al. 2016)).

#### 7.1.4 Differenziell exprimierte microRNAs nach BIRC5-KD (Exiqon)

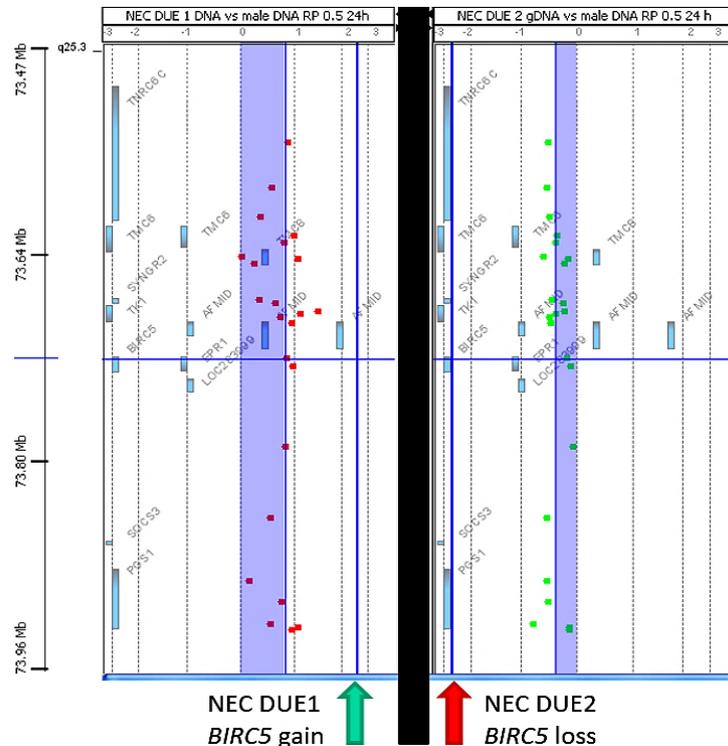
**Tab. I MicroRNAs nach BIRC5-KD in NEC-DUE1**

Nr.	Name [hsa]	AvgHy3	logFC	adj. p. Val	Nr.	Name [hsa]	AvgHy3	logFC	adj. p. Val
1	miR-130a-3p	6,884	-1,4	7,90E-05	11	miR-27b-3p	9,88	0,783	6,21E-04
2	miR-342-3p	6,605	1,292	7,90E-05	12	miR-10b-3p	7,133	-1,088	6,21E-04
3	<b>miR-124-3p</b>	7,375	1,732	7,90E-05	13	miR-125a-5p	8,573	0,767	6,76E-04
4	<b>miR-338-3p</b>	7,729	1,208	7,90E-05	14	let-7c-5p	9,608	-0,749	6,76E-04
5	miR-10a-3p	7,588	0,936	2,14E-04	15	miR-4500	10,289	-0,803	8,20E-04
6	<b>let-7g-5p</b>	10,765	-0,885	2,14E-04	16	miR-488-3p	6,088	0,775	1,26E-03
7	<b>let-7i-5p</b>	9,286	-1,193	2,14E-04	17	<b>miR-23b-3p</b>	11,201	0,644	1,26E-03
8	miR-125b-5p	6,112	0,873	2,72E-04	18	miR-660-5p	6,258	-0,748	1,97E-03
9	miR-552-3p	6,893	0,894	4,78E-04	19	let-7f-5p	9,641	-0,741	1,97E-03
10	let-7b-5p	9,885	-0,823	4,85E-04	20	<b>miR-24-3p</b>	11,089	0,562	1,98E-03

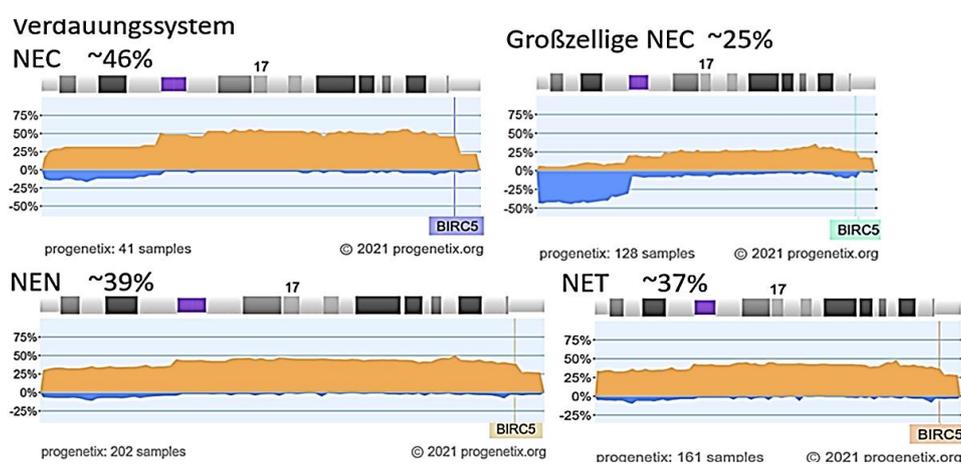
Die Tab. I zeigt die unterschiedlich exprimierte microRNAs nach BIRC5-KD in NEC-DUE1. Gezeigt werden die ersten top 20 microRNAs (Rangfolge nach p-Werten (adj.p.Val = korrigierte p-Werte, s. Abb. IV). Die gemessenen Expressionslevel sind relativ und nicht quantitativ. AvgHy3 = Durchschnitt Hy3™ Farbsignal, logFC =  $\log_2$  Fold Change (Abweichung in der microRNA-Expression), hsa = *homo sapiens* (eigene Tab. mit Daten Exiqon).

### 7.1.5 Unterschiede zwischen den NEC-Zelllinien

Die Array-CGH-Analyse (*Array Comparative Genomic Hybridization*) wurde von Dr. B. Möhlendick (Chirurgische Forschung, Uniklinik Düsseldorf) mittels kompetitiver Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit 2 Farben (rot, grün) durchgeführt. Die denaturierte, einzelsträngige Proben-DNA wird mit einer männlichen Referenz-DNA (male DNA RP) in einer 1:1 Ratio hybridisiert.



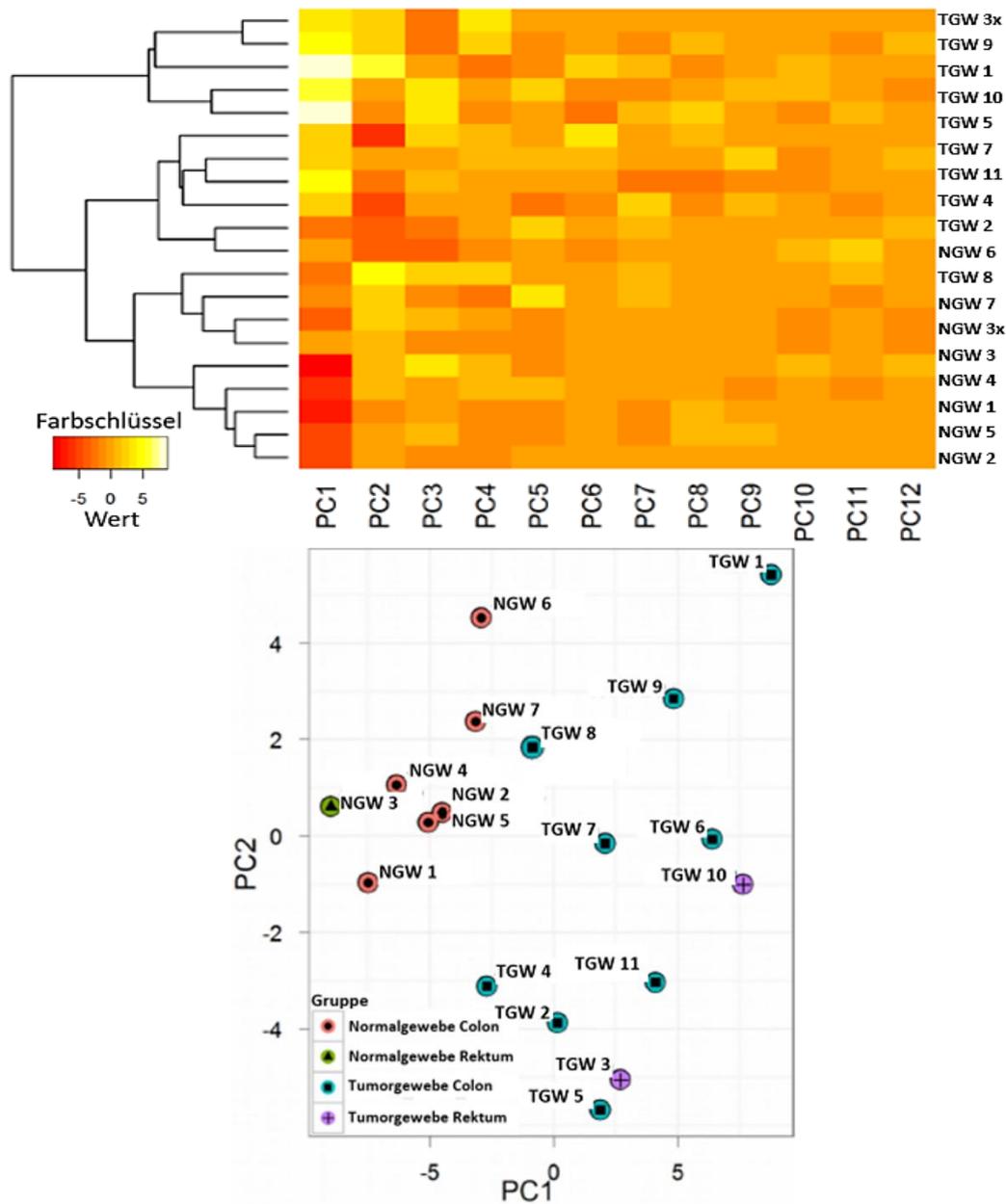
**Abb. VI Array-CGH-Analyse der NEC-Zelllinien.** Die Sonden des DNA-Microarrays (8x60K Microarray, Agilent) waren gegen Abschnitte des humanen Genoms (HG18) gerichtet. Eine höhere Intensität des roten Fluorophors (Probe) zeigt einen Zugewinn (*gain*), eine höhere Intensität des grünen Fluorophors (Referenz DNA) zeigt einen Verlust (*loss*). Bei gleicher Intensität erscheint ein gelbes Signal. Der Threshold wurde auf 5 zusammenhängende Proben mit gleichem Ergebnis gesetzt, die Auflösung des Arrays betrug bis zu 300 kbp. Die Daten und die Abb. stammen von Dr. Birte Möhlendick.



**Abb. VII Datensätze von NEC, NEN und NET des Verdauungssystems und großzelligen NEC (Progenetix).** Dargestellt ist Chromosom 17 mit der Position von BIRC5 (violett), Duplikationen (orange) und Deletionen (blau) innerhalb der Proben- (*Sample*) Anzahl. Durchschnittlich liegt eine Duplikation von *BIRC5* in ~40% und Deletionen in 2,5% der Fälle vor bei NEN, NET und NEC. Die Daten stammen aus Array- und chromosomaler CGH, *Whole Genome, Whole Exome Sequencing* (WGS, WES) Studien. Die Klassifikation richtet sich nach der *International classification of Diseases in Oncology* (ICD-O) und NCI *"neoplasm" classification*. (Datenbank und Software Gruppe Michael Baudis, Universität Zürich und das Schweizer Institut für Bioinformatik). Neuroendokrines Carcinom (NEC), Neuroendokrine Neoplasie (NEN) und Neuroendokriner Tumor (NET).

## 7.2 Analysen zu 4.3 Array-Analyse der NEC-G3-Primärtumorproben (Exiqon)

### 7.2.1 PCA-Plots der NEC-G3-Primärtumorproben (Exiqon)

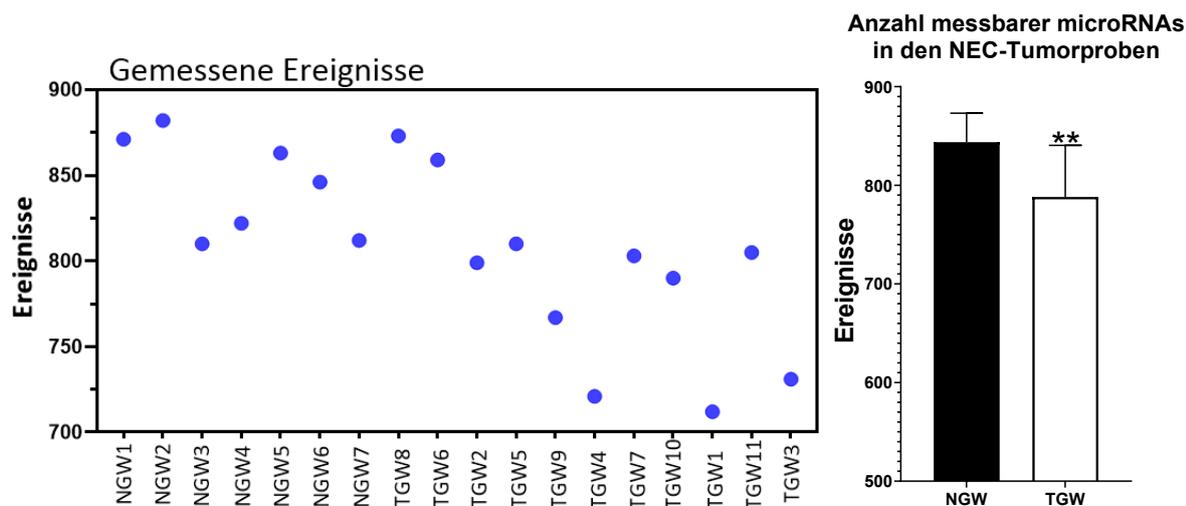


**Abb. VIII Traditioneller PCA-Plot und Matrix PCA-Plot der NEC-G3-Primärtumorproben (Exiqon).**

Im traditionellen PCA-Plot (*Principal Component Analysis*, Hauptkomponentenanalyse, oben, Abb. Exiqon) teilen sich die FFPE-NEC-G3 (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe von neuroendokrinen Carcinomen Grad 3) Tumorgewebe (TGW) und Normalgewebe (NGW) aufgrund ihrer abweichenden Biologie (PC1 und PC2) in unterschiedliche Quadranten auf.

Der Matrix PCA-Plot (Abb. Exiqon, unten) zeigt Muster zwischen unabhängigen Faktoren eines Probenpools. Diese Faktoren können biologisch oder technisch beeinflusst sein. PC1 und PC2 stellen eine Veränderung der microRNA-Expression aufgrund der abweichenden Biologie der Proben oder unterschiedlicher Behandlungen dar. PC3 und höher beschreiben grundlegende, wenig variable Faktoren, wie Probenherstellungsbedingungen, Operator und Lagerungszeit. Die Gruppierung der Proben wurde mittels hierarchischer Clusteranalyse der microRNAs mit *Complete-Linkage*-Methode und euklidischer Distanzmessung dargestellt. Die PCA wurde auf alle Proben mit den 50 microRNAs mit der höchsten Standardabweichung (größter Effekt) angewendet. Es wurde die normalisierte log2 Ratio der Daten verwendet und diese auf Null zentriert (der Durchschnittswert aller Proben wurde auf 0 gesetzt und so skaliert, dass sie eine einheitliche Varianz aufweisen (Varianz wurde auf 1 skaliert)).

## 7.2.2 Dotplot der messbaren microRNAs (Exiqon)



**Abb. IX Dotplot-Diagramm der gemessenen unterschiedlichen microRNAs (Exiqon).** Dargestellt sind microRNAs (hier Ereignisse), die oberhalb des Schwellenwertes für die jeweilige Probe detektierbar waren. Insgesamt kann der Array 2102 verschiedene humane microRNAs zuzüglich viraler microRNAs detektieren. Der Schwellenwert zur Detektion der microRNAs wurde individuell für jeden Mikroarray berechnet, als das 1,2-Fache des 25-igsten Perzentils der globalen Signalintensität des Slides. MicroRNAs, die Intensitäten oberhalb des Schwellenwertes in weniger als 20% der Proben zeigten, wurden aus dem Datensatz für die Expressionsanalyse ausgeschlossen (insgesamt 1104 microRNAs). Biologisch identische Proben wie Normalgewebe NGW im Vergleich zum Tumorgewebe TGW (jeder Patient stellt ein biologisches Replikat dar) sollten eine ähnliche Anzahl an microRNAs zeigen. Nach Exiqon sind die microRNAs für alle Proben gut vergleichbar. Das Balkendiagramm (rechts) zeigt den Mittelwert der Daten mit zugehöriger Standardabweichung, dass signifikant weniger messbare microRNAs (hier nur humane microRNAs) in den TGW vorhanden waren als in den NGW (Statistik Student's t-Test). D. h., es werden durchschnittlich in TGW bis zu 50 microRNAs nicht mehr messbar exprimiert. P-Werte = \*\* $\leq 0,005$  (eigene Abb. mit Daten von Exiqon).

## 7.2.3 Heatmaps zu der microRNA-Array-Analyse der Patientenproben (Exiqon)

Die folgenden *Heatmap*-Diagramme zeigen das Ergebnis der microRNA-Array-Analyse der NEC-G3-Primärtumorproben (Exiqon). Jede Reihe repräsentiert eine der signifikant dysregulierten microRNAs und jede Spalte eine Probe. Das Farbschema veranschaulicht den relativen Expressionslevel einer microRNA über alle Proben, dargestellt als *Row Z-Score*: Rot ist ein Expressionslevel unterhalb des Durchschnitts (Herunterregulation der microRNA) und grün ein Expressionslevel oberhalb des Durchschnitts (Hochregulation der microRNA). Hierdurch ist die Varianz der Expression der jeweiligen microRNA über alle Proben einschätzbar. Der *Row Z-Score* liefert keine Informationen für einen Vergleich der Regulation der microRNAs untereinander. Für die hierarchische Clusteranalyse wurde die *Complete-Linkage*-Methode gemeinsam mit der euklidischen Distanzmessung angewendet. Der Cluster-Baum der microRNAs ist links und oben der Cluster-Baum der Proben zu sehen. Für die Analyse wurden die normalisierten (Lowess Regressionsalgorithmus) logarithmischen Ratio-Werte ( $\log_2$  Ratio-Werte) verwendet ((Hy3™/Hy5™ duales Farbdesign, s. 3.1.15.1). Der  $\log_2$  Fold Change wird berechnet, indem der Mittelwert MW der Kontrolle (hier Normalgewebe NGW) vom MW der Tumorgewebe TGW-Proben subtrahiert wird. Zur eigenen Erstellung der *Heatmaps* aus den Daten von Exiqon wurde das Online-Programm Heatmapper (Babicki et al. 2016) verwendet.

## 7.2.4 Heatmap der gepoolten microRNA-Array-Analyse (Exiqon)

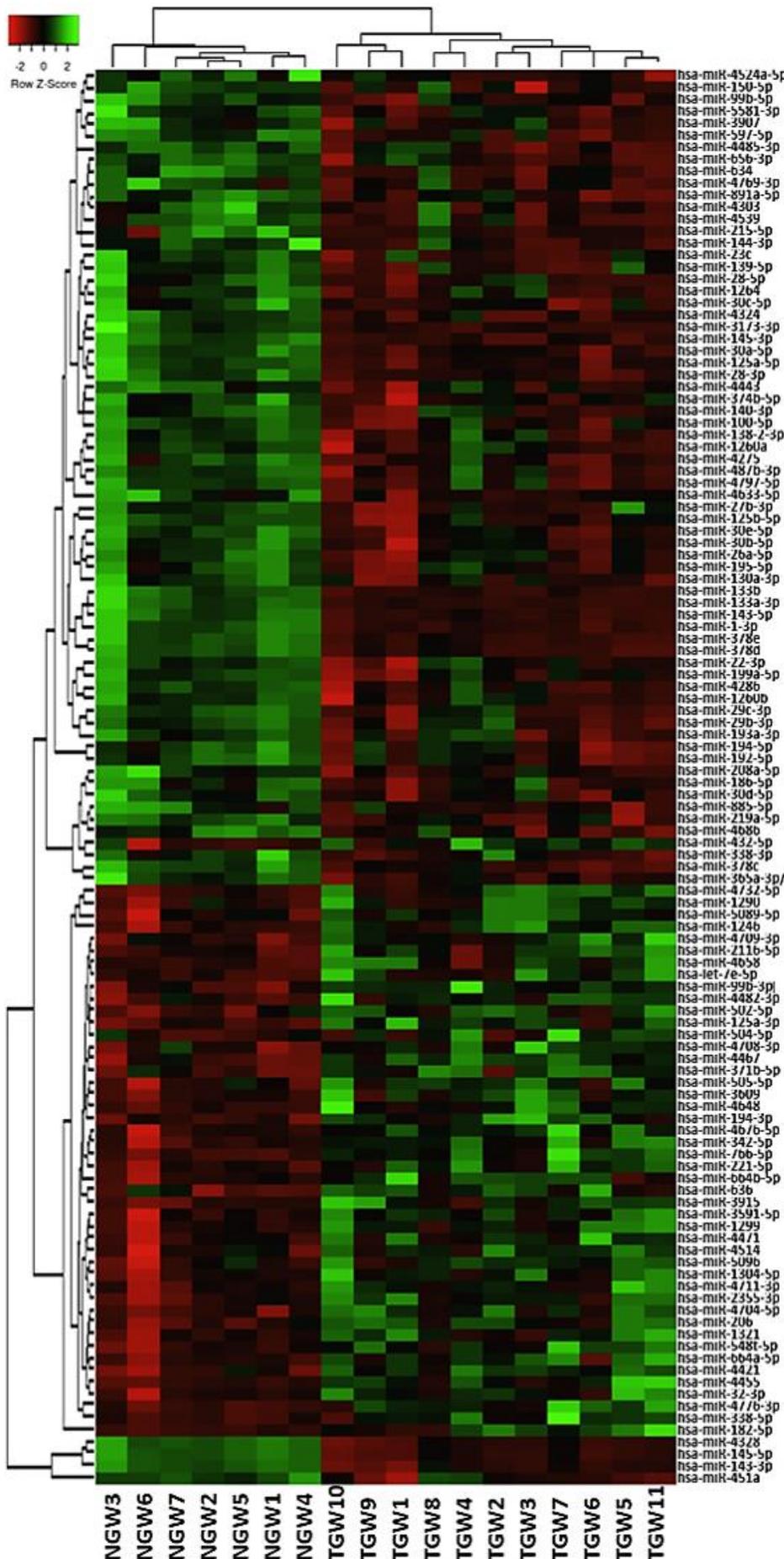
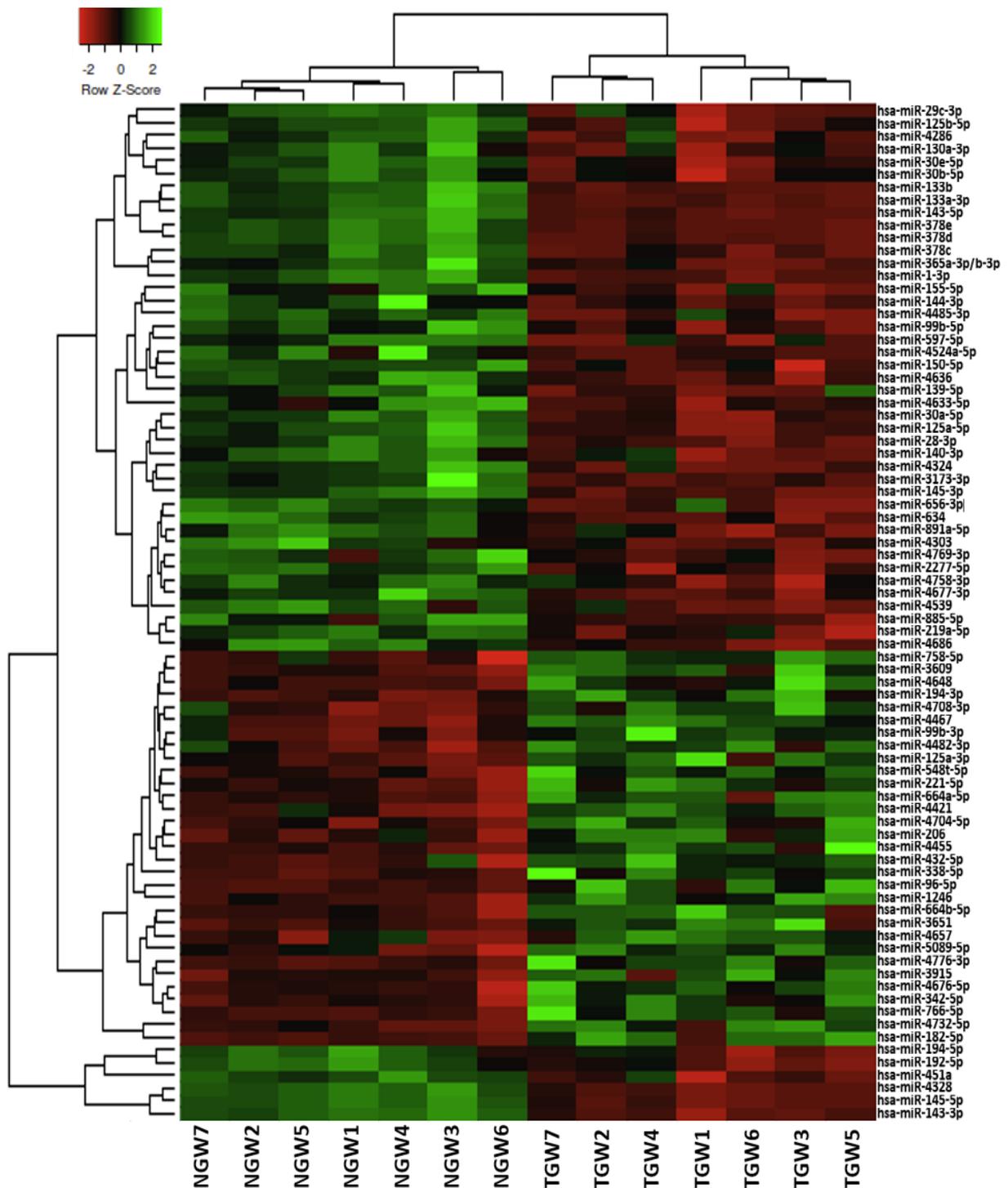


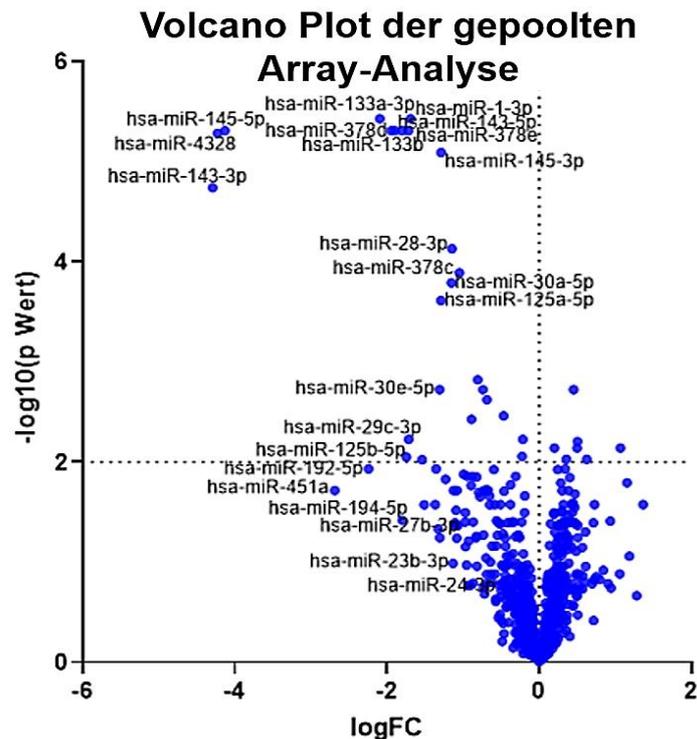
Abb. X Heatmap der gepoolten microRNA-Array-Analyse der TGW und NGW (Exiqon). In der Heatmap wurden die normalisierten log<sub>2</sub> Ratio-Werte farblich anhand eines Row Z-Scores dargestellt. Im Rahmen der gepoolten Analyse erfolgte die Berechnung des log<sub>2</sub> Fold Change (logFC) von TGW ohne NGW über den Mittelwert aller NGW (s. Tab. III). Dargestellt sind die 118 signifikantesten (p-Wert < 0,0063) deregulierten microRNAs zwischen TGW und NGW nach Anwendung des multiplen ungepaarten Student's t-Test (eigene Abb. mit Daten von Exiqon, Programm: Heatmapper (Babicki et al. 2016)).

### 7.2.5 Heatmap der gepaarte microRNA-Array-Analyse (Exiqon)



**Abb. XI Heatmap der gepaarten microRNA-Array-Analyse der TGW und NGW (Exiqon).** Bei den in der Heatmap dargestellten Daten handelt es sich um die normalisierten log<sub>2</sub> Ratio-Werte, die farbig anhand eines Row Z-Scores dargestellt wurden. Die gepaarte Analyse erfolgte mit der Berechnung des log<sub>2</sub> Fold Change des jeweiligen TGW mit seinem korrespondierenden NGW. Die statistische Auswertung erfolgte über einen multiplen ungepaarten t-Test, der für eine höhere Gewebespezifität ausschließlich mit den Colon-Proben berechnet wurde. NGW3 und TGW3 sind Rektumproben und nicht in der Statistik enthalten. Dargestellt sind die 80 signifikantesten (t-Test p-Wert < 0,0063) deregulierten microRNAs. Es zeigt sich eine deutliche Aufteilung der Proben in die erwarteten NGW- und TGW-Cluster (eigene Abb. nach Daten von Exiqon, Programm: Heatmapper (Babicki et al. 2016)).

## 7.2.6 Volcano Plots zu den Patientenproben (Exiqon)



**Abb. XII Volcano Plots zu der gepoolten und gepaarten FFPE-NEC-G3 microRNA-Array-Analyse (Exiqon).** Die Volcano Plots stellen microRNAs mit den größten Abweichungen zwischen TGW und NGW dar. Hierbei wurde bei der gepoolten Analyse für TGW ohne NGW der MW aller NGW verwendet und für die gepaarte Analyse die Tumورproben des Colons mit ihrem korrespondierenden NGW verglichen. In der Y-Achse wurde der negative Logarithmus der p-Werte aufgetragen. MicroRNAs mit geringer Signifikanz erscheinen unten. Auf der X-Achse wurde der log<sub>2</sub> Fold Change (logFC) zwischen den TGW und NGW aufgetragen. MicroRNAs, die stärker dereguliert wurden, sind in den oberen beiden Quadranten zu finden. MicroRNAs im negativen Bereich wurden im TGW herunter- und microRNAs im positiven Quadranten hochreguliert im Vergleich zum NGW (eigene Abb. nach Daten von Exiqon).

## 7.2.7 Differentiell exprimierte microRNAs der NEC-G3 Primärtumoren (Exiqon)

Tab. II MicroRNAs in NEC-G3 Primärtumoren

Nr.	gepoolte Analyse				gepaarte Analyse nur Colon			
	Name	logFC	P.Val	AvgHy3	Name	logFC	P.Val	AvgHy3
1	hsa-miR-1-3p	-1,693	1,00E-06	6,91	<b>hsa-miR-143-3p</b>	-3,766	1,00E-06	10,17
2	hsa-miR-133a-3p	-2,096	1,00E-06	6,25	<b>hsa-miR-145-5p</b>	-3,778	1,00E-06	9,45
3	hsa-miR-133b	-1,901	1,00E-06	6,99	hsa-miR-378d	-1,982	1,00E-06	6,72
4	<b>hsa-miR-143-3p</b>	-4,295	1,00E-06	10,17	hsa-miR-378e	-1,753	1,00E-06	6,83
5	hsa-miR-143-5p	-1,805	1,00E-06	6,59	hsa-miR-4328	-3,831	1,00E-06	9,86
6	hsa-miR-145-3p	-1,291	1,00E-06	6,72	hsa-miR-1-3p	-1,651	2,00E-06	6,91
7	<b>hsa-miR-145-5p</b>	-4,133	1,00E-06	9,45	hsa-miR-133a-3p	-2,143	2,00E-06	6,25
8	hsa-miR-28-3p	-1,149	1,00E-06	6,15	hsa-miR-143-5p	-1,747	3,00E-06	6,59
9	hsa-miR-378d	-1,947	1,00E-06	6,72	hsa-miR-133b	-1,831	4,00E-06	6,99
10	hsa-miR-378e	-1,72	1,00E-06	6,83	hsa-miR-145-3p	-1,225	1,00E-05	6,72
11	hsa-miR-4328	-4,233	1,00E-06	9,86	hsa-miR-378c	-1,124	2,90E-05	7,05
12	hsa-miR-30a-5p	-1,154	2,00E-06	6,746	hsa-miR-28-3p	-1,169	4,80E-05	6,15
13	hsa-miR-378c	-1,051	2,00E-06	7,05	hsa-miR-125a-5p	-1,175	1,51E-04	9,49
14	hsa-miR-125a-5p	-1,294	4,00E-06	9,49	hsa-miR-182-5p	1,713	2,57E-04	6,30
15	hsa-miR-30e-5p	-1,31	3,90E-05	7,451	<b>hsa-miR-192-5p</b>	-2,306	2,58E-04	7,91
16	hsa-miR-29c-3p	-1,718	1,55E-04	7,607				
17	hsa-miR-125b-5p	-1,746	2,93E-04	9,599				
18	hsa-miR-4286	-1,543	3,43E-04	9,987				
19	hsa-miR-30b-5p	-1,356	4,53E-04	8,200				
20	<b>hsa-miR-192-5p</b>	-2,244	4,65E-04	7,911				
21	hsa-miR-4633-5p	-1,231	7,43E-04	8,253				

Die Tab. II zeigt die microRNAs mit den größten Expressionsunterschieden log<sub>2</sub> Fold Change (logFC) zwischen TGW und NGW in Verbindung mit den niedrigsten p-Werten (Student's t-Test p.Val). Die gepoolte Analyse enthält alle Tumorproben. Die Berechnung des logFC (log<sub>2</sub> Fold Change) erfolgte mit dem Mittelwert aller Normalgewebe. Bei der gepaarten Analyse wurde jedes TGW mit seinem korrespondierenden NGW verglichen. Die gemessenen Expressionslevel sind relativ und nicht quantitativ. Gezeigt werden die ersten top microRNAs und nicht alle nach t-Test signifikant deregulierten microRNAs (250 nach gepoolter, über 210 nach gepaarter Array-Analyse), Rangfolge nach p-Werten. In der gepaarten Analyse sind nicht alle microRNAs aus der gepoolten Analyse enthalten, da nicht alle hier signifikant waren. AvgHy3= Durchschnitt Hy3™ Farbsignal, hsa= *homo sapiens* (eigene Tab. mit Daten von Exiqon).

Die Firma Exiqon verwendete eine p-Wert-Adjustierung für multiple Tests, die Korrekturformel von Benjamini-Hochberg-Prozedur. Aufgrund dessen haben microRNAs bei einem korrigierten p-Wert von 0,05 den Signifikanztest nicht bestanden und galten demnach als nicht dereguliert in den Primärtumoren. Die Firma Exiqon legte aber eine andere Gewichtung auf die Array-Ergebnisse als diese Arbeit. Mit den Hypothesentests sollten möglichst beste Kandidaten differentiell exprimierter microRNAs für Folgeanalysen identifiziert werden (s. p-Wert als Surprise-Index 4.2.3 Ende Kurzzusammenfassung). Dies dient der Qualitätssicherung und legt einen wirtschaftlichen Fokus auf erhobene Daten. Demgegenüber legt diese Arbeit einen explorativen Fokus auf die Daten (im Sinn von Fisher p-Wert als Surprise-Index). Auf eine Kontrolle nach Benjamini-Hochberg (p-Wert-Cutoff 0,05) wurde verzichtet, da die hohe Zahl der nach t-Test signifikant deregulierten microRNAs eingegrenzt werden musste. Das Kriterium war microRNAs zu finden, die den größten Effekt (höchste Signifikanz und Differenz) im Vergleich zwischen TGW und NGW zeigten. Diese microRNAs sind als tumorigen-dereguliert anzusehen.

## 7.2.8 IRS und aCGH-Daten der NEC-G3-Primärtumore

Tab. III IRS und aCGH-Daten der einzelnen NEC-Tumorproben

Typ	Patienten	aCGH <sup>1</sup> BIRC5	IRS BIRC5 zytoplasm <sup>2</sup>	IRS BIRC5 nukleär <sup>2</sup>
Colon/ Rektum NECs	TGW1	1	6	0
	TGW2	0	4	3
	TGW3	0	4	4
	TGW4 NEC-DUE2	-1	8	6
	TGW5	0	4	4
	TGW6	1	4	9
	TGW7	1	4	4
	TGW8	0	4	4
	TGW9	0	4	6
	TGW10	1	N/A	N/A
	TGW11	0	4	4
Magen NECs	TGW1 NEC-DUE1	1	4	6
	TGW2	0	0	0
	TGW3	N/A	4	4
	TGW4	1	N/A	N/A
	TGW5	1	4	9

IRS	
0-2	negativ
3-4	schwach positiv
6-8	moderat positiv
9-12	stark positiv
aCGH	
-1	Gen Verlust
0	Keine Veränderung
1	Gen Zugewinn

<sup>1</sup>aCGH-Daten von Dr. B. Möhlendick (Chirurgische Forschung UKD),

<sup>2</sup>IRS-Daten von Dr. L. Dizdar (Chirurgie UKD) 2017)

Die Tab. III zeigt vorhandene aCGH und IRS-Daten der Patientenproben. Die aCGH betreffend steht der Wert 1 für einen Zugewinn, 0 für ein Gleichbleiben und -1 für einen Verlust des *BIRC5*-Genbereichs. Die IRS-Daten wurden für den Nukleus und für das Zytoplasma der Tumorzellen bestimmt. Hierzu wurden Gewebeschnitte mit *BIRC5*-Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Der IRS ergibt sich durch die Multiplikation des Färbintensitäts-Scores mit dem Häufigkeitsscore. Die Unterscheidung in 2 IRS-Werte ist sinnvoll, da *BIRC5* in verschiedenen Kompartimenten mit abweichender Funktion vorkommt.

## 7.2.9 Transkriptionsfaktoren (TF) von microRNA Genen

Tabelle IV Transkriptionsfaktoren (TF) von microRNA Genen

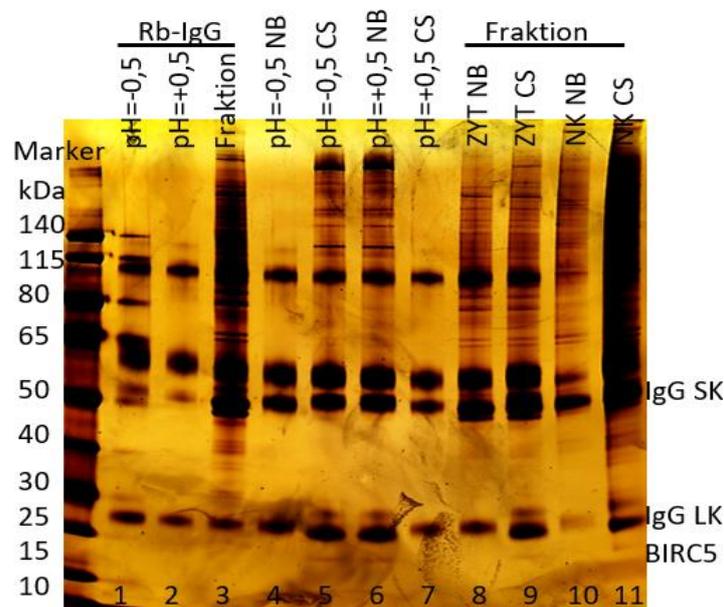
Gen	MIR124-3	MIR24-1	MIR23B (MIR27B)	MIR24-2	MIR124-2	MIR124-1
TSS-Entfernung (kb)	-0,1	-0,3	-63,4	-8,2	-1,1	-1,6
TF Bindungs-stellen Quellen: FANTOM5 Ensembl ENCODE EPDnew dbSUPER Craniofacial Atlas	POLR2A	POLR2A RBM22	POLR2A RBM22	DDX20 HNRNPL KHSRP POLR2A/B RBM22 RELB STAT3 TARDBP	POLR2A	POLR2A     XRCC5 ZEB1
	TARDBP XRCC5 ZEB2		XRCC5 ZEB2	ZEB1/2		

Die Tab. IV fasst die möglichen TF zusammen, die microRNA-Gene regulieren könnten und aufgrund der folgenden IP-Ergebnisse interessant sind. Die Informationen stammen aus der Datenbank GeneHancer (humane regulatorische Elemente, Version 4.8). Die gezeigten TFs tauchen in mindestens 2 anderen Datenbanken auf. Der Abstand der TF-Bindungsstelle (TFB) zum eigentlichen Gen (TSS) wird berücksichtigt. Es gibt eine 69% Übereinstimmung zu bereits publizierten TFs (Fishilevich et al. 2017). TSS= Transkriptionsstartpunkt, kb= Kilobasen, TF= Transkriptionsfaktor (eigene Tab.).

### 7.3 Analyse der Massenspektrometrie (BMFZ)

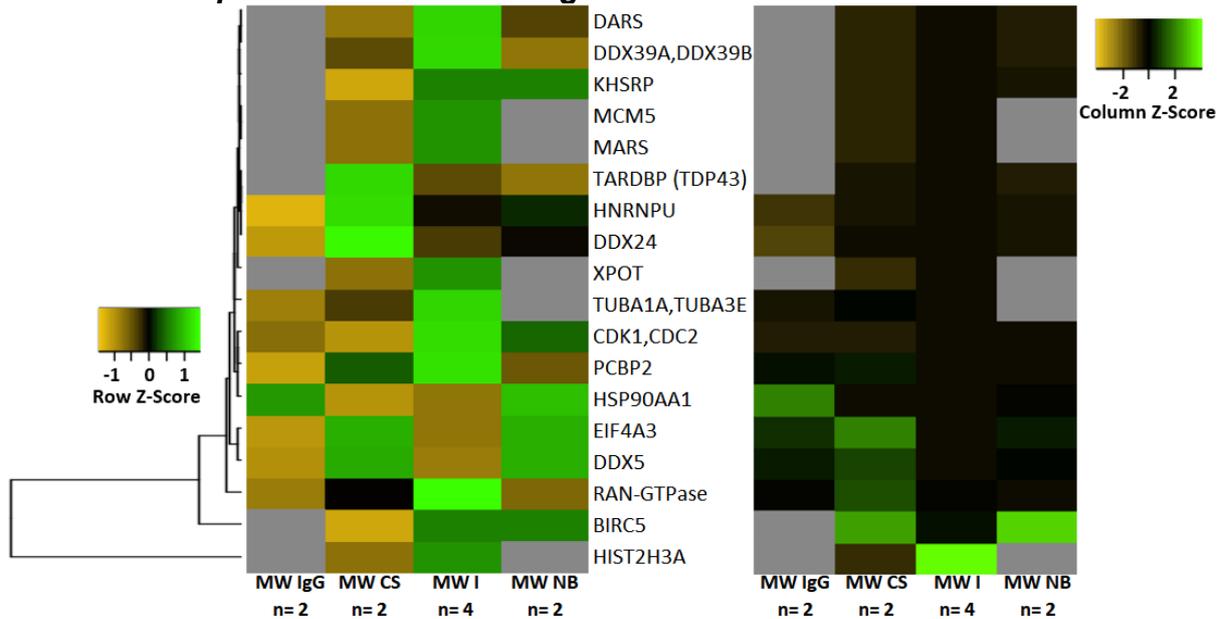
Die Proben wurden zur Durchführung der Co-Immunpräzipitations-Methode (Co-IP) eigenständig gewonnen und die isolierten Proteine zur Probenmessung an das Biomedizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität übergeben. Die Proben wurden dort im Rahmen der Massenspektrometrie von Dr. G. Poschmann weiterverarbeitet. Hierbei wurden die Proteinsuspensionen auf ein Silbergel aufgetragen und von Verunreinigungen befreit. Das Silbergel ist genauer als das Western Blotting, da die realen Proteinmengen anhand der Bandenstärke zur Bewertung der Probenqualität besser eingeschätzt werden können. Proben mit der stärksten Bande im Bereich der erwarteten kDa des gesuchten Proteins wurden für die Massenspektrometrie eingesetzt. Sie ermöglicht eine klare Identifikation und relative Quantifizierung der während der Co-IP gebundenen Proteine.

#### 7.3.1 Silbergel zur Bewertung der Proben für die Massenspektrometrie (BMFZ)



**Abb. XIII Silbergel zur Bewertung der Proben für die Massenspektrometrie (BMFZ).** Die Sichtbarmachung der Proteine durch eine Silberfärbung (Nesterenko et al. 1994) ermöglicht den Vergleich von Proteinmustern der Proben. Die Silberfärbung ist hochsensitiv (Proteinmengen im Nanogrammbereich) und beeinflusst nicht die Massenspektrometrieanalyse. Das Gel zeigt die Proben nach IP mit endogenem BIRC5. Die Proben 5, 6, 9 und 11 enthalten mehr BIRC5 als die übrigen Proben. Das BIRC5-Monomer läuft im Gel bei ~17 kDa und in der Massenspektrometrie bei 16,5 kDa. Die pH-Wert-Änderungen haben den größten Einfluss auf die BIRC5-Bindung. Im Fall der Fraktionierung scheint nur der verwendete Antikörper ausschlaggebend. Das Silbergel wurde im BMFZ der HHU von Dr. G. Poschmann durchgeführt. Es wurden jeweils 1/10tel der IP-Proben verwendet. SK= Schwere Kette, LK= leichte Kette, Rb= Kaninchen, ZYT= zytoplasmatisch, NK= nukleär, CS= Cell Signaling, NB= NovusBiologicals, Rb-IgG= Kaninchen IgG-Kontrolle (Abb. Dr. G. Poschmann).

### 7.3.2 Heatmaps der BIRC5-Co-IP-Ergebnisse



**Abb. XIV Heatmaps der BIRC5-Co-IP-Ergebnisse nach Massenspektrometrie der Proben.** NEC-DUE1 Lysate wurden mit einem gegen BIRC5-gerichteten Antikörper immunpräzipitiert, darunter monoklonale Antikörper von Invitrogen (I, n= 4) und Cell Signaling (CS, n= 2) und ein polyklonaler Antikörper von Novus Biologicals (NB, n= 2). Alle Antikörper stammen aus Kaninchen, weshalb eine Kaninchen IgG-Kontrolle (IgG, n= 2) in der Analyse mitgeführt wurde. Die Probengewinnung und Durchführung der Co-IP erfolgten eigenständig. Die Massenspektrometrie wurde im BMFZ (Düsseldorf) von Dr. G. Poschmann durchgeführt.

Die im Massenspektrometer gemessenen Intensitätswerte der IP-Durchläufe wurden in einer gemeinsamen Analyse normalisiert, wodurch unterschiedliche Proben direkt vergleichbar wurden. Durch die markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (*label-free quantification*) kann die relative Menge der in einer Probe enthaltenen Proteine bestimmt werden. Das Programm MaxLFQ (*generic label-free quantification technology*) ermöglicht Protein-Quantifizierung ohne isotopische Färbung über eine Intensitätsbestimmung und Normalisierungsprozedur, zugänglich in der *MaxQuant computational proteomics Platform* (Cox et al. 2014).

In den *Heatmaps* sind bereits bekannte und für diese Arbeit relevante mögliche BIRC5-Bindungspartner dargestellt. Aus den LFQ normalisierten Intensitätswerten wurde für jeden Antikörper der Mittelwert MW gebildet und als *Row Z-Score* (Reihen Z-Wert) und als *Column Z-Score* (Spalten Z-Wert) dargestellt. Der Z-Wert der jeweiligen Reihe bzw. Spalte beschreibt sein Verhältnis zu deren Mittelwert. Ein positiver Z-Wert in der Heatmap zeigt, dass die Intensität über dem Mittelwert der Reihe oder Spalte lag (Grün = starke Bindung) und ein negativer (Gelb= geringe Bindung) zeigt, dass er darunter lag. Für die hierarchische Clusteranalyse wurde die *Complete-Linkage*-Methode gemeinsam mit der euklidischen Distanzmessung angewendet. Links befindet sich der Cluster-Baum der Proteine. Proben, in denen keine Intensitäten für das jeweilige Protein gemessen wurden, sind grau dargestellt (eigene Abb. nach Daten des BMFZ, Programm Heatmapper (Babicki et al. 2016)).

### 7.3.3 Tabellen von RNA-Bindungsproteine (RBP) zu den Co-IP-Ergebnisse

Tabelle V MicroRNA-Biogenese relevante RNA-Bindungsproteine und ihre Bindungsstellen

Symbol Name	Bindungs-Motiv	Art der Regulation	Beispiele	Quelle
<b>ELAVL1 (HUR)</b> (→) <i>ELAV Like RNA Binding Protein 1</i>	GUUU Poly (U)	DROSHA Loop/ <b>negativ</b> Rekrutiert MSI2, stabilisiert Stem	miR-7	Michlewski und Cáceres. 2019 Kinoshita et al. 2021 RBPDB v1.3
<b>MSI2</b> (→) <i>Musashi RNA Binding Protein 2</i>	Rekrutiert UAG UAGUUG/UAGUAA/UAGUAG	<b>Leitstrang</b> <b>negativ</b> Rekrutiert von ELAVL1	miR-7, let-7a- 1/2/3, let-7b, let-7c, let-7g, let-7f1/2, let-7i	Michlewski und Cáceres. 2019 Kinoshita et al. 2021 Treiber et al. 2017 van Nostrand et al. 2021
<b>RBM4 (RBP)</b> (→) <i>RNA Binding Motif Protein 4</i>	GCGC(G) GCGCG/GCGCA/GCGUA CGCG			Kinoshita et al. 2021 van Nostrand et al. 2021 Treiber et al. 2017 RBPDB v1.3
<b>RBMX (HNRNPG)</b> <i>RNA Binding Motif Protein X-Linked</i>	CCA/C CCAG			Kinoshita et al. 2021 RBPDB v1.3
<b>HNRNPH1</b> (→) <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein H1</i>	GGGAGG/ GGGA G-reiche Motive GGGGGC Poly(G)	positiv	miR-106b, miR25, miR-224, miR-23b, miR-196b, miR-21, miR-34a, miR-9-1, miR-128-2, let-7a-3, miR-98	Kinoshita et al. 2021 Volk und Shomron. 2011 Kutluay et al. 2019 Katz et al.2010 Caputi und Zahler 2001 Treiber et al. 2017
<b>KHSRP</b> (→) <b>(KSRP)</b> <i>hnRNP KH-Type Splicing Regulatory Protein</i>	TLs mit kurzen G-reichen-Abschnitten GGG, GUUG 5'-Element oder 2 sequentielle Gs, AU-reiche Elemente, GUCC 1) 5'- CUGUUGAAUCUCAUGG -3' ja 5'- CUGUUGAAUCUCAUCC -3' ja 5'- CUUUCAAUCUCAUGG -3' nein 2) UGUUAU (Effizienz 61%) UGUUU (Effizienz 56%)	DROSHA/ DICER Loop/positiv	let-7, miR-16, miR-26b, miR-106a, miR-1, miR-15, miR-20a, miR-23b, miR-24, miR-17 1) miR-21	Michlewski und Cáceres. 2019 Volk und Shomron. 2011 1) Trabucchi et al. 2009 2) van Nostrand et al. 2021 Taniuchi et al.2020 Amirouche et al. 2013 Connerty et al. 2015 RBPDB v1.3
<b>MBNL1</b> (→) <i>Muscleblind Like Splicing Regulator 1</i>	CUG-Repeats, CCUG-Repeats CGCUU/GCUGC/CGCGC/UGCUU/ AGCUU/GCAGC/ <b>GCGCA</b> /GCCGC/UGCUA UGCU	DICER Loop/positiv Konkurriert mit LIN28	miR-1	Michlewski und Cáceres. 2019 Sznajder et al. 2016 van Nostrand et al. 2021 RBPDB v1.3
<b>FUS/TLS</b> (→) <b>(HNRNP P2)</b> <i>FUS RNA Binding Protein</i>	GGGGG/GGUGG (Effizienz ~60) GGUG GU-reiche Regionen Poly(G)	rekrutiert DROSHA Stem/positiv Loop/positiv	miR-9, miR-125b, miR132, let-7d, let-7g	Kinoshita et al. 2021 Michlewski und Cáceres. 2019 Morlando et al. 2012 Connerty et al. 2015 van Nostrand et al. 2021 RBPDB v1.3 Treiber et al. 2017
<b>SRSF1/ SRSF9</b> (→) <i>Serine and Arginine Rich Splicing Factor 1/9</i>	GGAGGA/GGAGGG AGGAG/ AGGAA AGGA(C)	DROSHA positiv	miR-7, miR-29b, miR-221, miR-222	Michlewski und Cáceres. 2019 Kinoshita et al. 2021 Van Nostrand et al. 2021 RBPDB v1.3
<b>TARDBP</b> (→) <i>TAR DNA Binding Protein (hnRNP)</i>	GAAUG GUAUG/ GUGUG/ GAAUG/ GAGUG JG-reich	DROSHA/ DICER Loop/positiv	miR-132, miR-143, miR-558-3p, miR-574-3p	Michlewski und Cáceres. 2019 van Nostrand et al. 2021 Connerty et al. 2015
<b>KHDRBS3</b> (→) <i>KH RNA Binding Domain Containing, Signal Transduction Associated 3</i>	AUAAA/UUAAA/ UAAAA/ UAUAU/ CUAAA/ AAUAA/AUUAA/UUUAA/UAAAC/ UAUAA AAUAAU 5'-[AU]UAA-3' Motiv			Van Nostrand et al. 2021 RBPDB v1.3
<b>PCBP1/ PCBP2</b> (→) <i>Poly(RC) Binding Protein 1/ 2</i>	C-reiche Motive CCCCC/HCCCC/CCCCH			van Nostrand et al. 2021
<b>PUM2</b> (→) <i>Pumilio RNA Binding Family Member 2</i>	UGUA UGUANAGUA 5'-UGUANAUA-3'	Leitstrang/ <b>negativ</b> Konkurriert mit AGO2	let-7a-1/a-3, let-7g, let7f-2, miR-199a-1/2	RBPDB v1.3 Sternburg et al. 2018 Treiber et al. 2017

Die Tab. V fasst bisher bekannte und vermutete Bindungsstellen relevanter RNA-Bindungsproteine (RBPs) zusammen. Aus den zugehörigen Quellen sind Beispiel-microRNAs aufgelistet. Einige RBPs interagieren nur mit dem terminalen (einzelsträngigen) Loop (TL) der pri-microRNA, wie KHSRP. Das hnRNP FUS bindet auch den Duplex-Stem. Viele RBPs haben einen positiven Einfluss auf die microRNA-Regulation, wie TARDBP, SRSF1/9, MBNL1 und HNRNPH1. RBPs wie ELAVL1 und MSI2 sind dagegen Inhibitoren der microRNA-Biogenese, die den Stem stabilisieren, sodass der Mikroprozessor diesen nicht prozessieren kann. Bei anderen RBPs, wie KHDRBS3,

RBM4 und RBM5 ist die Rolle noch unbekannt. RBPs die mit DICER oder dem Leitstrang interagieren, sind relevanter für einen Prozess im Zytoplasma. RBPs, die mit DROSHA bzw. der pri-microRNA interagieren, sind relevanter für einen Prozess im Zellkern. Wie beim Beispiel von MBNL1 und LIN28 können RBPs um Bindungsstellen konkurrieren. A, U, G, C stehen für die Basen Arginin, Uracil, Guanin, Cytosin und H kann jede dieser Basen sein. Die dargestellten Farben markieren die zugehörigen (möglichen) Sequenzen in den einzelnen pri-microRNAs in den folgenden Tabellen. In diesem Zusammenhang sind *Repeats* Wiederholungen eines Motivs in der Sequenz (eigene Tab. mit Daten aus den angegebenen Quellen).

**Tabelle VI Allgemeine Strukturen zur Erkennung von microRNAs**

Symbol Name	Bindungs-Motiv	Art der Regulation	Beispiele	Quelle
AGO1/2 (EIF2C1/2)	1) kurze RNAs 2) AU-Elemente der 3'UTR von mRNA	Einbau in RISC		
apikales UGU/GUG-Motiv	UGU/GUG	Mikroprozessor-Erkennung der pri-microRNA	miR-125a	Michlewski und Cáceres. 2019 Denzler und Stoffel. 2015 Fang und Bartel. 2015
Mismatch GHG-Motiv	Ungepaart, Position 7-9 am 3'-Arm, Position 8 ist nie ein G	Mikroprozessor-Erkennung der pri-microRNA	miR-125a	Denzler und Stoffel. 2015 Fang und Bartel. 2015
>hsa-mir-125a MI0000469				
<p>UGCCAGUCUCUAGGUCCUGAGACCCUUUAACCUUGAGGACAUCAGGGUCACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCCUGCCGUCUGGC</p>				

Die Tab. VI enthält Bindungsstellen des Mikroprozessor-Komplexes zur Erkennung von microRNAs oder der Bindung des RISC-Komplexes (AGO). Diese Sequenzabschnitte wurden nachfolgend grau dargestellt und innerhalb der gefalteten pri-microRNA rot umrahmt (eigene Tab. mit Daten aus den angegebenen Quellen). Die Angaben zur microRNA-125a entstammen miRBase (*Release 22.1*) (eigens erstellte Tab.).

**Tabelle VII RBP KHSRP, PUM2 und HNRNPH1 pri-microRNA-Bindung**

>hsa-mir-21 MI0000077	miR-21-5p	GUCGGGUAGCUUAUCAGCAGUGAUGUUGACUGUUGAAUCUAUGGCAACACCAGUCGAGGGGUGUCUGACA
>hsa-let-7a-1 MI0000060	let-7a-5p	UGGGUAGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUUAGGGUCACACCCACCACUGGGAGUAACUAUACAACUACUGUCUUUCCUA
>hsa-let-7a-2 MI0000061		AGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUAAGAUUAUCAUCAAGGGAGUAACUGUACAGCCUCCUAGCUUUCCU
>hsa-let-7a-3 MI0000062		GGGUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGGGUCUCUGCCUGCUAUGGGAAACUAUACAACUACUGUCUUUCCU
>hsa-let-7b MI0000063	let-7b-5p	CGGGGUGAGGUAGUAGGUUGUGGGUUUCAGGGCAUGAUGUUGCCCCUCGAAAGUAAUAUACAACCUACUGCCUCCUG
>hsa-let-7i MI0000434	let-7i-5p	CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUCUGUUUCUUCGGUUGUACAUUGCCCGCUUGAGUAAACUGCGCAAGCUACUGCCUUGCUA
>hsa-let-7g MI0000433	let-7g-5p	AGGCUGAGGUAGUAGUUUGUACAGUUUGAGGGUCUUGAUACCACCCUCUACAGGACUAAACUGUACAGGCCACUGCCUUGCCA
>hsa-mir-16-1 MI0000070		GUCAGCAGUGCCUUAGCAGCAGUAAAUAUUGGCGUUAAGAUUCUAAAUAUUAUCCAGUAUUACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUG
>hsa-mir-16-2 MI0000115		GUUCCACUCUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUAGUGAAUAUAUAUAUAACACCAUAUUACUGUGCUGCUUUAGUGUGAC

Die Tab. VII zeigt anhand von Beispielen die Bindungsstellen der RBPs KHSRP (G-reich AU-Elemente), PUM2 (-), HNRNPH1 (-), allgemeine Strukturen (-) aus Tab VI). Die Beispiele stammen aus Tab. V. Die rot markierten pri-microRNAs waren im microRNA-Array herunterreguliert. Die funktionellen microRNAs sind **fett** dargestellt (s. Anhang Abb. IV). Angegeben sind auch die microRNA ID und die Zugangsnummer von miRBase. Die Sequenzen entstammen ebenfalls miRBase (*Release 22.1*). Der Leitstrang wurde zusätzlich beschriftet (eigens erstellte Tab.).

**Tabelle VIII RBP ELAVL1, MSI2 und SRSF1/9 mögliche pri-microRNA-Bindungsstellen**

>hsa-mir-7-1 MI0000263 UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUAGUGAUUUUUGUUGUUUUGAUAAACUAAAUCGACAACAAAUACAGUCUGCCAUAUGGCA CAGGCCAUGCCUCUACAG
>hsa-mir-7-2 MI0000264 CUGGAUACAGAGUGGACCGGCGUGGCCCAUCUGGAAGACUAGUGAUUUUUGUUGUUUGUUCUUCACUGCGCUCAACAAACAAAUCCAGUCUACCUAAU GGUGCCAGCCAUCGCA
>hsa-mir-7-3 MI0000265 AGAUUAGAGUGGCUGUGGUCUAGUGCUGUGUGGAAGACUAGUGAUUUUUGUUGUUUGUGAUGUACUACGACAACAAGUCACAGCCGGCCUCAUAG CGCAGACUCCUUCGAC
>hsa-mir-140 MI0000456 UGUGUCUCUCUCUGUGUCUGGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUACGUAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCCAGGACAGGAUACCG GGGCACC

Die Tab. VIII zeigt mögliche bzw. bekannte Bindungsstellen von ELAVL1 (-), MSI2 (-) und SRSF1/9 (-) innerhalb der pri-microRNA-Sequenzen aus Anhang Tab V. Die funktionellen microRNAs sind **fett** dargestellt. Die Sequenzen, die microRNA ID und die Zugangsnummer stammen von miRBase (*Release 22.1*) (eigens erstellte Tab.).

**Tabelle IX Mögliche pri-microRNA-Bindungsstellen des RBP FUS**

>hsa-mir-9-1 MI0000466 CGGGGUUGGUUGUUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGGUGUGAGUCUUCUAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAAAAUAACCCCA
>hsa-mir-9-2 MI0000467 GGAAGCGAGUUGUUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGUAAUUGGUUCUUAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAAAAUCUUUCA
>hsa-mir-9-3 MI0000468 GGAGCCCGUUUCUCUUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGGCCACAGAGCCGUAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAGAAUAGAUUCA
>hsa-mir-125b-1 MI0000446 UGCGCUCCUCACAGUCCUGAGACCCUAACUUGUGAUGUUUUACCGUUUAAAUCACGGGUUAGGCUCUUUGGGAGCUGCGAGUCGUGCU
>hsa-mir-125b-2 MI0000470 ACCAGACUUUUCUAGUCCUGAGACCCUAACUUGUGAGGUUUUUAGUAACAUCACAAGUCAGGCUCUUUGGGACCUAGGCGGAGGGGA

In der Tab. IX wurden die Bindungsstellen des RBP FUS innerhalb der Bsp. pri-microRNAs aus Tab. 11 gelb markiert. Sie stammen aus Arbeiten, in denen eine Interaktion nachgewiesen wurde, die zugehörigen Quellen sind in der Tab. V aufgelistet. FUS kann hierbei sowohl den einzelsträngigen Loop als auch den doppelsträngigen Stem binden. Die funktionellen microRNAs sind **fett** dargestellt (s. Anhang Abb. IV). Angegeben sind die microRNA ID, die Zugangsnummer und die Sequenzen aus miRBase (*Release 22.1*) (eigens erstellte Tab.).

Die folgenden eigenständig erstellten zwei Tabellen listen pri-microRNA-Sequenzen mit enthaltenden funktionellen microRNAs (**fett**) auf, die in den Array-Analysen signifikant dereguliert waren (Grün hochreguliert und Rot herunterreguliert, s. Anhang Abb. IV). Es werden auch microRNAs einbezogen, die in den FFPE-Tumorproben signifikant dereguliert waren, da BIRC5 im Tumorgewebe hochreguliert war im Vergleich zum Normalgewebe (s. Anhang Abb. XII). Identifikationsnummer, Sequenzen und die Faltung der Haarnadeln wurden miRBase (*Release 22.1*) entnommen. Sehr lange Sequenzen wurden an den flankierenden Sequenzen gekürzt. Der microRNA-Stem und Loop sind relevanter für die Regulation durch RBPs.

Der in den Analysen detektierte Leitstrang wurde beschriftet. Es wurden lediglich potentielle Bindungsstellen, RBMs (RNA-Erkennungsstellen), innerhalb der pri-microRNAs markiert. Es handelt sich überwiegend um Annahmen nach Abgleich mit anderen Arbeiten (Quellen s. Anhang Tab. V). Es könnte weitere effizientere Bindungsstellen geben. Daher muss die Interaktion zwischen potentiellen RBPs und microRNAs von Interesse für jeden Fall, auch abhängig von Bedingungen und Zelltyp, experimentell nachvollzogen werden.

Die Überschneidungen der Bindungsstellen verschiedener RBPs und die Regulation der gleichen microRNA durch verschiedene RBPs ermöglichen die Anpassung von microRNA-Expressionsprofilen als Reaktion auf Umwelt-Einflüsse und Entwicklungsstadien (Volk und Shomron. 2011).

**Tabelle X Hochregulierte microRNAs nach BIRC5-KD mit möglichen RBMs**

>hsa-mir-124-1 MI0000443	miR-124-3p
5'-AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUUAAACCAUACAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAAUGGGGCGUG-3'	
>hsa-mir-124-2 MI0000444	miR-124-3p
GAUUAGAGGCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUUAAACCAUACAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAGCGGAGCCUACGGC	
>hsa-mir-124-3 MI0000445	miR-124-3p
UGAGGGUUCUUCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUUAAACCAUACAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAGAGGCUCC	
>hsa-mir-27b MI0000440	miR-27b-3p
CUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAUGAUUGGUUUUGGCUUGUUCACAGUGGCUAAAUUCUGCACCUGAAAGAGAGGUG	
>hsa-mir-27a MI0000085	miR-27a-3p
CUGAGGAGCAAGGCUUAGCUGCUUUGAGCAGGGGUCCACCAAGUCGUGUUCACAGUGGCUAAGUUCGGCCCCCAG	
>hsa-mir-23b MI0000439	miR-23b-3p keine Regulation durch KHSRP (Trabucchi et al. 2009)
CUCAGGUGCUCUGGCGUCUUGGGUUCUUGGCAUGCUGAUUUUGACUUAAGGUAUAUCACAUUGCCAGGGAUUAACCAGCAACCACGACCUU	
>hsa-mir-23a MI0000079	miR-23a-3p
GGCCGGCUUGGGUUCUUGGGGAUUGGUAUUGCUUCUGACAAAUCACAUUGCCAGGGAUUCCAACCGACC	
>hsa-mir-23c MI0016010	
ACUUUCCAGGUGUCACACAGUGAGUGGCUUUCACAGAGUACUUUGAGUCAUGCCCAUCAUCAUCAUUGCCAGUGAUUAACCAAGGAAAGUGAC	
>hsa-mir-3074 MI0014181	chr9: 95086014-95086094 [-]
GCUCGACUCCUGUUCUGUGAAGCAGUGUGUAUUUAGAGAACUGAUUACAGCUCAGUAGGCACCGGAGGGCGGGU	
>hsa-mir-24-1 MI0000080	chr9: 95086021-95086088 [+] keine Regulation durch KHSRP (Trabucchi et al. 2009) miR-24-3p
UCCGGUGCCUACUGCUGAUUAUCAGUUCUCUUUUUACACACUGGCUCAUCAGCAAGAACAGGAG	
>hsa-mir-24-2 MI0000081	miR-24-3p
CUCUGCCUCCGUGCCUACUGAGCUGAAACACAGUUGGUUUUUUACACUUGGCUACAGUUCAGCAAGAACAGGG	
>hsa-mir-338 MI0000814	miR-338-3p
JCUCCAACAUAUCCUGGUGCUGAGUGAUGACUCAUCGACUCCAGCAUCAUGAUUUUUUGUUAAGA	
>hsa-mir-342 MI0000805	keine Bindung KHSRP miR-342-3p
AAACUGGGCUCAAAGGUGAGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAUCAGUUUAUUUAUUUGUCUCACACAGAAAUCGACCCGUCACCUUGGCCU	
>hsa-mir-193a MI0000487	miR-193a-3p
CGAGGAUUGGGAGCUGAGGGCUGGGUCUUUUGCGGGCGAGAUGAUGUUCUAUAACAACUGGCUUACAAAUGCCAGUUCUCGGUCCCG	
>hsa-mir-149 MI0000478	miR-149-5p keine Effekt KHSRP-KD
GCCGUCGAGCUCUGGCCUCCGUGUUCUACUCCCGUUCGAGAGGGGGACGGGGGUGUGUUGGGGAGCUGGA	
>hsa-mir-301a MI0000745	miR-301a-3p
ACUGCUAACGAUUCGUCUACUUUAUUGCACUACUUACUUUACAGCUAGCUGCAUAUUAUUGCAAAGCAUCUGAAAGCAGG	
>hsa-mir-152 MI0000462	kein Effekt KHSRP-KD miR-152-3p
JGUUCUCCCGGCCAGGUUCUGUGAUACACUCCGACUCUGUCUUCAGCAGUCAUGGACAGAAACUUGGGCCCGGAAGGACC	
>hsa-mir-873 MI0005564	miR-873-5p
JUGUGCAUUUGCAGGAACUUGUGAGUUCUUCUUGUUAUAUAAGAACAGGAGACUGAUGAUUCCCGGGAACACCCACAA	
>hsa-mir-105-1 MI0000111	miR-105-5p
JUGCAUCGUGGUCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGUUCUGUCUUGCACCACGGAUUUUGAGCAUGUGCUACGGUGUCUA	
>hsa-mir-126 MI0000471	miR-126-3p
CGCUGGCAGGGGACAUUUUUUUUUUGUACGCGUGUGACACUCAAACUCGUAACCGAGUAAUUAUUGCGUGUCACGGCA	
>hsa-mir-99b MI0000746	miR-99b-5p
GGCACCACCCGUAAGAACCACCUUGCGGGGCCUUCUGGGACACAAGCUCUGUGUCUGGGGUCCGUGUC	

**Tabelle XI Herunterregulierte microRNAs nach BIRC5-KD mit möglichen RBMs**

>hsa-mir-143 MI0000459	kein Effekt KHSRP-KD	miR-143-3p TDP-43
JUGCAUCUCCUUCUCUCUCCAGCCUUGAGGGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAUUUGGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGGAAGAGAGAAG		
>hsa-mir-145 MI0000461		miR-145-5p
CACCUUGUCCUCACGUGUUCUCCAGGAAUCCUUAUAAGCUUAGAUGGGGAUUCUGGAAAUACUUGUUCUUGAGGUGAUGGUU		
>hsa-mir-192 MI0000234		miR-192-5p
ACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAUGAAUUGACAGCCAGUUCUCUGUCUUCUUGUCUGCCAUAUCCAUGGUACAGGUAUGUUCGCC		
>hsa-let-7f-1 MI0000067	let-7f-5p	let-7f-1-3p
JGAGAGUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGUGGGUUGGUGAUUUUACCUUGUUCAGGAGAUAAUAUACAUAUUGCCUUCUCCUGA		
>hsa-let-7g MI0000433		let-7g-5p
AGGCUGAGGUGAGUAGUUUGACAGUUUGAGGUCUAUGAUACCACCCUUAACAAGAUAAACUGUACAGGCCACUGCCUUGCCA		
>hsa-let-7i MI0000434		let-7i-5p
CUGGCUGAGGUGAGUAGUUUGUCUGUUUGGUCGUGUUGAGAUUGCCCGUUGUCAGAUAAACUGCCGAAGCUACUGCCUUGCUA		
>hsa-let-7b MI0000063		let-7b-5p
CGGGGUGAGGUGAGUAGUUUGUGGUUUUGAGGUCAGUGAUUUUGUCUCGGAAGAUAAUAUACAACCUACUGCCUUCUCCUG		
>hsa-let-7c MI0000064		let-7c-5p
GCAUCCGGGUUGAGGUGAGUUGUUAUGGUUAGAGUUACCCUUGAGUUAACUGUAACAACCUUCUAGCUUCCUUGGAGC		
>hsa-mir-130a MI0000448		miR-130a-3p
UGCUGUGGCAGAGCUUUUUUACAUUUGGCUACUGUUCACUUGUACUUAACAGUGCAAUUAAGGCAUUGGCCGUGUGGUG		
>hsa-mir-10b MI0000267	miR-10b-5p	keine Effekt KHSRP-KD miR-10b-3p
AGGUUGUAACGUUGUCUAUAUAUACCUUGUAGAACCAGAAUUUGUGUUAUCCGUAUAGCACAGAUUCGAUUCUAGGGGAUAUAUGGUCGA		
>hsa-mir-181b-1 MI0000270		miR-181b-5p
JUAUUUUUAAGAGGUCACAUUAACAUAUUGCUGUCGGUGGUUGAAUGUGGACAAGCUCACUGAACAAUUGAAUGCAAUGUGGCCG		

## 8 Literatur

- Adams, R. R., Carmena, M., Earnshaw, W. C. (2001): "Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis". *Trends in cell biology* **11** (2), S. 49–54. DOI: 10.1016/s0962-8924(00)01880-8.
- Ali, A. Salwa, Grönberg, M., Federspiel, B., Scoazec, J.-Y., Hjortland, G. Olav, Grønabæk, H. et al. (2017): "Expression of p53 protein in high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinoma". *PLoS ONE* **12** (11). DOI: 10.1371/journal.pone.0187667.
- Almagro, M. C. de, Vucic, D. (2012): "The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy". *Experimental oncology* **34** (3), S. 200–211.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D. C. (1997): "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma". *Nature medicine* **3** (8), S. 917–921. DOI: 10.1038/nm0897-917.
- Ameres, S. L., Horwich, M. D., Hung, J.-H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., Zamore, P. D. (2010): "Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs". *Science (New York, N.Y.)* **328** (5985), S. 1534–1539. DOI: 10.1126/science.1187058.
- Amirouche, A., Tadesse, H., Miura, P., Bélanger, G., Lunde, J. A., Côté, J., Jasmin, B. J. (2013): "Converging pathways involving microRNA-206 and the RNA-binding protein KSRP control post-transcriptionally utrophin A expression in skeletal muscle". *Nucleic Acids Research* **42** (6), S. 3982–3997. DOI: 10.1093/nar/gkt1350.
- Andersson, K. M. E., Turkkila, M., Erlandsson, M. C., Bossios, A., Silfverswärd, S. Töyrä, Hu, D. et al. (2017): "Survivin controls biogenesis of microRNA in smokers: A link to pathogenesis of rheumatoid arthritis". *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* **1863** (3), S. 663–673. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.11.033.
- Arora, V., Cheung, H. H., Plenchette, S., Micali, O. Cristina, Liston, P., Korneluk, R. G. (2007): "Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex". *The Journal of biological chemistry* **282** (36), S. 26202–26209. DOI: 10.1074/jbc.M700776200.
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., Wishart, D. S. (2016): "Heatmapper: web-enabled heat mapping for all". *Nucleic Acids Research* **44** (W1), W147-53. DOI: 10.1093/nar/gkw419.
- Baccarini, A., Chauhan, H., Gardner, T. J., Jayaprakash, A., Sachidanandam, R., Brown, B. D. (2011): "Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells". *Current biology: CB* **21** (5), S. 369–376. DOI: 10.1016/j.cub.2011.01.067.
- Balzeau, J., Menezes, M. R., Cao, S., Hagan, J. P. (2017): "The LIN28/let-7 Pathway in Cancer". *Frontiers in Genetics* **8**. DOI: 10.3389/fgene.2017.00031.
- Begum, N., Hubold, C., Buchmann, I., Thorns, C., Bouchard, R., Lubienski, A. et al. (2014): "Diagnostik und Therapie bei neuroendokrinen Neoplasien mit unklarem Primarius - ein Plädoyer für die offene Exploration". *Zentralblatt für Chirurgie* **139** (3), S. 284–291. DOI: 10.1055/s-0032-1327962.
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., Golani, I. (2001): "Controlling the false discovery rate in behavior genetics research". *Behavioural Brain Research*. **125**(1-2), S. 279-84. DOI: 10.1016/s0166-4328(01)00297-2. PMID: 11682119.
- Berthelet, J., Dubrez, L. (2013): "Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs)". *Cells* **2** (1), S. 163–187. DOI: 10.3390/cells2010163.
- BioProbes 67 2012. Almond B., Anest V., Beernink H., Blackmer T., Bradford J., Browne B. et al. (2012): "New tools for microRNA functional analysis. mirVana™ miRNA mimics and inhibitors". *BioProbes* **67** Published by Life Technologies Corporation ©
- Bolognesi, B., Lehner, B. (2018): "Reaching the limit". *eLife* **7**. DOI: 10.7554/eLife.39804.
- Boudhraa, Z., Carmona, E., Provencher, D., Mes-Masson, A.-M. (2020): "Ran GTPase: A Key Player in Tumor Progression and Metastasis". *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**. DOI: 10.3389/fcell.2020.00345.
- Boujard, D., Anselme, B., Cullin, C., Raguénès-Nicol, C. (2014): "Zell- und Molekularbiologie im Überblick". Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum (OnlinePlus). DOI:10.1007/978-3-642-41761-0

- Boveri, Theodor (1914): "Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Fischer.
- Brcic, I. (2017): "Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Neoplasien (GEP-NENs) – Update und neue WHO-Klassifikation 2017 der pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien". Journal für klinische Endokrinologie und Stoffwechsel **10** (4), S. 122–124. DOI: 10.1007/s41969-017-0015-2.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., Cohen, S. M. (2005): "Principles of MicroRNA–Target Recognition". PLoS Biology **3** (3). DOI: 10.1371/journal.pbio.0030085.
- Broughton, J. P., Pasquinelli, A. E. (2016): "A tale of two sequences: microRNA-target chimeric reads". Genetics, Selection, Evolution: GSE **48**. DOI: 10.1186/s12711-016-0209-x.
- Bubendorf, Lukas; Feichter, Georg E.; Obermann, Ellen C.; Dalquen, Peter; Klöppel, Günter; Kreipe, Hans H.; Remmele, Wolfgang (2011): "Pathologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Buffa, R., Rindi, G., Sessa, F., Gini, A., Capella, C., Jahn, R. et al. (1987): "Synaptophysin immunoreactivity and small clear vesicles in neuroendocrine cells and related tumours". Molecular and cellular probes **1** (4), S. 367–381. DOI: 10.1016/0890-8508(87)90018-1.
- The Cancer Genome Atlas Network 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer (2012)". Nature **487** (7407), S. 330–337.
- Camara-Clayette, V., Thomas, D., Rahuel, C., Barbey, R., Cartron, J. P., Bertrand, O. (1999): "The repressor which binds the -75 GATA motif of the GPB promoter contains Ku70 as the DNA binding subunit". Nucleic Acids Research **27** (7), S. 1656–1663. DOI: 10.1093/nar/27.7.1656.
- Caputi, M., Zahler, A. M. (2001): "Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 family". The Journal of biological chemistry **276** (47), S. 43850–43859. DOI: 10.1074/jbc.M102861200.
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., Earnshaw, W. C. (2012): "The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis". Nature reviews. Molecular cell biology **13** (12), S. 789–803. DOI: 10.1038/nrm3474.
- Carvalho, A., Carmena, M., Sambade, C., Earnshaw, W. C., Wheatley, S. P. (2003): "Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells". Journal of cell science **116** (Pt 14), S. 2987–2998. DOI: 10.1242/jcs.00612.
- Castanotto, D., Rossi, J. J. (2009): "The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics". Nature **457** (7228), S. 426–433. DOI: 10.1038/nature07758.
- Caswell, D. R., Swanton, C. (2017): "The role of tumour heterogeneity and clonal cooperativity in metastasis, immune evasion and clinical outcome". BMC Medicine **15**. DOI: 10.1186/s12916-017-0900-y.
- Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y. (2000): "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO". Nature **406** (6798), S. 855–862. DOI: 10.1038/35022514.
- Chen, G., Deng, X. (2018): "Cell Synchronization by Double Thymidine Block". Bio-protocol **8** (17). DOI: 10.21769/BioProtoc.2994.
- Chen, F., Peterson, S. R., Story, M. D., Chen, D. J. (1996): "Disruption of DNA-PK in Ku80 mutant xrs-6 and the implications in DNA double-strand break repair". Mutation research **362** (1), S. 9–19. DOI: 10.1016/0921-8777(95)00026-7.
- Chirshev, E., Oberg, K. C., Ioffe, Y. J., Unternaehrer, J. J. (2019): "Let-7 as biomarker, prognostic indicator, and therapy for precision medicine in cancer". Clinical and Translational Medicine **8**. DOI: 10.1186/s40169-019-0240-y.
- Choudhury, N. Roy, Michlewski, G. (2012): "Terminal loop-mediated control of microRNA biogenesis". Biochemical Society transactions **40** (4), S. 789–793. DOI: 10.1042/BST20120053.
- Chung, U., Igarashi, T., Nishishita, T., Iwanari, H., Iwamatsu, A., Suwa, A. et al. (1996): "The interaction between Ku antigen and REF1 protein mediates negative gene regulation by extracellular calcium". The Journal of biological chemistry **271** (15), S. 8593–8598. DOI: 10.1074/jbc.271.15.8593.
- Connerty, P., Ahadi, A., Hutvagner, G. (2015): "RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway". International Journal of Molecular Sciences **17** (1). DOI: 10.3390/ijms17010031.

- Coolen M., Bally-Cuif L. (2015): "MicroRNAs in Brain Development". Chapter 18- Academic Press. 2015. Seiten 447-488. Editor(s): Sen, Chandan K. (Hg.) (2015 Elsevier Inc): "MicroRNA in regenerative medicine". London: Elsevier Inc. ISBN 9780124055445
- Cossu, F., Milani, M., Mastrangelo, E., Lecis, D. (2019): "Targeting the BIR Domains of Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins in Cancer Treatment". Computational and Structural Biotechnology Journal **17**, S. 142–150. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.01.009.
- Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M. (2014): "Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ". Molecular & cellular proteomics: MCP **13** (9), S. 2513–2526. DOI: 10.1074/mcp.M113.031591.
- Creugny, A., Fender, A., Pfeffer, S. (2018): "Regulation of primary microRNA processing". FEBS letters **592** (12), S. 1980–1996. DOI: 10.1002/1873-3468.13067.
- Dang, C. V., Resar, L. M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J. E. et al. (1999): "Function of the c-Myc oncogenic transcription factor". Experimental cell research **253** (1), S. 63–77. DOI: 10.1006/excr.1999.4686.
- Dardenne, E., Polay Espinoza, M., Fattet, L., Germann, S., Lambert, M.-P., Neil, H. et al. (2014): "RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation". Cell reports **7** (6), S. 1900–1913. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.010.
- Davis, S., Lollo, B., Freier, S., Esau, C. (2006): "Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides". Nucleic Acids Research **34** (8), S. 2294–2304. DOI: 10.1093/nar/gkl183.
- Deiuliis, J. A. (2015): "MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics". International Journal of Obesity (2005) **40** (1), S. 88–101. DOI: 10.1038/ijo.2015.170.
- Denzler, R., Stoffel, M. (2015): "The Long, the Short, and the Unstructured: A Unifying Model of miRNA Biogenesis". Molecular cell **60** (1), S. 4–6. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.09.014.
- Destatis Pressemitteilung Nr. N 010 vom 3. Februar 2021
- Deo, M., Yu, J.-Y., Chung, K.-H., Tippens, M., Turner, D. L. (2006): "Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides". Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists **235** (9), S. 2538–2548. DOI: 10.1002/dvdy.20847.
- DiDonato, J. A., Mercurio, F., Karin, M. (2012): "NF-κB and the link between inflammation and cancer". Immunological reviews **246** (1), S. 379–400. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x.
- Diederichs, S., Haber, D. A. (2007): "Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression". Cell **131** (6), S. 1097–1108. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.032.
- Dizdar, L., Drusenheimer, J., Werner, T. A., Möhlendick, B., Schütte, S. C., Esposito, I. et al. (2018): "Establishment and Characterization of a Novel Cell Line Derived from a Small Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Anal Canal". Neuroendocrinology **107** (3), S. 246–256. DOI: 10.1159/000492222.
- Dizdar, L., Oesterwind, K. A., Riemer, J. C., Werner, T. A., Mersch, S., Möhlendick, B. et al. (2017): "Preclinical assesement of survivin and XIAP as prognostic biomarkers and therapeutic targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia". Oncotarget **8** (5), S. 8369–8382. DOI: 10.18632/oncotarget.14207.
- Dong, Z., Wu, H., He, Y., Huang, Z., Weng, Y., Li, H. et al. (2022): "MiRNA-124-3p.1 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by regulating FOXO3a by targeting AKT2 and SIRT1". Cell Death & Disease **13** (1). DOI: 10.1038/s41419-021-04491-0.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000): "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition". Cell **102** (1), S. 33–42. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00008-8.

- Du, J., Kelly, A. E., Funabiki, H., Patel, D. J. (2012): "Structural Basis for Recognition of H3T3ph and Smac/DIABLO N-terminal Peptides by Human Survivin". Structure (London, England: 1993) **20** (1), S. 185–195. DOI: 10.1016/j.str.2011.12.001.
- Dubitzky, Werner; Wolkenhauer, Olaf; Cho, Kwang-Hyun; Yokota, Hiroki (Hg.) (2013): "Encyclopedia of Systems Biology. New York, NY: Springer New York.
- Duffy, M. J., O'Donovan, N., Brennan, D. J., Gallagher, W. M., Ryan, B. M. (2007): "Survivin: a promising tumor biomarker". Cancer letters **249** (1), S. 49–60. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.12.020.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S. (2006): "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases". The Journal of biological chemistry **281** (6), S. 3254–3260. DOI: 10.1074/jbc.M510863200.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., Scott, F. L. (2006): "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family". EMBO Reports **7** (10), S. 988–994. DOI: 10.1038/sj.embor.7400795.
- Ellwanger, D. C., Büttner, F. A., Mewes, H.-W., Stümpflen, V. (2011): "The sufficient minimal set of miRNA seed types". Bioinformatics **27** (10), S. 1346–1350. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr149.
- Emde, A., Eitan, C., Liou, L.-L., Libby, R. T., Rivkin, N., Magen, I. et al. (2015): "Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS". The EMBO Journal **34** (21), S. 2633–2651. DOI: 10.15252/emboj.201490493.
- Encyclopedia of immunology (1998). 2. ed. San Diego: Acad. Press.
- Fang, W., Bartel, D. P. (2015): "The menu of features that define primary microRNAs and enable de novo design of microRNA genes". Molecular cell **60** (1), S. 131–145. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.08.015.
- Fazio, N., Spada, F., Giovannini, M. (2013): "Chemotherapy in gastroenteropancreatic (GEP) neuroendocrine carcinomas (NEC): a critical view". Cancer treatment reviews **39** (3), S. 270–274. DOI: 10.1016/j.ctrv.2012.06.009.
- Feder, M. E., Hofmann, G. E. (1999): "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology". Annual review of physiology **61**, S. 243–282. DOI: 10.1146/annurev.physiol.61.1.243.
- Felekis, K., Touvana, E., Stefanou, C., Deltas, C. (2010): "microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease". Hippokratia **14** (4), S. 236–240.
- Fidler, I. J. (1990): "Host and tumour factors in cancer metastasis". European journal of clinical investigation **20** (5), S. 481–486. DOI: 10.1111/j.1365-2362.1990.tb01889.x.
- Fishilevich, S., Nudel, R., Rappaport, N., Hadar, R., Plaschkes, I., Iny Stein, T. et al. (2017): "GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards". Database: the journal of biological databases and curation **2017**. DOI: 10.1093/database/bax028.
- Forterre, A., Komuro, H., Aminova, S., Harada, M. (2020): "A Comprehensive Review of Cancer MicroRNA Therapeutic Delivery Strategies". Cancers **12** (7). DOI: 10.3390/cancers12071852.
- Fortugno, P., Beltrami, E., Plescia, J., Fontana, J., Pradhan, D., Marchisio, P. Carlo et al. (2003): "Regulation of survivin function by Hsp90". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100** (24), S. 13791–13796. DOI: 10.1073/pnas.2434345100.
- Foster, F. M., Owens, T. W., Taniyanis-Hughes, J., Clarke, R. B., Brennan, K., Bundred, N. J., Streuli, C. H. (2009): "Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer". Breast Cancer Research: BCR **11** (3), R41. DOI: 10.1186/bcr2328.
- Fox, J. L., MacFarlane, M. (2016): "Targeting cell death signalling in cancer: minimising 'Collateral damage'". British Journal of Cancer **115** (1), S. 5–11. DOI: 10.1038/bjc.2016.111.
- Frank, Steven A. (2002): "Immunology and Evolution of Infectious Disease. Princeton (NJ).
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K. et al. (2007): "DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs". Nature cell biology **9** (5), S. 604–611. DOI: 10.1038/ncb1577.

- Fulda, S., Vucic, D. (2012): "Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer". Nature reviews. Drug discovery **11** (2), S. 109–124. DOI: 10.1038/nrd3627.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D. et al. (2015): "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015". Cell Death and Differentiation **22** (1), S. 58–73. DOI: 10.1038/cdd.2014.137.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Kroemer, G. (2016): "Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control". Microbial Cell **3** (3), S. 101–108. DOI: 10.15698/mic2016.03.483.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P. et al. (2018): "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018". Cell Death and Differentiation **25** (3), S. 486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4.
- Garg, H., Suri, P., Gupta, J. C., Talwar, G. P., Dubey, S. (2016): "Survivin: a unique target for tumor therapy". Cancer cell international **16**, S. 49. DOI: 10.1186/s12935-016-0326-1.
- Garrison, J. B., Correa, R. G., Gerlic, M., Yip, K. W., Krieg, A., Tample, C. M. et al. (2010): "ARTS and Siah Collaborate in a Pathway for XIAP Degradation". Molecular cell **41** (1), S. 107–116. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.12.002.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Hudson, D. F., Honda, R. et al. (2004): "Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle". The Journal of Cell Biology **166** (2), S. 179–191. DOI: 10.1083/jcb.200404001.
- Greulich, K. M., Utikal, J., Peter, R. U., Krähn, G. (2000): "c-MYC and nodular malignant melanoma. A case report". Cancer **89** (1), S. 97–103. DOI: 10.1002/1097-0142(20000701)89:1<97::aid-cncr14>3.0.co;2-0.
- Griffiths-Jones, S. (2004): "The microRNA Registry". Nucleic Acids Research **32** (Database issue), D109-11. DOI: 10.1093/nar/gkh023.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A. J. (2005): "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature". Nucleic Acids Research **34** (Database issue), D140-4. DOI: 10.1093/nar/gkj112.
- Griffiths-Jones, S. (2006): "miRBase: the microRNA sequence database". Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **342**, S. 129–138. DOI: 10.1385/1-59745-123-1:129.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. Kaur, van Dongen, S., Enright, A. J. (2007): "miRBase: tools for microRNA genomics". Nucleic Acids Research **36** (Database issue), D154-8. DOI: 10.1093/nar/gkm952.
- Gröger, C. J., Grubinger, M., Waldhör, T., Vierlinger, K., Mikulits, W. (2012): "Meta-Analysis of Gene Expression Signatures Defining the Epithelial to Mesenchymal Transition during Cancer Progression". PLoS ONE **7** (12). DOI: 10.1371/journal.pone.0051136.
- Güllülü, Ö., Hehlhans, S., Mayer, B. E., Gößner, I., Petraki, C., Hoffmann, M. et al. (2021): "A Spatial and Functional Interaction of a Heterotetramer Survivin-DNA-PKcs Complex in DNA Damage Response". Cancer research **81** (9), S. 2304–2317. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2931.
- Gulyaeva, L. F., Kushlinskiy, N. E. (2016): "Regulatory mechanisms of microRNA expression". Journal of Translational Medicine **14**. DOI: 10.1186/s12967-016-0893-x.
- Guo, Y., Liu, J., Elfenbein, S. J., Ma, Y., Zhong, M., Qiu, C. et al. (2015): "Characterization of the mammalian miRNA turnover landscape". Nucleic Acids Research **43** (4), S. 2326–2341. DOI: 10.1093/nar/gkv057.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M. T. (2008): "Wound repair and regeneration". Nature **453** (7193), S. 314–321. DOI: 10.1038/nature07039.
- Guvenc, H., Pavlyukov, M. S., Joshi, K., Kurt, H., Banasavadi-Siddegowda, Y. K., Mao, P. et al. (2012): "Impairment of Glioma Stem Cell Survival and Growth by a Novel Inhibitor for Survivin–Ran Protein Complex". Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research **19** (3), S. 631–642. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0647.
- Gyrd-Hansen, M., Meier, P. (2010): "IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer". Nat Rev Cancer **10** (8), S. 561–574. DOI: 10.1038/nrc2889.

- Haley, B., Zamore, P. D. (2004): "Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex". Nature structural & molecular biology **11** (7), S. 599–606. DOI: 10.1038/nsmb780.
- Halle, B., Thomassen, M., Venkatesan, R., Kaimal, V., Marcusson, E. G., Munthe, S. et al. (2016): "Shift of microRNA profile upon orthotopic xenografting of glioblastoma spheroid cultures". Journal of neuro-oncology **128** (3), S. 395–404. DOI: 10.1007/s11060-016-2125-x.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000): "The hallmarks of cancer". Cell **100** (1), S. 57–70. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Hart, A. (2001): "Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important". BMJ. **18**;323(7309); S. 391-3. DOI: 10.1136/bmj.323.7309.391.
- Heberle, H., Meirelles, G.V., da Silva, F.R., Telles, G.P., Minghim, R. (2015): "InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams". BMC Bioinformatics **22**;16(1):169. DOI: 10.1186/s12859-015-0611-3.
- Herzog, R., Zendedel, A., Lammerding, L., Beyer, C., Slowik, A. (2017): "Impact of 17beta-estradiol and progesterone on inflammatory and apoptotic microRNA expression after ischemia in a rat model". The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **167**, S. 126–134. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.11.018.
- Hoesel, B., Schmid, J. A. (2013): "The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer". Molecular Cancer **12**, S. 86. DOI: 10.1186/1476-4598-12-86.
- Holcik, M., Korneluk, R. G. (2001): "XIAP, the guardian angel". Nature reviews. Molecular cell biology **2** (7), S. 550–556. DOI: 10.1038/35080103.
- Hollstein, M. C., Peri, L., Mandard, A. M., Welsh, J. A., Montesano, R., Metcalf, R. A. et al. (1991): "Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations". Cancer research **51** (15), S. 4102–4106.
- Hong, S., Noh, H., Chen, H., Padia, R., Pan, Z. K., Su, S.-B. et al. (2013): "Signaling by p38 MAPK Stimulates Nuclear Localization of the Microprocessor Component p68 for Processing of Selected Primary MicroRNAs". Science signaling **6** (266). DOI: 10.1126/scisignal.2003706.
- Hong, M., Ren, M.-Q., Silva, J., Paul, A., Wilson, W. David, Schroeder, C. et al. (2017): "YM155 Inhibits Topoisomerase Function". Anti-cancer drugs **28** (2), S. 142–152. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000441.
- Hu, F., Pan, D., Zheng, W., Yan, T., He, X., Ren, F. et al. (2017): "Elucidating respective functions of two domains BIR and C-helix of human IAP survivin for precise targeted regulating mitotic cycle, apoptosis and autophagy of cancer cells". Oncotarget **8** (69), S. 113687–113700. DOI: 10.18632/oncotarget.22823.
- Hua, Y.-T., Xu, W.-X., Li, H., Xia, M. (2021): "Emerging roles of MiR-133a in human cancers". Journal of Cancer **12** (1), S. 198–206. DOI: 10.7150/jca.48769.
- Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., Wu, H. (2001): "Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain". Cell **104** (5), S. 781–790.
- Huntley, R. P., Sitnikov, D., Orlic-Milacic, M., Balakrishnan, R., D'Eustachio, P., Gillespie, M. E. et al. (2016): "Guidelines for the functional annotation of microRNAs using the Gene Ontology". RNA **22** (5), S. 667–676. DOI: 10.1261/rna.055301.115.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., Struhl, K. (2009): "An epigenetic switch involving NF-κB, Lin28, let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation". Cell **139** (4), S. 693–706. DOI: 10.1016/j.cell.2009.10.014.
- Jaffer, S., Orta, L., Sunkara, S., Sabo, E., Burstein, D. E. (2007): "Immunohistochemical detection of antiapoptotic protein X-linked inhibitor of apoptosis in mammary carcinoma". Human pathology **38** (6), S. 864–870. DOI: 10.1016/j.humpath.2006.11.016.

- Janknecht, R. (2010): "Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17)". American Journal of Translational Research **2** (3), S. 223–234.
- Jeyaprakash, A. Arockia, Klein, U. R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E. A., Conti, E. (2007): "Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together". Cell **131** (2), S. 271–285. DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.045.
- Jha, K., Shukla, M., Pandey, M. (2012): "Survivin expression and targeting in breast cancer". Surgical oncology **21** (2), S. 125–131. DOI: 10.1016/j.suronc.2011.01.001.
- Ji, H., Sang, M., Liu, F., Ai, N., Geng, C. (2019): "miR-124 regulates EMT based on ZEB2 target to inhibit invasion and metastasis in triple-negative breast cancer". Pathology, research and practice **215** (4), S. 697–704. DOI: 10.1016/j.prp.2018.12.039.
- Jo, M. Hyun, Shin, S., Jung, S.-R., Kim, E., Song, J.-J., Hohng, S. (2015): "Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs". Molecular cell **59** (1), S. 117–124. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.027.
- Johnson, G. E., Ivanov, V. N., Hei, T. K. (2008): "Radiosensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival". Apoptosis: an international journal on programmed cell death **13** (6), S. 790–802. DOI: 10.1007/s10495-008-0212-y.
- Jonas, S., Izaurralde, E. (2015): "Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing". Nature reviews. Genetics **16** (7), S. 421–433. DOI: 10.1038/nrg3965.
- Jones, M. (2006): "Overview of Nuclear Import". Original von Mike Jones für wikipedia. Titel: Overview of Nuclear Import
- Jung, S.-A., Park, Y.-M., Hong, S.-W., Moon, J.-H., Shin, J.-S., Lee, H.-R. et al. (2015): "Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (cIAP1) Stability Contributes to YM155 Resistance in Human Gastric Cancer Cells\*". The Journal of biological chemistry **290** (16), S. 9974–9985. DOI: 10.1074/jbc.M114.600874.
- Kaczanowski, S. (2016): "Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging". Physical biology **13** (3), S. 31001. DOI: 10.1088/1478-3975/13/3/031001.
- Katz, Y., Wang, E. T., Airoidi, E. M., Burge, C. B. (2010): "Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation". Nature methods **7** (12), S. 1009–1015. DOI: 10.1038/nmeth.1528.
- Kawahara, Y., Mieda-Sato, A. (2012): "TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109** (9), S. 3347–3352. DOI: 10.1073/pnas.1112427109.
- Kelly, T. K., Carvalho, D. D. de, Jones, P. A. (2010): "Epigenetic Modifications as Therapeutic Targets". Nature biotechnology **28** (10), S. 1069–1078. DOI: 10.1038/nbt.1678.
- Kenny, P. A., Lee, G. Y., Myers, C. A., Neve, R. M., Semeiks, J. R., Spellman, P. T. et al. (2007): "The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression". Molecular Oncology **1** (1), S. 84–96. DOI: 10.1016/j.molonc.2007.02.004.
- Khan, S., Bennit, H. Ferguson, Turay, D., Perez, M., Mirshahidi, S., Yuan, Y., Wall, N. R. (2014): "Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer". BMC Cancer **14**, S. 176. DOI: 10.1186/1471-2407-14-176.
- Kingston, E. R., Bartel, D. P. (2019): "Global analyses of the dynamics of mammalian microRNA metabolism". Genome Research **29** (11), S. 1777–1790. DOI: 10.1101/gr.251421.119.
- Kinoshita, C., Kubota, N., Aoyama, K. (2021): "Interplay of RNA-Binding Proteins and microRNAs in Neurodegenerative Diseases". International Journal of Molecular Sciences **22** (10). DOI: 10.3390/ijms22105292.
- Klein, U. R., Nigg, E. A., Gruneberg, U. (2006): "Centromere Targeting of the Chromosomal Passenger Complex Requires a Ternary Subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-Terminal Domain of INCENP". Molecular Biology of the Cell **17** (6), S. 2547–2558. DOI: 10.1091/mbc.E05-12-1133.

- Klöppel, G., Couvelard, A., Perren, A., Komminoth, P., McNicol, A.-M., Nilsson, O. et al. (2009): "ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: towards a standardized approach to the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and their prognostic stratification". Neuroendocrinology **90** (2), S. 162–166. DOI: 10.1159/000182196.
- Kluger, H. M., McCarthy, M. M., Alvero, A. B., Sznol, M., Ariyan, S., Camp, R. L. et al. (2007): "The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is up-regulated in metastatic melanoma, and XIAP cleavage by Phenoxodiol is associated with Carboplatin sensitization". Journal of Translational Medicine **5**, S. 6. DOI: 10.1186/1479-5876-5-6.
- Kong, B., Zhao, S., Kang, X., Wang, B. (2021): "MicroRNA-133a-3p inhibits cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer by targeting AQP1". Oncology Letters **22** (3). DOI: 10.3892/ol.2021.12910.
- Kovalchuk, Igor; Kovalchuk, Olga (Hg.) (2021): "Genome stability. From virus to human application. Edition 2. London, San Diego, CA, Cambridge, MA, Kidlington: Academic Press, an imprint of Elsevier (Translational epigenetics series, Volume 26).
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S. (2018): "miRBase: from microRNA sequences to function". Nucleic Acids Research **47** (Database issue), D155-62. DOI: 10.1093/nar/gky1141.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S. (2010): "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data". Nucleic Acids Research **39** (Database issue), D152-7. DOI: 10.1093/nar/gkq1027.
- Krammer, P. H. (2000): "CD95's deadly mission in the immune system". Nature **407** (6805), S. 789–795. DOI: 10.1038/35037728.
- Krausch, M., Raffel, A., Anlauf, M., Schott, M., Lehwald, N., Krieg, A. et al. (2014): "'Cherry picking", a multiple non-anatomic liver resection technique, as a promising option for diffuse liver metastases in patients with neuroendocrine tumours". World journal of surgery **38** (2), S. 392–401. DOI: 10.1007/s00268-013-2267-3.
- Krieg, A., Correa, R. G., Garrison, J. B., Le Negrato, G., Welsh, K., Huang, Z. et al. (2009): "XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106** (34), S. 14524–14529. DOI: 10.1073/pnas.0907131106.
- Krieg, A., Baseras, B., Tomczak, M., Verde, P. Emilio, Stoecklein, N. Hendrik, Knoefel, W. Trudo (2013): "Role of survivin as prognostic and clinicopathological marker in gastric cancer: a meta-analysis". Molecular biology reports **40** (9), S. 5501–5511. DOI: 10.1007/s11033-013-2650-z.
- Krieg, A., Mersch, S., Boeck, I., Dizdar, L., Weihe, E., Hilal, Z. et al. (2014): "New Model for Gastroenteropancreatic Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma: Establishment of Two Clinically Relevant Cell Lines". PLoS ONE **9** (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0088713.
- Krieg, S., Roderburg, C., Fung, S., Luedde, T., Knoefel, W. Trudo, Krieg, A. (2022): "Nuclear survivin is a prognosticator in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: a meta-analysis". Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **148** (9), S. 2235–2246. DOI: 10.1007/s00432-022-04013-1.
- Kutluay, S. B., Emery, A., Penumutchu, S. R., Townsend, D., Tenneti, K., Madison, M. K. et al. (2019): "Genome-Wide Analysis of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP) Binding to HIV-1 RNA Reveals a Key Role for hnRNP H1 in Alternative Viral mRNA Splicing". Journal of Virology **93** (21). DOI: 10.1128/JVI.01048-19.
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., Korneluk, R. G. (2008): "IAP-targeted therapies for cancer". Oncogene **27** (48), S. 6252–6275. DOI: 10.1038/onc.2008.302.
- Lai, X., Vera, J. (2013): "MicroRNA Clusters. In: Werner Dubitzky, Olaf Wolkenhauer, Kwang-Hyun Cho und Hiroki Yokota (Hg.): Encyclopedia of Systems Biology. New York, NY: Springer New York, S. 1310–1314.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A. et al. (2007): "A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing". Cell **129** (7), S. 1401–1414. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.040.

- Lawrence, B., Gustafsson, B. I., Chan, A., Svejda, B., Kidd, M., Modlin, I. M. (2011): "The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors". Endocrinology and metabolism clinics of North America **40** (1), 1-18, vii. DOI: 10.1016/j.ecl.2010.12.005.
- Lehman, J. A., Hoelz, D. J., Turchi, J. J. (2008): "DNA-DEPENDENT CONFORMATIONAL CHANGES IN THE KU HETERODIMER". Biochemistry **47** (15), S. 4359–4368. DOI: 10.1021/bi702284c.
- Lei, C., Du, F., Sun, L., Li, T., Li, T., Min, Y. et al. (2017): "miR-143 and miR-145 inhibit gastric cancer cell migration and metastasis by suppressing MYO6". Cell Death & Disease **8** (10), e3101-. DOI: 10.1038/cddis.2017.493.
- Lemke, J., Karstedt, S. von, Zinngrebe, J., Walczak, H. (2014): "Getting TRAIL back on track for cancer therapy". Cell Death and Differentiation **21** (9), S. 1350–1364. DOI: 10.1038/cdd.2014.81.
- Lens, S. M.A., Wolthuis, R. M.F., Klompaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T. et al. (2003): "Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension". The EMBO Journal **22** (12), S. 2934–2947. DOI: 10.1093/emboj/cdg307.
- Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Burge, C. B. (2003): "Prediction of mammalian microRNA targets". Cell **115** (7), S. 787–798. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)01018-3.
- Li, J., Feng, Q., Kim, J. M., Schneiderman, D., Liston, P., Li, M. et al. (2001): "Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins". Endocrinology **142** (1), S. 370–380. DOI: 10.1210/endo.142.1.7897.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997): "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade". Cell **91** (4), S. 479–489. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
- Li, S.-M., Wu, H.-L., Yu, X., Tang, K., Wang, S.-G., Ye, Z.-Q., Hu, J. (2018): "The putative tumour suppressor miR-1-3p modulates prostate cancer cell aggressiveness by repressing E2F5 and PFTK1". Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR **37**. DOI: 10.1186/s13046-018-0895-z.
- Liang, Y.-J., Wang, Q.-Y., Zhou, C.-X., Yin, Q.-Q., He, M., Yu, X.-T. et al. (2012): "MiR-124 targets Slug to regulate epithelial–mesenchymal transition and metastasis of breast cancer". Carcinogenesis **34** (3), S. 713–722. DOI: 10.1093/carcin/bgs383.
- Liang, J., Zhao, W., Tong, P., Li, P., Zhao, Y., Li, H., Liang, J. (2020): "Comprehensive molecular characterization of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for therapeutic targeting in cancer". BMC Medical Genomics **13**. DOI: 10.1186/s12920-020-0661-x.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J. et al. (2005): "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs". Nature **433** (7027), S. 769–773. DOI: 10.1038/nature03315.
- Lin, S., Gregory, R. I. (2015): "MicroRNA biogenesis pathways in cancer". Nat Rev Cancer **15** (6), S. 321–333. DOI: 10.1038/nrc3932.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G. et al. (1996): "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes". Nature **379** (6563), S. 349–353. DOI: 10.1038/379349a0.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T. et al. (2000): "Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain". Nature **408** (6815), S. 1004–1008. DOI: 10.1038/35050006.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001): "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method". Methods (San Diego, Calif.) **25** (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lloyd, Ricardo V. (Hg.) (2009): "Endocrine Pathology. Differential Diagnosis and Molecular Advances. 2., nd ed. New York, NY: Springer New York.
- Lloyd, Ricardo V.; Osamura, Robert Y.; Klöppel, Günter; Rosai, Juan (Hg.) (2017): "WHO classification of tumours of endocrine organs. International Agency for Research on Cancer. 4th edition. Lyon:

- International Agency for Research on Cancer (World Health Organization classification of tumours, 8 (in the 4th edition)).
- Long, J., Zuo, D., Park, M. (2005): "Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin". The Journal of biological chemistry **280** (42), S. 35477–35489. DOI: 10.1074/jbc.M504477200.
- Lu, M., Lin, S.-C., Huang, Y., Kang, Y. Jun, Rich, R., Lo, Y.-C. et al. (2007): "XIAP induces NF- $\kappa$ B activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization". Molecular cell **26** (5), S. 689–702. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.05.006.
- Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C. et al. (2016): "Distribution of miRNA expression across human tissues". Nucleic Acids Research **44** (8), S. 3865–3877. DOI: 10.1093/nar/gkw116.
- Ma, X., Becker Buscaglia, L. E., Barker, J. R., Li, Y. (2011): "MicroRNAs in NF- $\kappa$ B signaling". Journal of Molecular Cell Biology **3** (3), S. 159–166. DOI: 10.1093/jmcb/mjr007.
- Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, H. E., Gerharz, C. D. (1999): "Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties". Cancer research **59** (24), S. 6097–6102.
- Mahotka, C., Liebmann, J., Wenzel, M., Suschek, C. V., Schmitt, M., Gabbert, H. E., Gerharz, C. D. (2002): "Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants". Cell Death and Differentiation **9** (12), S. 1334–1342. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401091.
- Majid, A., Wang, J., Nawaz, M., Abdul, S., Ayesha, M., Guo, C. et al. (2020): "miR-124-3p Suppresses the Invasiveness and Metastasis of Hepatocarcinoma Cells via Targeting CRKL". Frontiers in Molecular Biosciences **7**. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00223.
- Makanae, K., Kintaka, R., Makino, T., Kitano, H., Moriya, H. (2013): "Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method". Genome Research **23** (2), S. 300–311. DOI: 10.1101/gr.146662.112.
- Mannhold, R., Fulda, S., Carosati, E. (2010): "IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy". Drug discovery today **15** (5-6), S. 210–219. DOI: 10.1016/j.drudis.2010.01.003.
- Marsden, V. S., O'Connor, L., O'Reilly, L. A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P. G. et al. (2002): "Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome". Nature **419** (6907), S. 634–637. DOI: 10.1038/nature01101.
- Martini, E., Wittkopf, N., Günther, C., Leppkes, M., Okada, H., Watson, A. J. et al. (2016): "Loss of Survivin in Intestinal Epithelial Progenitor Cells Leads to Mitotic Catastrophe and Breakdown of Gut Immune Homeostasis". Cell reports **14** (5), S. 1062–1073. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.010.
- Marusyk, A., Polyak, K. (2009): "Tumor heterogeneity: causes and consequences". Biochimica et biophysica acta **1805** (1), S. 105. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.11.002.
- Marzi, M. J., Ghini, F., Cerruti, B., Pretis, S. de, Bonetti, P., Giacomelli, C. et al. (2016): "Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach". Genome Research **26** (4), S. 554–565. DOI: 10.1101/gr.198788.115.
- Mataki, H., Seki, N., Mizuno, K., Nohata, N., Kamikawaji, K., Kumamoto, T. et al. (2016): "Dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p) coordinately targeted MTDH in lung squamous cell carcinoma". Oncotarget **7** (44), S. 72084–72098. DOI: 10.18632/oncotarget.12290.
- Medical gallery of Blausen Medical 2014 (2014). Wiki J Med **1** (2).
- Mehrotra, S., Languino, L. R., Raskett, C. M., Mercurio, A. M., Dohi, T., Altieri, D. C. (2010): "IAP REGULATION OF METASTASIS". Cancer cell **17** (1), S. 53. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.11.021.
- Mendonça, B.S., Ferreira, C.A., Maia, R.C., de Moraes, G.N. (2022): "Subcellular localization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in cancer: Does that matter? " BBA Advances **2**. 2022.100050.ISSN 2667-1603
- Meyer, T., Qian, W., Caplin, M. E., Armstrong, G., Lao-Sirieix, S.-H., Hardy, R. et al. (2014): "Capecitabine and streptozocin  $\pm$  cisplatin in advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine

- tumours". European journal of cancer (Oxford, England: 1990) **50** (5), S. 902–911. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.12.011.
- Michlewski, G., Cáceres, J. F. (2019): "Post-transcriptional control of miRNA biogenesis". RNA **25** (1), S. 1–16. DOI: 10.1261/rna.068692.118.
- Misono, S., Seki, N., Mizuno, K., Yamada, Y., Uchida, A., Arai, T. et al. (2018): "Dual strands of the miR-145 duplex (miR-145-5p and miR-145-3p) regulate oncogenes in lung adenocarcinoma pathogenesis". Journal of human genetics **63** (10), S. 1015–1028. DOI: 10.1038/s10038-018-0497-9.
- Modlin, I. M., Tang, L. H. (1997): "Approaches to the diagnosis of gut neuroendocrine tumors: the last word (today)". Gastroenterology **112** (2), S. 583–590. DOI: 10.1053/gast.1997.v112.pm9024313.
- Mohamed, M. S., Abdelhamid, A. O., Almutairi, F. M., Ali, A. G., Bishr, M. K. (2018): "Induction of apoptosis by pyrazolo3,4-dpyridazine derivative in lung cancer cells via disruption of Bcl-2/Bax expression balance". Bioorganic & medicinal chemistry **26** (3), S. 623–629. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.12.026.
- Morlando, M., Dini Modigliani, S., Torrelli, G., Rosa, A., Di Carlo, V., Caffarelli, E., Bozzoni, I. (2012): "FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment". The EMBO Journal **31** (24), S. 4502–4510. DOI: 10.1038/emboj.2012.319.
- Moy, R. H., Cole, B. S., Yasunaga, A., Gold, B., Shankarling, G., Varble, A. et al. (2014): "Stem loop recognition by DDX17 facilitates miRNA processing and antiviral defense". Cell **158** (4), S. 764–777. DOI: 10.1016/j.cell.2014.06.023.
- Nagtegaal, I. D., Odze, R. D., Klimstra, D., Paradis, V., Rugge, M., Schirmacher, P. et al. (2019): "The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system". Histopathology **76** (2), S. 182–188. DOI: 10.1111/his.13975.
- Nakahara, T., Kita, A., Yamanaka, K., Mori, M., Amino, N., Takeuchi, M. et al. (2007): "YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts". Cancer Res. **67**(17):8014-21. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1343.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M., Upton, S. J. (1994): "A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels". Journal of biochemical and biophysical methods **28** (3), S. 239–242. DOI: 10.1016/0165-022x(94)90020-5.
- Niederle, M. B., Hackl, M., Kaserer, K., Niederle, B. (2010): "Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: the current incidence and staging based on the WHO and European Neuroendocrine Tumour Society classification: an analysis based on prospectively collected parameters". Endocrine-related cancer **17** (4), S. 909–918. DOI: 10.1677/ERC-10-0152.
- Niedzialkowska, E., Wang, F., Porebski, P. J., Minor, W., Higgins, J. M. G., Stukenberg, P. Todd (2012): "Molecular basis for phosphospecific recognition of histone H3 tails by Survivin paralogues at inner centromeres". Molecular Biology of the Cell **23** (8), S. 1457–1466. DOI: 10.1091/mbc.E11-11-0904.
- Norbury, C. J., Zhivotovsky, B. (2004): "DNA damage-induced apoptosis". Oncogene **23** (16), S. 2797–2808. DOI: 10.1038/sj.onc.1207532.
- Noton, E. A., Colnaghi, R., Tate, S., Starck, C., Carvalho, A., Ko Ferrigno, P., Wheatley, S. P. (2006): "Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis". The Journal of biological chemistry **281** (2), S. 1286–1295. DOI: 10.1074/jbc.M508773200.
- Novak, K. (2005): "Backing Boveri". Nat Rev Cancer **5** (11), S. 843. DOI: 10.1038/nrc1758.
- Nuclear Import and Export in Plants and Animals (2005). Boston, MA: Springer US (Molecular Biology Intelligence Unit).
- Hanover, J. A., Love, D. C. (2005): "Nuclear Export. In: Nuclear Import and Export in Plants and Animals. Boston, MA: Springer US (Molecular Biology Intelligence Unit), S. 118–136.
- Öberg, K. (2018): "The Genesis of the Neuroendocrine Tumors Concept: From Oberndorfer to 2018". Endocrinology and metabolism clinics of North America **47** (3), S. 711–731. DOI: 10.1016/j.ecl.2018.05.003.

- Oberoi-Khanuja, T. K., Murali, A., Rajalingam, K. (2013): "IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration". Cell Death & Disease **4** (9), e784-. DOI: 10.1038/cddis.2013.311.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C. (2018): "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation". Frontiers in Endocrinology **9**. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.
- O'Dorisio, T.M., Vinik, A.I. (2015) Concept: O'Dorisio TM und Vinik. Design: Ruggie T. University of Iowa. NJCCN Conference. Edison, New Jersey. Oktober 3.2015
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., Ghosh, S. (2011): "Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways". Nature immunology **12** (8), S. 695–708. DOI: 10.1038/ni.2065.
- Ohno, M., Kunimoto, M., Nishizuka, M., Osada, S., Imagawa, M. (2009): "Ku proteins function as corepressors to regulate farnesoid X receptor-mediated gene expression". Biochemical and biophysical research communications **390** (3), S. 738–742. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.10.040.
- Oliver, T. G., Mercer, K. L., Sayles, L. C., Burke, J. R., Mendus, D., Lovejoy, K. S. et al. (2010): "Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer". Genes & Development **24** (8), S. 837–852. DOI: 10.1101/gad.1897010.
- Palozola, K. C., Donahue, G., Liu, H., Grant, G. R., Becker, J. S., Cote, A. et al. (2017): "Mitotic Transcription and Waves of Gene Reactivation During Mitotic Exit". Science (New York, N.Y.) **358** (6359), S. 119–122. DOI: 10.1126/science.aal4671.
- Pape, U. F., Höcker, M., Seuss, U., Wiedenmann, B. (2000): "New molecular aspects in the diagnosis and therapy of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system". Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer **153**, S. 45–60. DOI: 10.1007/978-3-642-59587-5\_4.
- Pasparakis, M., Vandenabeele, P. (2015): "Necroptosis and its role in inflammation". Nature **517** (7534), S. 311–320. DOI: 10.1038/nature14191.
- Paturi, S., Deshmukh, M. V. (2021): "A Glimpse of "Dicer Biology" Through the Structural and Functional Perspective". Frontiers in Molecular Biosciences **8**. DOI: 10.3389/fmolb.2021.643657.
- Pavel, M., Baudin, E., Couvelard, A., Krenning, E., Öberg, K., Steinmüller, T. et al. (2012): "ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary". Neuroendocrinology **95** (2), S. 157–176. DOI: 10.1159/000335597.
- Pavlyukov, M. S., Antipova, N. V., Balashova, M. V., Vinogradova, T. V., Kopantzev, E. P., Shakhparonov, M. I. (2011): "Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation". The Journal of biological chemistry **286** (26), S. 23296–23307. DOI: 10.1074/jbc.M111.237586.
- Pearse, A. G. (1969): "The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept". The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society **17** (5), S. 303–313. DOI: 10.1177/17.5.303.
- Pearse, A. G. E., Coulling, I., Weavers, B., Friesen, S. (1970): "The endocrine polypeptide cells of the human stomach, duodenum, and jejunum". Gut **11** (8), S. 649–658.
- Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A. (2007): "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?". Nat Rev Cancer **7** (6), S. 415–428. DOI: 10.1038/nrc2131.
- Peter, M. E. (2010): "Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step". Oncogene **29** (15), S. 2161–2164. DOI: 10.1038/onc.2010.59.
- Pfaffl, M. W. (2001): "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". Nucleic Acids Research **29** (9), e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pichiorri, F., Suh, S.-S., Rocci, A., Luca, L. de, Taccioli, C., Santhanam, R. et al. (2010): "Down-regulation of p53-inducible microRNAs 192, 194 and 215 impairs the p53/MDM2 auto-regulatory loop in multiple myeloma development". Cancer cell **18** (4), S. 367–381. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.09.005.
- Pihán, P., Carreras-Sureda, A., Hetz, C. (2017): "BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise". Cell Death and Differentiation **24** (9), S. 1478–1487. DOI: 10.1038/cdd.2017.82.

- Plescia, J., Salz, W., Xia, F., Pennati, M., Zaffaroni, N., Daidone, M. Grazia et al. (2005): "Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent". Cancer cell **7** (5), S. 457–468. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.03.035.
- Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., Patel, B. K. (2019): "Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis". Frontiers in Molecular Neuroscience **12**. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00025.
- Rajagopalan, S., Balasubramanian, M. K. (2002): "Schizosaccharomyces pombe Bir1p, a nuclear protein that localizes to kinetochores and the spindle midzone, is essential for chromosome condensation and spindle elongation during mitosis". Genetics **160** (2), S. 445–456.
- Rajman, M., Schrott, G. (2017): "MicroRNAs in neural development: from master regulators to fine-tuners". Development (Cambridge, England) **144** (13), S. 2310–2322. DOI: 10.1242/dev.144337.
- Reichert, S., Rödel, C., Mirsch, J., Harter, P. N., Tomicic, M. T., Mittelbronn, M. et al. (2011): "Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma". Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology **101** (1), S. 51–58. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.06.037.
- Reichholf, B., Herzog, V. A., Fasching, N., Manzenreither, R. A., Sowemimo, I., Ameres, S. L. (2019): "Time-resolved small RNA sequencing unravels the molecular principles of microRNA homeostasis". Molecular cell **75** (4), 756–768.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.06.018.
- Rice, A. M., McLysaght, A. (2017): "Dosage-sensitive genes in evolution and disease". BMC Biology **15**. DOI: 10.1186/s12915-017-0418-y.
- Rindi, G., Buffa, R., Sessa, F., Tortora, O., Solcia, E. (1986): "Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules". Histochemistry **85** (1), S. 19–28. DOI: 10.1007/BF00508649.
- Rindi, G., Klimstra, D. S., Abedi-Ardekani, B., Asa, S. L., Bosman, F. T., Brambilla, E. et al. (2018): "A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal". Modern Pathology **31** (12), S. 1770–1786. DOI: 10.1038/s41379-018-0110-y.
- Ristori, E., Nicoli, S. (2017). "Comparative Functions of miRNAs in Embryonic Neurogenesis and Neuronal Network Formation". Pages 265–282. Editor(s): Pietri Tonelli, Davide de (Hg.) (2017): "Essentials of noncoding RNA in neuroscience. Ontogenetics, plasticity of the vertebrate brain. Amsterdam: Academic Press.
- Rosa, J., Canovas, P., Islam, A., Altieri, D. C., Doxsey, S. J. (2006): "Survivin Modulates Microtubule Dynamics and Nucleation throughout the Cell Cycle". Molecular Biology of the Cell **17** (3), S. 1483–1493. DOI: 10.1091/mbc.E05-08-0723.
- Sampath, S. C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A., Funabiki, H. (2004): "The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly". Cell **118** (2), S. 187–202. DOI: 10.1016/j.cell.2004.06.026.
- Sanada, H., Seki, N., Mizuno, K., Misono, S., Uchida, A., Yamada, Y. et al. (2019): "Involvement of Dual Strands of miR-143 (miR-143-5p and miR-143-3p) and Their Target Oncogenes in the Molecular Pathogenesis of Lung Adenocarcinoma". International Journal of Molecular Sciences **20** (18). DOI: 10.3390/ijms20184482.
- Schott, M., Klöppel, G., Raffel, A., Saleh, A., Knoefel, W. Trudo, Scherbaum, W. A. (2011): "Neuroendocrine Neoplasms of the Gastrointestinal Tract". Deutsches Ärzteblatt International **108** (18), S. 305–312. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0305.
- Schunke, K. J., Rosati, L. M., Zahurak, M., Herman, J. M., Narang, A. K., Usach, I. et al. (2017): "Long-term analysis of 2 prospective studies that incorporate mitomycin C into an adjuvant chemoradiation regimen for pancreatic and periampullary cancers". Advances in Radiation Oncology **3** (1), S. 42–51. DOI: 10.1016/j.adro.2017.07.008.
- Sen, Chandan K. (Hg.) (2015 Elsevier Inc): "MicroRNA in regenerative medicine". London: Elsevier Inc.

- Shah, P., Ding, Y., Niemczyk, M., Kudla, G., Plotkin, J. B. (2013): "Rate-Limiting Steps in Yeast Protein Translation". *Cell* **153** (7), S. 1589–1601. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.049.
- Shi, Y. (2002): "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis". *Molecular cell* **9** (3), S. 459–470. DOI: 10.1016/s1097-2765(02)00482-3.
- Shi, Z.-M., Wang, L., Shen, H., Jiang, C.-F., Ge, X., Li, D.-M. et al. (2017): "Downregulation of miR-218 contributes to epithelial–mesenchymal transition and tumor metastasis in lung cancer by targeting Slug/ZEB2 signaling". *Oncogene* **36** (18), S. 2577–2588. DOI: 10.1038/onc.2016.414.
- Simbolo, M., Mafficini, A., Sikora, K. O., Fassan, M., Barbi, S., Corbo, V. et al. (2016): "Lung neuroendocrine tumours: deep sequencing of the four World Health Organization histotypes reveals chromatin-remodelling genes as major players and a prognostic role for TERT, RB1, MEN1 and KMT2D". *The Journal of Pathology* **241** (4), S. 488–500. DOI: 10.1002/path.4853.
- Song, M.-S., Rossi, J. J. (2017): "Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity". *Biochemical Journal* **474** (10), S. 1603–1618. DOI: 10.1042/BCJ20160759.
- Speliotes, E. K., Uren, A., Vaux, D., Horvitz, H. R. (2000): "The survivin-like *C. elegans* BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone". *Molecular cell* **6** (2), S. 211–223. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)00023-x.
- Stauber, R. H., Mann, W., Knauer, S. K. (2007): "Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential". *Cancer research* **67** (13), S. 5999–6002. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0494.
- Sternburg, E. L., Estep, J. A., Nguyen, D. K., Li, Y., Karginov, F. V. (2018): "Antagonistic and cooperative AGO2-PUM interactions in regulating mRNAs". *Scientific Reports* **8**. DOI: 10.1038/s41598-018-33596-4.
- Stoebel, D. M., Dean, A. M., Dykhuizen, D. E. (2008): "The Cost of Expression of Escherichia coli lac Operon Proteins Is in the Process, Not in the Products". *Genetics* **178** (3), S. 1653–1660. DOI: 10.1534/genetics.107.085399.
- Strzyz, P. (2017): "Transcription: No proper rest in mitosis". *Nature reviews. Molecular cell biology* **18** (11), S. 652–653. DOI: 10.1038/nrm.2017.102.
- Student. (1908): "The Probable Error of a Mean". *Biometrika* **6** (1), S. 1-25
- Sun, S.-C. (2010): "Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway". *Cell Research* **21** (1), S. 71–85. DOI: 10.1038/cr.2010.177.
- Sun, C., Nettlesheim, D., Liu, Z., Olejniczak, E. T. (2005): "Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo". *Biochemistry* **44** (1), S. 11–17. DOI: 10.1021/bi0485171.
- Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., Miyazono, K. (2009): "Modulation of microRNA processing by p53". *Nature* **460** (7254), S. 529–533. DOI: 10.1038/nature08199.
- Sznajder, Ł. J., Michalak, M., Taylor, K., Cywoniuk, P., Kabza, M., Wojtkowiak-Szlachcic, A. et al. (2016): "Mechanistic determinants of MBNL activity". *Nucleic Acids Research* **44** (21), S. 10326–10342. DOI: 10.1093/nar/gkw915.
- Tait, S. W.G., Parsons, M. J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., Green, D. R. (2010): "Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria". *Developmental cell* **18** (5), S. 802–813. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.03.014.
- Takahashi, H., Takahashi, M., Ohnuma, S., Unno, M., Yoshino, Y., Ouchi, K. et al. (2017): "microRNA-193a-3p is specifically down-regulated and acts as a tumor suppressor in BRAF-mutated colorectal cancer". *BMC Cancer* **17**. DOI: 10.1186/s12885-017-3739-x.
- Tang, Y.-C., Amon, A. (2013): "Gene copy number alterations: A cost-benefit analysis". *Cell* **152** (3), S. 394–405. DOI: 10.1016/j.cell.2012.11.043.
- Tang, H., Chen, Q., Yu, W., Zhao, T. (2020): "MiR-4328 inhibits proliferation, metastasis and induces apoptosis in keloid fibroblasts by targeting BCL2 expression". *Open Life Sciences* **15** (1), S. 638–646. DOI: 10.1515/biol-2020-0056.

- Taniuchi, K., Ogasawara, M. (2020): "KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer". *Oncotarget* **11** (2), S. 131–147. DOI: 10.18632/oncotarget.27413.
- Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M., Goodall, G. J. (2013): "On Measuring miRNAs after Transient Transfection of Mimics or Antisense Inhibitors". *PLoS ONE* **8** (1). DOI: 10.1371/journal.pone.0055214.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1992): "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979". *Biotechnology (Reading, Mass.)* **24**, S. 145–149.
- Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A. D., Filipowicz, W., Ramos, A. et al. (2009): "The RNA-binding Protein KSRP Promotes the Biogenesis of a Subset of miRNAs". *Nature* **459** (7249), S. 1010–1014. DOI: 10.1038/nature08025.
- Trabucchi, M., Briata, P., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., Rosenfeld, M. G. (2010): "KSRP PROMOTES THE MATURATION OF A GROUP OF miRNA PRECURSORS". *Advances in experimental medicine and biology* **700**, S. 36–42.
- Trang, P., Medina, P. P., Wiggins, J. F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M. et al. (2009): "Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA". *Oncogene* **29** (11), S. 1580–1587. DOI: 10.1038/onc.2009.445.
- Trang, P., Wiggins, J. F., Daige, C. L., Cho, C., Omotola, M., Brown, D. et al. (2011): "Systemic Delivery of Tumor Suppressor microRNA Mimics Using a Neutral Lipid Emulsion Inhibits Lung Tumors in Mice". *Molecular Therapy* **19** (6), S. 1116–1122. DOI: 10.1038/mt.2011.48.
- Treiber, T., Treiber, N., Plessmann, U., Harlander, S., Daiß, J.-L., Eichner, N. et al. (2017): "A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis". *Molecular cell* **66** (2), 270–284.e13. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.03.014.
- Truscott, M., Islam, A. B.M.M.K., Frolov, M. V. (2016): "Novel regulation and functional interaction of polycistronic miRNAs". *RNA* **22** (1), S. 129–138. DOI: 10.1261/rna.053264.115.
- Turner, N. C., Strauss, S. J., Sarker, D., Gillmore, R., Kirkwood, A., Hackshaw, A. et al. (2010): "Chemotherapy with 5-fluorouracil, cisplatin and streptozocin for neuroendocrine tumours". *British Journal of Cancer* **102** (7), S. 1106–1112. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605618.
- UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 (2020)". *Nucleic Acids Research* **49** (D1), D480–9.
- Uren, A. G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K. J., Burrows, F. J., Vaux, D. L., Choo, K. H. (2000): "Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype". *Current biology: CB* **10** (21), S. 1319–1328. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00769-7.
- van Kouwenhove, M., Kedde, M., Agami, R. (2011): "MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer". *Nat Rev Cancer* **11** (9), S. 644–656. DOI: 10.1038/nrc3107.
- van Nostrand, E. L., Freese, P., Pratt, G. A., Wang, X., Wei, X., Xiao, R. et al. (2021): "Author Correction: A large-scale binding and functional map of human RNA-binding proteins". *Nature* **589** (7842), E5. DOI: 10.1038/s41586-020-03067-w.
- van Riet, J., van de Werken, H. J. G., Cuppen, E., Eskens, F. A. L. M., Tesselaar, M., van Veenendaal, L. M. et al. (2021): "The genomic landscape of 85 advanced neuroendocrine neoplasms reveals subtype-heterogeneity and potential therapeutic targets". *Nature Communications* **12**. DOI: 10.1038/s41467-021-24812-3.
- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J., Olson, E. N. (2007): "Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA". *Science (New York, N.Y.)* **316** (5824), S. 575–579. DOI: 10.1126/science.1139089.
- Vavouri, T., Semple, J. I., Garcia-Verdugo, R., Lehner, B. (2009): "Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity". *Cell* **138** (1), S. 198–208. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.029.

- Végran, F., Boidot, R., Bonnetain, F., Cadouot, M., Chevrier, S., Lizard-Nacol, S. (2011): "Apoptosis gene signature of Survivin and its splice variant expression in breast carcinoma". Endocrine-related cancer **18** (6), S. 783–792. DOI: 10.1530/ERC-11-0105.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E. et al. (2000): "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins". Cell **102** (1), S. 43–53. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00009-x.
- Viswanathan, S. R., Daley, G. Q., Gregory, R. I. (2008): "Selective blockade of microRNA processing by Lin-28". Science (New York, N.Y.) **320** (5872), S. 97–100. DOI: 10.1126/science.1154040.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., Kroemer, G. (2011): "Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability". Nature reviews. Molecular cell biology **12** (6), S. 385–392. DOI: 10.1038/nrm3115.
- Vlachos, I.S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M.D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T. et al. (2015): "DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support". Nucleic Acids Res. **43**(W1):W460-466. DOI: 10.1093/nar/gkv403.
- Voges, Y., Michaelis, M., Rothweiler, F., Schaller, T., Schneider, C., Politt, K. et al. (2016): "Effects of YM155 on survivin levels and viability in neuroblastoma cells with acquired drug resistance". Cell Death & Disease **7** (10), e2410-. DOI: 10.1038/cddis.2016.257.
- Volk, N., Shomron, N. (2011): "Versatility of MicroRNA Biogenesis". PLoS ONE **6** (5). DOI: 10.1371/journal.pone.0019391.
- Wang, X.-Y., Gan, M.-X., Li, Y., Zhan, W.-H., Han, T.-Y., Han, X.-J. et al. (2015): "Cdc42 induces EGF receptor protein accumulation and promotes EGF receptor nuclear transport and cellular transformation". FEBS letters **589** (2), S. 255–262. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.11.049.
- Wang, D., Huang, J., Hu, Z. (2011): "RNA Helicase DDX5 Regulates MicroRNA Expression and Contributes to Cytoskeletal Reorganization in Basal Breast Cancer Cells\*". Molecular & cellular proteomics: MCP **11** (2). DOI: 10.1074/mcp.M111.011932.
- Wang, H., Luo, J., Liu, C., Niu, H., Wang, J., Liu, Q. et al. (2017): "Investigating MicroRNA and transcription factor co-regulatory networks in colorectal cancer". BMC Bioinformatics **18**. DOI: 10.1186/s12859-017-1796-4.
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., Zhou, B. P. (2013): "The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis". Current cancer drug targets **13** (9), S. 963–972.
- Wang, Y., Zeng, G., Jiang, Y. (2020): "The Emerging Roles of miR-125b in Cancers". Cancer Management and Research **12**, S. 1079–1088. DOI: 10.2147/CMAR.S232388.
- Wang, R., Zhang, S., Chen, X., Li, N., Li, J., Jia, R. et al. (2018): "EIF4A3-induced circular RNA MMP9 (circMMP9) acts as a sponge of miR-124 and promotes glioblastoma multiforme cell tumorigenesis". Molecular Cancer **17**. DOI: 10.1186/s12943-018-0911-0.
- Warraich, S. T., Yang, S., Nicholson, G. A., Blair, I. P. (2010): "TDP-43: a DNA and RNA binding protein with roles in neurodegenerative diseases". The international journal of biochemistry & cell biology **42** (10), S. 1606–1609. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.06.016.
- Warrier, N. Meenakshi, Agarwal, P., Kumar, P. (2020): "Emerging Importance of Survivin in Stem Cells and Cancer: the Development of New Cancer Therapeutics". Stem Cell Reviews and Reports **16** (5), S. 828–852. DOI: 10.1007/s12015-020-09995-4.
- Weinstein, I. Bernard, Joe, A. K. (2006): "Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy". Nature clinical practice. Oncology **3** (8), S. 448–457. DOI: 10.1038/ncponc0558.
- Werner, T. A., Tamkan-Ölcek, Y., Dizdar, L., Riemer, J. C., Wolf, A., Cupisti, K. et al. (2016): "Survivin and XIAP: two valuable biomarkers in medullary thyroid carcinoma". British Journal of Cancer **114** (4), S. 427–434. DOI: 10.1038/bjc.2016.5.
- Wheatley, S. P., Henzing, A. J., Dodson, H., Khaled, W., Earnshaw, W. C. (2004): "Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to

- inner centromere protein (INCENP) in vivo". The Journal of biological chemistry **279** (7), S. 5655–5660. DOI: 10.1074/jbc.M311299200.
- Wheatley, S. P., Altieri, D. C. (2019): "Survivin at a glance". Journal of cell science **132** (7). DOI: 10.1242/jcs.223826.
- Wiedemann, C., Schäfer, T., Burger, M. M., Sihra, T. S. (1998): "An Essential Role for a Small Synaptic Vesicle-Associated Phosphatidylinositol 4-Kinase in Neurotransmitter Release". The Journal of Neuroscience **18** (15), S. 5594–5602. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-15-05594.1998.
- de Winter, J.C.F. (2019): "Pitfalls of automation: a faulty narrative? ". Ergonomics. **62** (4). S. 505-508. DOI: 10.1080/00140139.2019.1563334.
- Woischke, C., Jung, P., Jung, A., Kumbrink, J., Eisenlohr, S., Auernhammer, C. Josef et al. (2020): "Mixed large cell neuroendocrine carcinoma and squamous cell carcinoma of the colon: detailed molecular characterisation of two cases indicates a distinct colorectal cancer entity". The Journal of Pathology: Clinical Research **7** (1), S. 75–85. DOI: 10.1002/cjp2.183.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X., Shi, Y. (2000): "Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO". Nature **408** (6815), S. 1008–1012. DOI: 10.1038/35050012.
- Wu, D., Huang, P., Wang, L., Zhou, Y., Pan, H., Qu, P. (2013): "MicroRNA-143 inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in prostate cancer". Molecular medicine reports **8** (2), S. 626–630. DOI: 10.3892/mmr.2013.1501.
- Xia, F., Canovas, P. M., Guadagno, T. M., Altieri, D. C. (2008): "A Survivin-Ran Complex Regulates Spindle Formation in Tumor Cells". Molecular and Cellular Biology **28** (17), S. 5299–5311. DOI: 10.1128/MCB.02039-07.
- Xia, F., Lee, C. W., Altieri, D. C. (2008): "Tumor cell dependence on Ran-GTP-directed mitosis". Cancer research **68** (6), S. 1826–1833. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5279.
- Yang, A., Shao, T.-J., Bofill-De Ros, X., Lian, C., Villanueva, P., Dai, L., Gu, S. (2020): "AGO-bound mature miRNAs are oligouridylated by TUTs and subsequently degraded by DIS3L2". Nature Communications **11**. DOI: 10.1038/s41467-020-16533-w.
- Yao, J. C., Hassan, M., Phan, A., Dagohoy, C., Leary, C., Mares, J. E. et al. (2008): "One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States". Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology **26** (18), S. 3063–3072. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.4377.
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. Robert, Anderson, D. G. (2014): "Non-viral vectors for gene-based therapy". Nature reviews. Genetics **15** (8), S. 541–555. DOI: 10.1038/nrg3763.
- Yue, Z., Carvalho, A., Xu, Z., Yuan, X., Cardinale, S., Ribeiro, S. et al. (2008): "Deconstructing Survivin: comprehensive genetic analysis of Survivin function by conditional knockout in a vertebrate cell line". The Journal of Cell Biology **183** (2), S. 279–296. DOI: 10.1083/jcb.200806118.
- Zlotorynski, E. (2019): "Insights into the kinetics of microRNA biogenesis and turnover". Nature reviews. Molecular cell biology **20** (9), S. 511. DOI: 10.1038/s41580-019-0164-9.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999): "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9". The Journal of biological chemistry **274** (17), S. 11549–11556. DOI: 10.1074/jbc.274.17.11549.
- Zumbrägel, F. K., Machtens, D. A., Curth, U., Lüder, C. G. K., Reubold, T. F., Eschenburg, S. (2017): "Survivin does not influence the anti-apoptotic action of XIAP on caspase-9". Biochemical and biophysical research communications **482** (4), S. 530–535. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.094.

## 9 Danksagung

Bei der Erstellung dieser Arbeit haben mich viele Personen unterstützt, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte:

Herrn Prof. Dr. med. W.T. Knoefel danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Klinik zu absolvieren.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Krieg danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, wo ich dieses Forschungsthema mit seiner außerordentlichen Betreuung erarbeiten konnte. Er war mir stets ein sorgsamer Mentor und übernahm somit auch die Rolle des Erstgutachters.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Rütter danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die unkomplizierte und freundliche Betreuung und Beratung. Seine fachliche Expertise war mir stets eine Hilfe bei der Bewertung meiner Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor den praktischen Teil meiner Promotion auszuüben.

Herrn Dr. Thomas Arthur Werner möchte ich postum für seine Unterstützung und seinen außerordentlichen Einsatz für meine Doktorarbeit danken.

Frau Dr. Sabrina Mersch danke ich für ihre kollegiale Unterstützung und ihre Hilfestellung beim Erlernen neuer Arbeitstechniken.

Frau Dr. Birte Möhlendick danke ich für ihre freundschaftliche und fachliche Unterstützung. Die gemeinsamen Diskussionen waren stets eine Bereicherung im fachlichen Diskurs.

Herrn Prof. Dr. Pfeffer danke ich für die Aufnahme in seinem Institut. Seiner Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme und kompetente Unterstützung in ihrem Labor.

Dem Laborteam der Chirurgischen Forschung möchte ich für die kollegiale und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken. Ein großes Dankeschön gilt Maria für ihre Unterstützung im Laboralltag.

Bei meiner Familie bedanke ich mich für ihre moralische Unterstützung. Meinem Partner Thomas Scholz danke ich für seine geduldige und motivierende Unterstützung.

## 10 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Frau Sina Schütte versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Außerdem versichere ich, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Mir ist bekannt, dass im Falle einer Täuschung die Abschlussarbeit mit "nicht bestanden" bewertet wird.

Essen, der 7. September 2022



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sina Schütte', is written over a horizontal line.

Unterschrift