

Identifikation und funktionelle Analyse strahlenregulierter microRNAs in Endothelzellen

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



Angefertigt am
Institut für Strahlenbiologie
Helmholtz-Zentrum München
unter der Leitung von Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp
und der Betreuung von Dr. Simone Mörtl.

vorgelegt von
Anne Krämer
aus Darmstadt

München, Oktober 2011

Die vorliegende Dissertation wurde von Oktober 2008 bis Oktober 2011 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp am Helmholtz Zentrum München angefertigt.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2012

Inhaltsverzeichnis

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	3
2.1	MicroRNAs (miRNAs)	3
2.1.1	<i>Ein historischer Überblick über nicht-kodierende RNAs (ncRNAs)</i>	3
2.1.2	<i>Die Biogenese von miRNA</i>	4
2.1.3	<i>Das RNase III-Enzym Dicer und die Argonaut-Proteine</i>	7
2.2	MiRNA-Effektor-Komplexe.....	8
2.3	Mechanismen der miRNA-vermittelten Genregulation	9
2.3.1	<i>Processing Bodies und Stress-Granula als miRNA working sites</i>	10
2.4	Zusammenspiel von DNA-Schäden, zellulärer Schadensantwort und miRNAs	13
2.5	Die Rolle von miRNAs nach ionisierender Strahlung	16
2.5.1	<i>MiRNA-Analysen in Endothelzellen nach Bestrahlung</i>	17
2.6	Ziel der Arbeit.....	19
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	20
3.1	Material	20
3.1.1	<i>Abkürzungen</i>	20
3.1.2	<i>Geräte, Chemikalien und Computerprogramme</i>	22
3.1.2.1	<i>Geräte</i>	22
3.1.2.2	<i>Chemikalien</i>	23
3.1.2.3	<i>Verwendete Puffer und Lösungen</i>	26
3.1.2.4	<i>Enzyme und kommerzielle Kits</i>	30
3.1.2.5	<i>Antikörper</i>	31
3.1.2.6	<i>RNA-Oligonukleotide</i>	32
3.1.2.7	<i>Primäre humane Zellen, Zelllinien und Zellkulturmedien</i>	33
3.1.2.8	<i>Computerprogramme</i>	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	35
3.2.1.1	<i>Kultivierung humaner Zellen und Zelllinien</i>	35
3.2.1.2	<i>Kryokonservierung von Säugerzellen.....</i>	35
3.2.1.3	<i>Auftauen von humanen Zellen.....</i>	36
3.2.2	<i>Funktionelle Analysen</i>	36
3.2.2.1	<i>Koloniebildungstest</i>	36
3.2.2.2	<i>Bestimmung der Proliferationsaktivität.....</i>	37

3.2.2.3	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität.....	37
3.2.2.4	Analyse der Zellzyklusverteilung und der SubG1-Population	38
3.2.2.5	Transfektion humaner Zellen mit kleinen RNA-Molekülen	38
3.2.2.6	Transiente Transfektion humaner Zellen mit dem Plasmid Ago2-eGFP	39
3.2.2.7	Isolation von RNA.....	39
3.2.2.8	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	40
3.2.2.9	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) von miRNAs für TaqMan®-MicroRNA-Array (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit)	40
3.2.2.10	Reverse Transkription zur Detektion von spezifischen miRNAs (TaqMan® MicroRNA reverse transcription kit)	41
3.2.2.11	Quantitative Echtzeit (Real-time)-Polymerasekettenreaktion von miRNAs	41
3.2.3	Immunfluoreszenz	42
3.2.3.1	Immunfluoreszenzfärbung für Fluoreszenzmikroskopie	42
3.2.4	Proteinanalytische Methoden	43
3.2.4.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten für die 1D-Gelelektrophoresen	43
3.2.4.2	Herstellung von Gesamtproteinextrakten für die 2D-Gelelektrophoresen	43
3.2.4.3	Proteinmengenbestimmung nach Bradford	43
3.2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen (Laemmli, 1970)	44
3.2.4.5	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose	44
3.2.4.6	Entfernen von Antikörpern (Stripping)	45
3.2.4.7	Relative Quantifizierung von Proteinen.....	45
3.2.4.8	2D-Gelelektrophorese.....	46
3.2.4.9	Human Apoptosis Array mittels Proteome Profiler™ Array.....	54
3.2.4.10	Bioinformatische Vorhersage von Ziel-mRNAs der untersuchten miRNAs.....	55
3.2.4.11	Statistik	56
4.	ERGEBNISSE	57
4.1	Untersuchung von microRNA-vermittelten Prozessen in der zellulären Strahlenantwort in immortalisierten Endothelzellen	57
4.1.1	<i>Funktion von Dicer und Argonaut-2 in der zellulären Strahlenantwort von EA.hy926 Zellen</i>	57
4.1.2	<i>Untersuchung der Strahlenantwort in Dicer- oder Ago2-depletierten EA.hy926 Zellen nach ionisierender Strahlung</i>	61
4.1.3	<i>Analyse der miRNA-Expression nach ionisierender Strahlung in der humanen Endothelzelllinie EA.hy926</i>	68
4.1.4	<i>Validierung differentiell exprimierter miRNAs in der Endothelzelllinie EA.hy926</i>	74
4.1.5	<i>Der Einfluss von spezifischen miRNAs auf die Strahlensensitivität von EA.hy926 Zellen</i>	76
4.1.6	<i>Der Einfluss von miRNAs auf die strahleninduzierte Apoptose in der Endothelzelllinie EA.hy926</i>	78
4.2	Untersuchung von microRNA-vermittelten Prozessen in der zellulären Strahlenantwort in primären Endothelzellen	81
4.2.1	<i>Funktion von Dicer und Argonaut-2 in der zellulären Strahlenantwort in primären Endothelzellen (HUVECs)</i>	81
4.2.2	<i>Zellzykluscheckpoint-Aktivierung und Apoptose in humanen primären Endothelzellen nach der Herunterregulierung von Dicer nach ionisierender Strahlung</i>	84
4.2.3	<i>Analyse der miRNA-Expression nach ionisierender Strahlung in primären Endothelzellen</i>	85
4.2.4	<i>Einfluss von spezifischen miRNAs auf die Strahlensensitivität in primären Endothelzellen</i>	88

4.3	Identifikation von miRNA-regulierten Proteinen in der Strahlenantwort von Endothelzellen	92
4.3.1	<i>Charakterisierung der Expression von miRNAs, die nach Bestrahlung einen Einfluss auf das Überleben von Endothelzellen zeigten.....</i>	92
4.3.2	<i>In silico-Identifizierung potentieller Targetgene der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p in EA.hy926 Zellen</i>	95
4.3.3	<i>Analyse von apoptoserelevanter Proteinen nach Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p in EA.hy926 Zellen mittels Human Apoptosis Arrays</i>	97
4.3.4	<i>Proteom-Analyse zur Identifizierung von miRNA-regulierten Proteinen in der Strahlenantwort von Endothelzellen</i>	99
4.3.5	<i>Validierung der 2D-DIGE Resultate durch quantitative Western-Blots</i>	107
4.3.6	<i>Bioinformatische GO-Term-Analyse der differentiell exprimierten Proteine.....</i>	110
4.3.7	<i>Bioinformatische Analyse differentiell exprimierter Proteine mittels der Ingenuity Software</i>	114
4.3.8	<i>Bioinformatische Netzwerkanalyse der deregulierten Proteine und miRNAs nach Bestrahlung</i>	118
4.4	Bildung von Stress-Granula nach Bestrahlung	122
4.4.1	<i>MiRNA-abhängige Bildung von Stress-Granula in EA.hy926 Zellen nach ionisierender Strahlung</i>	122
4.4.2	<i>Bildung von Stress-Granula in primären Endothelzellen nach ionisierender Strahlung</i>	128
5.	DISKUSSION	131
5.1	Funktion von Dicer und Argonaut-2 in der zellulären Strahlenantwort in Endothelzellen	131
5.2	MiRNA-Expressionsanalyse nach ionisierender Strahlung in Endothelzellen	134
5.3	Der Einfluss von spezifischen miRNAs auf die Strahlensensitivität und die Apoptose in Endothelzellen	138
5.4	Identifikation von Targettranskripten der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p	140
5.5	2D-DIGE von miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p regulierten Proteinen nach Bestrahlung	142
5.6	Übersicht der miRNA-vermittelten Funktionen in der Strahlenantwort von EA.hy926 und HUVEC Zellen	147
5.7	MiRNA-abhängige Bildung von Stress-Granula in HUVEC und EA.hy926 Zellen nach ionisierender Strahlung.....	148
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	151

7.	ANHANG.....	161
8.	PUBLIKATIONEN	169
8.1	Veröffentlichungen.....	169
8.2	Vorträge.....	169
8.3	Posterpräsentationen	170
9.	LEBENS LAUF	172
10.	DANKSAGUNG	174

1. Zusammenfassung

Voraussetzung für eine Optimierung der Strahlentherapie ist ein detailliertes Verständnis der Mechanismen, die die Strahlenempfindlichkeit von Zellen beeinflussen. Neben vielen anderen Prozessen induziert ionisierende Strahlung auch die Expression von microRNAs (miRNAs). MiRNAs sind eine Klasse von kleinen, nicht-kodierenden RNAs, die posttranskriptionell die Proteinexpression regulieren. Einige Publikationen beschreiben bereits miRNA-Änderungen in verschiedenen Zellsystemen nach Bestrahlung. Es gibt jedoch kaum Daten, die funktionelle Auswirkungen dieser miRNA-Veränderungen beschreiben. In dieser Arbeit wurde daher der Schwerpunkt auf die Analyse der funktionellen Rolle der miRNAs bei der Reaktion von immortalisierten und primären Endothelzellen auf ionisierende Strahlung gelegt.

Der Einfluss von miRNAs in der Strahlenantwort von Endothelzellen konnte in einem primären und einem immortalisierten System gezeigt werden. Eine globale Hemmung der miRNA-Expression wurde durch die RNAi-vermittelte Herunterregulierung der miRNA-prozessierenden Enzyme Argonaut-2 (Ago2) bzw. Dicer erreicht. Eine Reduktion der Proteine Dicer oder Ago2 führte nach Bestrahlung zu einem reduzierten Überleben. Dies lässt darauf schließen, dass miRNAs das Überleben der Zellen nach Bestrahlung positiv beeinflussen. Darüber hinaus waren die Aktivierung des G1/S-Zellzykluskontrollpunktes gestört und die Apoptose erhöht. MiRNAs hatten in diesem System keinen Einfluss auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur. Mittels der TaqMan®-basierten *Low Density Array*-Technologie wurden miRNAs, die 4 h, 12 h und 24 h nach 2,5 Gy Bestrahlung im primären und im immortalisierten System eine Veränderung in ihrer Expression aufwiesen, identifiziert. Die miRNA-Expressionen waren in beiden Zellsystemen zeitabhängig verändert. Dies deutet sowohl auf eine frühe als auch eine spätere miRNA-vermittelte Strahlenantwort hin. Nach Bestrahlung hochregulierte miRNAs wurden nach spezifischer Inhibierung funktionell charakterisiert. Acht miRNAs wurden in der immortalisierten Endothelzelllinie EA.hy926 analysiert. Die Inhibierung von drei dieser miRNAs (miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p) beeinflusste nach Bestrahlung das Überleben der Zellen negativ. Zusätzlich führte die Inhibierung dieser miRNAs zu einer gesteigerten strahleninduzierten Apoptose. Analoge Effekte konnten im primären System für die miRNAs miR-216a, miR-525-3p und miR-628-5p gezeigt werden.

Zur weiteren Aufklärung der miRNA-regulierten Funktionen wurden *Target*proteine der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p mittels 2D-Proteom-Analyse identifiziert. Insgesamt

konnten 44 Proteine bestimmt werden, die nach Bestrahlung und gleichzeitiger Inhibierung einer dieser miRNAs dereguliert waren.

Viele der Proteine, die nach Bestrahlung und gleichzeitiger Inhibierung einer spezifischen miRNA verändert waren, hatten eine biologische Funktion, die wichtig in der Strahlenantwort ist. Die *Gene Ontology-Term-Analyse* ergab nach Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p eine Beeinflussung der Zellzyklusregulation, der Antwort auf oxidativen Stress und der Apoptose-Induktion. Diese computergestützten Zuordnungen stehen somit im Einklang mit den experimentellen Apoptosedaten. Als *Targets* für alle drei miRNAs wurden die Proteine Chaperonin containing TCP1 (CCT2), Heat shock 70 kDa protein 9 (HSPA9/Grp75), Thioredoxin-1 (TXN1) und Annexin A3 (ANXA3) identifiziert.

In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluss von miRNAs auf die Stress-Granula-Bildung nach Bestrahlung in Endothelzellen untersucht. Es zeigte sich, dass die Bildung von Stress-Granula im primären und im immortalisierten System nach Bestrahlung in einer Subpopulation der Zellen erfolgt. Die Stress-Granula-Bildung ist vom miRNA-Gehalt der Zelle abhängig. Ein *Knockdown* der miRNA-prozessierenden Enzyme Dicer und Ago2 führte zu einer Reduktion von Stress-Granula, die durch die Transfektion von unspezifischen miRNAs komplementiert werden kann.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die wichtige Funktion von miRNAs in der Strahlenantwort von Endothelzellen gezeigt, sowie ihre Beteiligung an der Bildung von Stress-Granula nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Die übereinstimmenden Befunde zwischen immortalisierten und primären Zellen stärken die Annahme, dass miRNAs eine wichtige Funktion in der Strahlungsresistenz von Endothelzellen besitzen.

2. Einleitung

2.1 MicroRNAs (miRNAs)

2.1.1 *Ein historischer Überblick über nicht-kodierende RNAs (ncRNAs)*

Weniger als 2 % des menschlichen Genoms kodieren für Proteine, aber ein weitaus größerer Teil wird zumindest in RNA transkribiert. Diese nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs) fungieren als wichtige Regulatoren in einer Vielzahl zellulärer Prozesse. Früher wurde davon ausgegangen, dass RNAs lediglich eine Brücke zwischen der DNA und dem fertigen Protein darstellen. Hierbei sind die *messenger RNAs* (mRNAs) und die kleinen nukleären RNAs (snRNAs), die am Spleißen beteiligt sind, zu nennen. Weiterhin war bekannt, dass transfer RNAs (tRNAs) und ribosomale RNAs (rRNAs) für die Translation von mRNAs in Proteine zuständig sind. Ribosomale RNAs stellen einen Bestandteil des Ribosoms dar und erkennen Teile der mRNAs und tRNAs. Im letzten Jahrzehnt konnten eine Vielzahl weiterer Klassen an großen und kleinen nicht-Protein-kodierenden RNAs identifiziert und charakterisiert werden. Hierzu zählen ncRNAs die meist an infrastrukturellen Prozessen in Zellen beteiligt sind (z.B. small Cajal body-specific RNAs (scaRNAs), Telomerase RNAs und Y RNAs), oder RNA-Typen, die ausschließlich spezifische regulatorische Rolle besitzen (z.B. natürliche cis-Antisense-Transkripte, long noncoding RNAs (lncRNAs), piwi-interacting RNAs (piRNAs) und miRNAs (miRNAs)). Verschiedene Klassen von ncRNAs haben eine Funktion in der Hemmung der Genexpression, ein Phänomen, das als *RNA-Silencing* bezeichnet wird. Das *RNA-Silencing* wurde Anfang der 90er Jahre bei Pflanzen entdeckt (Matzke et al., 1989, Napoli et al., 1990, Smith et al., 1990). 1992 beschrieben Romano und Macino ein ähnliches Phänomen in *Neurospora crassa* (Romano und Macino, 1992). In Tieren wurde das *RNA-Silencing* zuerst durch Guo und Kemphues nachgewiesen. Sie fanden heraus, dass die Einführung sowohl von Sense- als auch Antisense-RNA zum Abbau von PAR-1 mRNA in *Caenorhabditis (C.) elegans* führte (Guo und Kemphues, 1995). Ein wichtiger Durchbruch gelang im Jahr 1998 durch Fire und Mello, die zeigen konnten, dass nicht eine einzelsträngige (ss), sondern eine doppelsträngige (ds) RNA der Auslöser für das *Gen-Silencing* war (Fire et al., 1998). Für ihre Arbeit über RNA-Interferenz (RNAi) erhielten Fire und Mello im Jahr 2006 den Nobelpreis der Medizin. In den Folgejahren konnte gezeigt werden, dass die dsRNA in kleinere einzelsträngige Zwischenprodukte von etwa 22 Nukleotiden (nt) Länge umgewandelt wird. Die so entstandenen kleinen RNAs sind in der Lage die Spaltung homologer Ziel-mRNAs zu induzieren und wurden daher als *small interfering RNAs* (siRNAs) bezeichnet. Das Phänomen

selbst wurde RNA-Interferenz genannt (Elbashir et al., 2001, Hamilton und Baulcombe, 1999, Hammond et al., 2000, Zamore et al., 2000). Dieses Potenzial zur Unterdrückung eines spezifischen Gens macht die RNA-Interferenz attraktiv für gentherapeutische Ansätze (Grimm und Kay, 2007a, b). Zu dieser Zeit wurde eine weitere Klasse von kleinen RNAs in *C. elegans* entdeckt. Sie erwiesen sich als wichtig für den Entwicklungsablauf in Würmern und wurden daher *small temporal* RNAs (stRNAs) genannt. Die erste stRNA wurde 1993 von zwei Forschergruppen beschrieben (Lee et al., 1993, Wightman et al., 1993). Sie wiesen nach, dass die 21 nt kleine stRNA lin-4 die mRNA lin-14 durch unvollständige Basenpaarung in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) posttranskriptionell reguliert. Im Jahr 2000 wurde mit let-7 die zweite stRNA in *C. elegans* entdeckt (Pasquinelli et al., 2000, Reinhart et al., 2000, Slack et al., 2000). Anschließend wurde eine Vielzahl weiterer kleiner, 22 nt langer einzelsträngiger RNAs in unterschiedlichen Organismen beschrieben, die jedoch nicht nur eine Funktion im Entwicklungsablauf hatten (Lagos-Quintana et al., 2001, Lau et al., 2001, Lee und Ambros, 2001, Llave et al., 2002). Daher wurde diese neue Klasse von evolutionär konservierten RNAs von stRNAs in microRNAs (miRNAs) umbenannt. Obwohl sie sich in ihren Längen ähneln, wurde bis 2001 keine Verbindung zwischen siRNAs und miRNAs hergestellt. 2001 konnte jedoch gezeigt werden, dass lange dsRNAs, die die Vorläufer von miRNAs (pre-miRNAs) darstellen, durch das gleiche Enzym, die RNase III Dicer, in reife miRNAs umgewandelt werden wie siRNAs (Bernstein et al., 2001, Grishok et al., 2001, Hutvagner et al., 2001, Ketting et al., 2001, Knight und Bass, 2001).

2.1.2 Die Biogenese von miRNA

Bei miRNAs handelt es sich um kleine, endogene, nicht-kodierende RNAs welche die Stabilität und die Translation von Protein-kodierenden mRNAs kontrollieren. Bioinformatische Analysen weisen darauf hin, dass 30-60 % des menschlichen Genoms durch miRNAs reguliert werden (Fabian et al., 2010, Friedman et al., 2009, Lewis et al., 2005). MiRNAs sind an der Regulation verschiedener grundlegender zellulärer Prozesse und Signalwege, wie der Zellproliferation, der Differenzierung, der Zellzyklusregulation und der Apoptose beteiligt (Bueno und Malumbres, 2011, Bueno et al., 2008, Foshay und Gallicano, 2007, Inui et al., 2010). Des Weiteren konnte eine Beteiligung von miRNAs an spezialisierten Prozessen wie z.B. der Entwicklung des zentralen Nervensystems, der Insulinsekretion, der Differenzierung von Adipozyten und B-Zellen bzw. der Herzentwicklung nachgewiesen werden (Brennecke et al.,

2003, Calin et al., 2004, Chan et al., 2004, Iorio et al., 2005, Johnson et al., 2005, Zhao et al., 2005). Veränderungen in ihrem Expressionsmuster können mit unterschiedlichen Krankheiten, insbesondere Krebs, assoziiert sein (Alvarez-Garcia und Miska, 2005, Esquela-Kerscher und Slack, 2006). Bisher wurden über 700 humane miRNAs identifiziert und ihre gesamte Anzahl wird auf weit über 1000 geschätzt. Aktuell (Stand November 2010) umfasst die Datenbank „www.microRNA.org“ über 1100 Einträge für potentielle humane miRNA-Sequenzen. Die Entwicklung neuer Sequenzierungsmethoden, wie das *Deep-Sequencing* (Lu et al., 2005) und computergestützte Voraussagemethoden (Li et al., 2006) haben zusätzlich die Suche nach neuen, nur wenig abundanten kleinen RNAs beschleunigt.

MiRNA-Gene sind, mit Ausnahme des Y-Chromosoms, über das gesamte Genom verteilt. Die meisten miRNAs sind in eng verwandten Arten evolutionär konserviert und viele besitzen Homologe in weiter entfernten Spezies.

Eine miRNA kann im Genom als eigenes Gen (monocistronisch) vorliegen. Sie kann außerdem in einem Intron eines proteinkodierenden Gens, mit welchem sie gemeinsam transkribiert wird, lokalisiert sein (intronisch, sog. „MiRtrons“) oder in einem Cluster zusammen mit anderen miRNAs durch einen gemeinsamen Promotor transkribiert werden (polycistronisch) (Filipowicz et al., 2008). Die miRNA-Biogenese beinhaltet drei RNA-Intermediate: ein bis zu mehrere Kilobasen (kb) langes, primäres Vorläufer Transkript (pri-miR = *primary miRNA transcript*), eine ca. 60 bis 80 Basenpaare (bp) lange Haarnadel-Struktur, welche als pre-miRNA (*precursor miRNA*) bezeichnet wird und eine ca. 18 bis 24 nt lange reife miRNA-Duplex Struktur (Bushati und Cohen, 2007, Peters und Meister, 2007). Im Fall der mono- und polycistronischen Transkription wird das miRNA-Gen durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) transkribiert. Sie kann wie ein typisches RNA-Pol II-Transkript eine 7-Methylguanosin Kappe am 5'-Terminus und einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende enthalten (Cai et al., 2004). In seltenen Fällen kann die Transkription von miRNA-Genen auch durch RNA-Pol III vermittelt werden (Borchert et al., 2006). Die in einer Haarnadelstruktur gefaltete pri-miRNA ähnelt dsRNA und enthält die späteren miRNAs als imperfekte „*stem-loop*“ Struktur ohne perfekte Watson-Crick Paarung (Zhang et al., 2007). Diese *stem-loop* Strukturen werden bei der Prozessierung der pri-miRNA durch einen Komplex bestehend aus der RNase III-Endonuklease Drosha und dem Cofaktor DGCR8 (DiGeorge syndrom critical region on chromosome 8) ausgeschnitten, was zur Bildung der pre-miRNAs führt. Hierbei erkennt DGCR8 die *stem-loop* Struktur und bindet an die pri-miRNA. Drosha schneidet die beiden Stränge asymmetrisch und spezifisch in der Nähe der Basis des „Stammes“. „MiRtrons“, die in einem Intron eines proteinkodierenden Gens kodiert sind, können auch ohne die durch

Drosha/DGCR8-vermittelte Prozessierung entstehen (Berezikov et al., 2007, Ruby et al., 2007). In diesem Falle wird die Haarnadelstruktur der pre-miRNA beim Spleißen des primären Gentranskriptes frei (Okamura et al., 2007). Anschließend wird die entstandene pre-miRNA mittels des Kern-Export-Faktors Exportin-5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma der Zelle transportiert (siehe Abb. 2-1).

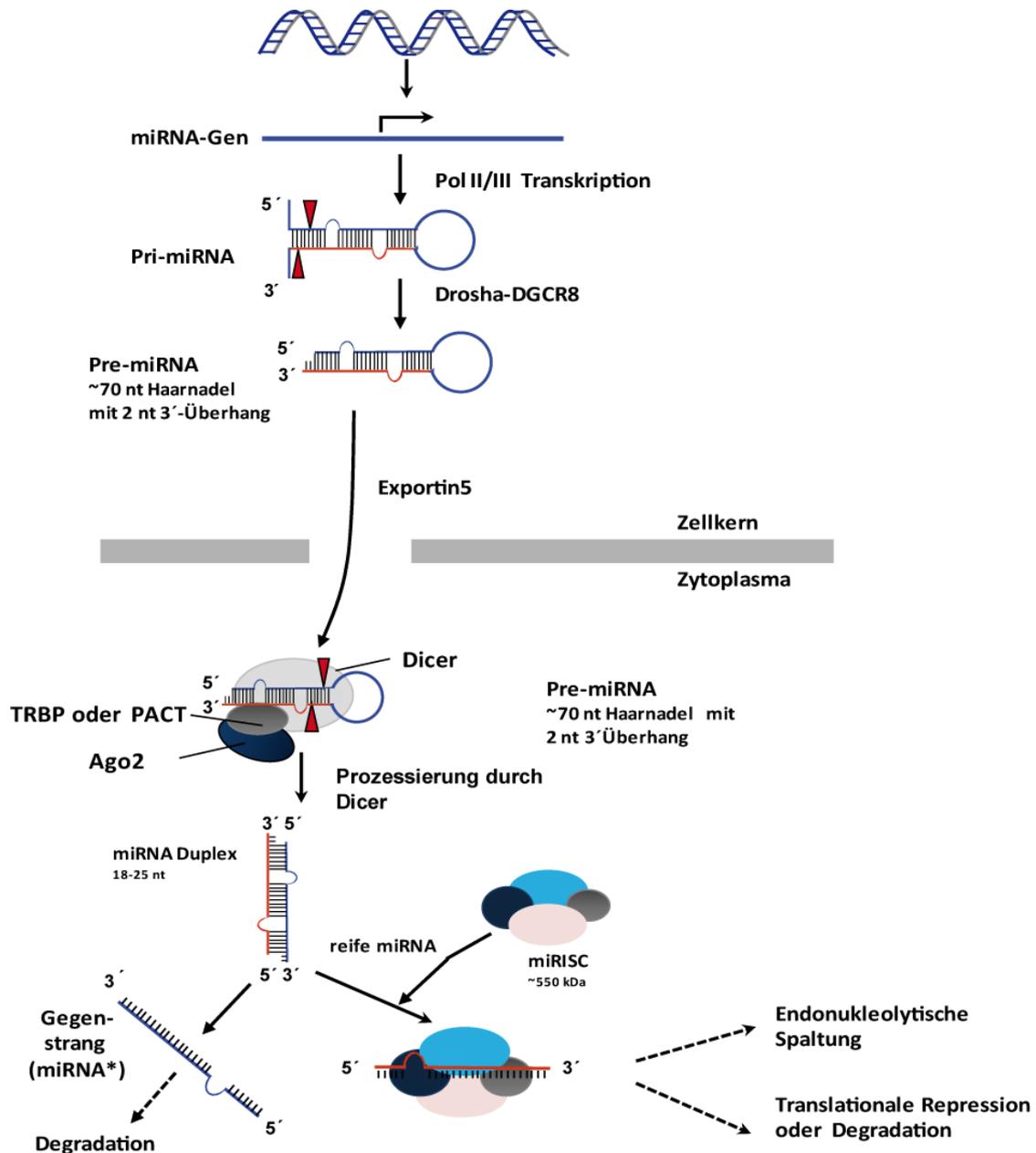


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Biogenese und Funktionsweise von miRNAs. Eine detaillierte Beschreibung dieser Prozesse ist im Text zu finden (modifiziert nach Filipowicz et al. 2008).

Dort entsteht durch Spaltung mittels der RNA III-Endoribonuclease Dicer, im Komplex mit seinem Cofaktor TRBP (HIV1 TAR RNA binding protein), ein 25-28 nt langes dsRNA-Molekül. Dieses besitzt an seinen 3'-Enden jeweils einen 2 nt langen Überhang. Im Allgemeinen bleibt der Strang, dessen 5'-Terminus am thermodynamisch instabilen Ende des RNA-Doppelstranges liegt, erhalten und fungiert im Anschluss in der Regel als reife, funktionelle miRNA, während der Gegenstrang degradiert wird (Tomari et al., 2004). In selteneren Fällen bleiben beide Arme des Duplexes erhalten und werden funktionell genutzt. Ein Strang bildet dann meist das Hauptprodukt (*major species*) und der andere Strang das Nebenprodukt (*minor species*, miRNA*) (Bushati und Cohen, 2007, Du und Zamore, 2005, Peters und Meister, 2007). Die reife einzelsträngige miRNA assoziiert anschließend mit einem Multi-Enzymkomplex, dem miRISC-Komplex (*miRNA induced silencing complex*).

2.1.3 Das RNase III-Enzym Dicer und die Argonaut-Proteine

Im Anschluss an die Prozessierung der Vorläufer-miRNAs im Nukleus werden die pre-miRNAs in das Zytoplasma exportiert und von Dicer weiterverarbeitet. Dicer ist sowohl an der Reifung von miRNAs als auch von siRNAs beteiligt. Das humane Dicer-Protein besitzt eine Größe von etwa 220 kDa und ist, mit Ausnahme von *Saccharomyces (S.) cerevisiae*, in Eukaryonten hoch konserviert. Säugetiere und *C. elegans* kodieren nur ein Dicer-Protein, während andere Organismen mehrere Dicer-Homologe mit unterschiedlichen Funktionen besitzen.

Das humane Dicer-Protein arbeitet als intramolekulares Dimer, das an seinen zwei RNase III-Domänen verbunden ist und in deren Mitte sich auch das aktive Zentrum befindet. Jeder Bestandteil des Dimers spaltet einen der beiden Stränge und erzeugt so Enden mit einem 5'-Phosphat und einem 2 nt langen 3'-Überhang (Zhang et al., 2004). Obwohl Dicer selbst schon die Spaltung von dsRNA oder pre-miRNAs vermitteln kann, ist es mit weiteren dsRNA bindenden Proteinen assoziiert. So liegt das humane Dicer als Protein-Komplex mit TRBP und/oder PACT (*protein activator of the RNA-activated protein kinase (PKR)*) vor (Chendrimada et al., 2005, Haase et al., 2005). Beide scheinen nicht für Dicer-vermittelte Spaltung erforderlich zu sein, sondern tragen eher zur Bildung des miRISC Effektor-Komplexes bei.

Nach der Spaltung durch Dicer werden die miRNAs in den miRISC Effektor-Komplex inkorporiert, der ein Argonaut-Protein als Kernkomponente enthält. Ago-Proteine wurden nach dem Ago1-Knockout Phänotyp in *Arabidopsis thaliana* benannt, der den Tentakeln des Tintenfisches

Argonauta argo ähnelt (Bohmert et al., 1998). Basierend auf Sequenzhomologien können Argonaut-Proteine in zwei Unterklassen unterteilt werden: eine ähnelt dem *Arabidopsis* Ago1 und die andere ist mit dem *Drosophila* Piwi vergleichbar.

In Mammalia werden die Ago-Proteine Ago1-4 exprimiert. Sie haben ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa und besitzen zwei funktionelle Domänen, die PAZ-Domäne (Piwi/Argonaut/Zwille) und die Piwi-Domäne (P-element induced wimpy testis). Von diesen vier Ago-Proteinen ist jedoch nur Ago2 am Mechanismus der RNA-Interferenz beteiligt, da es in der Lage ist mit seiner RNase H ähnlichen Piwi-Domäne einen mRNA Strang in der Mitte eines siRNA-mRNA oder miRNA-mRNA Duplexes zu spalten.

2.2 MiRNA-Effektor-Komplexe

Um ihre Funktionen ausüben zu können, werden miRNAs in miRISC Effektor-Komplexe eingebaut. Während der Assemblierung des miRISC-Komplexes muss das RNA-Duplex in zwei einzelne Stränge entwunden werden. Ein Strang, der die reife miRNA darstellt, bleibt an das Argonaut-Protein assoziiert. Der andere Strang, der sog. *passenger* Strang (miRNA*), wird meistens abgebaut. Welcher der beiden Stränge in den miRISC-Komplex eingebaut wird, ist nicht vollständig geklärt und in manchen Fällen können aus beiden Strängen reife miRNAs gebildet werden (Khvorova et al., 2003). Beim Menschen ist auch die Assemblierung des miRISC-Komplexes noch nicht ausreichend verstanden. Der miRISC-Grundkomplex besteht aus Dicer, seinem Partner-Protein TRBP (und/oder PACT) und einem Argonaut-Protein (Chendrimada et al., 2005, Haase et al., 2005). Der Komplex ist in der Lage eine reife miRNA zu binden und als fertiger miRISC-Komplex die komplementäre Ziel-mRNA zu spalten (Gregory et al., 2005, Maniataki und Mourelatos, 2005). In den letzten Jahren wurden jedoch weitere miRISC-Varianten gefunden, die sich in ihrer Größe und Proteinzusammensetzung unterscheiden. Die Bedeutung von Dicer im miRISC-Komplex wird durch Befunde in Dicer-defizienten embryonalen Stammzellen (ES) relativiert. In diesen Zellen können zwar keine pre-miRNAs zu reifen miRNAs prozessiert werden, siRNA-vermitteltes Gen-Silencing kann jedoch stattfinden. Dies zeigt, dass Dicer in Säugetieren vermutlich eher eine untergeordnete Rolle in dem nachfolgenden Schritt der miRISC-Bildung spielt (Kanellopoulou et al., 2005, Murchison et al., 2005).

2.3 Mechanismen der miRNA-vermittelten Genregulation

MiRNAs vermitteln das *Silencing* von RNAs durch miRISC Effektor-Komplexe. Ein entscheidender Faktor für den regulatorischen Mechanismus des RNA-*Silencings* ist der Grad der Komplementarität zwischen der miRNA und der Ziel-RNA. Eine perfekte Übereinstimmung der Sequenzen fördert die Ago2-vermittelte endonukleolytische Spaltung, während unvollständige Übereinstimmungen in der zentralen Region der kleinen RNAs zur Unterdrückung der mRNA-Translation führen (Doench et al., 2003).

Der genaue Wirkmechanismus von miRNAs ist noch Gegenstand intensiver Forschung und derzeit werden mehrere Modelle diskutiert, wie die Hemmung der Translation bei der Initiierung oder das Ribosomen *Drop-off*. Aus diesem Grund werden hier nur einige der möglichen Modelle aufgezeigt.

Ein möglicher Wirkmechanismus von miRNAs ist die Hemmung der Translation am Initiations- oder Elongationsschritt. Mehrere Labore konnten zeigen, dass eine miRNA-vermittelte Repression während der Initiations-Phase der Translation stattfindet. In *Drosophila*- und Maus-Zellen hemmen miRNAs entweder die Assoziation mit der kleinen ribosomalen Untereinheit oder dem 80S Ribosom (Mathonnet et al., 2007, Thermann und Hentze, 2007). Pillai et al. konnten 2005 zeigen, dass basierend auf der Dichtegradienten-Fraktionierung mRNAs, die durch miRNAs reprimiert waren, nicht in einer Polysomen-Fraktion sedimentieren, sondern sich mehr im oberen Bereich des Gradienten befinden. Dies deutet auf eine reduzierte ribosomale Beladung der reprimierten mRNAs hin (Pillai et al., 2005). Die Ergebnisse von Petersen et al. zeigen hingegen, dass die Hemmung der Translation auch nach dem Initiationsschritt stattfinden kann. Sie konnten nachweisen, dass die Repression der Translation durch miRNAs auch durch einen Ribosomen *Drop-off* vermittelt wird, indem sie ein vorzeitiges Abfallen der Ribosomen von den mRNAs induzieren (Petersen et al., 2006).

Eine andere Möglichkeit der Repression ist die miRNA-vermittelte mRNA-Deadenylierung und -Degradierung. Frühere Arbeiten wiesen darauf hin, dass die Menge an mRNAs, die durch miRNAs inhibiert werden, gleichbleibt. Neuere Studien zeigen jedoch, dass die Repression von mRNAs auch zu deren Destabilisierung und im weiteren Verlauf zur Degradation führen kann (Eulalio et al., 2007a, Eulalio et al., 2007b). Als Orte für diesen Abbau werden zytoplasmatische RNA-Granula diskutiert.

2.3.1 Processing Bodies und Stress-Granula als miRNA working sites

Processing Bodies (PBs) und Stress-Granula (SG) sind Mitglieder einer Klasse von zytoplasmatischen RNA-Granula, die auch als mRNA-*Silencing*-Foci bekannt sind. Je nachdem in welchem Zustand sich die Zelle befindet, binden sie mRNA-Transkripte und verhindern so deren Translation. PBs und SG können die gebundenen mRNAs anschließend wieder entlassen und so deren Translation ermöglichen. PBs und SG sind evolutionär hoch konserviert und können in einer einzigen Zelle koexistieren. Ihre Dynamik wird durch mehrere Signalwege reguliert und hängt von Mikrofilamenten und Mikrotubuli und den verwandten molekularen Motorproteinen Myosin, Dynein und Kinesin ab.

PBs sind konstitutiv in der Zelle vorhanden, reagieren aber auch auf Reize, welche die Translation und den Abbau von mRNAs beeinflussen. So kann ihre Bildung durch eine Vielzahl von Stressfaktoren, wie der Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezieskonzentration oder durch moderate Hypoxie, induziert werden (Carbonaro et al., 2011, Huang et al., 2011). PBs enthalten verschiedene Proteine, die in Prozesse des mRNA-Metabolismus, wie dem *Nonsense-Mediated Decay* (NMD), der Deadenylierung und dem *Decapping* involviert sind (Eulalio et al., 2007a). PBs können daher als zelluläre Standorte der mRNA-Degradation angesehen werden. Die Lokalisation von Ago-Proteinen in PBs führte zur Annahme, dass diese RNA-Granula eine Rolle bei der Lagerung von miRNAs spielen oder essentiell für die Ausübung ihrer Funktion sein könnten (Chu und Rana, 2006, Eystathioy et al., 2002, Meister et al., 2005). Es gibt mehrere Hinweise, die diese Hypothese unterstützen. So sind viele Ago-interagierende Proteine, wie GW182/TNRC6A, TNRC6B, RCK/p54, DCP1a und DCP2, in PBs lokalisiert. Mindestens drei dieser Proteine, RCK/p54, GW182/TNRC6A und TNRC6B, spielen eine wesentliche Rolle im miRNA-vermittelten Gen-*Silencing* (Chu und Rana, 2006, Liu et al., 2005a, Meister et al., 2005). Des Weiteren können mRNAs miRNA-abhängig in PBs überführt werden (Bhattacharyya et al., 2006, Liu et al., 2005a, Pillai et al., 2005). Ago-Proteine, die eine Mutation in der PAZ-Domäne aufweisen, sind nicht in der Lage, miRNAs zu binden. Proteine mit dieser Mutation lokalisieren nicht mehr mit PBs (Liu et al., 2005b). Diese Daten legen nahe, dass miRNAs gemeinsam mit Ago-Proteinen an ihre Ziel-mRNAs binden und der miRNA-Ago2-Komplex die mRNP (messenger ribonucleoprotein)-Aggregation und die Abgabe von mRNAs in PBs induziert (Abb. 2-2).

Die gebundenen mRNAs können anschließend durch die in PBs enthaltenen Deadenylyasen und *Decapping*-Enzyme sowie die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität von Xrn1 abgebaut oder in ihrer

Translation gehemmt werden. Die Rekrutierung von mRNAs in PBs hat jedoch nicht zwangsläufig deren Degradation zur Folge, sondern ist in einigen Fällen reversibel. So konnten Bhattacharyya et al. zeigen, dass die Translation der CAT-1 mRNA durch die miRNA miR-122 unterdrückt und die mRNA in PBs gelagert wird. Nach zellulärem Stress wird mittels des HuR-Proteins die CAT-1 mRNA aus den PBs freigesetzt und kann anschließend translatiert werden (Bhattacharyya et al., 2006).

Die Rolle von PBs im miRNA-Signalweg ist jedoch nicht unumstritten. In einigen Arbeiten wird angenommen, dass PBs als Folge des mRNA-Silencings gebildet werden, aber keinen Einfluss auf die Funktion von miRNAs haben (Chu und Rana, 2006, Eulalio et al., 2007b).

Eine weitere Klasse von zytoplasmatischen Aggregaten sind die so genannten Stress-Granula (Anderson und Kedersha, 2006). Stress-Granula sind in ihrer Form sehr heterogen. Sie werden nach unterschiedlichen Arten von zellulärem Stress, wie Hitzeschock, bestimmten Virusinfektionen, oxidativen Stress, UV-Bestrahlung, Chemikalien, Hypoxie oder Serumentzug, gebildet (Anderson und Kedersha, 2006, McInerney et al., 2005, Pothof et al., 2009b). So konnte z.B. die SG-Bildung nach UV-Bestrahlung von Zellen und nach Ganzkörperbestrahlung von Mäusen nachgewiesen werden (Leung et al., 2006, Pothof et al., 2009a, Pothof et al., 2009b).

In diesen zytoplasmatischen Aggregaten werden untranslatierte mRNAs zum Schutz vor Degradation gespeichert. Neben mRNAs enthalten SG verschiedene RNA-stabilisierende und RNA-destabilisierende Proteine, Translationsinitiationsfaktoren und RNA-Bindeproteine wie Tia-1 und TIAR. Außerdem können sie Apoptose regulierende Faktoren (z.B. die Apoptose-regulatoren CCAR1 und Prohibitin2) aufweisen, was darauf hindeutet, dass sie auch bei der Regulation der Apoptose-Signalwege als Reaktion auf Stress beteiligt sein könnten (Buchan und Parker, 2009, Eisinger-Mathason et al., 2008). SG werden jedoch nur transient gebildet. Sobald wieder günstigere Bedingungen in der Zelle hergestellt sind, werden sie abgebaut. Funktionell sind SG mit der Erholung der Zellen nach Stress verbunden, indem sie die bevorzugte Translation von wichtigen mRNAs der Stress-Antwort (z.B. Hitzeschock-Proteinen) ermöglichen (Bond, 2006).

Ein mögliches Modell, das Funktionen von PBs und SG in Einklang bringt, wird in Abbildung 2-2 gezeigt und beschrieben (Peters und Meister, 2007). Hierbei werden 48S pre-Initiationskomplexe durch die Bindung an Ago2-Komplexe reprimiert und in PBs oder SG eingebaut. Da SG häufig in der Nähe von PBs lokalisiert sind, ist es möglich, dass die reprimierten mRNAs zwischen den RNA-Granula ausgetauscht werden können. PBs könnten eher eine Funktion als statischen

Speicher für einige mRNAs und einen Ort des Abbaus für andere mRNAs darstellen, während SG untranslatierte RNAs vor schädlichen Bedingungen schützen.

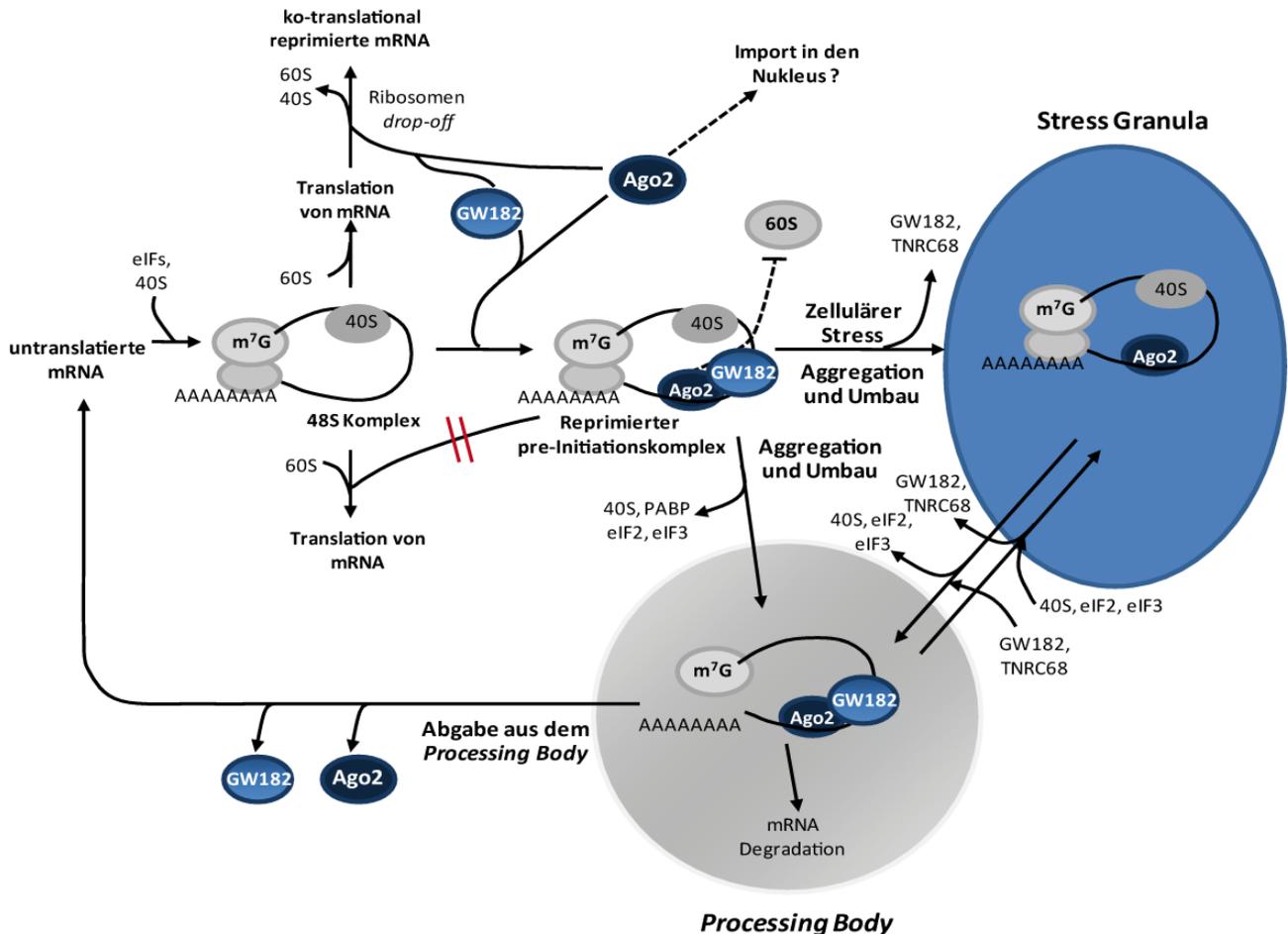


Abb. 2-2: Zusammenspiel von SG und PBs und Gen-Silencing. Im Zytosol können miRNAs und Ago2-Protein-Komplexe an mRNAs binden, die sich in der Translation befinden. Die Komplexe können das Abfallen der Ribosomen von der mRNA (Ribosomen Drop-off) und eine ko-translationale Repression induzieren (oben links). Alternativ können die Ago2-Protein-Komplexe die 48S pre-Initiations-Komplexe binden und die Initiation der Translation verhindern, indem sie die Verbindung der 40S mit der 60S ribosomalen Untereinheit unterdrücken (Mitte). Diese reprimierten Komplexe können nach der Abspaltung der 40S Untereinheit, des Poly (A)-Bindungsprotein (PABP), eIF2 und eIF3 in *Processing Bodies* (PBs) eingebaut werden (unteres Bild). Nach zellulärem Stress kann der Einbau von reprimierten Initiations-Komplexen auch in Stress-Granula (SG) erfolgen (Mitte rechts). Da SG und PBs nahe beieinander lokalisiert sind, ist auch ein Austausch von reprimierten mRNPs zwischen SG auf PBs denkbar. Reprimierte mRNAs können entweder in PBs degradiert oder mittels RNA-bindender Proteine wieder in das Zytosol entlassen werden, wo dann die Translation erfolgen kann. Darüber hinaus kann Ago2 in den Kern transportiert werden und Funktionen der Genregulation

ausführen. Es ist zu beachten, dass mehrere Faktoren wie eIF6 der Einfachheit halber nicht in der Abbildung gezeigt sind (modifiziert nach Peters und Meister, 2007).

Bis heute ist allerdings noch nicht klar, wie viel jeder dieser Mechanismen zum miRNA-induzierten *Silencing* beiträgt und wie sie im Einzelnen reguliert werden.

2.4 Zusammenspiel von DNA-Schäden, zellulärer Schadensantwort und miRNAs

Die DNA-Schadens-Antwort (*DNA damage response*; DDR) ist ein komplexes Netzwerk, das die Prozessierung von entstandene DNA-Schäden ermöglicht (Harper und Elledge, 2007). Eine wesentliche Rolle der DDR in der Zelle besteht darin den Zellzyklus zu stoppen, damit die Reparatur beschädigter DNA erfolgen kann oder der Zelltod induziert wird, wenn zu viel Schaden entstanden ist. Damit ist die DDR ein wichtiger Bestandteil zur Erhaltung der genomischen Integrität (Bartek et al., 2007). Darüber hinaus ist die DDR auch an vielen anderen physiologischen Prozessen, wie z.B. der Meiose, der Homöostase der Telomere und bei Virusinfektionen, beteiligt (Jackson und Bartek, 2009).

DNA-Schäden können auch auf transkriptioneller Ebene zu einer veränderten miRNA-Expression führen. Hierbei spielt p53 eine entscheidende Rolle. Durch genomweite miRNA-Expressionsstudien nach DNA-Schädigung wurde eine Kohorte von miRNAs identifiziert, bei denen eine p53-abhängige Regulation erfolgt (Chang et al, 2007; Tarasov et al, 2007). Ein Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Wildtyp- und p53-defizienten Zellen zeigte, dass besonders die miR-34-Familie (miR-34a-c) durch DNA-Schäden und Stress p53-abhängig induziert wird (He et al., 2007a). Weiterhin werden die zwei homologen miRNAs miR-192 und miR-215 nach genotoxischem Stress p53-abhängig hochreguliert (Braun et al., 2008, Georges et al., 2008). Weitere Untersuchungen zeigen, dass die globale miRNA-Expression nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) auf eine ATM (ataxia teleangiectasia mutated)-abhängige Weise induziert wird. In humanen und murinen Zellen konnte in ATM-Knockouts die Induktion der miRNA-Biogenese nach DNA-Schädigung unterdrückt werden. ATM unterstützt die Prozessierung von miRNAs durch die Phosphorylierung von KSRP (KH-type Splicing Regulatory Protein), was wiederum die Bindung und die Prozessierung von pri-miRNAs an den Drosha-DGCR8-Komplex verstärkt. Darüber hinaus könnte ATM andere Zielproteine phosphorylieren, die auch zur DSB-induzierten miRNA-Biogenese beitragen. Diese Ergebnisse zeigen, dass ATM eine wichtige Rolle in der Regulation der miRNA-Biogenese spielt (Liu und Liu, 2011, Zhang et al.,

2011). Weiterhin beeinflussen p53 und ATM nicht nur die miRNA-Expression, sie werden auch selber durch miRNAs reguliert.

Neben p53 werden durch DNA-Schäden auch die Aktivitäten anderer Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, CREB und E2F1, reguliert. Von ihnen ist bekannt, dass sie ebenfalls die Expression von miRNAs verändern können (Petrocca et al., 2008, Taganov et al., 2006). Daher ist anzunehmen, dass auch diese Faktoren einen Anteil an der miRNA-regulierten zellulären Antwort auf DNA-Schäden besitzen.

Zelluläre Reaktionen auf DNA-Schäden, wie sie z.B. durch Strahlung verursacht werden, werden von der Zelle über Zellzykluskontrollpunkte gesteuert. Als Reaktion auf strahleninduzierte DNA-Schäden werden die Zellen am Übergang von der G1- zur S-Phase (G1/S) oder G2- zur M-Phase (G2/M) des Zellzyklus gestoppt, um DNA-Reparatur und das Überleben der Zelle zu ermöglichen. Wenn der Schaden jedoch entweder irreparabel ist oder die DNA-Schäden nicht richtig repariert werden, tritt durch mitotische und apoptotische Prozesse der programmierte Zelltod ein (Pawlik und Keyomarsi, 2004).

Der Tumorsuppressor p53 wirkt nicht nur bei der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur mit, er reguliert als Transkriptionsfaktor auch die Expression von zahlreichen Genen, die als Reaktion auf eine Vielzahl von Stressfaktoren zum Zellzyklusarrest, der Apoptose und Seneszenz von Zellen führt (Vousden und Lane, 2007). p53 vermittelt den Zellzyklusarrest als Reaktion auf DNA-Schäden unter anderem durch die transkriptionelle Induktion des CDK-Inhibitors p21^{CIP1}. Dieses Protein induziert die Hemmung des Cyclin-CDK-Komplexes, welcher sonst den Übergang von der G1- zur S-Phase induziert (Waldman et al., 1995). Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass miRNAs eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Faktoren spielen, die für die Zellzyklusprogression benötigt werden. Die stressabhängige Induktion der miR-34-Familie durch p53 wurde schon in vielen Arbeiten gezeigt (He et al., 2007a, Tarasov et al., 2007, Hermeking, 2010). Eine ektopische Expression der miR-34-Familie führt zu einer Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose durch die Herunterregulierung der Cykline D1 und E2, sowie CDK4, CDK6 und anderen Proteinen. Die miRNA miR-34a verursacht daher vermutlich eine p21^{CIP1}-unabhängige Regulation, durch die ein p53-vermittelter G1-Phase-Arrest induziert wird (He et al., 2007b). Zwei weitere Gruppen von miRNAs, miR-194-2-192 und miR-194-1-215, werden ebenfalls durch p53 induziert, was zu einer Hochregulierung der miRNAs miR-192, miR-194 und miR-215 führt (Braun et al., 2008). So regulieren die nach genotoxischem Stress hochexprimierten miRNAs miR-192/miR-215 Zieltranskripte, die eine Rolle bei der Regulation

des G1/S- und des G2/M-Zellzykluskontrollpunktes spielen. Des Weiteren kann auch durch eine Überexpression von miR-192/215 ein Arrest des Zellzyklus induziert werden. Diese miRNAs lösen den Zelltod jedoch mit einer geringeren Effizienz aus als miR-34a (Braun et al., 2008, Georges et al., 2008).

Zusammengefasst stellt die Stressinduzierte Regulation von miRNAs einen flexiblen Mechanismus dar, der eine schnelle Herunterregulierung der Expression von Zellzyklusproteinen nach einer Aktivierung von p53 erklären kann.

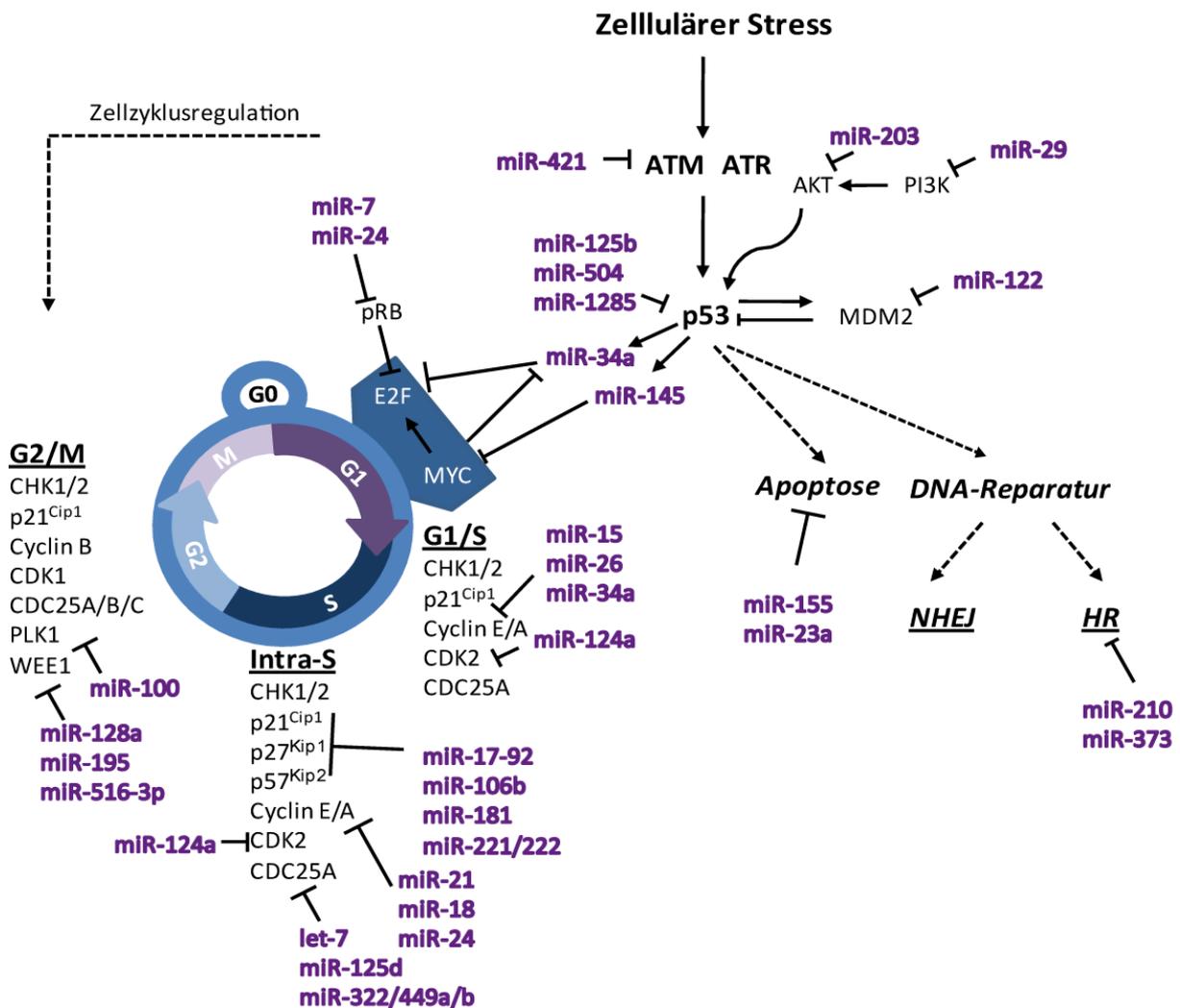


Abb. 2-3: Übersicht über die in der Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligten miRNAs. MiRNAs sind auf vielfältige Weise in die DNA-Schadensantwort involviert. Die Abbildung zeigt Interaktionen von miRNAs mit ihren *Target*proteinen, die eine Rolle in der Zellzykluskontrolle, der Apoptose und der DNA-Reparatur spielen. MiRNAs sind in lila dargestellt (modifiziert nach Bueno und Malumbres, 2011; Hu und Gatti, 2011).

2.5 Die Rolle von miRNAs nach ionisierender Strahlung

Wenn Zellen ionisierender Strahlung (IR) ausgesetzt werden, kommt es zu einer Reihe von Schädigungen. Sie umfassen Schäden an der DNA, wie Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenschäden, sowie Schädigungen von Proteinen und Membranen. Dies führt z.B. zu Änderungen des Zellzyklus, Mutationen, Schwesterchromatidaustauschen, DNA-Reparatur, Chromosomenaberrationen und Apoptose (Amundson, 2008, Preston, 2005).

Um den Einfluss von miRNAs auf die zellulären Reaktionen auf ionisierende Strahlung zu untersuchen, wurden die Expressionsänderungen in unterschiedlichen Zellsystemen und Spezies analysiert. Die Untersuchungen wurden mit unterschiedlichen Zelltypen (primär und immortalisiert) in einem großen Dosisbereich (0,05 Gy-40 Gy) durchgeführt (Maes et al., 2008, Simone et al., 2009, Wagner-Ecker et al., 2010, Weidhaas et al., 2007).

Ein Großteil der Arbeiten untersuchte die miRNA-Expressionen in primären und immortalisierten Zellen sowie Krebszelllinien nach *in vitro*-Bestrahlung und sie wiesen eine Vielzahl strahlenregulierter miRNAs nach. Shin et al. führten miRNA-Expressionsstudien mit der Lungenkrebslinie A549 nach 20 Gy und 40 Gy gamma-Bestrahlung durch (Shin et al., 2009). Cha et al. untersuchten die spezifischen miRNA-Expressionsänderungen nach niedrigen (0,05 Gy), mittleren (1 Gy) und hohen Dosen (10 Gy) gamma-Bestrahlung in der humanen Lymphoblasten Zelllinie IM9 (Cha et al., 2009a, Cha et al., 2009b). Josson et al. analysierten die miRNA-Expression in Prostata-Krebszellen nach Bestrahlung mit 6 Gy (Josson et al., 2008). Weidhaas et al. zeigten Expressionsänderungen des let-7-Clusters in der Lungenkrebslinien A549, A427 und H4441 sowie normalen Lungenepithelzellen (CLR2741) in Zellkultur nach gamma-Bestrahlung (Weidhaas et al., 2007). Eine miRNA-Expressionsanalyse von primären Fibroblasten 0,5 h, 6 h und 24 h nach 0,2 bzw. 2 Gy Röntgenstrahlen wurde von Maes et al. durchgeführt (Maes et al., 2008). Diese Studie ergab nach Bestrahlung sehr unterschiedliche miRNA-Expressionsmuster zu den individuellen Zeitpunkten und legt somit eine akute und eine späte Strahlenantwort nahe. Eine von Templin et al. durchgeführte Studie wies miRNA-Expressionsänderungen nach *in vivo*-Bestrahlung im humanen System nach. Templin et al. verwendeten hierfür periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells = PBMNC) von Krebstherapiepatienten vor und nach Ganzkörperbestrahlung (Templin et al., 2011).

In allen aufgeführten Studien besaßen die durch Strahlung veränderten miRNAs viele potentielle Zieltranskripte, von denen angenommen wird, dass sie an der Regulation wichtiger zellulärer Funktionen wie der DDR, der Apoptose, dem Zellzyklus und der DNA-Reparatur beteiligt sind.

Simone et al. verwendeten drei stressinduzierende Agenzien (ionisierende Strahlung, Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Etoposid), um herauszufinden, ob unterschiedliche DNA-schädigende Behandlungen identische biologische Effekte in humanen Fibroblasten zeigen. Die Basen-Schädigungen durch Wasserstoffperoxid erfolgen vor allem durch freie Radikale, Etoposid generiert DNA-Doppelstrangbrüche, ionisierende Strahlung hat ein vielfältiges Schadenspektrum, das sowohl Strangbrüche der DNA als auch Basen-Schäden umfasst. Die Autoren identifizierten sieben miRNAs, die nach Behandlung mit allen drei Agenzien dereguliert waren und folgerten daraus, dass diese miRNAs eine Funktion bei der Prozessierung von exogen induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen besitzen (Simone et al., 2009).

Erste funktionelle Studien strahlenregulierter miRNAs wurden von Weidhaas et al. und Wagner-Ecker et al. durchgeführt. Sie konnten in ihren Systemen zeigen, dass die Inhibierung oder Überexpression von einzelnen strahlenregulierten miRNAs die Strahlenresistenz oder die Strahlensensitivität der Zellen beeinflussen kann (Wagner-Ecker et al., 2010, Weidhaas et al., 2007).

Ein Vergleich aller Studien zeigte keine oder nur sehr geringe Überschneidungen der miRNA-Expressionsprofile. Eine mögliche Erklärung ist, dass die miRNA-Regulation hoch flexibel und relativ schnell erfolgt. Daher ist eine Regulation vermutlich stark abhängig vom Zelltyp, der Dosis und weiteren Faktoren wie der Temperatur und den Wachstumsbedingungen. Die einzigen häufig veränderten miRNAs gehören zum let-7-Cluster. Es ist bekannt, dass diese miRNAs die Ras-Gene und so die Zellproliferation im humanen Zellsystem inhibieren (Simone et al., 2009). Andere Signalwege, die von diesem Cluster reguliert werden, sind die Apoptose-Induktion, die DNA-Reparatur und der Glutathionmetabolismus.

Bis jetzt konnten allerdings nur relativ wenige miRNA-Target-Wechselwirkungen experimentell validiert werden. Des Weiteren ist die biologische Rolle der meisten strahlenregulierten miRNAs noch nicht funktionell analysiert (Griffiths-Jones, 2006, Inui et al., 2010, Kloosterman und Plasterk, 2006).

2.5.1 MiRNA-Analysen in Endothelzellen nach Bestrahlung

Endothelzellen bilden mit einem Monolayer die innere Schicht des Gefäßsystems von Normal- und Tumorgewebe aus. Dieses Endothel ist essentiell für die normale Funktion des kardiovaskulären, cerebrovasculären und pulmonalen Gefäßsystem. Hierbei ist das vaskuläre Endothel nicht nur ein Barriere für Blutzellen und Plasma, sondern es stellt auch ein metabolisch

aktives Organ dar und spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Gefäßpermeabilität, dem makromolekularen Transport, dem Gefäßtonus, Entzündungen, Koagulation und der Gefäßwandstruktur (Sato, 2001). Die Angiogenese, also die Neubildung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen wird von Endothelzellen vermittelt und stellt einen wichtigen Prozess während der Entwicklung dar. Da das vaskuläre Endothel empfindlich auf verschiedene Reize wie Zytokine, Hypoxie, Strahlung und mechanische Beanspruchung reagiert, ist es direkt an der Entwicklung und Progression einer Vielzahl von schweren Krankheiten wie Herzerkrankungen, Schlaganfall, venöse Thrombose, Diabetes und dem Tumorwachstum beteiligt (Sato, 2001, Tousoulis et al., 2011, Tousoulis et al., 2010). In den letzten Jahren wurden daher einige Studien zur Funktion von miRNAs in Endothelzellen durchgeführt. Bei Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Dicer-Gens schon im Embryo letal ist. Eine mögliche Erklärung für die embryonale Letalität ist die mangelhafte Bildung und Aufrechterhaltung von Blutgefäßen. Diese anatomischen Defekte waren mit der veränderten Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), dessen Rezeptoren KDR (VEGFR2) und FLT-1 (VEGFR1) und des Angiopoietin-Rezeptors Tie-1 assoziiert (Yang et al., 2005). Polisenio et al. konnten zeigen, dass die miRNAs miR-221 und miR-222 eine wichtige Rolle bei der Modulation der Angiogenese in primären Endothelzellen (HUVECs) besitzen (Polisenio et al., 2006). In den gleichen Zellen untersuchten Kuehbacher et al. die Rolle der wichtigen miRNA-regulierenden Enzyme Dicer und Drosha für deren angiogene Funktionen (Kuehbacher et al., 2007).

Trotz der Menge an Daten über den Einfluss von miRNAs auf den Angiogeneseprozess in Endothelzellen ist in diesen Zellen bis jetzt nur wenig über die Aktivitäten von miRNAs nach ionisierender Strahlung mit klinisch relevanten Dosen bekannt. In der klassischen Strahlentherapie werden sowohl Zellen des soliden Tumors als auch Endothelzellen, die sich in der direkten Umgebung des Tumors befinden, mit einer Dosis von 0,5-2 Gy bestrahlt. Endothelzellen reagieren jedoch sensitiv auf ionisierende Strahlung, was zur Folge hat, dass die Bestrahlungsdosen bei der Anti-Tumor-Therapie wegen der erhöhten Abtötung von Endothelzellen im angrenzenden gesunden Gewebe limitiert sind (Abdollahi et al., 2003).

Bis jetzt sind jedoch erst wenige Daten erhoben worden, wie die Expression von miRNAs in Endothelzellen als Reaktion auf Strahlung (z.B. während der Strahlentherapie) variiert und welche Funktion die miRNAs für die Strahlensensitivität dieser Zellen besitzen.

Erste Untersuchungen des miRNA-Expressionsprofils in primären humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC9) nach Bestrahlung mit der therapeutisch relevanten

Dosis von 2 Gy zeigte, dass elf miRNAs signifikant hoch- oder herunterreguliert waren. Die Überexpression oder Inhibition einiger dieser miRNAs führte in diesen primären Zellen zu einer deutlichen Änderung des klonogenen Überlebens und der Proliferation nach Bestrahlung (Wagner-Ecker et al., 2010). Vincenti et al. untersuchten die miRNA-Expression zu frühen (30 min) und späteren Zeitpunkten (4 h, 8 h) in primären Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) nach 1 Gy Röntgenstrahlung. Sie konnten eine Hochregulierung des miR-17-92 Clusters detektieren, der mit einem Anstieg der c-Myc-mRNA und mit einem vorübergehenden Anstieg des Transkriptionsfaktors c-Myc im Nukleus korrelierte (Vincenti et al., 2011).

2.6 Ziel der Arbeit

Endothelzellen, wie zum Beispiel die Endothelzellen des Darms, reagieren empfindlich auf ionisierende Strahlung (Abdollahi et al., 2003, Paris et al., 2001). Als Folge dieser erhöhten Strahlensensitivität sind wegen der starken Normalgewebsschädigung die Bestrahlungsdosen bei der Tumorthherapie limitiert.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung von miRNAs in der Strahlenantwort in Endothelzellen, um damit ein besseres Verständnis der Strahlenempfindlichkeit in diesen Zellen zu erzielen. Hierfür wurde die Rolle von miRNAs in der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung in der endothelialen Zelllinie EA.hy926 und in primären HUVECs untersucht.

Der Einfluss von miRNAs in der Strahlenantwort in Endothelzellen sollte zuerst durch eine globale Hemmung der miRNA-Expression analysiert werden. Ein globaler *Knockdown* von miRNAs sollte durch die RNAi-vermittelte Herunterregulierung von Argonaut-2 (Ago2) bzw. Dicer, die beide eine Bedeutung in der Prozessierung bzw. der Funktion von miRNAs besitzen, erzielt werden. Im Anschluss daran sollten verschiedene Prozesse der DNA-Schadensantwort untersucht werden. Weiterhin sollten miRNAs, die nach einer klinisch relevanten Dosis von 2,5 Gy Bestrahlung eine Veränderung in ihrer Expression in EA.hy926 Zellen aufweisen, mittels der TaqMan-basierten Low-Density-Array-Technologie identifiziert werden. Einzelne miRNAs, die nach der Bestrahlung hochreguliert waren, sollten in weiteren Versuchen mittels spezifischer miRNA-Inhibitoren funktionell charakterisiert werden.

Zytoplasmatische RNA-Granula werden als miRNA „working sites“ diskutiert. Um dies im Kontext mit ionisierender Strahlung zu analysieren, wurde die miRNA-abhängige Bildung von RNA-Granula nach Bestrahlung in Endothelzellen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CHAPS	Cholamidopropyltrimethylammoniumpropansulfonat
CHK	“Cell cycle Checkpoint Kinase”
C _t	<i>Crossing point</i>
d	Tage (<i>days</i>)
Da	Dalton
dest.	destilliert
<i>DIGE</i>	<i>2D-differential gel electrophoresis</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch (<i>double strand break</i>)
DTT	Dithiothieitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Scanner/Sorter</i>
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSC	<i>forward scatter</i>
fw	<i>forward</i>
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde (<i>hour</i>)
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HCl	Salzsäure
HKG	Haushaltsgen (<i>house keeping gene</i>)
HR	Homologe Rekombination

3. Material und Methoden

HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Inh.	Inhibitor
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IR	Ionisierende Strahlung (<i>Ionizing Radiation</i>)
k	kilo
kDa	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
l	Liter
λ	Wellenlänge (<i>lambda</i>)
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
M	Molar (mol/l)
m	Milli (10^{-3})
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
μ	Mikro (10^{-6})
min	Minute
miRNA	microRNA
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethyltriazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Nano (10^{-9})
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NHEJ	nichthomologe Endverknüpfung
NOV	Natriumorthovanadat
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^{+} -Konzentration
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rev	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-time</i> PCR
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde
Ser	Serin
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>

3. Material und Methoden

sog.	sogenannt
SSB	Einzelstrangbruch (<i>single strand break</i>)
SSC	<i>Side scatter</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TLDA	TaqMan® <i>Low Density Array</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Oktylphenylpoly-(ethylenglykolether) _n
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
Tyr	Tyrosin
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
x g	x-fache Erdbeschleunigung

3.1.2 Geräte, Chemikalien und Computerprogramme

3.1.2.1 Geräte

¹³⁷ Cs-γ-Strahlenquelle	HWM-D 2000, Wälischmiller Engineering GmbH, Germany
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Alpha Innotech <i>FluorChem HD2</i>	Alpha Innotech
Durchflußzytometer	BD LSRII, Becton Dickinson, USA
Inkubationsschränke	Heraeus, Hanau Memmert, Schwabach Sanyo, Japan Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Küvetten	Brand, Wertheim
Mikroskop	Olympus LH50A, Olympus Optical Co., Hamburg
PCR-Gerät	Cyclone gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Petrischalen	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen

3. Material und Methoden

pH-Meter	InoLab pH Level 1, UK
Fotometer	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Scanner	Umax, PowerLook 1000, Willich
Schüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Spannungsquellen	BioRad, München
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbänke	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Typhoon Trio™ Scanner	GE Healthcare, Freiburg
Z1 Coulter Particle Counter	Beckman Coulter, Fullerton, CA
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus, Hanau Eppendorf Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg Minifuge RF, Heraeus, Hanau Multifuge 3SR, Heraeus, Hanau Sigma 1K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

3.1.2.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	30 %/0,8 % (Protogel™), National Diagnostics, Atlanta, USA 40 %/19:1, Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumacetat	Merck KG aA, Darmstadt
Ammoniumchlorid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Merck KG aA, Darmstadt
Borsäure	Merck KG aA, Darmstadt
Bradford-Reagenz	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim

3. Material und Methoden

BSA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
CHAPS	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; AppliChem, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KG aA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KG aA, Darmstadt
DMEM mit Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMEM-F12	Provitro, Berlin
DMSO	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DTT	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
EDTA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Essigsäure	Merck KG aA, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KG aA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formamid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glukose	Merck KG aA, Darmstadt
Glycerin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Harnstoff	Merck KG aA, Darmstadt; GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HAT (50x)	Biochrom AG, Berlin
HEPES	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol	AppliChem, Darmstadt
Iodacetamid	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Isopropanol	Merck KG aA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck KG aA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KG aA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KG aA, Darmstadt
L-Lysin Monohydrochlorid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3. Material und Methoden

Magermilchpulver	ROTH GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Merck KG aA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumcitrat	ROTH, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	AppliChem, Darmstadt
Nonidet-P40	Roche, Basel, Schweiz
NOV	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phenol/Chloroform (5:1), pH 4,5	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
PMSF	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ponceau-S-Rot	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Propidiumiodid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Protease Inhibitor Cocktail 1	Roche, Basel, Schweiz
Protease Inhibitor Cocktail 2	Roche, Basel, Schweiz
ProtoGel® 30 %	National Diagnostics, Atlanta, Georgia
Restore™ Western Stripping Buffer	Pierce, Rockford, USA
10 x Rotiblock	ROTH GmbH, Karlsruhe
Saccharose	Merck KG aA, Darmstadt
Salzsäure	Merck KG aA, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg; GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Silbernitrat	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Thioharnstoff	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trinatriumcitrat	Merck KG aA, Darmstadt
Tris	Merck KG aA, Darmstadt

3. Material und Methoden

Triton X-100	Merck KG aA, Darmstadt
Trypsin	GibcoBRL, Karlsruhe
beta-Mercaptoethanol	Merck KG aA, Darmstadt
Vectashield – <i>mounting medium</i>	Linaris, Wertheim
Zitronensäure	NeoLab, Heidelberg

3.1.2.3 Verwendete Puffer und Lösungen

0,5 % Agarose für 2D-Gele	0,5 g Agarose 100 ml 1 x Laufpuffer Aufkochen in der Mikrowelle, zwischendurch rühren, flüssige Agarose bei 60°C lagern
----------------------------------	--

Blockpuffer für Antikörperdetektion (Western-Blot)

8 % Magermilchpulver in 1 x TBS-T lösen

4 x Laemmli-Laufpuffer (für SDS-PAGE)	240 mM Tris-HCl, pH 6,8 8 % SDS 40 % Glycerin 0,08 % Bromphenolblau 20 % beta-Mercaptoethanol
---	---

Lysepuffer I	25 mM Tris-HCl, pH 7,5 120 mM NaCl 0,3 % Triton X-100
---------------------	---

NOV- Stammlösung (100 mM)	18,3 mg NOV/ml Wasser
----------------------------------	-----------------------

2 % Paraformaldehyd	1,5 g Paraformaldehyd 75 ml PBS lösen bei 72°C
----------------------------	--

3. Material und Methoden

PBS (Phosphate buffered saline)	9,6 g PBS lösen in 1 Liter Wasser, autoklavieren
1 % PBS + (Blockpuffer für Immunzytochemie)	100 ml PBS 5 % BSA
Ponceau-S-Rot-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau-S-Rot 5 % Essigsäure in 500 ml bidest. H ₂ O lösen
SDS-PAGE	375 mM Tris-Lösung, pH 8,8
5 % (8 %, 10 %, 12 %) Trenngel	5 % (8 %, 10 %, 12 %) Acrylamid/Bisacrylamid 30/1 0,1 % SDS-Lösung 0,1 % APS 0,01 % TEMED
5 % Sammelgel	125 mM Tris-Lösung, pH 6,8 5 % Acrylamid/Bisacrylamid 30/1 0,1 % SDS-Lösung 0,1 % APS 0,01 % TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % SDS
Solution I (Zellzyklus, SubG1)	584 mg Natriumchlorid 1 g Natriumcitrat 0,3 ml Nonidet-P40, in einem Liter Wasser lösen frisch hinzufügen: 10 µg/ml RNase A und 10 µg/ml PI
Solution II (Zellzyklus, SubG1)	15 g Zitronensäure 85,6 g Saccharose, in einem Liter Wasser lösen frisch hinzufügen: 10 µg/ml PI

3. Material und Methoden

10 x TBS-T (pH 7,6)	20 mM Tris-Base (2,4 g/l) 137 mM NaCl (8 g/l) 0,1 % Tween 20 (1 ml/l)
10 x TE	50 ml 1 M Tris-Base 10 ml 0,5 M EDTA auf 500 ml mit Wasser auffüllen
Towbin-Puffer	3 g Tris-Base 14,4 g Glycin in H ₂ O lösen 200 ml Ethanol auf 1 Liter mit Wasser auffüllen
1 M Tris	121,1 g Tris-Base auf 1 l mit Wasser auffüllen, pH mit HCl einstellen
2D-Lysepuffer	40 mM Tris/HCl, pH 7,6 1 % Triton X-100 Protease Inhibitor Cocktails (1:100) Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (1:100) Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (1:100)
2D-Lyse Puffer (Rehydrierungspuffer 1)	für 2 ml
7 M Harnstoff	2,1 g
2 M Thioharnstoff	0,76 g
4 % CHAPS	0,08 g
1 % DTT	0,02 g

1 ml MilliQ Wasser zugeben und bis zur vollständigen Lösung gut durchmischen. Anschließend 1 % IPG (immobilisierter pH-Gradient, pH 3-11, für 2 ml Gesamtvolumen 20 µl IPG) und einige Körner Bromphenolblau zugeben.

3. Material und Methoden

2D-Resolubilisierungspuffer	für 20 ml
7 M Harnstoff	8,4 g
2 M Thioharnstoff	3,04 g
4 % CHAPS	0,8 g
30 mM Tris	0,072 g

2D-SDS-Äquibrierungslösung	für 200 ml
6 M Harnstoff	72,07 g in 50 ml Wasser (37°C)
50 mM 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	6,7 ml
30 % (v/v) Glycerin	69 ml
2 % (w/v) SDS	4 g
Bromphenolblau	einige Körner
auf 200 ml mit Wasser bidest. auffüllen	

1.) 50 ml SDS-Äquibrierungslösung + 0,5 g DTT (1 %)

2.) 50 ml SDS-Äquibrierungslösung + 1,2 g Iodacetamid (2,5 %)

2D-SDS-PAGE (12 %) für 10 Gele

Proto Gel (30 %)	400 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	250 ml
10 % SDS	10 ml
MilliQ Wasser	329 ml
10 % APS	5 ml
TEMED	0,5 ml

2D-Verdrängungslösung	für 100 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	25 ml
50 (v/v) Glycerin	58 ml
MilliQ Wasser	17 ml

2D-DIGE

Immobiline DryStrip pH 3-11 NL, 24 cm	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
CyDye DIGE Fluor, Cy2 minimal dye	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
CyDye DIGE Fluor, Cy3 minimal dye	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
CyDye DIGE Fluor, Cy5 minimal dye	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

3.1.2.4 Enzyme und kommerzielle Kits

Caspase-3 Assay-Puffer	Calbiochem, Darmstadt
Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-pNA), colorimetrisch	Calbiochem, Darmstadt
Luminogen™ Advance Western-Blotting Detection Kit	GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine™ RNAiMax	Invitrogen, Karlsruhe
Megaplex RT Primer Human Pool A V 2.1	Applied Biosystems, New Jersey, USA
TaqMan® Micro RNA Assay	Applied Biosystems, New Jersey, USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems, New Jersey, USA
Restore™ Plus Western-Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
RNaseA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
MirVana™ miRNA Isolation Kit	Ambion, Austin, Texas, USA
MTT - Cell Proliferation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
2D-Clean-Up-Kit	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
High Molecular Weight Protein Standard	Biorad, München
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Biorad, München

3.1.2.5 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in der jeweils angegebenen Verdünnung verwendet. Die Verdünnung der Antikörper für Western-Blot-Analysen erfolgte in 1 x TBST, versetzt mit 8 % Milchpulver.

Tabelle 3-1: Primärantikörper für Western-Blot (W)- oder Immunfluoreszenz (IF)-Analysen

Antikörper	Bezugsquelle	Katalognummer	Wirt	Verdünnung Western: W Immunfluoreszenz: IF	Größe (kDa)
Actin	Santa Cruz	sc-1616	goat	W: 1:3000	46
Argonaut-2 (C34C6)	CellSignaling	2897	rabbit	W: 1:1000	97
phospho-Chk-2 (Thr68)	CellSignaling	2661	rabbit	W: 1:1000	62
Dicer	CellSignaling	3363	rabbit	W: 1:1000	220
H2A	Abcam	ab18255	rabbit	W: 1:500	14
phospho-H2AX (Ser139)	Millipore	05-636	mouse	W: 1:1000 IF: 1:250	17
Mortalin (Grp75)	CellSignaling	2816	rabbit	W: 1:1000	75
p21^{Waf1/Cip1}	CellSignaling	2947	rabbit	W: 1:1000	21
p53	Santa Cruz	sc-126	rabbit	W: 1:1000	53
Tia-1 (C-20)	Santa Cruz	sc-1751	goat	W: 1:1000 IF: 1:250	40-50
Thioredoxin-1	CellSignaling	2285	rabbit	W: 1:1000	12
XRCC5	Abcam	ab87860	mouse	W: 1:1000	81
XRCC6	Novus Biologicals	NBP1-19508	mouse	W: 1:1000	70

Tabelle 3-2: Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Katalognummer	Verdünnung
Anti-Goat IgG, Peroxidase konjugiert	Santa Cruz	sc2020	1:20000
Anti-Mouse IgG, Peroxidase konjugiert	Santa Cruz	sc2005	1:10000
Anti-Rabbit IgG, Peroxidase konjugiert	Santa Cruz	sc2004	1:20000
Anti-Rabbit IgG, Alexa488 konjugiert	Invitrogen	A11008	1:250
Anti-Goat IgG, Cy3 konjugiert	Abcam	ab97115	1:500

3.1.2.6 RNA-Oligonukleotide

3.1.2.6.1 MiRNA-Inhibitoren

Tabelle 3-3: MiRNA-Inhibitoren

miRNA-Inhibitoren	Zielsequenz (5´-3´)	Bezugsquelle
microRNA Inhibitor control	GTGTAACACGTCTATACGCCCA	Exiqon, Vendaek, Dänemark
hsa-miR-146a-Inhibitor	ACCCATGGAATTCAGTTCTC	Exiqon, Vendaek, Dänemark
hsa-miR-146b-5p-Inhibitor	AGCCTATGGAATTCAGTTCTCA	Exiqon, Vendaek, Dänemark
hsa-miR-216a-Inhibitor	TCACAGTTGCCAGCTGAGATTA	Exiqon, Vendaek, Dänemark
hsa-miR-301b-Inhibitor	GCTTTGACAATATCATTGCACTG	Exiqon, Vendaek, Dänemark
hsa-miR-518b-Inhibitor	CTCTAAAGGGGAGCGCT	Exiqon, Vendaek, Dänemark
hsa-miR-518d-5p-Inhibitor	CAGAAAGTGCTTCCCTCTAGAG	Exiqon, Vendaek, Dänemark
hsa-miR-525-3p-Inhibitor	GCTCTAAAGGGAAGCGCCTT	Exiqon, Vendaek, Dänemark
hsa-miR-628-5p-Inhibitor	CTCTAGTAAATATGTCAGCA	Exiqon, Vendaek, Dänemark

3.1.2.6.2 Precursor-miRNAs

Tabelle 3-4: Pre-miRNAs

Pre-miRNAs	Stem-loop sequence (5'-3')	Bezugsquelle
Pre-miR-216a	GAUGGCUGUGAGUUGGCUUA UCCUCAGCUGGCAACUGUGA GAUGUUCAUACAAUCCUCA CAGUGGUCUCUGGGAUUAUG CUAAACAGAGCAAUUUCCUA GCCUCACGA	Ambion, Cambridgeshire, UK
Pre-miR-518d-5p	CUCAGGCUGUGACCCUCUAG AGGGAAGCACUUUCUGUUGC UUGAAAGAAGAGAAAGCGCU GGGUUUAGAGGAUUACUCU UUGAG	Ambion, Cambridgeshire, UK
Pre-miR-525-3p	CUCAAGCUGUGACUCUCCAG AGGGAUGCACUUUCUCUUAU GUGAAAAAAGAAGGCGCU UCCUUUAGAGCGUUACGGU UUGGG	Ambion, Cambridgeshire, UK

3.1.2.6.3 Short interfering RNAs (siRNAs)

Tabelle 3-5: siRNAs

RNAi	Zielsequenz (5'-3')	Bezugsquelle
negative (control)	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	Qiagen, Hilden
Argonaut-2 (EIF2C2)	ACGGGUCUGUGGUGAUA AATT	Qiagen, Hilden
Dicer-1	UGUGCUAUCUGGAUCCUAGTT	Qiagen, Hilden
NBS1	AUGAUGUGGCCAUAGAAGATT	Ambion,Cambridgeshire, UK
TP53	AGTACGTGCAAGTCACAGACTTGGC	Invitrogen, Paisley, UK
ATM	GGGCCTTTGTTCTTCGAGACGTTAT	Invitrogen, Paisley, UK

3.1.2.7 Primäre humane Zellen, Zelllinien und Zellkulturmedien

Die Zelllinie EA.hy926 wurde durch Fusion eines Thioguanin-resistenten A549-Klones mit primären humanen Endothelzellen aus einer Nabelschnurvene (HUVEC) erhalten. Die hieraus entstandenen Zellen weisen differenzierte Endothelialzell-ähnliche Funktionen auf. Primäre humane Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) wurden von der Firma Provitro bezogen und kultiviert.

Tabelle 3-6: Verwendete Zellen und Zellkulturmedien

	Bezugsquelle	Mediumzusammensetzung
EA.hy926 Endothelzellen	Dr. Soile Tapio, Insitut für Strahlenbiologie, HMGU	DMEM 10 % FCS 1 x HAT-Medium
Humane Nabelschnurzellen (Human umbilical vein endothelial cells; pooled (HUVEC-p))	Provitro, Berlin, Deutschland	DMEM-F12 2 % FCS 0,4 % ECGS/H (Protein Extrakt aus bovinen Hypothalami + Heparin) 0,1 ng/ml EGF (epidermal growth factor) 1 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor) 1 µg/ml Hydrocortison

3.1.2.8 Computerprogramme

Abbildungen	Adobe Photoshop CS, Adobe Inc. Adobe Illustrator CS, Adobe Inc. Microsoft® Power Point 2007
Antikörperdetektion	Alpha View, Alpha Innotec
2D-DIGE Auswertungssoftware	DeCyder™ 2D Software
2D-DIGE Proteinanalysesoftware	ProteinPilot™ Software 4.0
2D-DIGE Scansoftware	Typhoon Scan control software, GE Healthcare
FACS Software	FACSDiva, Becton Dickinson, USA
Literaturrecherchen	http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
Quantitative Auswertung von Filmen	TotalLab TL100, Amersham, UK
Tabellenkalkulation und Diagramme	Microsoft® Excel 2007, Microsoft
Textverarbeitung	Microsoft® Word 2007, Microsoft

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung humaner Zellen und Zelllinien

Die Anzucht der adhärenz wachsenden Endothelzelllinie EA.hy926 erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), welches zuvor mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum) und 1 x HAT angereichert wurde. Die Kultivierung von primären Endothelzellen (HUVECs) erfolgte in voll supplementiertem DMEM-F12 (siehe 3.1.2.7). Vor Gebrauch wurde das Medium auf 37°C vorgewärmt. Die Kultivierung erfolgte ohne Antibiotikazusatz bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Anteil von 5 %. Die konfluente Zellkultur wurde ca. alle drei Tage im Verhältnis 1:5 passagiert. Dabei wurde das verbrauchte Kulturmedium verworfen und die Zellen 1-mal mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen, um das Kulturmedium vollständig zu entfernen. Die adhärenz Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Hierzu wurden sie 3-5 min bei 37°C bis zu einem vollständigen Ablösen der Zellen inkubiert. Anschließend erfolgte die Neutralisation der Zell-Trypsin-Suspension mit Vollmedium. Danach wurden die Zellen 5 min bei 300 x g zentrifugiert, in PBS gewaschen und das Sediment in Vollmedium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung wurde mittels Partikelzähler durchgeführt. Hierfür wurde von der Zellsuspension 500 µl abgenommen, mit 19,5 ml 0,9 M NaCl verdünnt und im Partikelzähler gemessen.

3.2.1.2 Kryokonservierung von Säugerzellen

Die Kryokonservierung der humanen Zellen erfolgte in Aliquots zu je 2-3 x 10⁶ Zellen mit 1 ml Einfriermedium in Kryokonservierungsröhrchen. Die entnommene Zellsuspension wurde bei 300 x g für 5 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in Einfriermedium aufgenommen. Da Säugerzellen langsam eingefroren werden sollen, wurden die Röhrchen in einen mit Isopropanol befüllten *Nalgene Cryo 1°C Freezing Container* überführt und über Nacht (ÜN) bei -80°C gelagert. Die Abkühlrate betrug 1°C/min. Nach 24 h konnten die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

EA.hy926-Einfriermedium	40 ml DMEM
	5 ml FCS (Endkonzentration 10 %)
	5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (Endkonzentration 10 %)

3.2.1.3 Auftauen von humanen Zellen

Das DMEM-Vollmedium wurde auf 37°C vorgewärmt und anschließend ca. 12 ml in einem kleinen Zellkulturgefäß (25 cm²) vorlegt. Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, in warmem Wasser aufgetaut und in das vorgelegte Medium überführt. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen, wurde das Medium am darauffolgenden Tag durch vorgewärmtes, voll supplementiertes Medium ersetzt.

3.2.2 Funktionelle Analysen

3.2.2.1 Koloniebildungstest

Um nach Bestrahlung die Überlebensfähigkeit von Zellen zu untersuchen, wurden Zellen dünn in 6-Loch Platten ohne Kontakt zu den Nachbarzellen kultiviert. Dies entsprach z.B. bei der unbestrahlten Kontrolle einer Zellzahl von 100 bzw. 200 Zellen je Schale. Alle weiteren Zellzahlen sind aus Tabelle 3-7 ersichtlich. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 3-7: Verwendete Zellzahlen für den Koloniebildungstest in Abhängigkeit von der Dosis

Dosis	Verwendete Zellzahlen/6-Loch Platte
0 Gy	100 und 200
2,5 Gy	200 und 500
5 Gy	200 und 500
10 Gy	500 und 1000

Einen Tag nach dem Aussäen erfolgte die Bestrahlung der Zellen, die anschließend 7 d im Brutschrank inkubiert wurden. In dieser Zeit bildeten sich aus jeweils einer einzigen Ausgangszelle Kolonien, die anschließend mit einer verdünnten Giemsalösung (1:20 in PBS) gefärbt wurden. Hierfür wurde zuerst das Medium von den Zellen entfernt. Dann wurde mit PBS gewaschen und die Zellen 15 min mit 100 % Ethanol fixiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation mit der Giemsalösung wurden die blaugefärbten Kolonien mit Wasser gewaschen, die Schalen getrocknet und unter dem Binokular ausgezählt.

3.2.2.2 Bestimmung der Proliferationsaktivität

Der Aktivitätstest beruht darauf, dass nur metabolisch aktive Zellen das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) umsetzen können. Hierbei entstehen aus dem gelben MTT Reagenz violette Formazan-Kristalle, die in den Zellen eingelagert werden. Diese werden anschließend mit Hilfe eines SDS enthaltenden Reagenz solubilisiert. Gelöstes Formazan wurde fotometrisch bestimmt.

EA.hy926 Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 24-Loch-Platten ($1 \cdot 10^3$ Zellen) ausgesät und inkubiert. 48 h nach der Transfektion mit siRNA wurden die Zellen bestrahlt und weitere 5 d bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das MTT-Reagenz zugegeben (1/10 Vol des Kulturmediums) und die Zellen 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Metabolisch aktive Zellen konnten das Reagenz umsetzen und einlagern, während dies bei inaktiven Zellen nicht möglich war. Nach 4 h wurde die auf 37°C vorgewärmte *solubilization solution* zugegeben (1 Vol des Kulturmediums), um die Zellen aufzulösen und die eingeschlossenen Kristalle in Lösung zu bringen. Die Zellyse erfolgte über Nacht bei 37°C. Am Folgetag konnte die Absorption bei 595 nm gemessen.

3.2.2.3 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Eine Methode zur Messung von Apoptose besteht in der Detektion von aktiven Caspasen mit dem Caspase-3-Substrat Ac-DEVD-pNA.

Vor der Bestrahlung wurden zunächst 5×10^5 Zellen in einer 6 cm-Schale ausgesät und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy, 5 Gy und 10 Gy bzw. mit 0 Gy (Kontrolle) geerntet. Zur Messung der Caspase-3-Aktivität wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Sediment in 38 µl Lysepuffer (25 mM Tris (pH 7,5), 120 mM NaCl₂ und 0,3 % Triton X-100) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellysate durch Zentrifugation bei 16000 x g für 5 min bei 4°C geklärt. Für jede Probe wurden 80 µl des Assay-Puffers (100 mM HEPES (pH 7,5), 0,5 mM EDTA, 20 % Glycerol, 50 mM DTT) mit 2 µl des Caspase-3-Substrates Ac-DEVD-pNA (DMSO und H₂O 1:1 gelöst) gemischt. Nach der Übertragung der Puffer/Substrat-Lösung in eine 96-Loch Platte wurden 18 µl des Zellysats hinzugefügt. Proben ohne Lysat wurden als negative Kontrolle vorbereitet. Caspase-3 katalysiert die Hydrolyse von Ac-DEVD-pNA, was zur Freigabe des pNA

Chromophors mit einer λ_{\max} von 405 nm führt. Die Absorption von 405 nm wurde bei 37°C alle 15 min über einen Zeitraum von 5 h mit einem TECAN Spektralphotometer gemessen.

3.2.2.4 Analyse der Zellzyklusverteilung und der SubG1-Population

Mit der durchflusszytometrischen Bestimmung der SubG1-Population lassen sich apoptotische Zellen quantifizieren, da diese durch die Fragmentierung der DNA einen geringeren DNA-Gehalt als vitale Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus besitzen. Ca. 1×10^6 Zellen wurden in 6 cm-Schalen ausgesät und bei 37°C ÜN inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit 2,5 Gy, 5 Gy oder 10 Gy bestrahlt und 48 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die adhärenenten Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und das PBS anschließend entfernt. Zum Ablösen der Zellen wurden 0,5 ml Trypsin/EDTA zugegeben und bei 37°C für 5 min inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit dem zuvor gesammelten Medium abgestoppt und die Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Sedimentation der Zellen erfolgte für 5 min bei 300 x g. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl DNA-Extraktionspuffer (*Solution I*) resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 500 µl PI-Färbelösung (*Solution II*) zu der Zellsuspension zugegeben. Der Ansatz wurde vor der Analyse mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und kann dann einige Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen anhand ihrer Größe und Granularität über die FSC/SSC-Kanäle detektiert und der DNA-Gehalt der Zellen wurde bei einer Fluoreszenz von > 600 nm auf einer linearen Skala quantifiziert. Die Anregungswellenlänge entsprach 488 nm. Alle Zellen, die eine geringere Fluoreszenz als Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus aufwiesen, wurden als apoptotisch klassifiziert.

3.2.2.5 Transfektion humaner Zellen mit kleinen RNA-Molekülen

Die Transfektion humaner adhärenenten Zellen und Zelllinien mit kleinen RNA-Molekülen (siRNAs und Pre-miR™ bzw. Anti-miR™ Moleküle) erfolgte unter Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ RNAiMax (Invitrogen, Karlsruhe). Hierfür wurden 150000 Zellen in einer 6 cm-Schale in Vollmedium ausgesät und ÜN bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde 2 ml frisches, vorgewärmtes Vollmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden pro 6 cm-Schale 2 µl der entsprechenden siRNA, Pre-miR™ oder Anti-miR™

(10 µM Stock-Lösung) mit 500 µl DMEM Medium ohne FCS vermischt. 5 µl des Transfektionsreagenz wurden ebenfalls in 500 µl Medium ohne FCS verdünnt. Beide Ansätze wurden vereinigt, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend unter Schwenken zu den Zellen pipettiert. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde frisches Vollmedium auf die Zellen gegeben. Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen nach 24 h geerntet und entsprechend des jeweiligen Versuches weiterverarbeitet.

3.2.2.6 Transiente Transfektion humaner Zellen mit dem Plasmid Ago2-eGFP

Zur Transfektion von adhärennten Zellen mit dem Ago2-eGFP-Plasmid wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die transiente Transfektion wurden Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät (300000 Zellen pro Well). Bei 50-80 % Konfluenz wurde das Medium erneuert und der Transfektionsansatz nach Angaben des Herstellers zugegeben. Dabei wurden 4 µg Plasmid-DNA pro Versuchsansatz eingesetzt. Das Transfektionsmedium wurde nach einer Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ für 4 h durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur Ernte weitere 24 bis 48 h inkubiert. Transient transfizierte Zellen wurden zur Isolation von Gesamtzell-Proteinextrakten bzw. RNA herangezogen.

3.2.2.7 Isolation von RNA

Für Expressionsanalysen wurde eine Isolation von kleinen und großen RNA-Spezies durchgeführt. Diese erfolgte mit dem *MirVana™ miRNA Isolation Kit* der Firma Ambion. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Zusammengefasst wurden folgende Schritte durchgeführt: die pelletierten Zellen wurden in Lysepuffer aufgenommen, dem Lysat wurde 1/10 Volumen an miRNA Homogenate-Puffer hinzugefügt und die Probe für 10 min auf Eis inkubiert. Für die folgende organische Extraktion wurde 1 Volumen saures Phenol:Chloroform (5:1, pH 4,5) hinzugegeben und der Ansatz für 1 min gut durchmischt. Die Phenol-Fällung erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 10000 x g). Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen 100 %-igem Ethanol vermischt. Die gesamte Flüssigkeit wurde auf die Zentrifugationssäule gegeben, zentrifugiert (20 s, 10000 x g) und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde einmal mit Wash Solution 1 und zweimal mit Wash Solution 2/3 gewaschen (20 s, 10000 x g) und

die Durchflussfraktion verworfen. Die Reinigungssäule wurde auf ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die RNA mit 40-50 µl Wasser (95°C) eluiert.

3.2.2.8 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei der fotometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration nutzt man das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Bestimmt man das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm, lässt sich die Reinheit der Nukleinsäuren abschätzen. In einer reinen DNA- bzw. RNA-Lösung sollte der Quotient 260 nm/280 nm zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Liegt eine Kontamination mit Proteinen vor, ist der Wert kleiner.

3.2.2.9 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) von miRNAs für TaqMan®-MicroRNA-Array (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit)

Zur Untersuchung der miRNA-Expression in Endothelzellen nach Bestrahlung wurden microRNA TaqMan® *Low Density Arrays* (TLDA) der Firma Applied Biosystems genutzt und die hierfür benötigte cDNA nach den Anweisungen des Herstellers hergestellt. Die TLDA *human microRNA Panel A v2.1* Karte enthält 378 verschiedene humane microRNAs. Darüber hinaus sind drei kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs), U6 (SNORU6), RNU44 (SNORD44) und RNU48 (SNORD48) enthalten, die als endogene Kontrollen zur Normalisierung der Expressionsdaten dienen. Die Multiplex reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des TaqMan® *microRNA reverse transcription kit*. Die RT-Primer wurden aus einem vordefinierten Primer Pool (Megaplex RT Primer Human Pool A V 2.1) aller auf dem Array vorhandenen miRNAs zugefügt. Für jede 7,5 µl RT-Reaktion wurden 0,2 µl dNTPs, 0,1 µl RNase-Inhibitor, 0,8 µl 10 x *reverse transcription buffer*, 1,5 µl *MultiScribe* Reverse Transkriptase, 0,2 µl nukleasefreies H₂O, 0,8 µl Primer und 3 µl RNA (200 ng/µl Verdünnung) zusammen gegeben. Der Ansatz wurde anschließend nach folgendem Programm inkubiert: 40 x (2 min bei 16°C, 1 min bei 42°C, 1 min 50°C) und abschließend für 5 min bei 85°C inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde entweder direkt für die Echtzeit-PCR weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.2.10 Reverse Transkription zur Detektion von spezifischen miRNAs (TaqMan® MicroRNA reverse transcription kit)

Für die spezifische reverse Transkription von miRNAs wurde das System der Firma Applied Biosystems nach Herstellerangaben verwendet. Um es zu ermöglichen, dass ausschließlich reife miRNAs in cDNA umgeschrieben werden können, werden bei dieser Detektionsmethode sog. *looped* RT-Primer eingesetzt. Für jede miRNA existiert dabei ein spezifischer Primer. Hierbei wurden je 10 ng Gesamt-RNA in die Reaktion eingesetzt, wobei die RNA zuvor auf 5 ng/µl verdünnt wurde. Für jede 15 µl RT-Reaktion wurden 0,15 µl dNTPs, 0,19 µl RNase Inhibitor, 1,5 µl 10 x *Reverse Transcription Buffer*, 0,5 µl *MultiScribe* Reverse Transkriptase, 9,16 µl nukleasefreies H₂O, 1,5 µl Primer und 2 µl RNA zusammen gegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 30 min bei 16°C, 30 min bei 42°C und abschließend für 5 min bei 85°C inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde entweder direkt für die PCR weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.2.11 Quantitative Echtzeit (Real-time)-Polymerasekettenreaktion von miRNAs

Die Quantifizierung von spezifischen miRNAs erfolgte mit TaqMan®-Sonden. Die Fluoreszenz-Messung erfolgt dabei nach jedem Elongationsschritt. Der Schnittpunkt des gemessenen Signals mit einer Basislinie oberhalb des unspezifischen Hintergrundsignals wird als *threshold cycle* (C_t) bezeichnet. Der C_t wird durch die Anzahl der PCR-Zyklen angegeben. Die relative Regulation einer miRNA wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Hierbei wird die Formel $2^{-(\Delta C_t(\text{bestrahlt}) - \Delta C_t(\text{Kontrolle}))}$ genutzt, wobei $\Delta C_t = C_t(\text{miRNA}) - C_t(\text{Referenz-snoRNA})$ entspricht. Dabei wird die miRNA-Expression gegenüber einer kleinen nukleolären RNA (interner Standard) normalisiert.

3.2.2.11.1 Quantifizierung von miRNAs mittels TaqMan®-MicroRNA-Array

Zur Untersuchung von miRNA-Expressionsmustern wurden microRNA TaqMan® *Low Density Arrays* von Applied Biosystems gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die cDNA wurde aus 300 ng Gesamt-RNA mit spezifischen Multiplex reverse Transkriptase *stem-loop* Primern generiert. Anschließend wurden 6 µl cDNA in 444 µl RNase-freiem H₂O verdünnt, mit 450 µl TaqMan 2 x *Universal PCR Master Mix* versetzt und zur Amplifikation auf *Multi Fluidic*

Cards geladen. Die Messung der Genexpression erfolgte mittels eines ABI Prism 7900HT Systems. Die miRNA-Expression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe 3.2.2.11) quantifiziert, wobei die kleine RNA RNU6 als endogene Kontrolle zur Normalisierung diente.

3.2.2.11.2 Quantifizierung von spezifischen miRNAs

Die Echtzeit-Quantifizierung von spezifischen miRNAs erfolgte mit *Single Primer Assays* nach Herstellerangaben. Dieses System basiert auf dem TaqMan-Prinzip und enthält einen miRNA-spezifischen *sense*-Primer, einen spezifischen *antisense*-Primer und eine miRNA-spezifische TaqMan-Sonde. Für eine 10 μ l -Reaktion wurden 2 μ l RT-Produkt, 5 μ l TaqMan 2 x *Universal PCR Master Mix* und 3 μ l nukleasefreies H₂O zusammen gegeben. Das Standardprogramm bestand aus einer Enzymaktivierung für 10 min bei 95°C, einer Denaturierung der cDNA für 15 sec bei 95°C und einem Annealing- und Extensionsschritt für 60 sec bei 60°C für 45 Zyklen am StepOnePlus™. Die miRNA-Expression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe 3.2.2.11) quantifiziert, wobei die kleine RNA RNU44 als endogene Kontrolle zur Normalisierung diente.

3.2.3 Immunfluoreszenz

3.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung für Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der γ -H2AX-Foci wurden 1×10^6 Zellen auf Objektträgern ausgesät und ÜN bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit einer Dosis von 2,5 Gy bestrahlt. Nach einer Inkubation bei 37°C wurden die Objektträger nach 1 h, 4 h bzw. 24 h mit PBS gewaschen und für 15 min in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Präparate 1-mal mit PBS gewaschen. Nach zwei weiteren Waschschritten in PBS/0,15 % Triton wurden die Präparate anschließend dreimal für 10 min in PBS+ geblockt. Nach dem Blocken wurden die Präparate mindestens 1 h mit dem Primärantikörper (1:500 in PBS+) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS (5 min), einmaligem Waschen in PBS/0,15 % Triton (10 min) und einmaligem Waschen mit PBS (5 min) wurden die Präparate 1-mal für 7 min in PBS+ geblockt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 *Goat Anti-Rabbit*, 1:200 in PBS+) erfolgte für 1 h bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurde erneut 2-mal für 5 min mit PBS/0,15 % Triton und 2-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden für 2 min mit Hoechst33342 gefärbt und die Zellen wurden erneut 2-mal für 2 min mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden Deckgläser mittels Vectashield auf die gefärbten Zellen aufgebracht. Die γ -H2AX Foci je Nukleus wurden innerhalb der nächsten 3 d am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

3.2.4 Proteinanalytische Methoden

3.2.4.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten für die 1D-Gelelektrophoresen

Zur Extraktion von Gesamtprotein aus kultivierten Säugetierzellen wurden die konfluent wachsenden Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bei 300 x g für 5 min pelletiert. Nach einem Waschschrift in 1 ml PBS und einer erneuten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200 μ l Lyse I Puffer (für ca. 3×10^6 Zellen) resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min bei 4°C und 850 rpm geschüttelt, anschließend wurde der Zelldebris durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g von den gelösten Proteinen abgetrennt. Der Proteinextrakt wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

3.2.4.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten für die 2D-Gelelektrophoresen

Zur Lyse der Zellen wurden 200 μ l des 2D-Lyse Puffers auf 2×10^6 Zellen in einem 2,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und die Zellsuspension 3 min bei 95°C in einem Thermoblock erhitzt. Danach wurden die Zellen 20 min bei Raumtemperatur sonifiziert, um die Zellen vollständig zu lysieren. Anschließend wurden die Proteine mittels 2D-Clean-Up-Kit nach Herstellerangaben präzipitiert. Die Resolubilisierung des präzipitierten Protein-Sediments erfolgte in 300 μ l Resolubilisierungspuffer. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proteine bei -80°C gelagert.

3.2.4.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration aus einem Zelllysat erfolgte fotometrisch nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford, 1976). Durch Bindung von *Coomassie Brilliant Blue G* an Proteine wird ein Komplex gebildet, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Vor Beginn der Messung wurde eine Standardkurve mit BSA erstellt, wobei aus einer 1 μ g/ml BSA-Stammlösung eine Verdünnungsreihe mit 0 μ g, 2 μ g, 4 μ g, 8 μ g, 12 μ g, 16 μ g und 20 μ g BSA in je 1 ml Bradford-Reagenz hergestellt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 bis 30 min im Dunkeln wurde die

Absorption im Photometer bei 595 nm gemessen. Anhand der Standardkurve konnte auf die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Proben rückgeschlossen werden.

3.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen (Laemmli, 1970)

Bei der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Für das Polyacrylamidgel wird ein Netzwerk aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid generiert. Je nach Größe der zu trennenden Proteine wird ein Gel genutzt, in dem die Mischung aus beiden Agenzien variiert wurde, um eine optimale Porengröße zu erhalten. Je nach Größe der Proteine wurden 5 %-12 % Polyacrylamid-Gele verwendet. Für eine optimale Auftrennung wurde zusätzlich ein Sammelgel auf das Trenngel aufgetragen.

Die Proteinextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 15 µg in einem Probenvolumen von 10 µl eingestellt. Das gesamte Volumen wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Pro Polyacrylamidgel erfolgte die Auftrennung bei 15 mA, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.4.5 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose

Die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels des XCell II™ Blot Systems auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin et al., 1992).

Hierfür wurden das Trenngel, die Nitrozellulosemembran sowie 1 bis 2 Filterpapiere in 1 x Towbin-Transferpuffer für 15 min äquilibriert und der *Blot*, wie in Abbildung 3-1 dargestellt, aufgebaut.

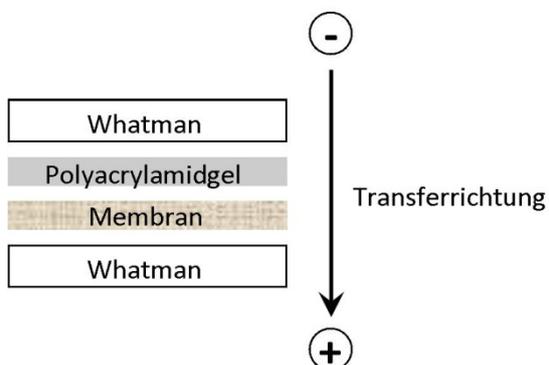


Abb. 3-1: Aufbau eines halb-trockenen Elektroblots.

Der Transfer erfolgte 1-2 h bei 15 V. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran 2 min mit Ponceau-S-Lösung gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Überschüssiges Ponceau-S

wurde mit Wasser abgespült. Anschließend erfolgte eine Immundetektion mit entsprechenden Antikörpern. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran für mindestens 1 h in Rotiblock-Lösung oder 8 % Milch/TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in geeigneter Verdünnung bei 4°C ÜN (siehe Tabelle 3-1). Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, folgten drei Waschschrte für je 15 min in TBS-T. Der in 8 % Milch/TBS-T gelöste HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelte Sekundärantikörper wurde für mindestens 1 h mit der Membran inkubiert. Danach wurde erneut dreimal 15 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Visualisierung der gebundenen Antikörper. Hierfür wurde die Membran mit einer 1:1 Mischung der Lösungen Luminogen A und Luminogen B überspült und die Chemolumineszenz mittels des Alpha Innotech *FluorChem HD2* und der Software Alpha View der Firma Alpha Innotech detektiert.

3.2.4.6 Entfernen von Antikörpern (*Stripping*)

Um eine Membran nach einer Immunodetektion für eine weitere Detektion mit einem anderen Antikörper nutzbar zu machen, muss der zuvor verwendete Antikörper von der Membran entfernt werden. Dies erfolgte mittels des „Stripping“-Verfahrens. Die Membran wurde mit „Stripping“-Buffer für 15-20 min schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Membran mehrmals in TBS-T-Puffer gewaschen und für mindestens 30 min mit 8 % Milch/TBS-T geblockt. Die Membran konnte im Anschluss mit dem nächsten Antikörper behandelt werden.

3.2.4.7 Relative Quantifizierung von Proteinen

Die Menge eines Proteins in einer bestimmten Probe relativ zu anderen Proteinen wurde über die Bandenstärke bestimmt. Die Bandenstärken wurden mittels des Analyseprogramms ImageMaster (TotalLab TL100, Amersham, UK) gemessen. Anschließend wurden die Verhältnisse zwischen Ladungskontrolle und Kandidatenprotein errechnet. Aus diesem Verhältnis ergaben sich Aufschlüsse über die Expression der untersuchten Proteine.

3.2.4.8 2D-Gelelektrophorese

3.2.4.8.1 Differentielle Proteomanalyse (2D-differential gel electrophoresis (DIGE))

Die 2D-DIGE-Analyse unterteilt sich in die experimentelle 2D-DIGE-Analyse bestehend aus der Markierung der Proteine, der isoelektrischen Fokussierung, der Äquilibration, der SDS-PAGE, dem Scannen und der Auswertung sowie der Identifizierung der Proteine durch MALDI (Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation)-MS- oder LC (liquid chromatography)-MS/MS-Massenspektrometrie.

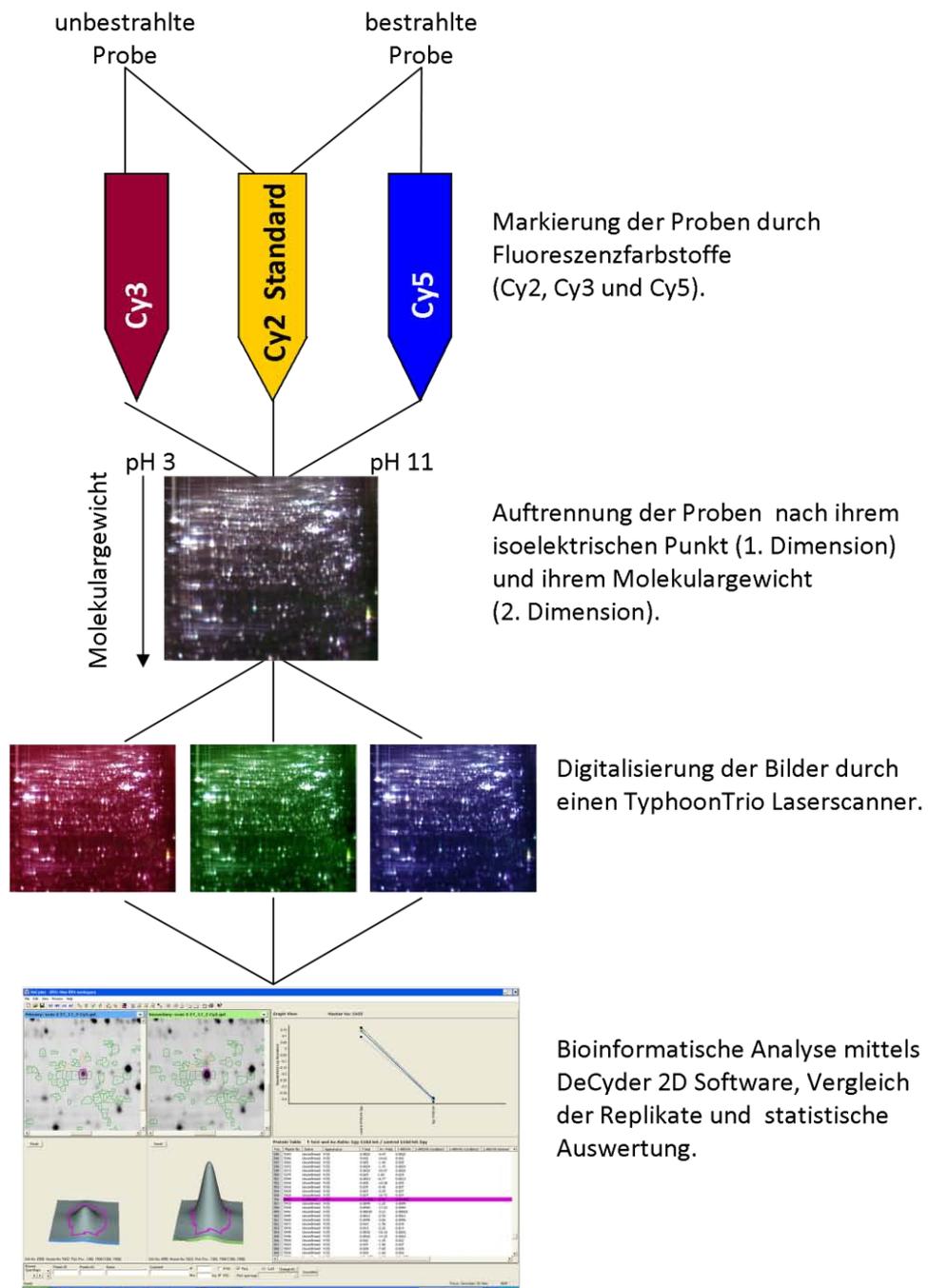


Abb. 3-2: Arbeitsablauf bei der differentiellen Proteomanalyse (2D-DIGE-Technik). Die bestrahlten und unbestrahlten Proben wurden *in vitro* mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 bzw. Cy5 markiert. Die Färbung des internen Standards (bestrahlte und unbestrahlte Proben aller verwendeten Replikate) erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2. Nach Vereinigung aller gefärbten Proben erfolgte die zweidimensionale Gelelektrophorese, bei der die Proteine zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt und danach nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Anschließend erfolgte das Auslesen der Daten für jeden der drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Danach wurden durch eine bioinformatische Analyse mittels der DeCyser™ 2D-Software diejenigen Proteinspots bestimmt, die im Vergleich von bestrahltem und unbestrahltem Zustand eine Veränderung zeigten. Die Identität der Proteine wurde abschließend massenspektrometrisch bestimmt.

3.2.4.8.2 2D-Clean-Up-Kit für die erste Dimension (IEF) (BioRad)

Die Probenvorbereitung für die 2D-Gelelektrophorese wurde mit dem Clean-Up-Kit von BioRad durchgeführt. 150-300 µg Gesamtzellextrakt wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 600 µl vom *Precipitanten* (Agens 1) zur Probe gegeben und das Gemisch anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Daran anschließend wurden ~~600 µl~~ *Co-Precipitanten* (Agens 2) hinzugeben, kräftig durchmischt und für 5 min bei 12000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat erneut bei 12000 x g für 1 min zentrifugiert. Danach wurde der restliche Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Das Pellet wurde mit 80 µl Waschpuffer 1 bedeckt und 30 sec gut durchmischt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 12000 x g. Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen wurde, wurde das Sediment in 50 µl H₂O bidest. aufgenommen und invertiert. Das Pellet wurde bei diesem Schritt nicht gelöst. Anschließend wurden 2 ml eiskalter Waschpuffer 2 hinzugefügt, die Suspension für mindestens 1 h bei -20°C gelagert und während der Inkubationszeit alle 10 min für 20-30 sec kräftig durchmischt. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 12000 x g und der Überstand wurde erneut vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde für ca. 5 min bei RT getrocknet und dann in Resolubilisierungspuffer aufgenommen.

3.2.4.8.3 Markierung der Proteine

Vor dem Färben wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt und auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt. Hierzu wurden 2 µl des Präzipitats auf ein pH-Indikatorpapier getropft.

3. Material und Methoden

Die lyophilisierten Fluoreszenzfarbstoffe (*CyDyes*) wurden nach Herstellerprotokoll mit Dimethylformamid (DMF) rekonstituiert und bei -20°C gelagert. Zur Färbung der Proben wurde zu 50 µg Proteinextrakt 333 pmol Cy3 oder Cy5 in Dimethylformamid gegeben. Zur Färbung des internen Standards wurden 25 µg aller Proteinextrakte gepoolt und zu je 50 µg 333 pmol Cy2 Fluoreszenzfarbstoff zugegeben. Die Inkubation erfolgte 45 min auf Eis. Zum Abstoppen der Reaktion wurde jeweils 1 µl 10 mM Lysin hinzugegeben und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Die entsprechenden Proben wurden danach in einem Reaktionsgefäß vereinigt (siehe Tabelle 3-8) und anschließend mit *Rehydration Solution* auf 450 µl aufgefüllt.

Tabelle 3-8: Beladung der 2D-Gele

	Cy2	Cy3	Cy5
Gel 1	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 1	Inhibitor-Kontrolle 5 Gy, 12 h Replik 1
Gel 2	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 2	Inhibitor-Kontrolle 5 Gy, 12 h Replik 2
Gel 3	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 3	Inhibitor-Kontrolle 5 Gy, 12 h Replik 3
Gel 4	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 1	miR-216a-Inhibitor 5 Gy, 12 h Replik 1
Gel 5	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 2	miR-216a-Inhibitor 5 Gy, 12 h Replik 2
Gel 6	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 3	miR-216a-Inhibitor 5 Gy, 12 h Replik 3
Gel 7	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 1	miR-518d-5p-Inhibitor 5 Gy, 12 h Replik 1
Gel 8	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 2	miR-518d-5p-Inhibitor 5 Gy, 12 h Replik 2
Gel 9	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 3	miR-518d-5p-Inhibitor 5 Gy, 12 h Replik 3
Gel 10	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 1	miR-525-3p-Inhibitor 5 Gy, 12 h Replik 1
Gel 11	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 2	miR-525-3p-Inhibitor 5 Gy, 12 h Replik 2
Gel 12	Gepoolter interner Standard	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy Replik 3	miR-525-3p-Inhibitor 5 Gy, 12 h Replik 3

3.2.4.8.4 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die vorbereiteten Gelstreifen (IPG-Strips) mit einer Länge von 24 cm (pH 3-11) wurden mit den Proben über Nacht passiv beladen. Hierfür wurde die gesamte Probe, bestehend aus einer Mischung aller drei Fluoreszenzfarbstoffe (siehe Tab. 3-7), ohne Luftblasen möglichst

gleichmäßig in einer Rehydrations-Vorrichtung zwischen den beiden Elektroden verteilt. Die Gelstreifen wurden nun mit der Gelseite nach unten auf dem Puffer platziert. Anschließend wurden die Streifen mit Dry Strip Cover Fluid (Mineralöl) überschichtet. Vor der Auftrennung in der ersten Dimension wurden die Gelstreifen für 12-16 h bei RT rehydriert. Danach erfolgte die isoelektrische Fokussierung.

Hierfür wurden die Gelstreifen in einem IPGphor3-Gerät mit folgender Konfiguration analysiert: bei einer Temperatur von 20°C über 3 h bei 300 V, einem Gradienten über 4 h auf 1000 V, einem Gradienten über 2 h 30 min auf 3500 V, einem Gradienten über 3 h 30 min auf 10000 V und über 5 h bei 10000 V. Dies entspricht einer Gesamtlauzeit von 18 h und einer gesamten Voltzahl von 82850. Vor Beginn der Auftrennung in der zweiten Dimension wurden die Streifen zunächst 20 min in SDS-Äquibrierungslösung mit 1 % DTT und anschließend 20 min in SDS Äquibrierungslösung mit 2,5 % Iodacetamid äquilibriert.

3.2.4.8.5 SDS-PAGE (2. Dimension)

Es wurden gleichzeitig bis zu 12 Gele (25 x 25 cm) in einer Gießkammer gegossen. Die 12 % Gellösung wurde von oben in die Gelkassetten eingefüllt und durch die Verdrängungslösung komplett in die Kassetten gedrängt, so dass sich die Gelgrenze ca. 1 cm unterhalb der Glasoberkante befand. Anschließend wurden die Gele mit 0,1 % SDS-Lösung besprüht, um eine ebene Front zu erhalten. Die Gele wurden 2 h bei Raumtemperatur gelagert und polymerisierten danach ÜN bei 4°C aus.

Die IPG-Strips wurden mit 0,5 % Agaroselösung auf den SDS-Polyacrylamidgelen fixiert. In der unteren Kammer befand sich Laufpuffer in 1-facher Konzentration und in der oberen Kammer Laufpuffer in 2-facher Konzentration. Die Proteinauftrennung erfolgte für ca. 1 h bei 25°C und 0,5 W je Gel (36 V) und anschließend für 4 h 30 min und 15 W je Gel (290 V) bis sich die Bromphenolblau-Lauffront im unteren Bereich des Gels befand.

3.2.4.8.6 Scannen und Auswerten der 2D-DIGE-Gele

Die Gele wurden mittels des Typhoon Trio Scanners mit den Einstellungen aus Tabelle 3-9 bei einer Auflösung von 100 µm (Pixelgröße) eingescannt.

Tabelle 3-9 : Einstellung für das Scannen von 2D-DIGE-Gelen

Farbstoff	Laser	Filter
Cy2	Blau (488 nm)	520 nm BP 40
Cy3	Grün (532 nm)	580 nm BP 30
Cy5	Rot (633 nm)	670 nm BP 30

Dabei sollten sich die intensivsten *Spots* nicht in der Sättigung befinden und der Unterschied zwischen den Farbstoffen bzw. Gelen sollte nicht zu groß sein. Die Gelbilder wurden für die Auswertung im Gelformat gespeichert.

Die 2D-Gele wurden mit der Software DeCyder™ Version 5.0 ausgewertet. Bei der Detektion der Proteinspots der 2D-Gele im DIA-Modul (Differentielle *In-Gel* Analyse) wurde der Parameter *Estimated number of Spots* auf 100000 eingestellt. Nach der Detektion der *Spots* wurden die korrespondierenden DIA-Dateien in ein BVA-Modul (Biologische Varianz Analyse) importiert und ausgewertet. Bei der BVA-Auswertung wurden die Gelbilder den verschiedenen Gruppen (interner Standard, Probe A und Probe B) zugeordnet und die jeweiligen drei Replikate miteinander verglichen (Gruppe 1: Gel 1, 2 und 3; Gruppe 2: Gel 4, 5 und 6; Gruppe 3: Gel 7, 8 und 9; Gruppe 4: Gel 10, 11 und 12). Das Programm DeCyder™ errechnete anschließend automatisch die Regulationen mit Signifikanzen. Proteinspots die innerhalb der drei biologischen Replikate eine Regulation von 1,3 oder mehr ($\leq -1,3$ oder $\geq 1,3$) und ein Wert von unter 0,05 im Student t-Test bei einem Vergleich der drei biologischen Replikate aufwiesen, wurden als signifikant verändert bewertet. Proteinspots mit $p < 0,05$ wurden manuell überprüft, um eventuelle Artefakte aus der Analyse auszuschließen.

3.2.4.8.7 Silberfärbung zur Proteinspot-Identifizierung

Um die Proteine zu identifizieren, die eine Veränderung in ihrer Expression aufweisen, wurden die Gele nach quantitativer Auswertung mit dem folgenden Protokoll gefärbt (Tabelle 3-10). Die Färbung mit Silber ist eine der sensitivsten Färbemethoden, um Proteine in einem Gelsystem sichtbar zu machen und diese anschließend für nachfolgende Analysen auszustanzen.

Tabelle 3-10: Protokoll für die Silberfärbung von 2 Gelen

Schritt	Behandlung	für 2 Gele	Zeit
Fixierung	50 % Methanol 12 % Essigsäure	500 ml Methanol 120 ml Essigsäure 380 ml H ₂ O bidest.	1 h; ÜN
Waschen	50 % Ethanol	300 ml Ethanol 300 ml H ₂ O bidest.	3 x 20 min
Sensitizer	0,2 g/l Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	80 mg Na ₂ S ₂ O ₃ 400 ml H ₂ O bidest.	1 min
Waschen	H ₂ O bidest.		1 min
Silberfärbung	2 g/l Silbernitrat (AgNO ₃) 0,075 % Formaldehyd (37 %)	200 mg AgNO ₃ 100 ml H ₂ O bidest. 75 µl Formaldehyd	30 min-1 h
Spülen	H ₂ O bidest.		15-30 sec
Entwickeln	30 g/l Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) 1,25 mg/l Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃) 0,025 % Formaldehyd (37 %)	30 g Na ₂ CO ₃ 999,625 ml Aqua bidest 125 µl einer 10 % Na ₂ S ₂ O ₂ -Lösung 250 µl Formaldehyd	ungefähr 10 min
Stoppen	12 % Essigsäure 50 % Methanol	500 ml Methanol 120 ml Essigsäure 380 ml H ₂ O bidest.	10 min
Lagern	1 % Essigsäure	10 ml Essigsäure 1990 ml H ₂ O bidest.	

3.2.4.8.8 Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse

Die zu identifizierenden *Spots* wurden mit einer Pipettenspitze ausgestanzt, in ein 1 ml-Reaktionsgefäß gegeben und bis zur Analyse in H₂O bidest. bei -20°C gelagert.

Der tryptische Verdau und die anschließende Identifizierung erfolgten in der *Proteomics Core Facility* des Helmholtz-Zentrums München (Sarioglu et al., 2006). Hier wurden die Gelspots mit 15 mM K₃Fe(CN)₆ und 50 mM Na₂S₂O₃ entfärbt. Anschließend wurden die Gelstücke für 15 min in einem Waschpuffer (50 mM NH₄HCO₃ in 30 % Acetonitril (ACN)) gewaschen. Nach einem Äquilibrierungsschritt in 10 mM in NH₄HCO₃ wurden die Gelstücke zweimal mit 10 mM NH₄HCO₃ rehydriert. Die Proben wurden mit 0,1-0,2 ng modifiziertem Trypsin (SIGMA, 10 ng/µl in 50 mM NH₄HCO₃) ÜN bei 37°C verdaut. Der Überstand wurde gesammelt und mit den Eluaten der anschließenden Elutionsschritte (80 % v/v ACN, 1 % v/v Trifluoressigsäure (TFA)) vereinigt. Die vereinigten Eluate wurden in einer SpeedVac Zentrifuge (SpeedVac, Thermo Science) getrocknet.

Die getrockneten Proben wurden in 20 µl 50 % v/v ACN, 0,1 % v/v TFA für die nachfolgende MALDI-Analyse resuspendiert.

3.2.4.8.9 MALDI-MS-Analyse

Nach dem Verdau wurden die Peptidgemische mit einer Trägermatrix auf einem Probenträger für die Messung kokristallisiert und im MALDI-Massenspektrometer analysiert. Hierfür wurden von der Probe 0,5 µl auf einen Edelstahl-MALDI-Probenträger getropft. Verwendet wurden dabei 0,5 µl einer Matrix-Lösung bestehend aus 5 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA, Bunker, Bremen, Deutschland). Die Messung erfolgte mit einem Proteomics Analyzer 4700 Massenspektrometer (MALDI-TOF/TOF) (Applied Biosystems, Framingham, USA). Die Daten wurden im Positiv-Reflektor-Modus mit einem 355 nm Nb:YAG-Laser bei einer Ionen-Beschleunigungs-Spannung von 20 kV gemessen.

Der Massenbereich (*mass range* = m/z 900-4000) wurde mit dem Peptid-Kalibrierstandard III (Applied Biosystems) kalibriert. Für jedes MS- und MS/MS-Spektrum wurden 3000 Laserschüsse akkumuliert. In Abhängigkeit der Daten wurden die 8 häufigsten Ionen (ohne die Massen von autolytischen Produkten von Trypsin und bekannten Keratin-Peptid-Massen) für weitere MS/MS-Analysen ausgewählt. Die erworbenen MS/MS-Spektren wurden mit der Protein Pilot Software 3.0 analysiert. Die Datenbanksuche erfolgte mit MASCOT (Version 2.3.02) auf der Basis der humanen Datenbank UniRef100 (aktualisiert April 2011; 12831896 Sequenzen, 4517045117 Rückstände).

3.2.4.8.10 LC-MS/MS-Analyse

Bei nicht erfolgreicher Identifizierung durch MALDI-MS wurden zusätzlich LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie) Spektren generiert. Der hierfür notwendige Verdau erfolgte wie in 3.2.3.8.8 beschrieben. Die verdauten Peptide wurden mittels *reverse phase* Chromatographie (PepMap, 15 cm \times 75 µm ID, 3 µm/100 Å Porengröße) getrennt. Dies erfolgte durch Nano-HPLC (Ultimate 3000, Dionex) mit einer Flussrate von 250 nl/min. Der binäre Trennungsgradient wurde aus Lösung A (97,9 % HPLC-H₂O, 2 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure) und B (98 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure und 1,9 % HPLC-H₂O) erzeugt, wobei der zeitliche Verlauf in Tabelle 3-11 dargestellt ist.

Tabelle 3-11: Nano-HPLC Gradientenverlauf

Zeit (min)	Lösung A (%)	Lösung B (%)
0-140	98-70	2-30
140-150	69-5	31-95
151-160	5	95

Die Nano-HPLC wurde mittels eines Orbitrap (LTQ Orbitrap XL) Massenspektrometers (ThermoFisher, Bremen, Deutschland) durchgeführt, das mit einer nano-ESI-Quelle ausgestattet ist. Die Aufnahmen der MS-Spektren erfolgten in einem Bereich von 300 bis 1500 m/z . Die verwendete Methode erlaubt, je nach Signalstärke, die sequenzielle Isolation der maximal zehn intensivsten Ionen. Hochauflösende MS-Scans in der Orbitrap und MS/MS-Scans wurden in der linearen Ionenfalle parallel durchgeführt. Die Ziel-Peptide, die bereits für MS/MS ausgewählt worden waren, wurden dynamisch für 30 s ausgeschlossen. Die Massenspektrometrie erfolgte bei einer Elektrospray-Spannung von 1,25-1,4 kV, wobei kein Mantel- und Hilfs-Gasstrom verwendet wurde. Die Ionenauswahlschwelle betrug für die MS/MS-Analyse einen Zahlenwert von 500, eine Aktivierung von 0,25 (Q-Wert) und die Aktivierungszeit von 30 ms. Alle MS/MS-Spektren wurden mit Mascot (Matrix Science (Version: 2.2.06)) analysiert. Die Mascot-Suche erfolgte auf der Basis der humanen Datenbank *Swiss-Prot* (aktualisiert Mai 2011; 529056 Sequenzen, 187423367 Rückstände). Iodacetamid-Derivate von Cystein wurden als stabile und die Oxidation von Methionin sowie die Desaminierung von Arginin und Glutamin wurden als variable Modifikationen in Mascot angegeben. Die Scaffold Software (Version Scaffold_2_02_03, Proteome Software Inc., Portland, OR) wurde verwendet, um MS/MS Peptid- und Protein-Identifikationen zu validieren. Ein Protein wurde als identifiziert angesehen, wenn die Wahrscheinlichkeit bei mehr als 95,0 % lag und mindestens zwei identifizierte Peptide enthielt. Die Protein-Wahrscheinlichkeiten wurden durch den Protein-Prophet-Algorithmus zugeordnet (Nesvizhskii et al., 2003). Anschließend erfolgte die Auswertung durch eine bioinformatische Sequenzdatenbanksuche.

3.2.4.8.11 Analyse mittels Proteindatenbanken

Die Recherche der biologischen Funktion der signifikant veränderten Proteine (Kandidatenproteine) erfolgte primär in der *Swiss-Prot* Datenbank. Außerdem wurden in der

(bio)medizinischen Datenbank Pubmed mit entsprechenden Verknüpfungen der Schlagworte thematisch passende Publikationen recherchiert, welche sich mit den Kandidatenproteinen im Zusammenhang mit Bestrahlung und Zellstress beschäftigten. Das internetbasierte Analyseprogramm *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity® Systems, Redwood City, California, USA; www.ingenuity.com) wurde genutzt, um die Kandidatenproteine in einem oder mehreren Netzwerken zusammenzuführen. Die Analyse ermittelt anhand vorliegender Veröffentlichungen mit welchen weiteren Proteinen die Fokusproteine verbunden sind. Hierfür wird eine Microsoft Excel Datei mit der *Swiss-Prot*-Zugangsnummer aller signifikant veränderten Proteine (Kandidatenproteine) einschließlich der relativen Expressionsänderungen erstellt und in das Programm geladen. Diese Zugangsnummern werden von der IPA-Applikation erkannt und anschließend, basierend auf Informationen aus der Ingenuity Signalweg Informationsbank (*Ingenuity Pathways Knowledge Base*), in ein globales molekulares Netzwerk übertragen. Der exakte Chi-Quadrat-Test wurde zur Abschätzung der Signifikanz der gefundenen Netzwerke verwendet. Die Punktzahl jedes Netzwerkes gibt einen numerischen Wert an, der dessen Relevanz und die Größe des Netzwerkes, basierend auf der Anzahl an Proteinen im Datensatz, angibt.

3.2.4.9 Human Apoptosis Array mittels Proteome Profiler™ Array

Array-Puffer 1, 2 und 3	21 ml Array-Puffer 1; 21 ml Array-Puffer2, 5 x Wash Conc. und 21 ml Array-Puffer 3
Lyse-Puffer	21 ml Lysis Buffer 15 (Bestandteil des Kits)
Waschpuffer-Puffer 1, 2 und 3	42 ml 25 x Wash Buffer Conc. (Bestandteil des Kits)
Detektionsantikörper	Detection Antibody Cocktail (Bestandteil des Kits)
Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP (Bestandteil des Kits)

Die Verwendung des *Proteome Profiler™*-Arrays (R&D Systems) ermöglicht es, die relative Menge verschiedener apoptoserelevanter Proteine innerhalb einer Probe gleichzeitig zu bestimmen. Der *Human Apoptosis Array* wurde nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Materialien und Reagenzien durchgeführt. Auf der Nitrozellulose-Membran befanden sich insgesamt 35 verschiedene Antikörper sowie 3 Positiv-Kontrollen und eine Negativ-Kontrolle in Duplikaten. Aus dem Zellsediment wurde nach Herstellerangaben ein Lysat hergestellt. Die Nitrozellulose-Membranen wurden anschließend ÜN mit diesen verdünnten Proteinlysaten bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die in der zu untersuchenden Probe vorhandenen Proteine

3. Material und Methoden

binden dabei an den immobilisierten Erstantikörper auf der Membran. Der Array wurde gewaschen, um die ungebundenen Proteine zu entfernen, und anschließend mit einem Gemisch biotinylierter Detektions-Antikörper inkubiert. Der Antikörper-Proteinkomplex wurde letztendlich mit Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) und mit ECL-Substratlösung nachgewiesen. Das durch die Chemolumineszenz hervorgerufene Signal auf der Membran wurde mittels des Alpha Imager System (*Alpha Innotec Corp.*, USA) detektiert. Zur Auswertung der Bilder und zur Quantifizierung der Signale wurde das Analyseprogramm TotalLab TL100 verwendet. Eine Normierung erfolgte anhand der sechs Positiv-Kontrollen.

Tabelle 3-12: Antikörper auf dem Human Apoptosis Array (R&D Systems)

Auf dem Array gespottete Proteine		
Bad	TRAIL R1/DR4	PON2
Bax	TRAIL R2/DR5	p21/CIP1/CDNK1A
Bcl-2	FADD	p27/Kip1
Bcl-x	Fas/TNFSF6	Phospho-p53 (S15)
Pro-Caspase-3	HIF-1 alpha	Phospho-p53 (S46)
Cleaved Caspase-3	HO-1/HMOX1/HSP32	Phospho-p53 (S392)
Catalase	HO-2/HMOX2	Phospho-Rad17 (S635)
clAP-1	HSP27	SMAC/Diablo
clAP-2	HSP60	Survivin
Claspin	HSP70	TNF RI/TNFRSF1A
Clusterin	HTRA2/Omi	XIAP
Cytochrome c	Livin	PBS (Negativ-Kontrolle)

3.2.4.10 Bioinformatische Vorhersage von Ziel-mRNAs der untersuchten miRNAs

Die bioinformatische Analyse der potentiellen Zielgene von miRNAs wurde mit Hilfe einer Konsens-Methode aus vier verschiedenen miRNA-Ziel-Vorhersage-Tools durchgeführt. Neben TargetScanS (<http://www.targetscan.org/>) (Lewis et al., 2005, Grimson et al., 2007) und PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de>) (Krek et al., 2005, Lall et al., 2006) wurden Vorhersagen aus Pita (Kertesz et al., 2007) und RNA22 (Miranda et al., 2006, Sturm et al., 2010) verwendet. Von allen Vorhersagen wurden nur solche als relevant erachtet, die durch mindestens zwei verschiedene Algorithmen unabhängig voneinander diagnostiziert wurden. Des Weiteren wurden die Ergebnisse weiter eingegrenzt, indem Literaturrecherchen zu bereits bekannten Zusammenhängen zwischen veränderten miRNAs und publizierten Zielgenen nach ionisierender Strahlung durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurde eine Gene Ontology (GO) Analyse mit dem R-Paket GoStats durchgeführt (Camon et al., 2004). Zur Korrektur für multiples Testen

wurde die Benjamini-Hochberg Prozedur verwendet (Hochberg und Benjamini, 1995), wobei eine Veränderung als signifikant gewertet wurde, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war.

3.2.4.11 Statistik

Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte +/- des mittleren Standardfehlers dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student t-Tests bei zwei Gruppen. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung von microRNA-vermittelten Prozessen in der zellulären Strahlenantwort in immortalisierten Endothelzellen

4.1.1 Funktion von Dicer und Argonaut-2 in der zellulären Strahlenantwort von EA.hy926 Zellen

Dicer ist ein wichtiges Enzym bei der miRNA Prozessierung. Argonaut-2 (Ago2) trägt zur Prozessierung und Stabilität von miRNAs bei und stellt die katalytische Untereinheit des miRISC-Komplexes dar. Zur Analyse der funktionellen Auswirkungen einer globalen miRNA-Repression auf die Strahlenantwort wurden die miRNA-prozessierenden Enzyme Dicer und Ago2 herunterreguliert. Hierfür wurde die Endothelzelllinie EA.hy926 mit chemisch synthetisierten siRNA-Oligonukleotiden entweder gegen Dicer oder Ago2 transfiziert. Als Kontrolle wurden EA.hy926 Zellen mit einer Kontroll-siRNA transfiziert (siKontrolle). Die Herunterregulierung von Dicer und Ago2 wurde mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass 48 h nach Transfektion mit siRNA die Proteinmenge von Dicer 2 % und die Proteinmenge von Ago2 24 % verglichen mit der Menge an Protein in den Kontrollen betrug (Abb. 4-1).



Abb. 4-1: Herunterregulierung von Dicer und Ago2 in EA.hy926 Zellen mittels RNAi. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet, um die Effizienz der siRNA-vermittelten Herunterregulierung von Dicer und Ago2 zu bestimmen. Die Proteinmenge von Dicer und Ago2 wurde mittels Western-Blot detektiert. Hierfür wurden Proteinextrakte von Kontroll-siRNA (siKontrolle)-, siDicer- und siAgo2-transfizierten Zellen analysiert. Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle. Die Ziffern bezeichnen die relative Intensität der entsprechenden Bande im Vergleich zur Kontrollbande nach der Normalisierung mit der Beladungskontrolle (Aktin).

Zur funktionellen Analyse der Dicer- und Ago2-Herunterregulierung wurde die Expression von miRNAs mittels Echtzeit-PCR detektiert. Hierfür wurden vier miRNAs ausgewählt (miR-10b, miR-101, miR-518b und miR-523-5p), die in untransfizierten EA.hy926 Zellen unterschiedlich stark exprimiert werden. Die Quantifizierung dieser miRNAs mittels Echtzeit-PCR und spezifischen Primern für die reifen miRNAs zeigte eine deutliche Verminderung aller vier miRNAs (Abb. 4-2). Dies lässt auf eine globale Reduktion des zellulären miRNAs Gehaltes nach Dicer- und Ago2-Herunterregulierung schließen.

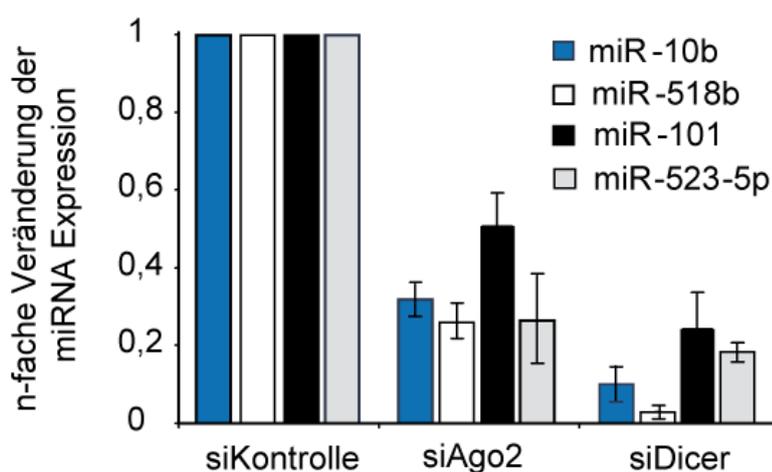


Abb. 4-2: Expression ausgewählter miRNAs nach Herunterregulierung von Dicer oder Ago2 mittels Echtzeit-PCR. EA.hy926 Zellen wurden vor der RNA-Isolation für 48 h mit Kontroll-siRNA (siKontrolle), siDicer oder siAgo2 transfiziert. Anschließend wurde die Expression von vier miRNAs im Vergleich zu einer Kontrolle (RNU44), einer snoRNA, die nicht mittels Dicer/Ago2 prozessiert wird, bestimmt. Die Ergebnisse zeigen einen Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Um sicherzustellen, dass weder die Dicer- noch die Ago2-Expression durch ionisierende Strahlung verändert wird, wurden der Proteingehalt der beiden Proteine 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy im Western-Blot untersucht. Abbildung 7-1 A (Anhang) zeigt, dass EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung mit 2,5 Gy weder zum Zeitpunkt von 4 h noch zum Zeitpunkt von 24 h eine Veränderung in der Dicer- oder Ago2-Expression aufwiesen.

Anschließend wurden Dicer- und Ago2-herunterregulierte EA.hy926 Zellen in Bezug auf ihre Strahlenempfindlichkeit analysiert. Hierfür wurde zuerst der Einfluss der Herunterregulierung von Dicer oder Ago2 auf die Proliferation von EA.hy926 Zellen untersucht. Abbildung 4-3 zeigt, dass die Herunterregulierung von Dicer oder Ago2 in dem untersuchten Zeitraum von 72 h keinen Einfluss auf das Zellüberleben im Vergleich zu den siKontrolle-transfizierten EA.hy926 Zellen hatte.

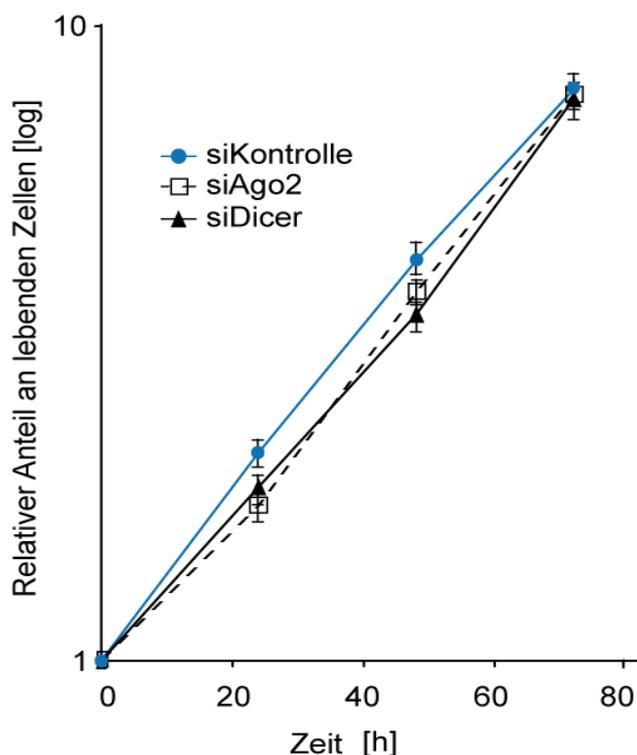


Abb. 4-3: Zellproliferation von Dicer- und Ago2-depletierten EA.hy926 Zellen. Das Wachstum von EA.hy926 Zellen wurde 48 h nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (siKontrolle), siDicer oder siAgo2 in einem Zeitraum von 72 h ermittelt. Das Diagramm zeigt das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Um das Zellüberleben nach Bestrahlung zu bestimmen, wurde die metabolische Aktivität von Dicer- und Ago2-depletierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle bestimmt. Hierfür wurden EA.hy926 Zellen mit siDicer oder siAgo2 transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit Dosen von 0,5, 2,5 und 5 Gy bestrahlt. Die metabolische Aktivität wurde 5 d nach Bestrahlung mittels MTT-Assay analysiert (Abb. 4-4). Sowohl Ago2- als auch Dicer-herunterregulierte Zellen zeigten nach der Bestrahlung eine reduzierte metabolische Aktivität verglichen mit den Kontrollzellen. Eine erhöhte Sensitivität zeigte sich bei Dicer- und Ago2-depletierten Zellen schon nach der kleinsten Dosis (0,5 Gy). So verringerte sich die metabolische Aktivität bei siAgo2-transfizierten Zellen nach 0,5 Gy auf 89 % und bei siDicer-transfizierten Zellen auf 79 %, während die siKontroll-transfizierten Zellen eine Restaktivität von 95 % verglichen mit den unbestrahlten Proben zeigten. Nach einer Dosis von 5 Gy betrug die metabolische Aktivität in den Kontrollen 45 %, nach der Herunterregulierung von Dicer oder Ago2 hingegen nur noch ca. 20 %.

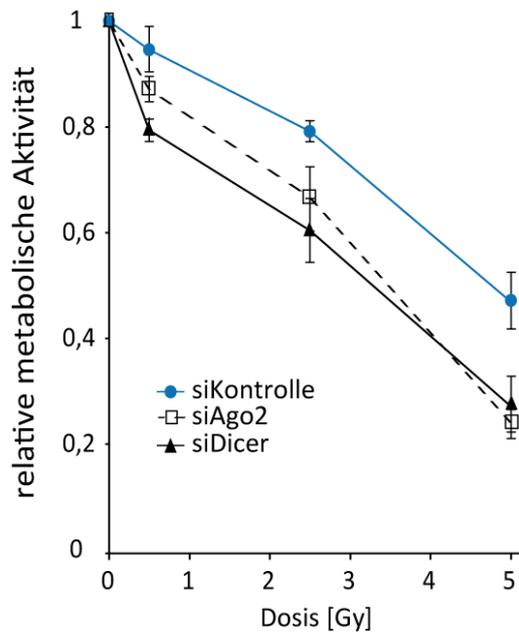


Abb. 4-4: Metabolische Aktivität von Dicer- und Ago2-depletierten EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung. Die metabolische Aktivität wurde 5-7 d nach Bestrahlung mittels MTT-Assays bestimmt. EA.hy926 Zellen wurden 48 h vor Bestrahlung mit den angegebenen Dosen mit siKontrolle, siDicer oder siAgo2 transfiziert. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Zur Bestätigung der erhöhten Strahlenempfindlichkeit von Ago2- oder Dicer-depletierten Zellen wurde das klonogene Überleben nach Bestrahlung mittels eines Koloniebildungstests analysiert. EA.hy926 Zellen wurden dazu 48 h vor der Bestrahlung mit 0,5, 2,5 und 5 Gy mit siRNAs gegen Dicer oder Ago2 transfiziert. Die Analyse der gewachsenen Kolonien erfolgte 5-7 d nach der Bestrahlung. Auch in diesem Überlebenstest konnte eine Reduktion des Zellüberlebens in Ago2- oder Dicer-herunterregulierten Zellen nach Bestrahlung mit den unterschiedlichen Dosen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden (Abb. 4-5).

Das Zellüberleben sank bei 0,5 Gy bei siAgo2- und siDicer-transfizierten Zellen auf unter 80 %, bei den Kontrollen betrug das Überleben 90 %. Nach einer Bestrahlung mit 5 Gy betrug das Zellüberleben in den Kontrollen 11 %, nach der Herunterregulierung von Dicer oder Ago2 hingegen nur noch ca. 5 % bzw. 6 % verglichen mit den unbestrahlten Kontrollen.

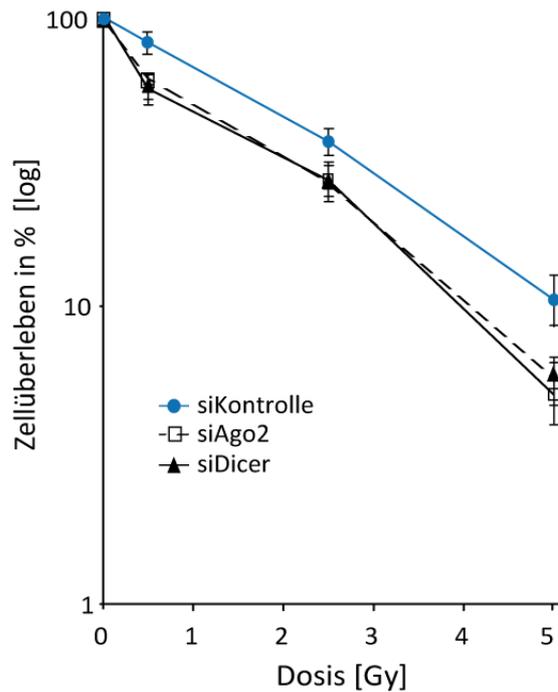


Abb. 4-5: Zellüberleben von Dicer- und Ago2-depletierten EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung. Das Zellüberleben von EA.hy926 Zellen wurde nach Transfektion mit siKontrolle, siDicer oder siAgo2 bestimmt. Der Koloniebildungstest wurde 5-7 d nach einer Bestrahlung mit 0,5, 2,5 und 5 Gy analysiert. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Proteine Ago2 und Dicer ohne Bestrahlung keinen Einfluss auf das Zellüberleben der endothelialen Zelllinie EA.hy926 haben. Im Gegensatz dazu ist das Überleben von Zellen nach Bestrahlung im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert, wenn diese zuvor mit siDicer oder siAgo2 transfiziert worden waren. Da eine Herunterregulierung der Proteine Dicer und Ago2 zu einem verringerten Gehalt an miRNAs in der Zelle führt und die Hauptfunktion dieser Enzyme in der Prozessierung von miRNAs liegt, legt die erhöhte Strahlungssensitivität nahe, dass miRNAs wichtige Funktionen in der Strahlenantwort ausüben.

4.1.2 Untersuchung der Strahlenantwort in Dicer- oder Ago2-depletierten EA.hy926 Zellen nach ionisierender Strahlung

Die Aktivierung von Signalwegen, die Reparatur von DNA-Schäden und die Induktion des programmierten Zelltodes stellen kritische Prozesse innerhalb der Strahlenantwort dar. Darum

sollte die Rolle von Dicer und Ago2 in der strahleninduzierten Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten, der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und der Apoptose untersucht werden. Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Propidiumiodid-Färbung der DNA 24 h nach Bestrahlung ermittelt (Abb. 4-6). In nicht bestrahlten Zellen waren keine Unterschiede in der Zellzyklusverteilung zwischen Dicer- und Ago2-herunterregulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zu detektieren. So betrug der prozentuale Anteil von Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen in der G1-Phase ohne Bestrahlung 87 %. Der prozentuale Anteil von siDicer- oder siAgo2-transfizierten Zellen in der G1-Phase lag ohne Bestrahlung ebenfalls bei ca. 85 % (86 % bzw. 85 %). Mit zunehmender Strahlendosis zeigten sowohl Ago2- als auch Dicer-depletierte Zellen eine Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. So lag der prozentuale Anteil von Kontrollzellen (siKontrolle) in der G2/M-Phase nach Bestrahlung mit 10 Gy bei 39 %, in siDicer- oder siAgo2-transfizierten Zellen machte der prozentuale Anteil jedoch 65 % bzw. 67 % des gesamten Zellzyklus aus (Abb. 4-6).

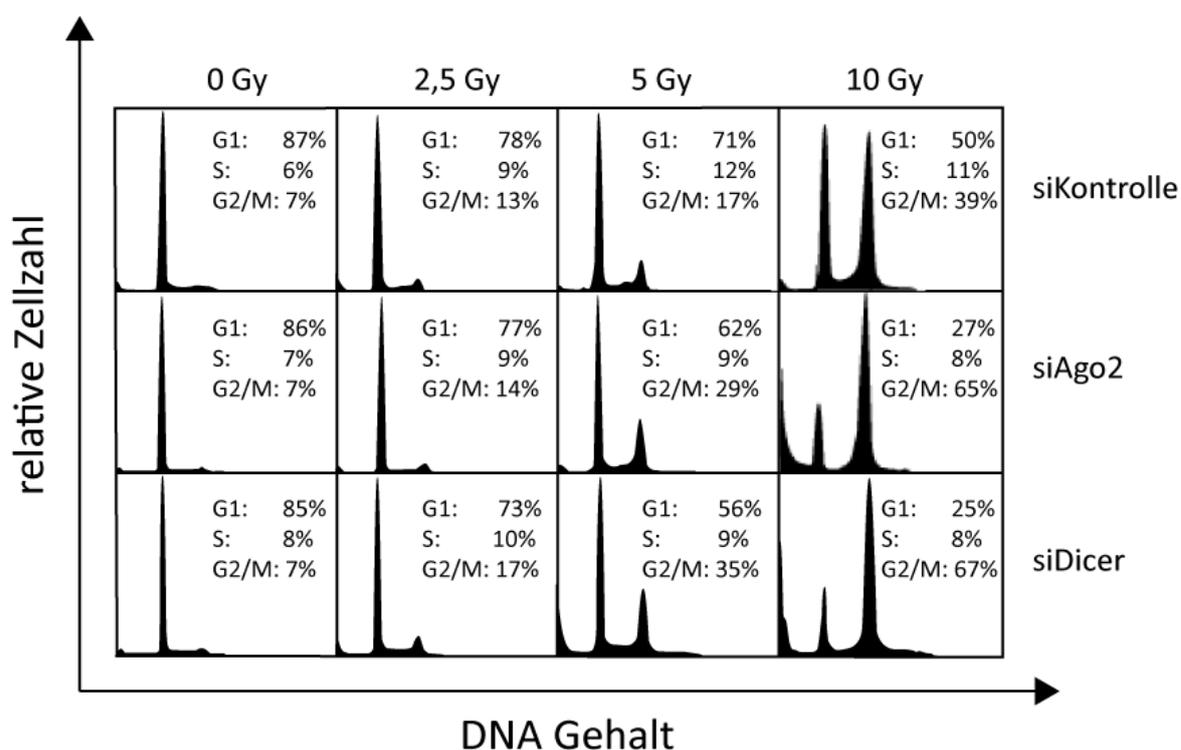


Abb. 4-6: Zellzyklusverteilung in Dicer- oder Ago2-depletierten EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung. Die Zellzyklusverteilung wurde in Zellen analysiert, die zuvor mit Kontroll-siRNA (siKontrolle), siDicer oder siAgo2 transfiziert worden waren. Die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus erfolgte 24 h nach Bestrahlung mit 2,5, 5 oder 10 Gy. Je ein repräsentatives Experiment von dreien ist als Histogramm dargestellt.

Diese Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase ist mit einer verminderten Anzahl von Zellen in der G1-Phase verbunden. So betrug der prozentuale Anteil von Kontrollzellen (siKontrolle) in der G1-Phase nach Bestrahlung mit 10 Gy 50 %, während der Anteil von Zellen in der G1-Phase, die vorher mit siDicer oder siAgo2 transfiziert worden waren, 25 % bzw. 27 % ausmachte (Abb. 4-6).

Der prozentuale Anteil an G1-Phase-Zellen nach einer Bestrahlung mit den unterschiedlichen Dosen ist in Abbildung 4-7 dargestellt. Zwischen unbestrahlten Zellen und Zellen, die mit 2,5 Gy bestrahlt wurden, war nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. siAgo2 oder siDicer kein signifikanter Unterschied zu detektieren. Nach einer Bestrahlung mit 5 Gy bzw. 10 Gy war der Anteil an Zellen, die sich in der G1-Phase befanden, bei einer vorherigen Transfektion mit Kontroll-siRNA signifikant höher als der Anteil an Zellen in der G1-Phase, die vorher mit siDicer oder siAgo2 transfiziert worden waren.

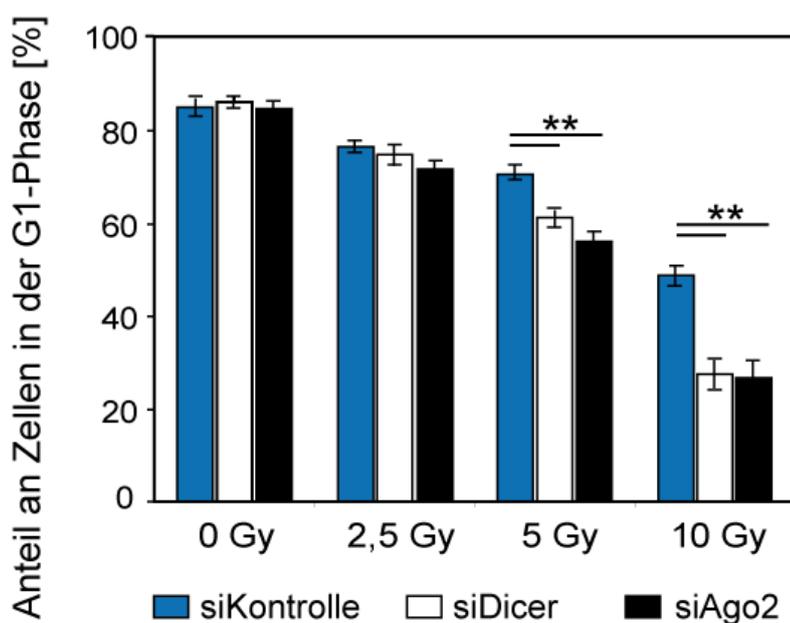


Abb. 4-7: Quantifizierung der humanen Endothelzelllinie EA.hy926 in der G1-Phase 24 h nach der Bestrahlung. 24 h nach Bestrahlung wurde der prozentuale Anteil an EA.hy926 Zellen in der G1-Phase in Kontroll-siRNA (siKontrolle), siDicer- oder siAgo2-transfizierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. SD und die Signifikanz der Proben wurde durch den Student t-Tests ermittelt, wobei * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$ entspricht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Berechnet man aus den prozentualen Anteilen die n-fache Änderung in der G1-Phase, ergibt sich nach einer Bestrahlung mit 10 Gy für siKontroll-transfizierte Zellen eine 1,6-fache Reduktion der G1-Phase, für siDicer bzw. siAgo2 eine 3,2-fache bzw. eine 3,1-fache Reduktion der G1-Phase im

Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Dies deutet entweder auf eine Beeinträchtigung der Aktivierung des G1/S-Kontrollpunktes oder auf einen ausgeprägten G2/M-Block durch DNA-Schädigung hin, nachdem Ago2 und Dicer herunterreguliert worden waren.

Um zu ermitteln, ob die stärkere Reduktion von Zellen in der G1-Phase in Ago2- bzw. Dicer-depletierten Zellen nach Bestrahlung auf eine fehlerhafte Induktion des G1/S-Kontrollpunktes zurückzuführen ist, wurde die Aktivierung von wichtigen Proteinen des G1/S-Kontrollpunktes im Western-Blot untersucht. Die Signalkaskade zur Aktivierung des G1/S-Kontrollpunktes beinhaltet die Phosphorylierung von Chk-2 und die Stabilisierung von p53. Diese Stabilisierung induziert anschließend die Expression des CDK-Inhibitorproteins p21. Es zeigte sich, dass sowohl für Ago2-depletierte Zellen (Abb. 4-8 A) als auch für Dicer-depletierte Zellen (Abb. 4-8 B) nach Behandlung mit ionisierender Strahlung keine Akkumulation des p21-Proteins nachweisbar war. Diese fehlende Akkumulation des CDK-Inhibitors konnte jedoch nicht auf eine gestörte Phosphorylierung von Chk-2 am Threonin 68 (p-Chk-2 (Thr68)) oder einem Defizit in der Stabilisierung von p53 zurückgeführt werden. MiRNAs scheinen daher nach Behandlung der EA.hy926 Zellen mit ionisierender Strahlung erst nach der p53-Stabilisierung einen Einfluss auf die Signalkaskade zur Zellzyklus-Checkpoint Aktivierung zu haben.

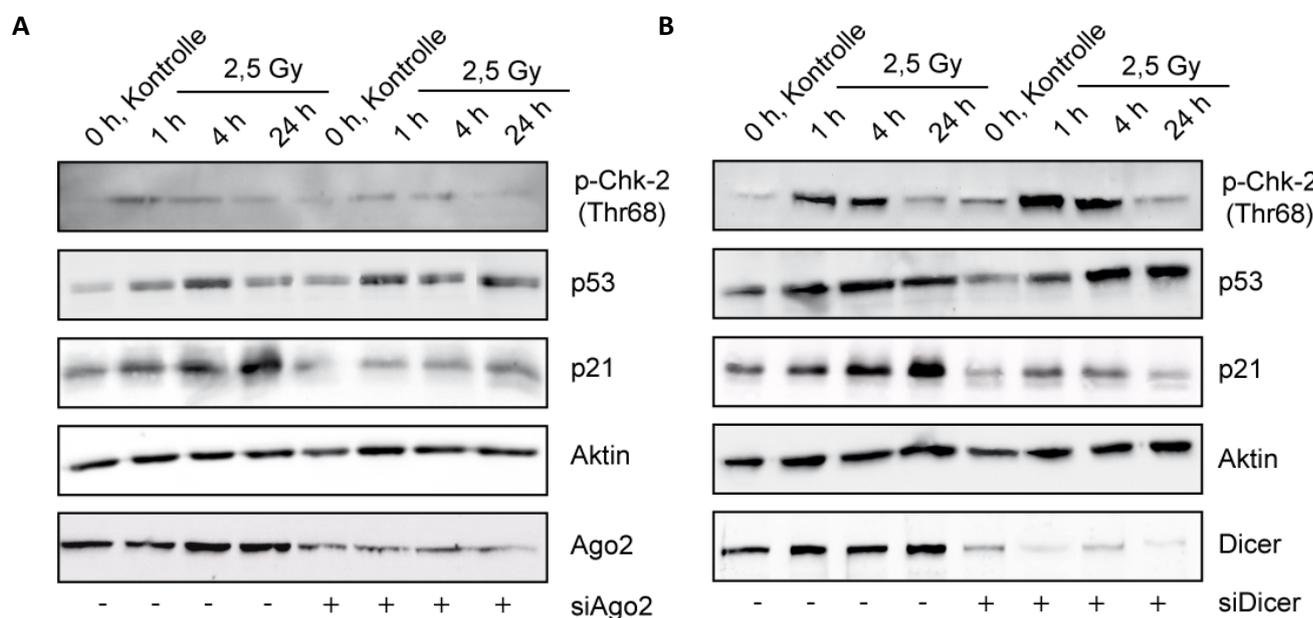


Abb. 4-8: Untersuchung der Expression und Stabilisierung von Proteinen des Zellzyklus nach Dicer- bzw. Ago2-Herunterregulierung in EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung. Die Detektion der Zellzyklus relevanten Proteine Phospho (p)-Chk-2 (Thr68), p53 und p21 erfolgte in Ago2- (A) und Dicer-depletierten Zellen (B) 1 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung durch Western-Blot-Analysen. Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle. Ein repräsentativer Blot von dreien wird gezeigt.

Die durchgeführten Zellzyklusanalysen deuten nach Ago2- und Dicer-Herunterregulierung bereits 24 h nach Bestrahlung auf einen erhöhten Anteil an Zellen mit einem verminderten DNA-Gehalt hin, was auf eine erhöhte Apoptose hinweist. Daher wurden 48 h nach Bestrahlung weitere durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen durchgeführt. Durch die DNA-Fragmentierung, die während der Apoptose auftritt, nimmt der DNA-Gehalt im Vergleich zu vitalen Zellen ab. Deshalb zeigen apoptotische Zellen nach Färbung der DNA ein geringeres Fluoreszenzsignal als die Zellpopulationen der einzelnen Zellzyklusphasen. Apoptotische Zellen sind somit als sog. SubG1-Fraktion im Histogramm nachweisbar (Abb. 4-9).

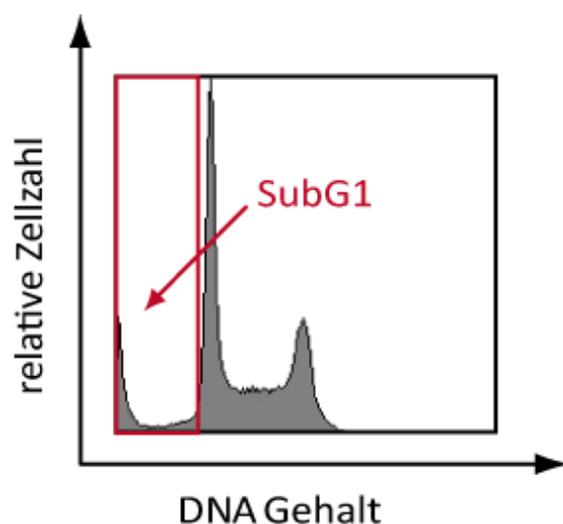


Abb. 4-9: Beispielhaftes Histogramm der Zellzyklusanalyse von EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy. Der SubG1-Phase wurden Zellen mit einem DNA-Gehalt zugeordnet, der geringer als die G1-Phase war.

Um die Apoptoserate in Ago2- und Dicer-herunterregulierten Zellen nach Bestrahlung zu messen, wurde die Menge an Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometer bestimmt und mit den siKontrolle-transfizierten Zellen verglichen. Hierbei zeigte die Zellzyklusverteilung 48 h nach der Bestrahlung sowohl für Ago2- als auch für Dicer-depletierte Zellen einen signifikanten Anstieg der Zellen in der SubG1-Phase. In Kontroll-transfizierten Zellen befanden sich nach Bestrahlung 11 % (5 Gy) und 18 % (10 Gy) der Zellen in der SubG1-Phase, während in Dicer- und Ago2-herunterregulierten Zellen 20-22 % (5 Gy) bzw. 32-36 % (10 Gy) aller gemessenen Zellen der SubG1-Phase zugeordnet werden konnten (Abb. 4-10).

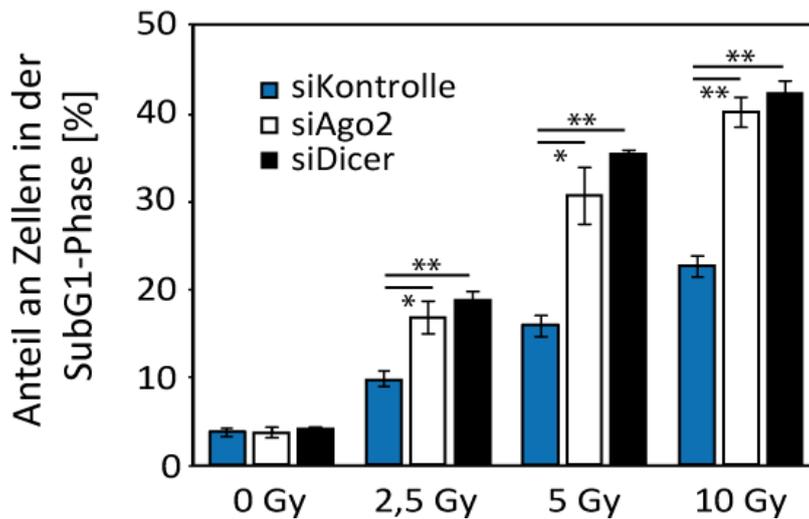


Abb. 4-10: Bestimmung der strahleninduzierten Apoptose in Dicer- und Ago2-herunterregulierten EA.hy926 Zellen. 48 h nach Bestrahlung wurde die apoptotische Zellfraktion mittels SubG1-Analyse in Kontroll-siRNA (siKontrolle)-, siDicer- oder siAgo2-transfizierten Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Fehlerbalken wurden aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD generiert. Die Signifikanz der Proben wurde mittels des Student t-Tests ermittelt, wobei * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$ entspricht.

Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde der programmierte Zelltod in Ago2- und Dicer-herunterregulierten Zellen nach Bestrahlung auch durch die Messung der Caspase-3-Aktivität bestimmt (Abb. 4-11). Hierbei erfolgte die colorimetrische Detektion von aktiven Caspasen mit dem Caspase-3-Substrat Ac-DEVD-pNA. Caspase-3 katalysiert die Hydrolyse von Ac-DEVD-pNA, die zur Freisetzung des pNA-Chromophors führt, welches anschließend mit einem Spektralphotometer gemessen werden kann.

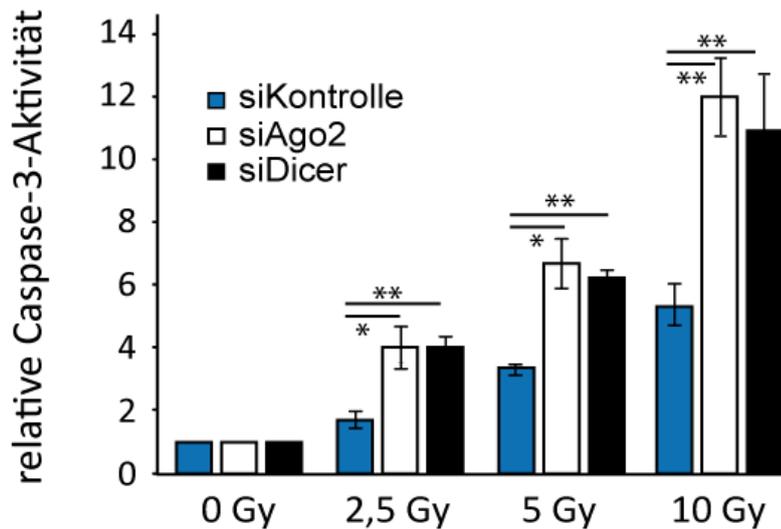


Abb. 4-11: Bestimmung der strahleninduzierten Caspase-3-Aktivität in EA.hy926 Zellen nach Herunterregulierung von Dicer und Ago2. Die relative Apoptoserate in Dicer- oder Ago2-depletierten Zellen wurde durch eine Messung der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen ermittelt. Die Messung der Caspase-3-Aktivität erfolgte 24 h nach Bestrahlung mit den angegebenen Dosen. Die Fehlerbalken wurden aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD ermittelt. Die Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe des Student t-Tests errechnet, wobei * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$ entspricht.

In unbestrahlten Kontrollzellen (siKontrolle) und Ago2- oder Dicer-depletierten Zellen zeigte sich eine ähnliche basale Caspase-3-Aktivität. Vierundzwanzig Stunden nach der Bestrahlung war eine dosisabhängige Erhöhung der Caspase-3-Aktivität in allen Zellen messbar. Es zeigte sich jedoch ein stärkerer Anstieg der Caspase-3-Aktivität in Ago2- und Dicer-herunterregulierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4-11).

DNA-Doppelstrangbrüche stellen die schwerwiegendste DNA-Schädigung nach ionisierender Strahlung dar. Um zu ermitteln, ob die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung in siAgo2- bzw. siDicer-transfizierten Zellen mit einer geringeren Reparatureffizienz von DNA-Doppelstrangschäden zusammenhängt, wurde die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen untersucht. Hierbei wurden Kontrollzellen und siDicer- oder siAgo2-depletierte Zellen bestrahlt und die Anzahl von γ -H2AX-Foci zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Wie Abbildung 4-12 zu entnehmen ist, weist die Reparatur von γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung in siAgo2- bzw. siDicer-herunterregulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen keine veränderte Reparaturkinetik auf. Eine Stunde nach Bestrahlung wurden in allen Zellen ein Maximum von 47-50 γ -H2AX-Foci pro Zelle nachgewiesen. Anschließend erfolgte über 24 h ein kontinuierlicher Rückgang der Anzahl von γ -H2AX-Foci. Vierundzwanzig Stunden nach

Bestrahlung wiesen alle Zellen eine fast vollständige Reparatur der Doppelstrangbrüche auf. Diese Kinetiken lassen darauf schließen, dass weder die Induktion noch die spätere Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche in Ago2- oder Dicer-depletierten Zellen beeinträchtigt ist.

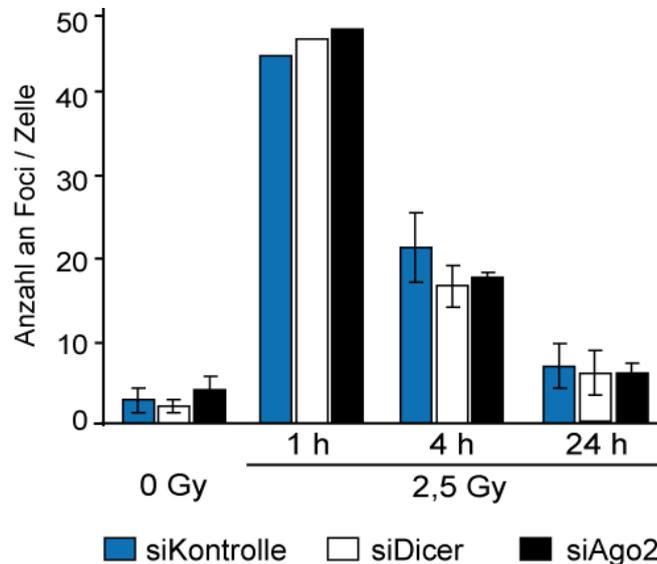


Abb. 4-12: DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in Dicer- oder Ago2-herunterregulierten EA.hy926 Zellen nach der Bestrahlung. Die γ -H2AX-Foci je Nukleus nach Bestrahlung mit 2,5 Gy wurde zu den angegebenen Zeitpunkten am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte von zwei unabhängigen biologischen Replikaten \pm SD. Der Zeitpunkt 1 h nach Bestrahlung wurde einmal analysiert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass nach ionisierender Strahlung Ago2 und Dicer und somit vermutlich auch miRNAs für die Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten und die Induktion von Apoptose in Endothelzellen eine wichtige Rolle spielen, dass sie auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur hingegen keinen Einfluss haben.

4.1.3 Analyse der miRNA-Expression nach ionisierender Strahlung in der humanen Endothelzelllinie EA.hy926

Die Experimente mit Ago2- und Dicer-herunterregulierten EA.hy926 Zellen legen nahe, dass miRNAs eine wichtige Rolle in der Strahlenantwort besitzen. Um festzustellen, welche spezifischen miRNAs an der Strahlenreaktion mitwirken, wurde eine miRNA-Expressionsanalyse von endothelialen EA.hy926 Zellen angefertigt. Dies wurde mittels TaqMan® *Low Density Arrays*

durchgeführt, die eine gleichzeitige Detektion von 378 humanen miRNAs erlauben. Die Messung der miRNAs erfolgte nach 4 h, 12 h und 24 h im Anschluss an eine Bestrahlung mit 2,5 Gy. Anschließend wurden die veränderten miRNAs zu den angegebenen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle analysiert. Hierfür wurden die Expressionsstärken der miRNAs zuerst mittels einer endogenen Kontrolle (U6), die sich ebenfalls auf dem Array befand, normalisiert. U6 ist eine kleine snoRNA, die im Gegensatz zu miRNAs nicht über Dicer und Ago2 prozessiert wird. Anschließend wurden die normalisierten Werte jeder einzelnen miRNA mit den normalisierten Werten der passenden Kontrolle verrechnet. MiRNAs wurden als signifikant verändert erachtet, wenn der p-Wert aus drei unabhängigen Experimenten $< 0,05$ war und sie eine Regulation $< 0,5$ oder > 2 im Vergleich zu den unbestrahlten Proben aufwiesen.

In Abbildung 4-13 sind alle miRNAs aufgeführt, die 4 h nach der Bestrahlung eine signifikante Expressionsänderung im Vergleich zu den unbestrahlten Proben aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt zeigten 22 miRNAs eine signifikante Deregulierung, wobei die Expression von 14 miRNAs herunterreguliert (grüne Balken) und von acht miRNAs erhöht war (rote Balken).

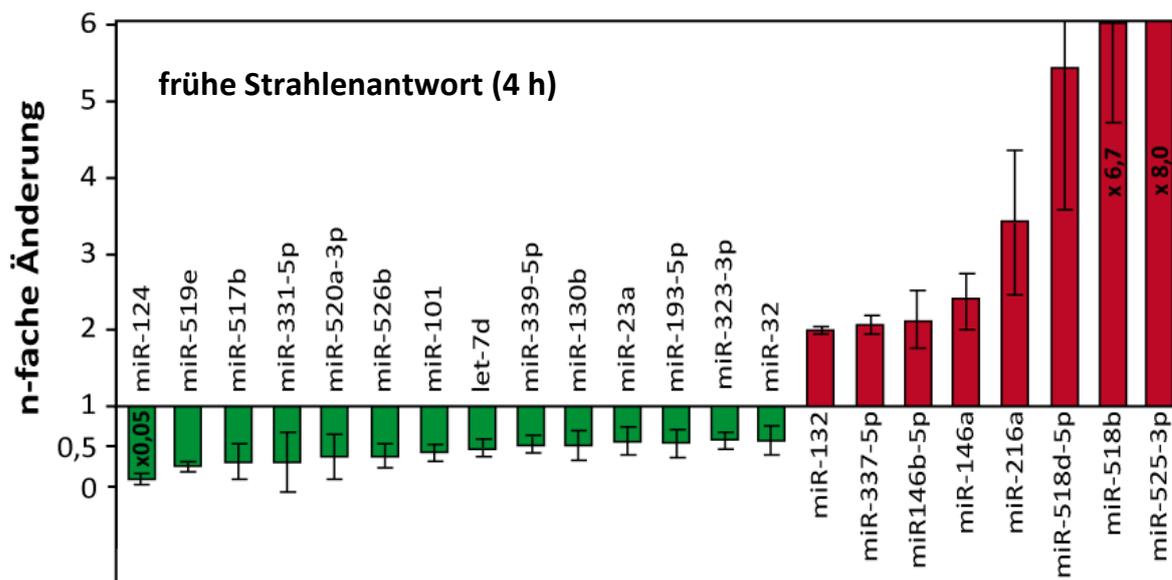


Abb. 4-13: MiRNA-Expressionsprofil der frühen Strahlenantwort in EA.hy926 Zellen nach ionisierender Strahlung. Differenziell exprimierte miRNAs wurden 4 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy analysiert ($p < 0,05$). Hochregulierte miRNAs sind in rot, herunterregulierte miRNAs in grün dargestellt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten \pm SD.

Zwölf Stunden nach Bestrahlung mit 2,5 Gy zeigten 33 miRNAs eine signifikante Veränderung ($< 0,5$ oder > 2) in ihrer Expression im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen. Hiervon waren 14 miRNAs hochreguliert (rote Balken), während 19 miRNAs eine Herunterregulierung erfahren haben (Abb. 4-14).

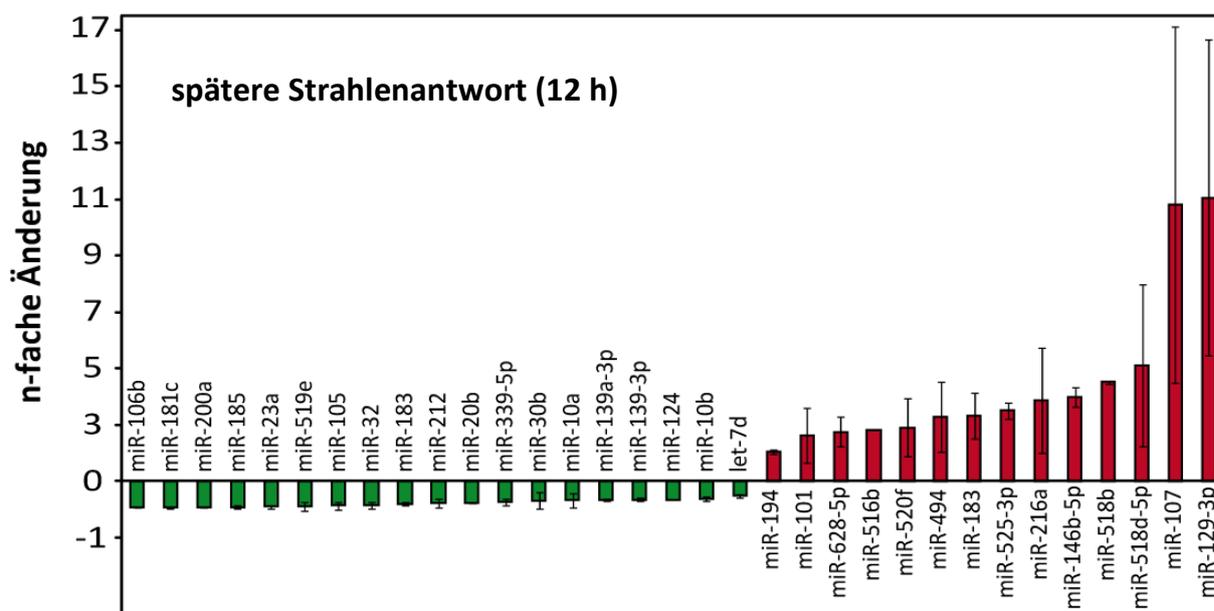


Abb. 4-14: MiRNA-Expressionsprofil der späteren Strahlenantwort in EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung. Nach 2,5 Gy Bestrahlung wurden alle differentiell exprimierten miRNAs nach 12 h im Vergleich zu den unbestrahlten Proben untersucht ($p < 0,05$). Im Diagramm werden höher exprimierte miRNAs in rot, niedriger exprimierte miRNAs in grün gezeigt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten \pm SD.

Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung mit 2,5 Gy zeigten 22 miRNAs eine signifikante Veränderung ($< 0,5$ oder > 2) in ihrer Expression im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen. Hiervon waren vier miRNAs hochreguliert (rote Balken), während 19 miRNAs eine Herunterregulierung zeigten (grüne Balken) (Abb. 4-15).

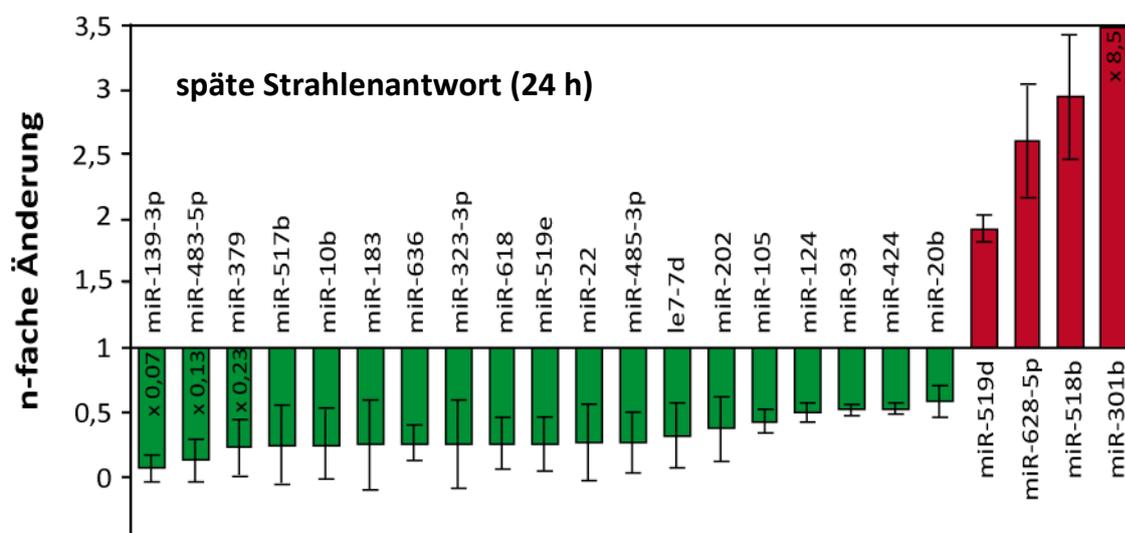


Abb. 4-15: MiRNA-Expressionsprofil der späten Strahlenantwort in EA.hy926 Zellen nach ionisierender Strahlung. Die Grafik zeigt alle differentiell exprimierte miRNAs 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy ($p < 0,05$). Hochregulierte miRNAs sind in rot, herunterregulierte miRNAs in grün dargestellt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten \pm SD.

In Tabelle 4-1 sind alle miRNAs, die nach den drei untersuchten Zeitpunkten (4 h, 12 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 2,5 Gy verändert waren, aufgeführt.

Tabelle 4-1: Übersichtstabelle der veränderten miRNAs in EA.hy926 Zellen 4 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy. MiRNAs wurden als differentiell exprimiert gewertet, wenn sie nach Bestrahlung in allen drei biologischen Replikaten eine n-fache Expressionsänderung von $< 0,5$ oder > 2 verglichen mit der Kontrolle aufwiesen. Exprimierte miRNAs sind mit einem X gekennzeichnet. Die Expressionsänderung ist als Mittelwert (Mittelw.) dreier unabhängiger Experimente dargestellt und ist bei einer Herunterregulierung in grün, bei einer Hochregulierung rot dargestellt.

4. Ergebnisse

analysierte microRNAs	detektierbar Mittelw. p-Wert			detektierbar Mittelw. p-Wert			detektierbar Mittelw. p-Wert		
	4 h	4 h	4 h (t-Test)	12 h	12 h	12 h (t-Test)	24 h	24 h	24 h (t-Test)
hsa-let-7d	X	0,43	0,0171	X	0,48	0,00394	X	0,32	0,0625
hsa-miR-10a	X			X	0,33	0,06639	X		
hsa-miR-10b	X			X	0,38	0,00774	X	0,25	0,0946
hsa-miR-20b	X			X	0,22	0,00008	X	0,51	0,0413
hsa-miR-22	X			X			X	0,27	0,0141
hsa-miR-23a	X	0,51	0,0041	X	0,10	0,0029	X		
hsa-miR-32	X	0,52	0,0027	X	0,14	0,0093	X		
hsa-miR-33b				X	0,31	0,0784			
hsa-miR-93	X						X	0,52	0,0043
hsa-miR-101	X	0,36	0,0279	X	2,62	0,1432	X		
hsa-miR-105	X			X			X	0,44	0,0117
hsa-miR-106b	X			X	0,07	2,43221E-09	X		
hsa-miR-107				X	10,80	0,1595			
hsa-miR-124	X	0,05	0,0025	X	0,35	0,0000			
hsa-miR-129-3p	X			X	11,05	0,1265			
hsa-miR-130b	X	0,47	0,0026	X			X		
hsa-miR-132	X	2,03	0,0011	X			X		
hsa-miR-139-3p				X	0,34	0,00214	X	0,07	0,0063
hsa-miR-146a	X	2,38	0,0482						
hsa-miR-146b-5p	X	2,14	0,0109	X	3,98	0,00684	X		
hsa-miR-181c	X			X	0,07	0,00027	X		
hsa-miR-182	X			X	0,20	0,00146	X		
hsa-miR-183	X			X	3,33	0,06639	X	0,25	0,0939
hsa-miR-185	X			X	0,08	0,00162	X		
hsa-miR-193a-3p	X	0,51	0,0193	X	0,34	0,00405	X		
hsa-miR-194	X			X	2,06	0,00295			
hsa-miR-200a				X	0,07	0,000003			
hsa-miR-202							X	0,37	0,0508
hsa-miR-216a	X	3,43	0,0312	X	3,87	0,1627	X		
hsa-miR-301b	X			X	2,37	0,0134	X	8,60	0,0435
hsa-miR-323-3p	X	0,57	0,0273				X	0,26	0,0496
hsa-miR-331-5p	X	0,28	0,0207						
hsa-miR-337-5p	X	2,39	0,0024						
hsa-miR-339-5p	X	0,47	0,0031	X	0,25	0,0124	X		
hsa-miR-363				X	0,13	0,0133			
hsa-miR-379	X						X	0,23	0,0379
hsa-miR-424	X			X			X	0,43	0,0047
hsa-miR-483-5p	X						X	0,13	0,0181
hsa-miR-485-3p							X	0,28	0,0242
hsa-miR-494	X			X	3,29	0,00008	X		
hsa-miR-516b	X			X	2,82	0,00001	X		
hsa-miR-518b	X	6,77	0,0295	X	4,52	0,00020	X	2,95	0,0240
hsa-miR-518d-5p	X	5,44	0,0781	X			X		
hsa-miR-519d	X			X			X	2,25	0,0063
hsa-miR-519e	X	0,23	0,0002	X	0,11	0,01373	X	0,26	0,0379
hsa-miR-520a-3p	X	0,33	0,0930	X			X		
hsa-miR-525-3p	X	8,04	0,0365	X	3,51	0,0070	X		
hsa-miR-526b	X	0,34	0,0439	X			X		
hsa-miR-618	X						X	0,26	0,0440
hsa-miR-628-5p	X			X	2,76	0,0399	X	2,61	0,0589
hsa-miR-212	X			X	5,79	0,0167	X		
hsa-miR-636	X			X			X	0,25	0,0565
hsa-miR-517b	X	0,26	0,0333	X			X	0,25	0,0424
hsa-miR-520f	X			X	2,91	0,12039			

Zu allen Zeitpunkten wurde neben der Hochregulierung von miRNAs auch eine große Anzahl an miRNAs herunterreguliert. Dies lässt darauf schließen, dass zu allen drei untersuchten Zeitpunkten sowohl eine Erniedrigung der Expression von Zielproteinen durch die

Hochregulierung der miRNA-Expression als auch eine Hochregulierung der Zielproteine durch eine Erniedrigung der miRNA-Expression erfolgte. Ein Vergleich der deregulierten miRNAs an den verschiedenen Zeitpunkten zeigt nur wenige Überlappungen. Nur eine herunterregulierte miRNA (let-7c) und zwei hochregulierte miRNAs (miR-518b, miR-519e) wiesen nach Bestrahlung zu allen drei untersuchten Zeitpunkten (4 h, 12h und 24 h) eine Veränderung auf (Abb. 4-16).

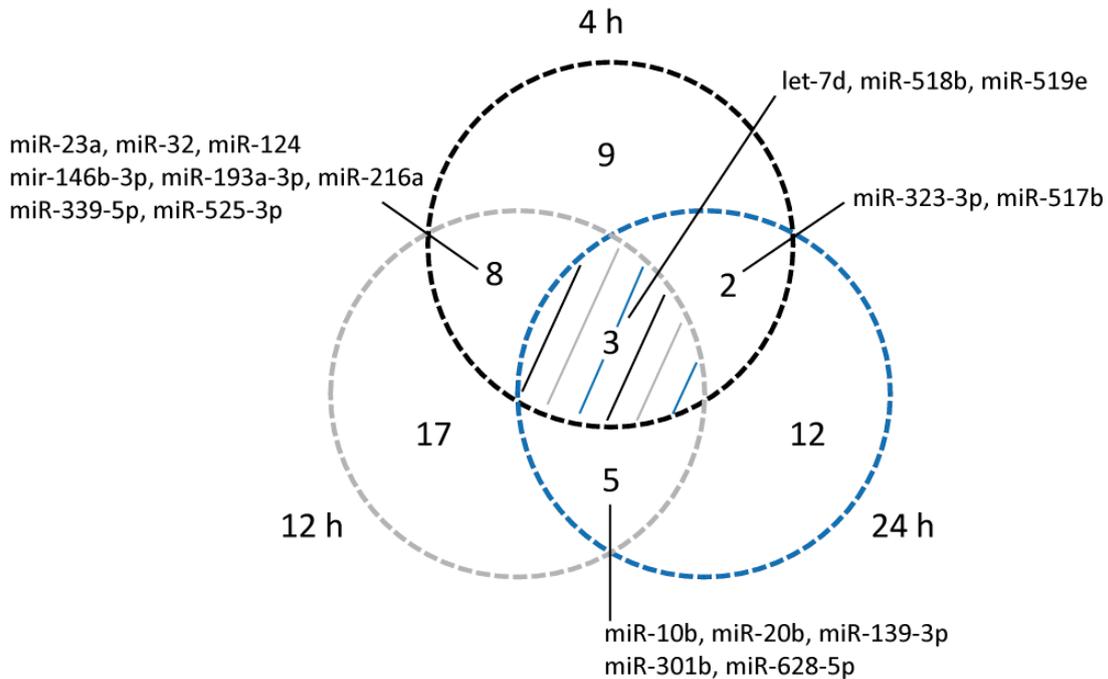


Abb. 4-16: Venn-Diagramm von allen differenziell exprimierten miRNAs 4 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung in EA.hy926 Zellen. Das Diagramm zeigt die Anzahl der differenziell exprimierten miRNAs nach 4 h (schwarz) 12 h (grau) und 24 h (dunkelblau) nach Bestrahlung mit 2,5 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) umfasst alle miRNAs, die zu allen drei Zeitpunkten signifikant verändert sind.

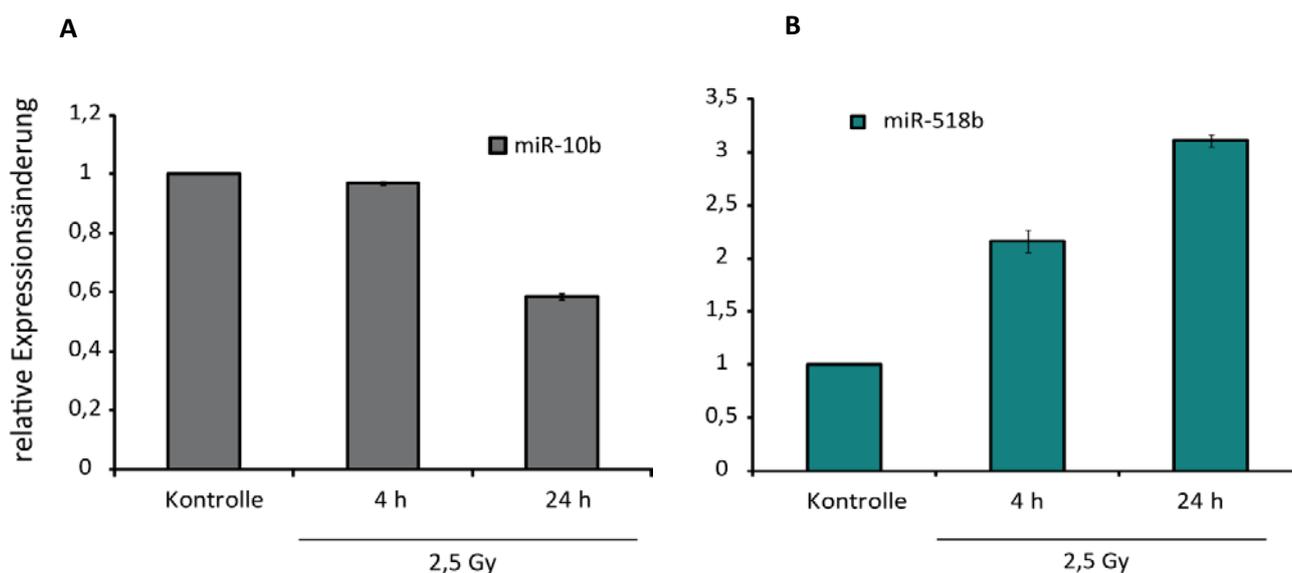
Die größte Überschneidung an miRNAs, die auf gleiche Weise differenziell exprimiert vorlagen, war zwischen dem 4 h- und 12 h-Wert zu detektieren. Acht miRNAs wiesen zu beiden Zeitpunkten eine veränderte Expression auf. Fünf miRNAs zeigten sowohl 12 h als auch 24 h nach Bestrahlung eine Expressionsänderung in die gleiche Richtung. Die geringste Überlappung an miRNAs mit einer gleichen Regulation nach Bestrahlung war zwischen dem 4 h- und dem 24 h-Wert zu detektieren (zwei herunterregulierte miRNAs). Alle anderen miRNA Expressionsänderungen waren nur zu einem Zeitpunkt dereguliert. Neun miRNAs waren nur zum 4 h-Zeitpunkt, 17 miRNAs nur zum 12 h-Zeitpunkt und 12 miRNAs ausschließlich zum

24 h-Zeitpunkt dereguliert. Die größten Unterschiede waren zwischen dem frühen (4 h) und späten (24 h) Zeitpunkt nach Bestrahlung zu detektieren, während der 12 h-Wert zu beiden anderen Zeitwerten mehrere identisch exprimierte miRNAs aufwies. Diese Unterschiede in der miRNA Expressionsänderung, besonders während des frühen (4 h) und späten (24 h) Zeitwertes nach Bestrahlung, lässt auf unterschiedliche und zeitabhängige regulatorische Funktionen der miRNAs innerhalb der Strahlenantwort schließen.

4.1.4 Validierung differentiell exprimierter miRNAs in der Endothelzelllinie EA.hy926

Zur Überprüfung der TaqMan® *Low Density Array* Ergebnisse wurden einige miRNAs ausgewählt, die im miRNA-Array nach Bestrahlung mindestens 2-fach reguliert waren (Abb. 4-13 und 4-15), und diese wurden mittels quantitativer *Single Primer Assays* in einem weiteren biologischen Replikate analysiert. In einem ersten Schritt erfolgte hierzu die cDNA-Synthese mittels miRNA *looped* RT-Primer. Diese Primer sind, im Gegensatz zum Primer-Pool bei der *Low Density Array* Analyse, für jede miRNA spezifisch.

EA.hy926 Zellen wurden mit 2,5 Gy bestrahlt und die RNA nach 4 h und 24 h für die miRNA-Analyse isoliert. Die Abbildung 4-17 A-C zeigt die Quantifizierung der miRNAs miR-10b, miR-518b und miR-146-5p.



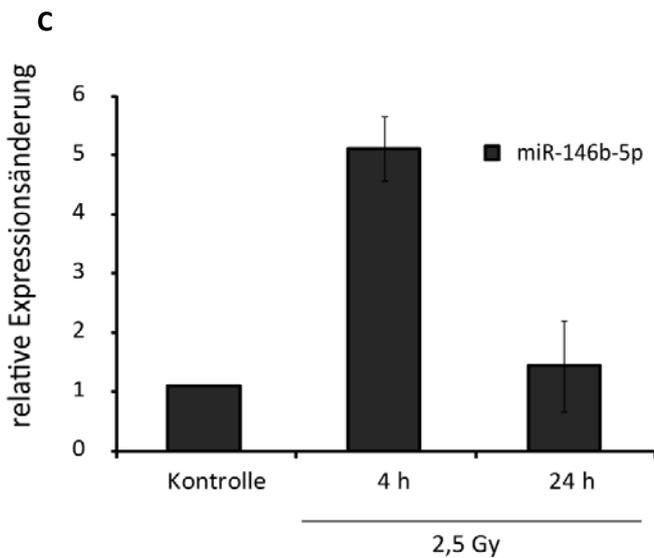


Abb. 4-17: Validierung der differentiellen miRNA-Expression in humanen EA.hy926 Endothelzellen. Die Zelllinie EA.hy926 wurde mit 0 Gy (Kontrolle) und 2,5 Gy bestrahlt. Die miRNAs wurden 4 h und 24 h nach Bestrahlung isoliert. Als interner Kalibrator diente eine ubiquitär exprimierte kleine RNA RNU44. **A:** Relative Expressionsänderung der miRNA miR-10b 4 h und 24 h nach Bestrahlung **B:** Relative Expressionsänderung der miRNA miR-518b 4 h und 24 h nach Bestrahlung **C:** Relative Expressionsänderung der miRNA miR-146b-5p 4 h und 24 h nach Bestrahlung. Die relative Expression der miRNAs ist als Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt.

Die Expressionsdaten der miRNAs miR-10b, miR-518b und miR-146b-5p, die mit Hilfe des TaqMan® *Low Density Arrays* ermittelt wurden, konnten mittels quantitativer Echtzeit-PCR durch spezifische miRNA Primer bestätigt werden (Abb. 4-17). Die relative Expressionsänderung war bei beiden Analysen nicht exakt identisch, die Deregulationen der miRNAs wiesen jedoch die gleiche Tendenz auf. Die miRNA miR-518b zeigte zum Beispiel 4 h nach Bestrahlung im TaqMan® *Low Density Array* eine Hochregulierung der Expression um das 6-fache (Abb. 4-13), 24 h nach Bestrahlung eine Expressionserhöhung um das 3-fache (Abb. 4-15). Durch *Single Primer Assays* wurde mittels spezifischer miRNA Primer 4 h nach Bestrahlung eine Hochregulierung um das 2,2-fache, 24 h nach Bestrahlung eine Hochregulierung um das 3,1-fache gemessen (Abb. 4-17 B).

4.1.5 Der Einfluss von spezifischen miRNAs auf die Strahlensensitivität von EA.hy926 Zellen

Nach der Identifizierung der strahleninduzierten miRNAs war die nächste Aufgabe die genauen Auswirkungen der einzelnen hochregulierten miRNAs für die Strahlenantwort zu analysieren. Aufgrund ihrer deutlichen Induktion nach Bestrahlung wurden die miRNAs miR-146a, miR-146b-5p, miR-216a, miR-518b, miR-518d-5p, miR-525-3p, miR-628-5p und miR-301b für eine weitere Analyse ausgewählt. Bei den hierfür eingesetzten miRNA-Inhibitoren (Anti-miRs, miRCURY LNA™ microRNA Inhibitors; Exiqon, Dänemark) handelt es sich um LNA- (locked nucleic acid) modifizierte Oligonukleotide. Das LNA-vermittelte *Silencing* von miRNAs beruht darauf, dass das Inhibitor-Oligonukleotid komplementär zu der miRNA ist. Die Basenpaare des Inhibitors stehen somit mit den zellulären Ziel-mRNAs im Wettbewerb um die miRNA. Die nun doppelsträngigen miRNAs können nicht mehr in den miRISC-Komplex eingebaut werden und sind somit nicht mehr funktionell. LNA-Oligonukleotide können leicht in Zellen unter Verwendung von Standardverfahren transfiziert werden.

Zuerst wurde jedoch der Einfluss der Inhibition dieser miRNAs auf die Proliferation von EA.hy926 Zellen untersucht (Anhang Abb. 7-2 A). Die Transfektion mit Anti-miRs hatte in dem untersuchten Zeitraum von 96 h keinen Einfluss auf das Zellüberleben im Vergleich zu den Kontroll-Inhibitor (Kontroll-Inh)-transfizierten EA.hy926 Zellen. Anschließend wurde ihr Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der Zellen getestet. Als Kontrolle dienten EA.hy926 Zellen, die mit einem unspezifischen miRNA-Inhibitor (Inh-Kontrolle) transfiziert worden waren.

Als Nachweis für die Strahlenempfindlichkeit wurde die metabolische Aktivität 6 d nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, 2,5 Gy und 5 Gy mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse des Zellüberlebens nach der Inhibierung von spezifischen miRNAs, die zum Zeitpunkt von 4 h nach Bestrahlung eine Hochregulierung zeigten, sind in Abbildung 4-18 zusammengefasst.

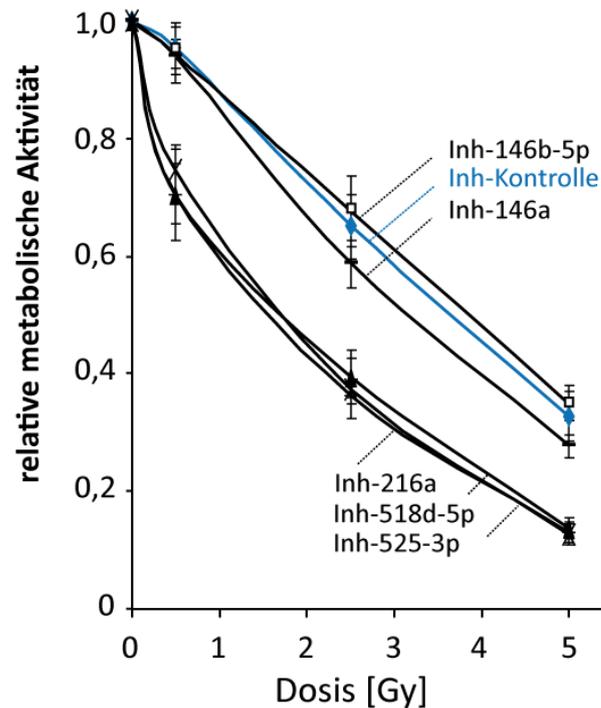


Abb. 4-18: Einfluss von miRNAs, die 4 h nach Bestrahlung im TLDA eine Hochregulierung gezeigt hatten, auf das Überleben nach Bestrahlung in EA.hy926 Zellen. MiR-146a, miR-146b-5p, miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p wurden durch Transfektion von spezifischen miRNA-Inhibitoren inhibiert (Inh-146a, Inh-146b-5p, Inh-216a, Inh-518d-5p und Inh-525-3p). Die metabolische Aktivität wurde 6 d nach der Bestrahlung mittels MTT-Assay quantifiziert. Die Abbildung stellt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD dar.

Von den fünf untersuchten miRNAs war nach der Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p in EA.hy926 Zellen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit zu detektieren, während die Hemmung von miR-146a und miR-146b-5p keinen signifikanten Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der Zellen hatte.

Anschließend wurden die miRNAs inhibiert, 24 h nach Bestrahlung eine Hochregulierung gezeigt hatten. Die Abbildung 4-19 zeigt die Ergebnisse der relativen metabolischen Aktivität nach Inhibition dieser miRNAs.

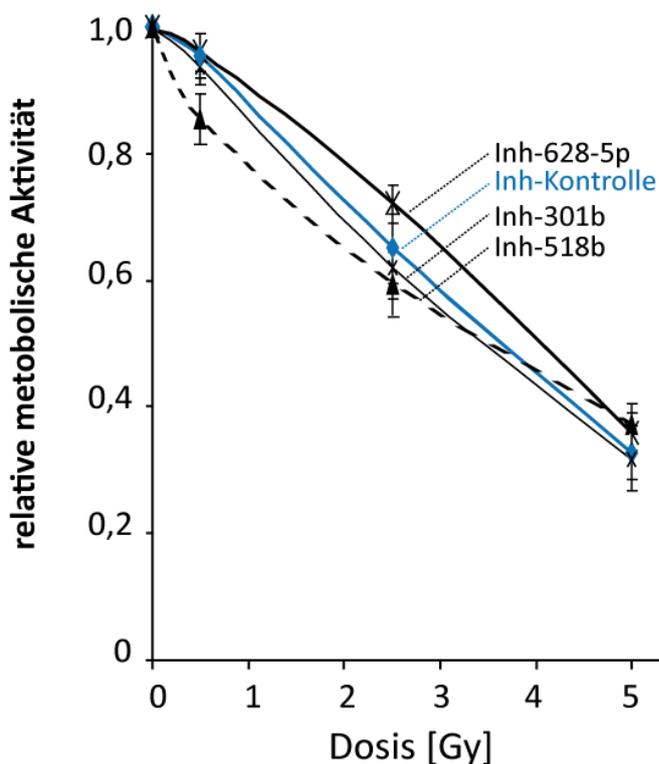


Abb. 4-19: Einfluss von miRNAs, die 24 h nach Bestrahlung im TLDA eine Hochregulierung gezeigt hatten, auf das Überleben nach Bestrahlung in EA.hy926 Zellen. MiR-301b, miR-518b und miR-628-5p wurden durch Transfektion der jeweiligen spezifischen miRNA-Inhibitoren inhibiert. Die metabolische Aktivität wurde 6 d nach der Bestrahlung mittels MTT-Assay quantifiziert. Die Abbildung stellt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD dar.

Die Hemmung der miRNAs miR-518b, miR-628-5p und miR-301b (Inh-518b, Inh-628-5p und Inh-301b) hatte keinen Effekt auf das Überleben in EA.hy926 Zellen. Die miRNA miR-518b (Inh-miR-518b) war die einzige miRNA, die im TaqMan[®] *Low Density Array* sowohl nach 4 h als auch 24 h eine erhöhte Expression aufwies.

4.1.6 Der Einfluss von miRNAs auf die strahleninduzierte Apoptose in der Endothelzelle EA.hy926

Die Zellzyklusverteilung und die Apoptoserate der mit den acht miRNA-Inhibitoren (miR-146a, miR-146b-5p, miR-216a, miR-518b, miR-518d-5p, miR-525-3p, miR-628-5p und miR-301b) behandelten Zellen wurden 48 h nach Bestrahlung mit 2,5, 5 oder 10 Gy durchflusszytometrisch analysiert. Die Quantifizierung von G1- und G2/M-Phase in unbestrahlten und bestrahlten Zellen

war vergleichbar mit dem Ergebnis der mit Kontroll-siRNA transfizierten EA.hy926 Zellen (Abb. 4-6 bzw. 4-7). So befand sich in den unbestrahlten Kontrollen ein großer Anteil an Zellen in der G1-Phase (86-89 %), 7-9 % konnten der S-Phase und etwa 9-11 % der G2-Phase bzw. der M-Phase zugeordnet werden. Nach Bestrahlung stieg der Anteil an Zellen, die in der G2/M-Phase des Zellzyklus waren, nach Transfektion mit einer der acht getesteten Anti-miRs oder dem Kontroll-Inhibitor in einem vergleichbaren Maße an. Die Inhibierung hatte somit keinen Einfluss auf die Zellzykluskontrolle nach Bestrahlung (Daten nicht gezeigt).

Die Anzahl an Zellen mit einem subdiploiden Chromosomensatz (SubG1) stieg jedoch nach Transfektion mit den spezifischen Inhibitoren von miR-216a, miR-518d-5p oder miR-525-3p (Inh-216a, Inh-518d-5p und Inh-525-3p) im Vergleich zur Kontrolle (Inh-Kontrolle) nach Bestrahlung signifikant an. In Kontrollen waren 11 % (5 Gy) und 22 % (10 Gy) der Zellen in der SubG1-Phase, während in miR-216a-inhibierten Proben der Anteil an Zellen in der SubG1-Phase 23 % (5 Gy) bzw. 69 % (10 Gy), in miR-518d-inhibierten Proben 24 % (5 Gy) bzw. 60 % (10 Gy) und in miR-525-3p-inhibierten Proben 20 % (5 Gy) bzw. 50 % (10 Gy) ausmachte. Dies lässt auf einen größeren Anteil an apoptotischen Zellen nach Inhibierung der einzelnen miRNAs nach Bestrahlung schließen (Abb. 4-20).

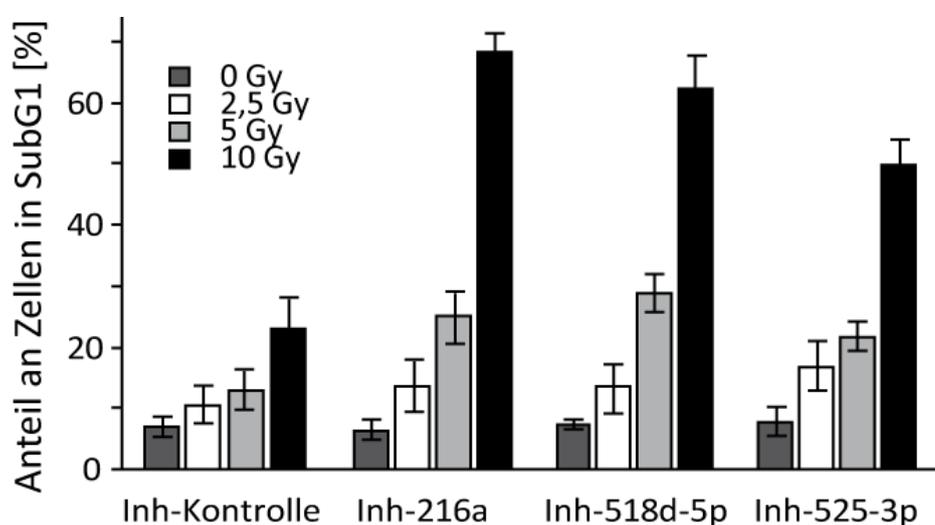


Abb. 4-20: Strahleninduzierte Apoptose nach Inhibierung spezifischer miRNAs. In EA.hy926 Zellen wurden durch miRNA-Inhibitoren spezifische miRNAs inhibiert und im Anschluss an die Bestrahlung mit 0, 2,5, 5 und 10 Gy der Anteil an apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Messung der SubG1-Population erfolgte 48 h nach der Bestrahlung. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Zur Bestätigung der erhöhten strahleninduzierten Apoptose in Zellen mit inhibierten miRNAs wurde die Caspase-3-Aktivität 24 h nach Bestrahlung gemessen. In Kontrollen war die relative Caspase-3-Aktivität nach 5 Gy ca. 1,5-fach höher als in unbestrahlten Proben, nach 10 Gy stieg sie auf das 2,1-fache. Die relative Caspase-3-Aktivität betrug, bezogen auf die jeweiligen unbestrahlten Kontrollen, in miR-216a-inhibierten Proben das 2,3-fache (5 Gy) bzw. das 3,9-fache (10 Gy), in miR-518d-inhibierten Proben das 2,2-fache (5 Gy) bzw. das 3,2-fache (10 Gy) und in miR-525-3p-inhibierten Proben das 2,1-fache (5 Gy) bzw. das 3-fache (10 Gy) (Abb. 4-21). Dies lässt auf eine höhere Apoptoserate nach Bestrahlung schließen. Abbildung 4-21 zeigt die Ergebnisse der untersuchten miRNA-Inhibitoren Inh-216a, Inh-518d-5p und Inh-525-3p.

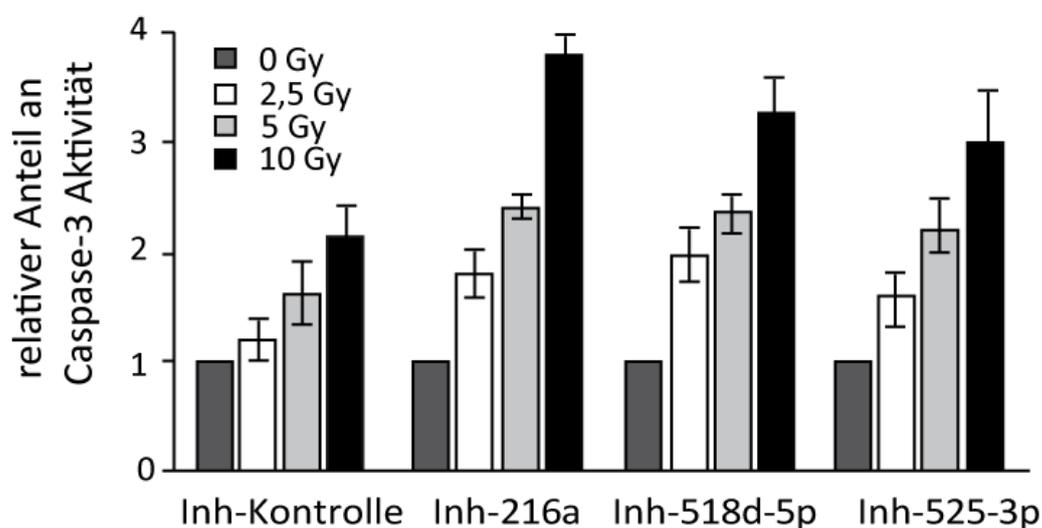


Abb. 4-21: Auswirkungen der Inhibierung von miRNAs auf die Apoptose von humanen Endothelzellen nach Bestrahlung. EA.hy926 Zellen wurden mit spezifischen miRNA-Inhibitoren transfiziert. Die Caspase-3-Aktivität wurde im Anschluss an die Bestrahlung mit 0, 2,5, 5 und 10 Gy quantifiziert. Die Caspase-3-Messung wurde 24 h nach der Bestrahlung durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die untersuchten miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p einen Einfluss auf das Überleben der Zelle nach Bestrahlung haben. Alle drei miRNAs haben Einfluss auf die strahleninduzierte Apoptose, während die Zellzykluskontrollpunkt-Aktivierung keine Beeinträchtigung aufweist.

4.2 Untersuchung von microRNA-vermittelten Prozessen in der zellulären Strahlenantwort in primären Endothelzellen

4.2.1 Funktion von Dicer und Argonaut-2 in der zellulären Strahlenantwort in primären Endothelzellen (HUVECs)

Um die funktionellen Auswirkungen von miRNAs in der Strahlenantwort auch in primären Endothelzellen zu untersuchen, wurden humane Nabelschnurzellen (HUVECs) mit chemisch synthetisierten siRNA-Oligonukleotiden gegen Dicer bzw. Ago2 transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen die mit einer Kontroll-siRNA (siKontrolle) transfiziert worden waren. Die Quantifizierung der Herunterregulierung von Dicer und Ago2 erfolgte mittels Western-Blot. Wie in Abbildung 4-22 zu erkennen ist, war eine Herunterregulierung von Ago2 nach Transfektion mit siAgo2 nicht erfolgreich. Die Proteinmenge von Dicer konnte verglichen mit der Menge an Protein in den Kontrollen auf etwa 40 % gesenkt werden.

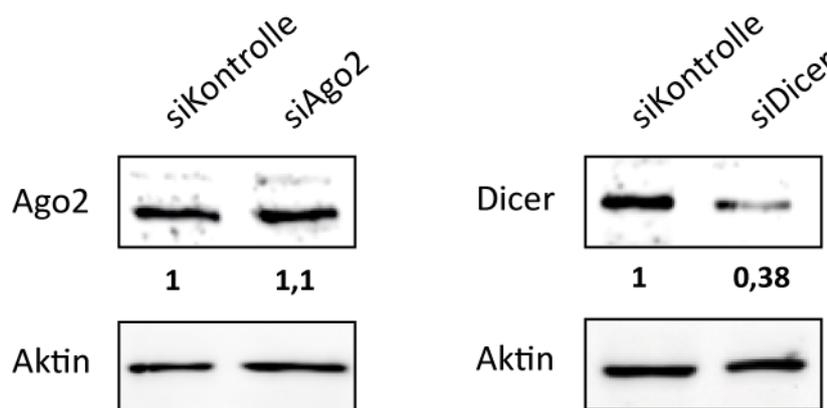


Abb. 4-22: Herunterregulierung von Dicer und Ago2 in primären Endothelzellen mittels RNAi. Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Dicer und Ago2 erfolgte 48 h nach der Transfektion mit siDicer und siAgo2 mittels Western-Blot. Der Nachweis von Aktin ermöglichte eine Kontrolle der Beladung. Die relative Intensität der jeweiligen Bande wurde im Vergleich zur Kontroll-Bande nach der Normalisierung mit der Beladungskontrolle (Aktin) bestimmt.

Da eine Reduktion von Ago2 mittels RNAi in HUVEC Zellen nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden für alle weiteren Versuche zur Analyse der Funktion von miRNAs in der zellulären Strahlenantwort Dicer-depletierte Zellen verwendet.

Um sicherzustellen, dass die Expression von Dicer und Ago2 in primären HUVEC Zellen nach ionisierender Strahlung nicht verändert wird, wurden beide Proteine 2 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy im Western-Blot untersucht. Abbildung 7-1 B (Anhang) zeigt, dass HUVEC Zellen nach Bestrahlung mit 2,5 Gy keine Unterschiede in der Dicer- oder Ago2-Expression aufwiesen.

Anschließend wurden Dicer-herunterregulierte HUVEC Zellen in Bezug auf ihre Strahlenempfindlichkeit analysiert. Zuerst wurde der Einfluss der Herunterregulierung von Dicer auf die Proliferation von HUVEC Zellen untersucht. Die Messung der Proliferation erfolgte über vier Tage nach der Transfektion. Ohne Bestrahlung war die Zellproliferationsrate von Dicer-depletierten Zellen ähnlich zu den Kontrollen. Abbildung 4-23 zeigt, dass die Herunterregulierung von Dicer keinen Einfluss auf das Zellüberleben im Vergleich zu den siKontroll-transfizierten EA.hy926 Zellen hatte.

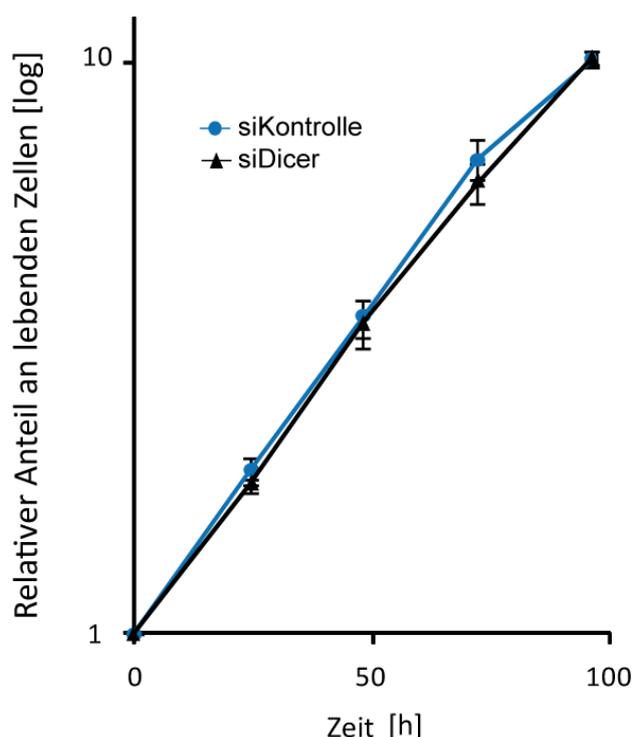


Abb. 4-23: Zellproliferation von Dicer-depletierten primären Endothelzellen. Eine Herunterregulierung mittels siDicer hatte ohne Bestrahlung keinen Einfluss auf das Zellüberleben. Das Wachstum von EA.hy926 Zellen wurde nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (siKontrolle) und siDicer ermittelt. Das Diagramm zeigt das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit wurde das Zellüberleben in Dicer-depletierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle mittels MTT-Assay bestimmt. Hierfür wurden HUVEC Zellen mit siDicer transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit Dosen von 0,5, 2,5 und 5 Gy bestrahlt und die metabolische Aktivität fünf Tage nach Bestrahlung bestimmt (Abb. 4-24). Dicer-herunterregulierte Zellen zeigten nach der Bestrahlung eine reduzierte metabolische Aktivität verglichen mit den Kontrollzellen. Diese erhöhte Sensitivität zeigte sich bei Dicer-depletierten Zellen schon nach der kleinsten Dosis (0,5 Gy). So verringerte sich die metabolische Aktivität nach 0,5 Gy auf 89 %, während die Kontrollen eine Restaktivität von 95 % verglichen mit den unbestrahlten Kontrollen zeigten. Nach einer Dosis von 5 Gy betrug die metabolische Aktivität in den Kontrollen 22 %, nach der Herunterregulierung von Dicer hingegen nur noch ca. 5 %.

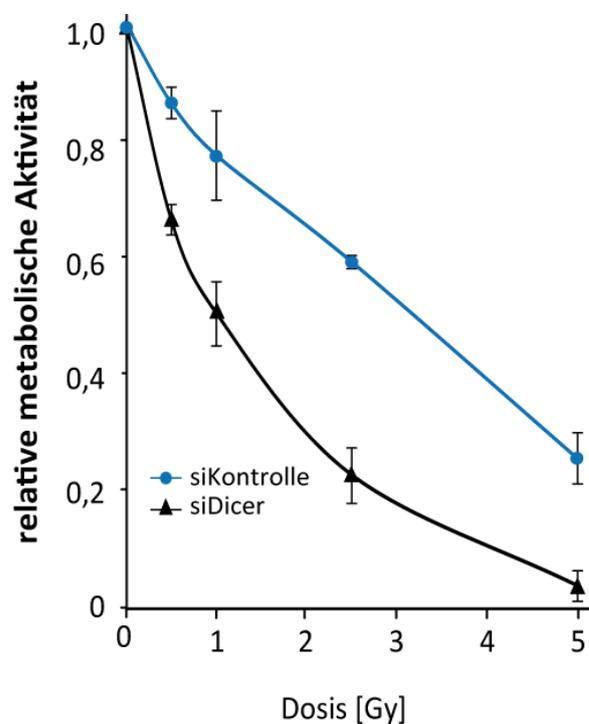


Abb. 4-24: Metabolische Aktivität von Dicer-herunterregulierten primären Endothelzellen (HUVECs) nach ionisierender Strahlung. Die metabolische Aktivität wurde 5 d nach Bestrahlung mittels MTT-Assay bestimmt. Die Transfektion der HUVECs mit siKontrolle oder siDicer erfolgte 48 h vor der Bestrahlung mit 0,5, 2,5, 5 Gy. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten \pm SD.

4.2.2 Zellzykluscheckpoint-Aktivierung und Apoptose in humanen primären Endothelzellen nach der Herunterregulierung von Dicer nach ionisierender Strahlung

Um nachzuweisen, ob die Reduktion von Dicer auch in primären Endothelzellen einen Einfluss auf die Aktivierung des G1/S-Kontrollpunktes hat, wurde mittels Western-Blot-Analysen die Expression des p53-Zielproteins p21 analysiert. In den Dicer-herunterregulierten Zellen war nach Bestrahlung keine Akkumulation des p21-Proteins mehr zu detektieren, während in Kontroll-transfizierten Zellen nach Bestrahlung wie erwartet eine Akkumulation des Proteins erfolgte (Abb. 4-25).

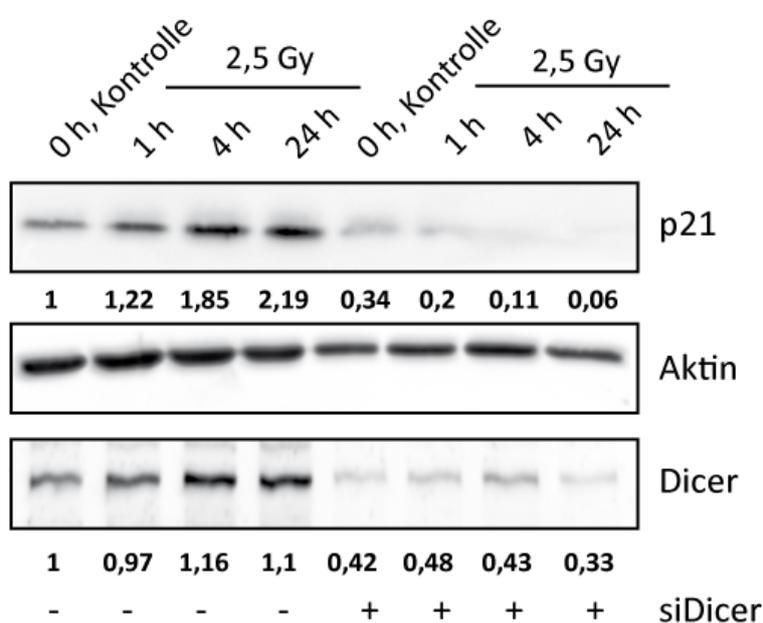


Abb. 4-25: p21-Expression und Stabilisierung nach Dicer-Herunterregulierung in primären Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) nach Bestrahlung. Die Detektion der p21- und Dicer-Expression erfolgte in Dicer-depletierten Zellen 1 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mittels Western-Blot. Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle. Die relative Intensität der jeweiligen Bande nach der Normalisierung mit der Beladungskontrolle (Aktin) ist angegeben. Ein repräsentativer Blot wird gezeigt.

In der Endothelzelllinie EA.hy926 ist die Reduktion von Ago2 bzw. Dicer nach Bestrahlung auch mit einer erhöhten Apoptoserate verbunden. Daher wurde in HUVECs analysiert, ob die Reduktion von Dicer einen Einfluss auf eine Induktion des programmierten Zelltodes hat. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde die Anzahl an Zellen in der SubG1-Phase quantifiziert.

Die Apoptoserate in Dicer-herunterregulierten Zellen wurde nach Bestrahlung durchflusszytometrisch bestimmt und mit den siKontroll-transfizierten Zellen verglichen. Achtundvierzig Stunden nach Bestrahlung war ein signifikanter Anstieg an Zellen in der SubG1-Phase messbar. Ab einer Dosis von 2,5 Gy war jedoch der Anstieg der Apoptose in Dicer-herunterregulierten Zellen im Vergleich zu siKontroll-transfizierten Zellen deutlich stärker. In Kontrollzellen befanden sich nach Bestrahlung 9 % (2,5 Gy), 15 % (5 Gy) und 18 % (10 Gy) der Zellen in der SubG1-Phase, während in Dicer-herunterregulierten Zellen die Zahl an Zellen in der SubG1-Phase 21 % (2,5 Gy), 39-44 % (5 Gy) bzw. 48-51 % (10 Gy) ausmachte (Abb. 4-26).

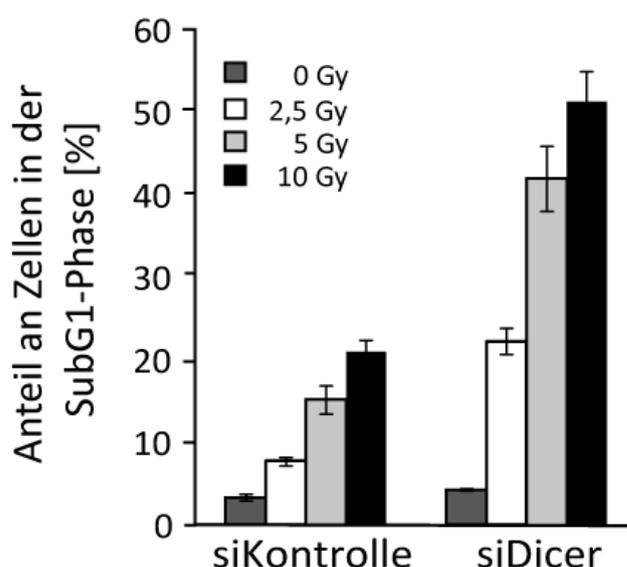


Abb. 4-26: Bestimmung der Apoptose in humanen primären Endothelzellen (HUVECs) nach einer Reduktion von Dicer nach Bestrahlung. 48 h nach Bestrahlung wurde die apoptotische Zellfraktion mittels SubG1-Analyse in Kontroll-siRNA (siKontrolle)- oder siDicer-transfizierten Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD generiert.

4.2.3 Analyse der miRNA-Expression nach ionisierender Strahlung in primären Endothelzellen

Auch in primären humanen Endothelzellen (HUVECs) wurde die miRNA-Expression 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy mittels TaqMan® *Low Density Arrays* gemessen. Anschließend wurden die veränderten miRNAs zu den angegebenen Zeitpunkten im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle analysiert.

4. Ergebnisse

In Abbildung 4-27 sind alle miRNAs aufgeführt die 4 h nach der Bestrahlung eine signifikante Expressionsänderung $< 0,5$ oder > 2 im Vergleich zu den unbestrahlten Proben aufwiesen. 27 miRNAs zeigten nach Bestrahlung mit 2,5 Gy eine signifikante Deregulierung. Von diesen veränderten miRNAs waren neun miRNAs herunterreguliert (grüne Balken) und 18 miRNAs signifikant hochreguliert (rote Balken).

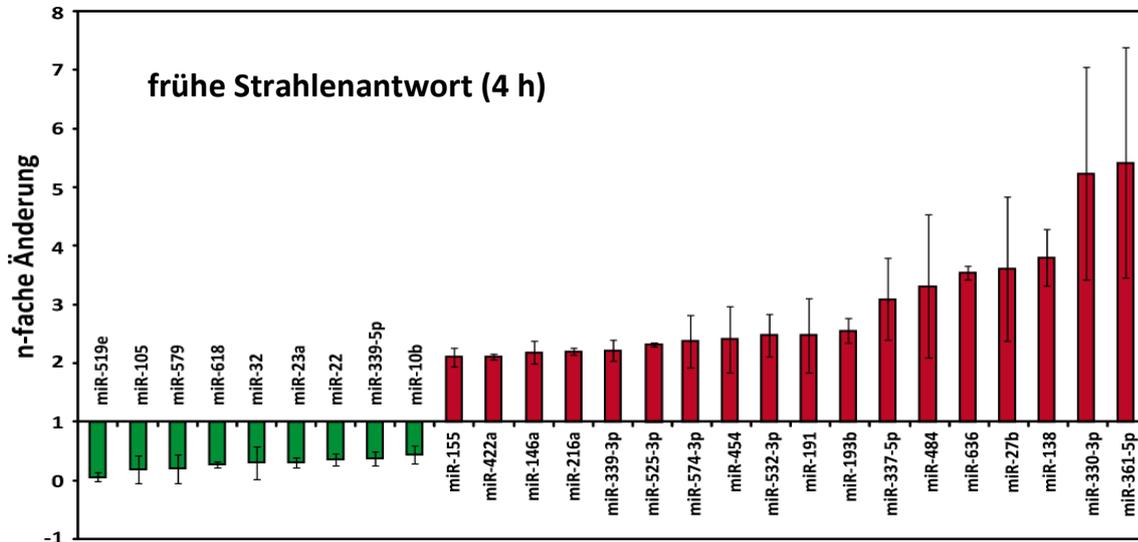


Abb. 4-27: MiRNA-Expressionsprofil der frühen Strahlenantwort in HUVEC Zellen nach ionisierender Strahlung. Differentiell exprimierte miRNAs wurden 4 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy in HUVECs bestimmt ($p < 0,05$). Hochregulierte miRNAs sind in rot, herunterregulierte miRNAs sind in grün dargestellt.

Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung mit 2,5 Gy waren 17 miRNAs zu detektieren, die eine signifikante Veränderung ($< 0,5$ oder > 2) in ihrer Expression im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen aufwiesen. Wie aus Abbildung 4-28 ersichtlich ist, waren hiervon neun miRNAs herunterreguliert und (grüne Balken) acht miRNAs hochreguliert (rote Balken).

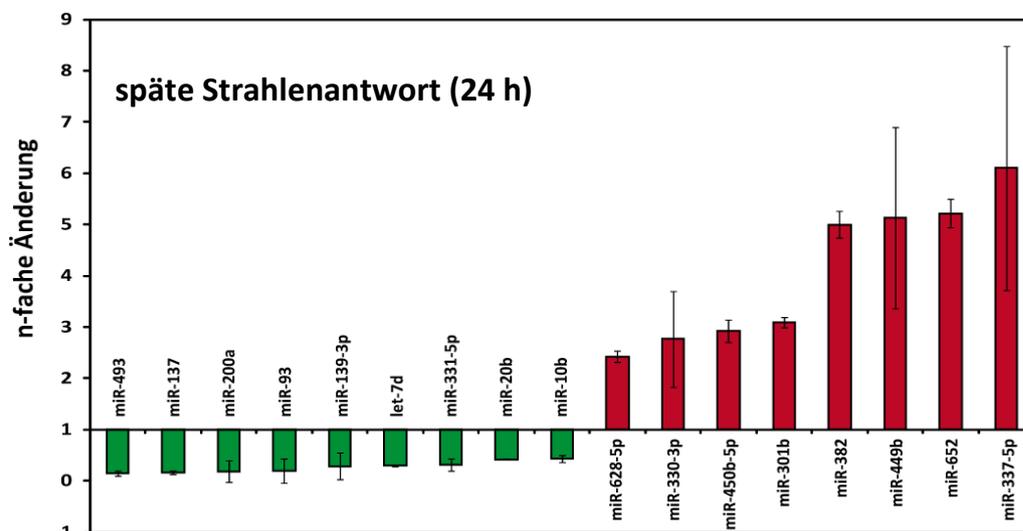


Abb. 4-28: MiRNA-Expressionsprofil der späten Strahlenantwort in HUVEC Zellen nach ionisierender Strahlung. Die Grafik zeigt alle differentiell exprimierten miRNAs 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy ($p < 0,05$). Hochregulierte miRNAs sind in rot, herunterregulierte miRNAs in grün dargestellt.

Tabelle 4-2 zeigt alle miRNAs, die in HUVECs 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy verändert waren.

Tabelle 4-2: Übersichtstabelle der veränderten miRNAs in HUVEC Zellen 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy. Alle miRNAs, die nach Bestrahlung in zwei biologischen Replikaten eine Expressionsänderung von $< 0,5$ oder > 2 im Vergleich zu unbestrahlten Zellen zeigten, wurden als differentiell exprimiert gewertet. Mit einem X sind alle zu diesem Zeitpunkt exprimierten miRNAs gekennzeichnet. Der Mittelwert (Mittelw.) stellt die Expressionsänderung zweier unabhängiger Experimente dar (Herunterregulierung in grün, Hochregulierung in rot).

analysierte microRNAs	detektierbar 4 h	Mittelwert 4 h	p-Wert 4 h (t-Test)	detektierbar 24 h	Mittelwert 24 h	p-Wert 24 h (t-Test)
hsa-let-7d	X			X	0,29	0,0003
hsa-miR-10b	X	0,44	0,034	X	0,43	0,006
hsa-miR-20b	X			X	0,005	0,0001
hsa-miR-22	X	0,35	0,013	X		
hsa-miR-23a	X	0,3	0,006	X		
hsa-miR-27b	X	3,61	0,046	X		
hsa-miR-32	X	0,29	0,017	X		
hsa-miR-93	X			X	0,19	0,04
hsa-miR-105	X	0,18	0,038	X		
hsa-miR-137	X			X	0,17	0,0007
hsa-miR-139-3p	X			X	0,29	0,026
hsa-miR-146a	X	2,18	0,012	X		
hsa-miR-191	X	2,47	0,028	X		
hsa-miR-193b	X	2,55	0,009	X		
hsa-miR-200a	X			X	0,18	0,031
hsa-miR-216a	X	2,2	0,001	X		
hsa-miR-301b	X			X	3,09	0,0011
hsa-miR-330-3p	X	5,23	0,03	X	2,77	0,0116
hsa-miR-331-3p	X			X	0,32	0,0138
hsa-miR-337-5p	X	3,09	0,052	X	6,1	0,0393
hsa-miR-339-3p	X	2,21	0,011	X		
hsa-miR-339-5p	X	0,37	0,017	X		
hsa-miR-155	X	2,1	0,01	X		
hsa-miR-361-5p	X	5,42	0,041	X		
hsa-miR-382	X			X	4,99	0,0211
hsa-miR-422a	X	2,11	0,001	X		
hsa-miR-449b	X			X	5,13	0,0087
hsa-miR-454	X	2,4	0,037	X		
hsa-miR-493	X			X	0,14	0,0021
hsa-miR-525-3p	X	2,31	0,0004			
hsa-miR-532-3p	X	2,47	0,029	X		
hsa-miR-574-3p	X	2,37	0,041	X		
hsa-miR-579	X	0,2	0,047	X		
hsa-miR-618	X	0,27	0,003	X		
hsa-miR-628-5p	X			X	2,43	0,0033
hsa-miR-636	X	3,54	0,002	X		
hsa-miR-652	X			X	5,22	0,0021
hsa-miR-520e	X	0,06	0,003	X		

Wie schon in der Endothelzelllinie EA.hy926 sind auch in den primären Nabelschnurendothelzellen wenige miRNAs zu beiden Zeitpunkten der Analyse verändert. In HUVECs wiesen eine herunterregulierte miRNA (miR-10b) und zwei hochregulierte miRNAs (miR-330-3p und miR-337-5p) sowohl zum frühen Zeitpunkt (4 h) als auch zum späten Zeitpunkt (24 h) nach Bestrahlung eine differentielle Expression auf (Abb. 4-29).

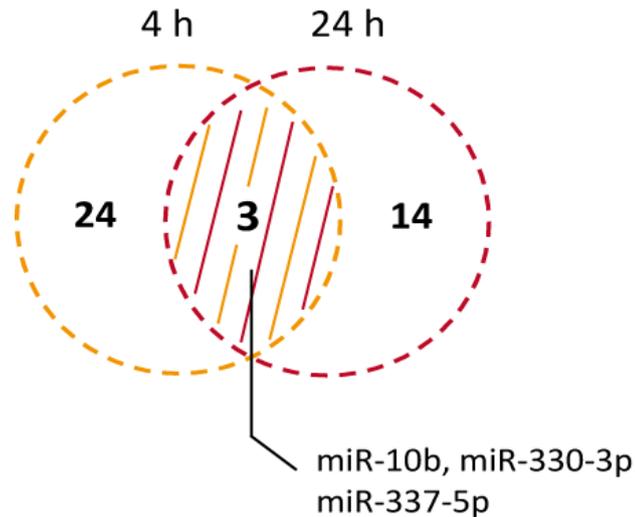


Abb. 4-29: Venn-Diagramm von differentiiell exprimierten miRNAs 4 h und 24 h nach Bestrahlung in HUVECs. Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiiell exprimierten miRNAs 4 h (orange) und 24 h (rot) nach Bestrahlung mit 2,5 Gy. Die Schnittmenge (schraffierter Bereich) umfasst die drei miRNAs, die zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Veränderung aufwiesen.

Alle anderen miRNAs waren nur zu einem Zeitpunkt differentiiell exprimiert. Die transiente miRNA-Expressionsveränderung zum frühen (4 h) und späten (24 h) Zeitpunkt nach Bestrahlung deutet auch in primären Zellen auf zeitabhängige, regulatorische Funktionen der miRNAs innerhalb der Strahlenantwort hin.

4.2.4 Einfluss von spezifischen miRNAs auf die Strahlensensitivität in primären Endothelzellen

Zur Analyse des Einflusses spezifischer miRNAs auf die Strahlensensitivität wurden die miRNAs miR-146a, miR-216a, miR-301b, miR-525-3p und miR-628-5p ausgewählt, da sie alle im TLDA nach Bestrahlung eine Induktion gezeigt hatten. Hierfür wurde zuerst der Einfluss der Inhibition der miRNAs auf die Proliferation von HUVEC Zellen untersucht (Anhang Abb. 7-2 B). Die

Transfektion mit spezifischen Inhibitoren hatte in dem untersuchten Zeitraum von 96 h keinen Einfluss auf das Zellüberleben im Vergleich zu den Kontroll-Inhibitor (Kontroll-Inh)-transfizierten HUVEC Zellen.

Nach Transfektion der Zellen mit spezifischen Inhibitoren wurde die metabolische Aktivität nach Bestrahlung gemessen. Als Kontrolle dienten HUVEC Zellen, die mit einem unspezifischen miRNA-Inhibitor (Inh-Kontrolle) transfiziert worden waren. Die Messungen erfolgten 6 d nach Bestrahlung mit 0 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy, 2,5 Gy und 5 Gy.

Die Strahlenempfindlichkeit nach Inhibierung von spezifischen miRNAs, die in primären Endothelzellen im TaqMan® *Low Density Array* eine Hochregulierung aufgewiesen hatten, ist aus Abbildung 4-30 ersichtlich.

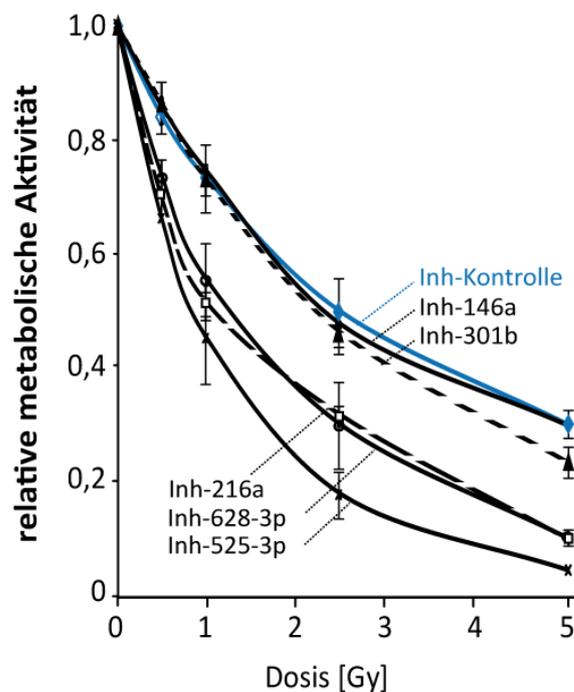


Abb. 4-30: Einfluss von miRNAs auf die Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung in primären HUVECs. MiR-146a, miR-216a, miR-301b, miR-525-3p und miR-628-3p wurden durch Transfektion von spezifischen miRNA-Inhibitoren inhibiert (Inh-146a, Inh-216a, Inh-301b, Inh-525-3p und Inh-628-3p). Die metabolische Aktivität wurde 6 d nach der Bestrahlung mittels MTT-Assay im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (Inh-Kontrolle) quantifiziert. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD generiert.

Von den fünf untersuchten miRNAs war nach der Inhibierung der miRNAs miR-216a, miR-525-3p und miR-628-3p eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit zu detektieren, während die Hemmung von miR-146a und miR-301b keinen signifikanten Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit hatte.

Die Zellzyklusverteilung und die Apoptoserate von HUVEC Zellen wurden nach Behandlung mit miRNA-Inhibitoren und 48 h nach Bestrahlung durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil an Zellen in der SubG1-Phase erhöhte sich nach der Transfektion mit Anti-miRs gegen miR-216a, miR-525-3p und miR-628-3p (Inh-216a, Inh-525-3p bzw. Inh-628-3p) im Vergleich zur Kontrolle (Inh-Kontrolle) nach Bestrahlung. In Kontrollen war ein SubG1-Phase-Anteil von 13 % (5 Gy) und 24 % (10 Gy) nach Bestrahlung zu detektieren, während in miR-216a-inhibierten Proben die Zellen in der SubG1-Phase 33 % (5 Gy) bzw. 42 % (10 Gy), in miR-525-3p-inhibierten Proben 25 % (5 Gy) bzw. 38 % (10 Gy) und in miR-628-5p-inhibierten Proben 30 % (5 Gy) bzw. 35 % (10 Gy) des gesamten Zellzyklus ausmachten. Dies lässt auf einen größeren Anteil an apoptotischen Zellen nach Bestrahlung schließen (Abb. 4-31).

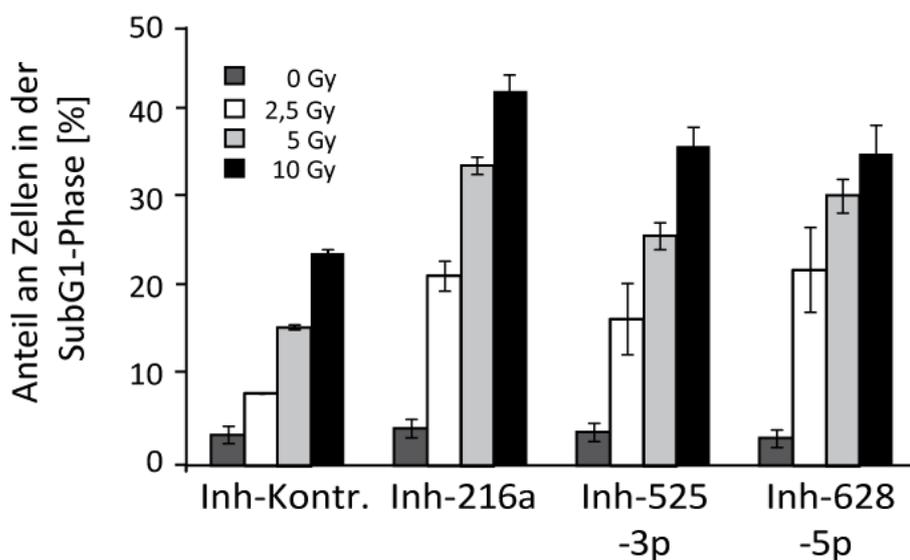


Abb. 4-31: Anteil an Zellen in der SubG1-Phase nach Transfektion mit Anti-miRs auf die primären humanen Nabelschnurzellen nach Bestrahlung. In HUVECs wurden durch miRNA-Inhibitoren (Inh-216a, Inh-525-3p bzw. Inh-628-3p) die spezifischen miRNAs inhibiert und 48 h im Anschluss an die Bestrahlung (0, 2,5, 5 und 10 Gy) der Anteil an apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD generiert.

Dieser Versuch zeigt, dass die miRNAs miR-216a, miR-525-3p und miR-628-3p in HUVEC Zellen eine Rolle in der strahleninduzierten Apoptose besitzen.

Die Analyse der G1- und G2/M-Phase in unbestrahlten und bestrahlten Zellen nach der Inhibierung der drei miRNAs miR-216a, miR-525-3p und miR-628-3p zeigte hingegen eine vergleichbare Zellzyklusverteilung wie in den Kontroll-siRNA transfizierten HUVEC Zellen. Die Inhibierung dieser miRNAs hatte somit keinen Einfluss auf die Zellzykluskontrolle nach Bestrahlung (Daten nicht gezeigt).

4.3 Identifikation von miRNA-regulierten Proteinen in der Strahlenantwort von Endothelzellen

4.3.1 Charakterisierung der Expression von miRNAs, die nach Bestrahlung einen Einfluss auf das Überleben von Endothelzellen zeigten

Um die biologische Funktion der nach Bestrahlung veränderten miRNAs zu verstehen und deren Bedeutung in der Strahlenantwort von Zellen analysieren zu können, ist es unerlässlich, die Zieltranskripte und damit die Zielproteine dieser miRNAs zu identifizieren. Bevor jedoch eine Analyse der miRNA-regulierten Proteine in der Strahlenantwort durchgeführt wurde, sollte die Expression der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p genauer charakterisiert werden. Hierfür wurden EA.hy926 Zellen mit 2,5 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden anschließend nach 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h geerntet und die RNA für die miRNA-Analyse isoliert. Die miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p wurden durch quantitative Echtzeit-PCR in Einzelanalyse (*Single Primer Assays*) mittels miRNA-spezifischen RT-Primern analysiert. Die Abbildung 4-32 zeigt die Kinetik der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p nach Bestrahlung zu den angegebenen Zeitpunkten.

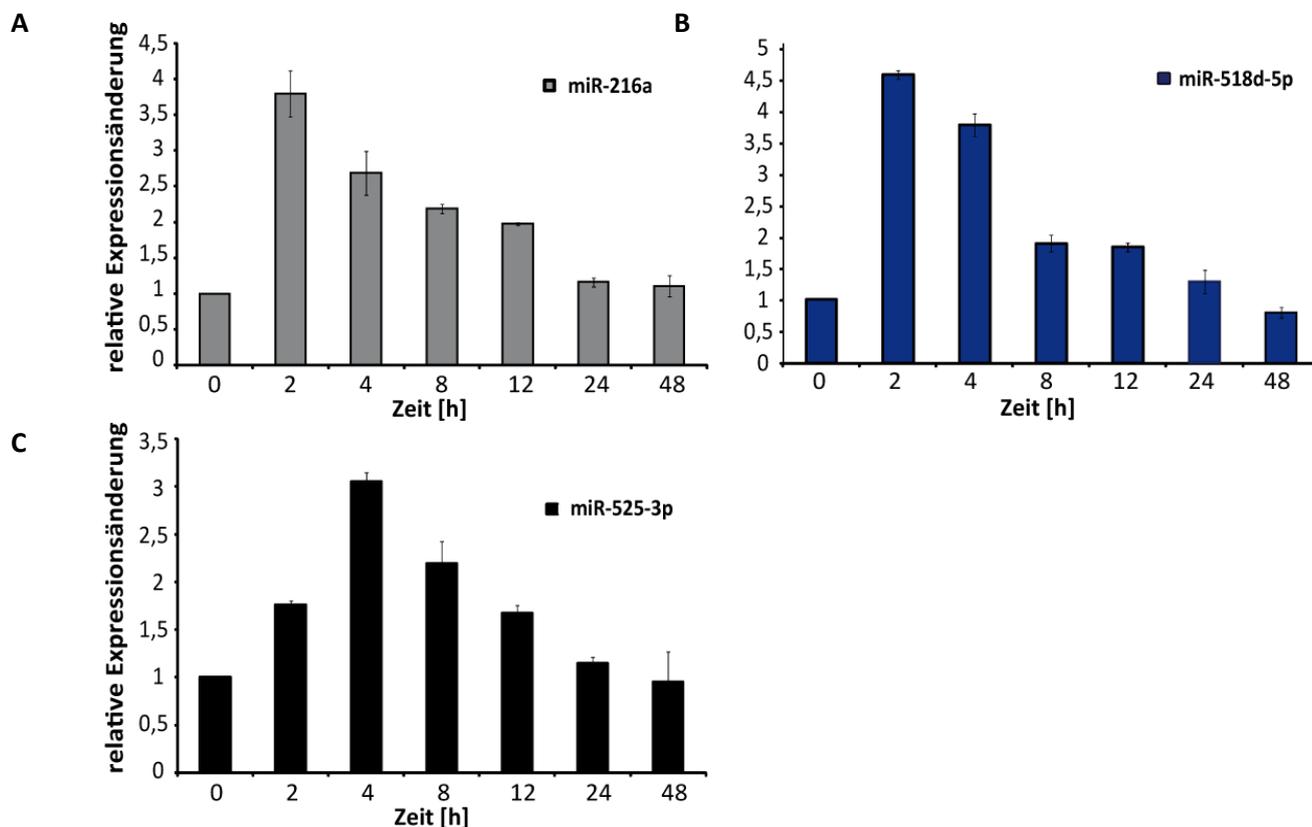


Abb. 4-32: Kinetik der miRNA-Expression von miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p nach Bestrahlung in der Endothelzelllinie EA.hy926. Die Zelllinie EA.hy926 wurde

unbestrahlt (Kontrolle (0 h)) bzw. im Anschluss an eine Bestrahlung mit 2,5 Gy nach 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h geerntet. Anschließend wurden die Expression der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p mittel *Single Primer Assays* gemessen. Die C_t -Werte wurden auf die C_t -Werte der kleinen RNA RNU44 normiert und die relative miRNA-Expression mittels der komparativen $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt. In Abbildung **A** ist die relative Expressionsänderung der miRNA miR-216a, in **B** die relative Expressionsänderung der miRNA miR-518d-5p und in **C** die relative Expressionsänderung der miRNA miR-525-3p zu den angebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung gezeigt. Die relative Expression der miRNAs ist als Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen \pm SD dargestellt.

Die durch die TaqMan® *Low Density Arrays* ermittelten Expressionsdaten der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p konnten mittels quantitativer Echtzeit-PCR durch spezifische miRNA Primer bestätigt werden (Abb. 4-32). Die Höhe der relativen Expressionsänderung war bei beiden Analysemethoden nicht identisch, alle miRNAs zeigten aber in den Einzelanalysen, wie schon in den nach 4 h, 12 h und 24 h durchgeführten miRNA-Arrays, eine erhöhte Expression dieser miRNAs nach Bestrahlung. Die Kinetiken der relativen Expressionsänderung der drei miRNAs weisen nach 2,5 Gy Bestrahlung unterschiedliche Verläufe auf. So stiegen die miRNAs miR-216a und miR-518d-5p zum 2 h-Zeitpunkt nach Bestrahlung bereits stark an (3,5-fach bzw. 4,6-fach) und nahmen danach langsam ab (4 h, 8 h, 12 h), bis sie nach 24 h wieder die Ausgangsexpression erreichten. Die miRNA miR-525-3p wurde 2 h nach Bestrahlung nur leicht erhöht exprimiert (1,7-fach) und erreichte erst nach 4 h ihre maximale Expression (3,1-fach). Bei den anschließenden Zeitwerten (8 h und 12 h) nach Bestrahlung verringerte sich ihre Expression und war nach 24 h nicht mehr verändert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p im Gegensatz zu vielen anderen strahlenregulierten miRNAs (siehe Kapitel 4.1.3) über einen relativ langen Zeitraum eine Expressionerhöhung aufweisen.

Um zu analysieren, welchen Einfluss die spezifische Inhibierung der miRNAs auf die Expression der spezifischen miRNAs nach Bestrahlung hatte, wurden diese mittels *Single Primer Assays* untersucht. Hierfür wurde die Expression der drei miRNAs nach Inhibition mit den spezifischen Anti-miRs (Inh-216a, Inh-518d-5p und Inh-525-3p) quantifiziert (Abb. 4-33). Als Kontrolle diente dabei die Expression der miRNAs nach Inhibierung mit einem nichtspezifischen miRNA-Inhibitor (Inh-Kontrolle).

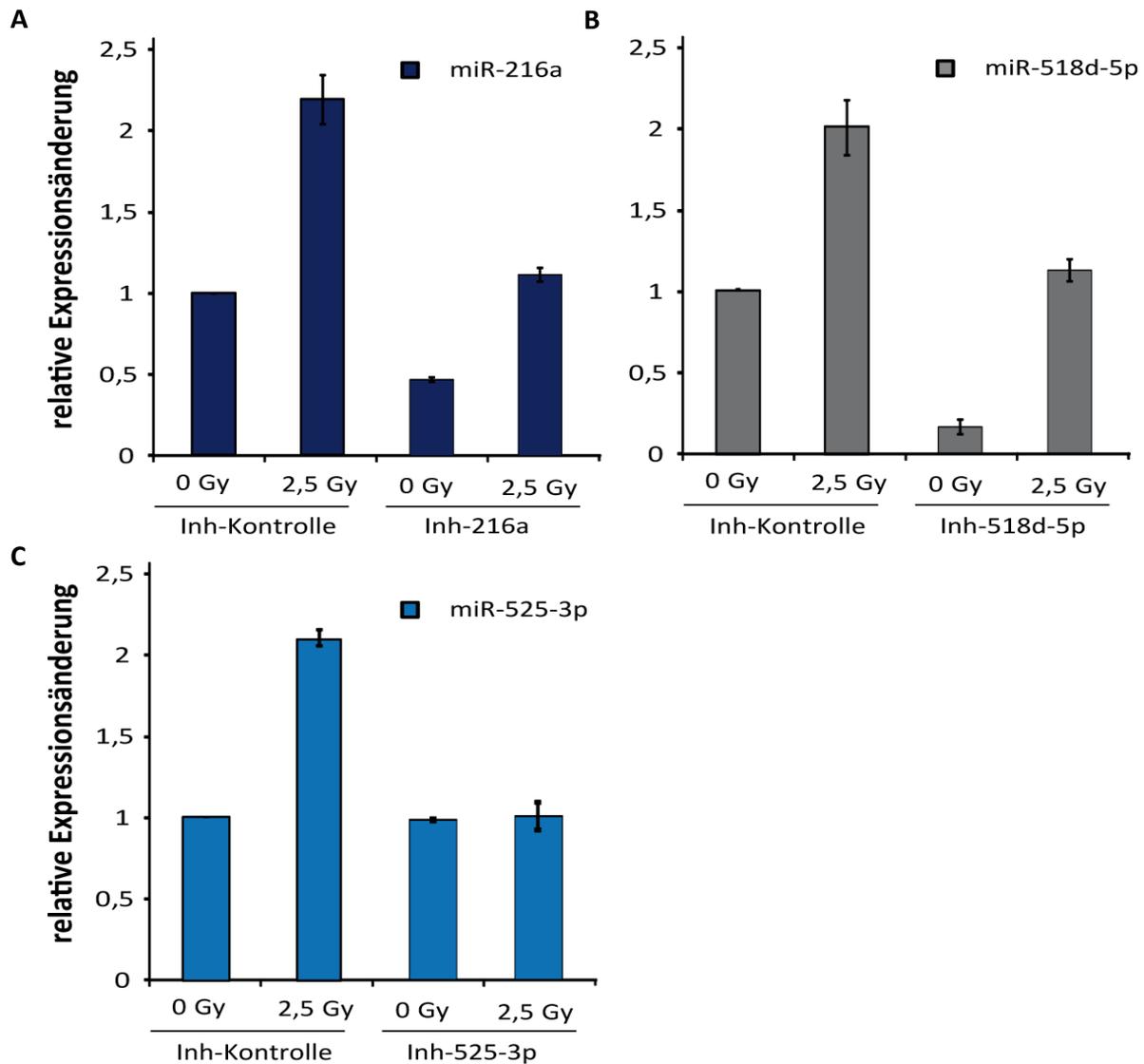


Abb. 4-33: Analyse der miRNA-Expression in humanen EA.hy926 Endothelzellen nach Transfektion mit spezifischen Inhibitoren. Die Zelllinie EA.hy926 wurde mit 0 Gy und 2,5 Gy bestrahlt. Die miRNAs wurden 4 h nach Bestrahlung isoliert und im Anschluss die miRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR durchgeführt. Die kleine RNA RNU44 diente zur Normalisierung. Die miRNA-Expression der bestrahlten Proben wurde gegen die Expression der unbestrahlten Kontrollen verrechnet. **A:** Relative Expressionsänderung der miRNA miR-216a nach Transfektion mit Anti-miR-216a nach Bestrahlung. **B:** MiR-518d-5p-Expressionsänderung nach Inhibierung durch den spezifischen Inhibitor nach Bestrahlung. **C:** Relative Expressionsänderung der miRNA miR-525-3p nach Transfektion von 525-3p-Inhibitor nach Bestrahlung. Die Berechnung der relativen miRNA-Expression erfolgte mittels der komparativen $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Der Mittelwert der relativen miRNA-Expression wurde aus zwei unabhängigen Experimenten \pm SD ermittelt.

Nach Bestrahlung mit 2,5 Gy waren in den Kontroll-Inhibitor inhibierten EA.hy926 Zellen alle drei miRNAs deutlich induziert. So erhöhte sich z.B. 4 h nach Bestrahlung die Expression von miR-216a um das 2,3-fache im Vergleich zu den unbestrahlten Proben. Wurden die Zellen jedoch mit spezifischen Anti-miRs transfiziert, zeigte sich, dass die Expression von zwei miRNAs in den unbestrahlten Proben im Vergleich zum Kontroll-Inhibitor deutlich verringert war. So war die Expression von miR-216a und miR-518d-5p in unbestrahlten EA.hy926 Zellen auf das 0,5- bzw. auf 0,2-fache der Ursprungsexpression reduziert. Wurden die Zellen vor der Bestrahlung mit spezifischen Anti-miRs transfiziert, sind alle drei miRNAs nach Bestrahlung mit 2,5 Gy im Vergleich zum Kontroll-Inhibitor deutlich niedriger exprimiert. Diese Ergebnisse zeigen eine Destabilisierung der miRNAs miR-216a und miR-518d-5p, nachdem sie vom Inhibitor gebunden worden sind. Die Expression von miR-525-3p ändert sich in bestrahlten EA.hy926 Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle hingegen nicht.

4.3.2 *In silico-Identifizierung potentieller Targetgene der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p in EA.hy926 Zellen*

Für die *in silico*-Identifizierung potentielle miRNA-Zielgene der drei miRNAs, die einen Einfluss auf die Strahlensensitivität in EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung besitzen, wurden vier unabhängige Computeralgorithmen verwendet: TargetScanS, PicTar, Pita und RNA22 (Grimson et al., 2007, Kertesz et al., 2007, Lall et al., 2006, Sturm et al., 2010). Die identifizierten Zielgene wurden zusätzlich einer *GO-Term*-Analyse unterzogen, und es wurden nur Zielgene bestimmt die im Zusammenhang mit Apoptose, Zellzyklus, Stressantwort und DNA-Reparatur stehen (Tab. 4-3).

Tabelle 4-3: *GO-Term*-Analyse der potentiellen Zielgene der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p.

miR-216a						
<i>GO-Term</i>	Potentielle Zielgene					
Zelltod/Apoptose	AKT1S1	AQP2	BCL11B	BLOC1S2	CEBPG	CUL3
	GRIN2A	HTT	MEF2D	PDE5A	PRKCA	PRKCE
	RARB	RFFL	SERBP1	SMAD7	UACA	XIAP
Stressantwort	AQP2	BMPR2	CEBPG	GRIN2A	HTT	PTPLAD1
	SLC30A9	UACA	UBE2V2	XIAP	XRRA1	
DNA-Reparatur	CEBPG	SLC30A9	UBE2V2			

4. Ergebnisse

miR-518d-5p						
GO-Term	Potentielle Zielgene					
Zelltod/Apoptose	BDKRB2	CEBPG	COL18A1	CUL3	EDAR	EYA2
	FGF2	LIG4	NIPL	NOTCH2	PDE1B	PLAGL1
	ROBO1	SFRP5	TBX5	TMBIM6	UBQLN1	VAV2
Stressantwort	CEBPG	CUL4B	EYA2	LIG4	MB	MORF4L1
	MRPS35	PDE1B	SCARA3	SMC1A	VAPB	
DNA-Reparatur	CEBPG	CUL4B	EYA2	LIG4	MORF4L1	SMC1A
Stress-Granula	BNIP1	CEBPG	COL18A1	CUL3	NOTCH2	PLAGL1
	TBX5	VAV2				
miR-525-3p						
GO-Term	Potentielle Zielgene					
Zelltod/Apoptose	ADIPOQ	AKT1	AQP2	ARHGEF12	BCL2	BCL2L2
	BDKRB2	BID	BIRC2	CDH1	CEBPG	DAPK2
	DYRK2	EGFR	EGLN3	EIF2AK3	ESR1	FASLG
	FGF2	GJA1	HIP1	HIPK1	KAT2A	LIG4
	LRRK2	NELL1	NET1	NOTCH2	PDE3A	PRKCE
	RAF1	SIRT1	SLC11A2	TBRG4	TGFB3	TIA1
	TMBIM6	TNFRSF19	TNFRSF8	TP63	TWIST1	TXNDC5
	Stressantwort	AKT1	AQP2	ARNT	ATP1A2	AVPR1A
CEBPG		CETN1	DNMT3B	DTX3L	DUSP3	DYRK2
EGFR		EIF2AK3	FASLG	GUCA1B	HIPK1	LRRK2
MAP2K4		MRE11A	NBN	NCOR1	PEBP1	PLEKHB1
POLD3		PXDN	RHO	SDR16C5	SIRT1	SLC11A2
SSRP1		TNFRSF19	TP63	XRRA1		
DNA-Reparatur	CEBPG	MRE11A	NBN	POLD3	SIRT1	SSRP1
Zellzyklusarrest	BTG4	MACF1	NBN	NOTCH2	RASSF1	TBRG4
	VASH1					

In Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, die für die miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p vorliegen, ergab die *GO-Term*-Analyse eine Vielzahl von potentiellen Zielgenen, die eine wichtige Funktion in der Induktion der Apoptose, der Zellzykluskontrolle und Antwort auf Stress besitzen. Zusätzlich wurden, obwohl ein globaler *Knockdown* von miRNAs keinen Effekt auf die DSB-Reparatur zeigte, potentielle Zielgene identifiziert, die eine Funktion in DNA-Reparatur besitzen. Eine experimentelle Verifizierung mittels Western-Blot wurde für die Proteine AKT1, BCL2, EGFR, FASLG, MRE11, NBN, Tia-1 und TNFR (in der Tabelle 4-3 blau markiert) versucht. Hierfür wurden EA.hy926 Zellen mit spezifischen Anti-miRs und Pre (precursor)-miRNAs transfiziert und unbestrahlt bzw. 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy geerntet. Die veränderte miRNA-Expression hatte jedoch in keinem Fall einen Einfluss auf die Proteinmenge der potentiellen Zielgene (Daten nicht gezeigt). Somit war es nicht möglich mittels einer computergestützten *GO-Term*-Analyse *Target*gene der untersuchten miRNAs zu identifizieren. Zur weiteren Identifikation von miRNA-*Targets* wurden daher funktionelle Analysen durchgeführt.

4.3.3 Analyse von apoptoserelevanten Proteinen nach Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p in EA.hy926 Zellen mittels Human Apoptosis Arrays

Die strahleninduzierte Apoptose ist nach einer Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p in EA.hy926 Zellen erhöht. Zur Identifizierung von miRNA-regulierten apoptoserelevanten Proteinen oder Signalwegen wurden *Human Apoptosis Arrays* eingesetzt. Mittels dieses Arrays kann die Proteinmenge, bzw. die Phosphorylierung von 35 verschiedenen apoptoserelevanten Proteinen gleichzeitig in einer Probe bestimmt werden. Hierfür wurden EA.hy926 Zellen mit einem unspezifischen Inhibitor (Inh-Kontrolle) oder mit Anti-miRs der miRNA miR-216a, miR-518d-5p oder miR-525-3p transfiziert und anschließend mit einer Dosis von 0 Gy oder 2,5 Gy bestrahlt. Die mit 2,5 Gy bestrahlten Zellen wurden nach 4 h und nach 24 h im Anschluss an die Bestrahlung geerntet.

Abbildung 4-34 demonstriert exemplarisch die Immundetektion auf zwei *Human Apoptosis Arrays*. Die roten Kästchen zeigen, dass die drei p53-Phosphorylierungen 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy nach vorheriger Transfektion mit der Anti-miR-525-3p (Abb. 4-35 B) deutlich stärker ist als nach Bestrahlung und vorheriger Transfektion der Inhibitor-Kontrolle (Abb. 4-36 A).

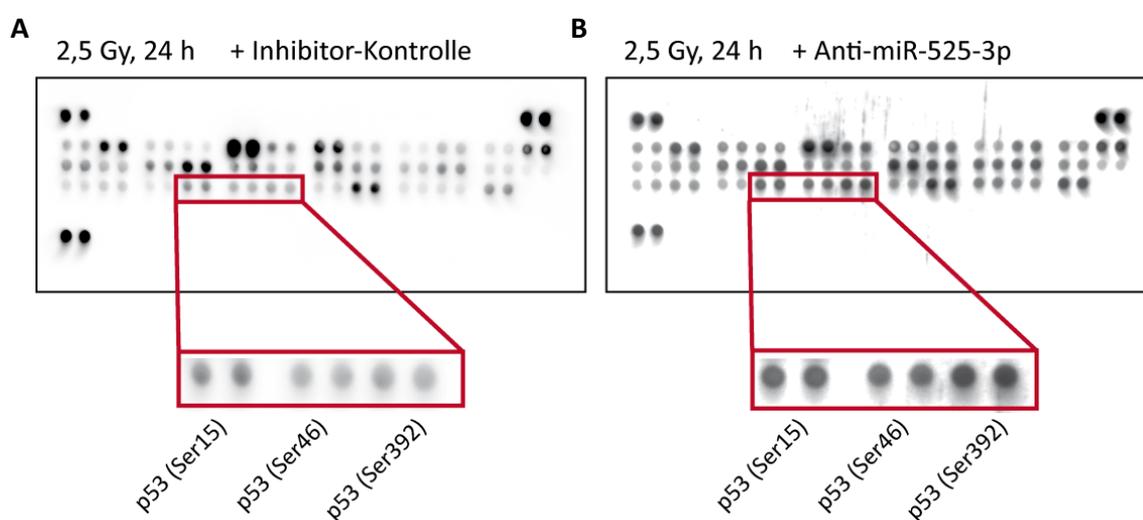


Abb. 4-34: Phosphorylierung von p53 in EA.hy926 Zellen 24 h nach Bestrahlung und Transfektion mit Inhibitor-Kontrolle bzw. Anti-miR-525-3p. EA.hy926 Zellen wurden zunächst mit (A) Inhibitor-Kontrolle bzw. (B) Anti-miR-525-3p behandelt und anschließend mit 2,5 Gy bestrahlt. 24 h nach Bestrahlung wurden Veränderungen apoptoserelevanter Proteine im *Human Apoptosis Array* analysiert. In A und B ist exemplarisch die Immundetektion auf zwei *Human Apoptosis Arrays* zu sehen. Die

4. Ergebnisse

untersuchten p53-Phosphorylierungen sind mit einem roten Kästchen markiert und wurden im unteren Teil der Abbildung vergrößert dargestellt. Nach Inhibition

Die Abbildung 4-35 zeigt die relative Veränderung von Phospho-p53 (Ser 15, 46 und 392) bzw. Caspase-3 relativ zu den Werten der unbestrahlten Zellen und nach Normierung auf die Ladekontrolle. Hierfür wurde zum Zeitwert von 4 h und 24 h nach Bestrahlung nach vorheriger Transfektion mit Kontroll-Inhibitor oder der Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p (Inh-216a, Inh-518d-5p bzw. Inh-525-3p) *Human Apoptosis Arrays* angefertigt und ausgewertet.

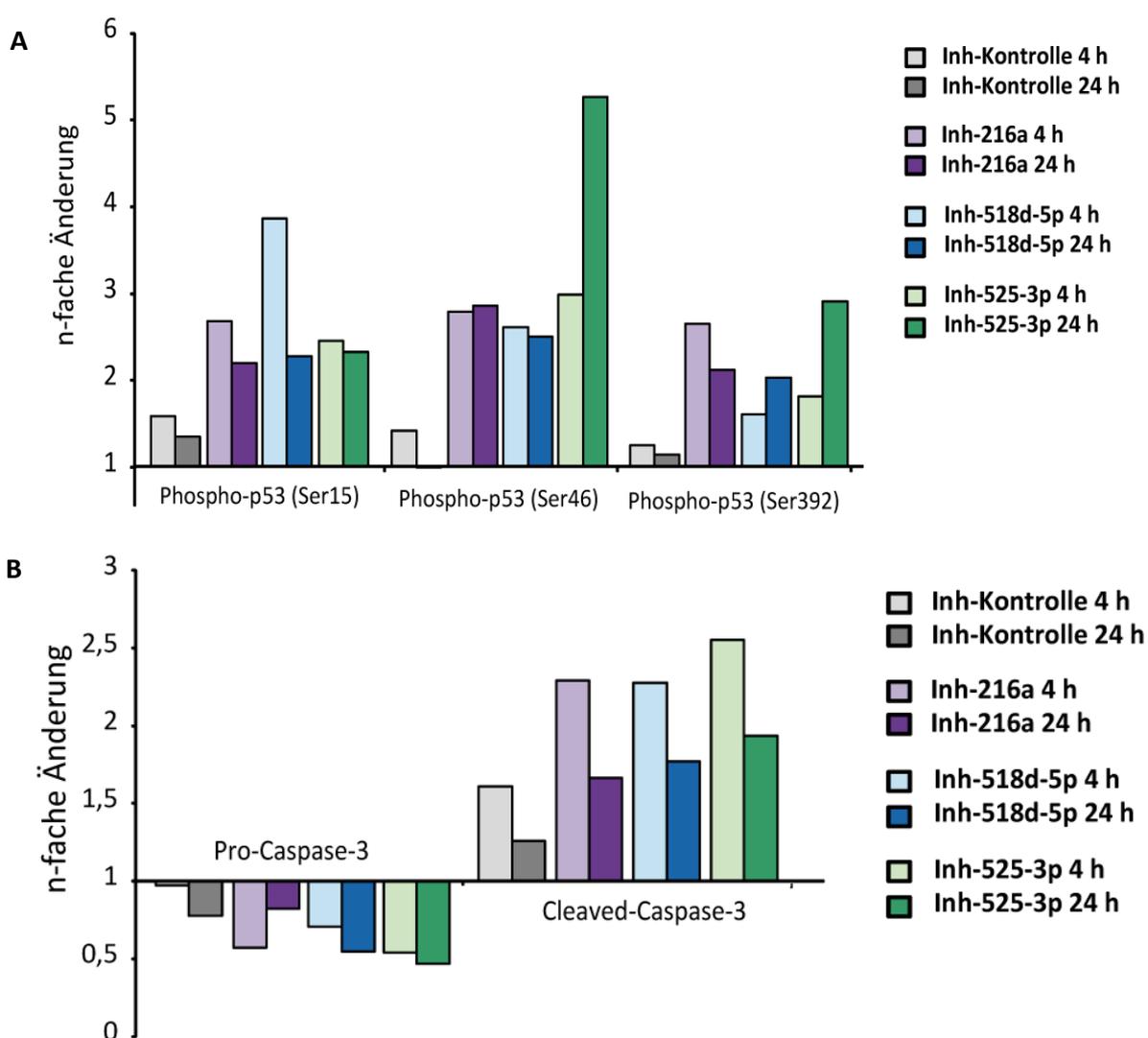


Abb. 4-35: Proteinveränderungen nach Bestrahlung in Anti-miR- und Kontroll-Inhibitor-behandelten EA.hy926 Zellen. EA.hy926 Zellen wurden mit Anti-miRs gegen miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p transfiziert und mit 2,5 Gy bestrahlt. Anschließend wurden Veränderungen apoptoserelevanter Proteine im *Human Apoptosis Array* analysiert. In **A** sind die Phosphorylierungen an den Serinen 15, 46 und 392 von p53 zu

beiden Zeitwerten aufgetragen. **B** zeigt den Gehalt an Pro-Caspase-3 und der aktiven Caspase-3 (*Cleaved-Caspase-3*) nach 4 h bzw. 24 h Bestrahlung.

Aus Abbildung 4-31 ist ersichtlich, dass die Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p einen deutlichen Einfluss auf die Phosphorylierung des p53-Proteins hatte. So ist, verglichen mit der Inhibitor-Kontrolle, zu beiden Zeitpunkten nach Bestrahlung Phosphorylierung an den Serinen 15, 46 und 392 deutlich erhöht. Zudem nahmen die p53-Phosphorylierungen bei den Kontroll-Inhibitor-transfizierten Zellen 24 h nach Bestrahlung wieder ab, während sie in den Inh-216a-, Inh-518d-5p- bzw. Inh-525-3p-transfizierten Proben meistens gleich blieben oder sogar zunahmen. Die deutliche Induktion der p53-Phosphorylierungen nach Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p und Bestrahlung deutet somit eher auf eine mitochondriale Apoptose hin, da es keine Hinweise auf eine Veränderung von Proteinen gibt, die an der rezeptorvermittelten Apoptose beteiligt sind. Die Untersuchung der Pro-Caspase-3 und der aktiven Caspase-3 unterstützt das Ergebniss, dass alle drei miRNAs einen Einfluss auf die strahleninduzierte Apoptose besitzen. So ist die Menge an aktiver Caspase-3 nach Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p deutlich höher und die Menge an Pro-Caspase-3 geringer als in Kontroll-Inhibitor-transfizierten Zellen. Alle anderen untersuchten apoptoserelevanten Proteine zeigten jedoch nach der Normierung mit der Positivkontrolle, verglichen mit der Kontrolle, keinen signifikanten Unterschied nach Inhibition der spezifischen miRNAs und anschließender Bestrahlung mit 2,5 Gy.

4.3.4 Proteom-Analyse zur Identifizierung von miRNA-regulierten Proteinen in der Strahlenantwort von Endothelzellen

Die beiden vorangegangenen Methoden (*GO-Term-Analyse* und *Human Apoptosis Array*) waren zur Identifizierung von Zielproteinen der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p in der Strahlenantwort noch nicht ausreichend. Daher wurde in einem weiteren Ansatz versucht, die Zielproteine der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p mittels 2D-DIGE-Analysen von Gesamtzellextrakten nach Inhibierung und anschließender Bestrahlung zu identifizieren. Bei dieser Methode können durch die verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen zwei zu vergleichende Proben (bestrahlt und unbestrahlt) zusammen mit einem internen Standard mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde die Analyse zur Identifizierung von miRNA-regulierten Proteinen in der Strahlenantwort mittels vier verschiedenen Kombinationen durchgeführt (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Mittels 2D-DIGE untersuchte Kombinationen

	Cy3	Cy5
Kombination 1	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy	Inhibitor-Kontrolle 5 Gy, 12 h
Kombination 2	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy	miR-216a-Inhibitor 5 Gy, 12 h
Kombination 3	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy	miR-518d-5p Inhibitor 5 Gy, 12 h
Kombination 4	Inhibitor-Kontrolle 0 Gy	miR-525-3p-Inhibitor 5 Gy, 12 h

Für die 2D-DIGE-Analysen wurde die humane Endothelzelllinie EA.hy926 mit den miRNA-Inhibitoren Inh-216a, Inh-518d-5p und Inh-525-3p transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen bestrahlt und 12 h nach Bestrahlung geerntet. Als Kontrolle wurden EA.hy926 Zellen verwendet, die mit einem Kontroll-Inhibitor transfiziert worden waren. Für alle Ansätze wurden drei biologische Replikate analysiert.

Abbildung 4-36 zeigt ein Beispielgel, in dem drei mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2, Cy3 und Cy5) markierte Extrakte übereinander gelagert sind.

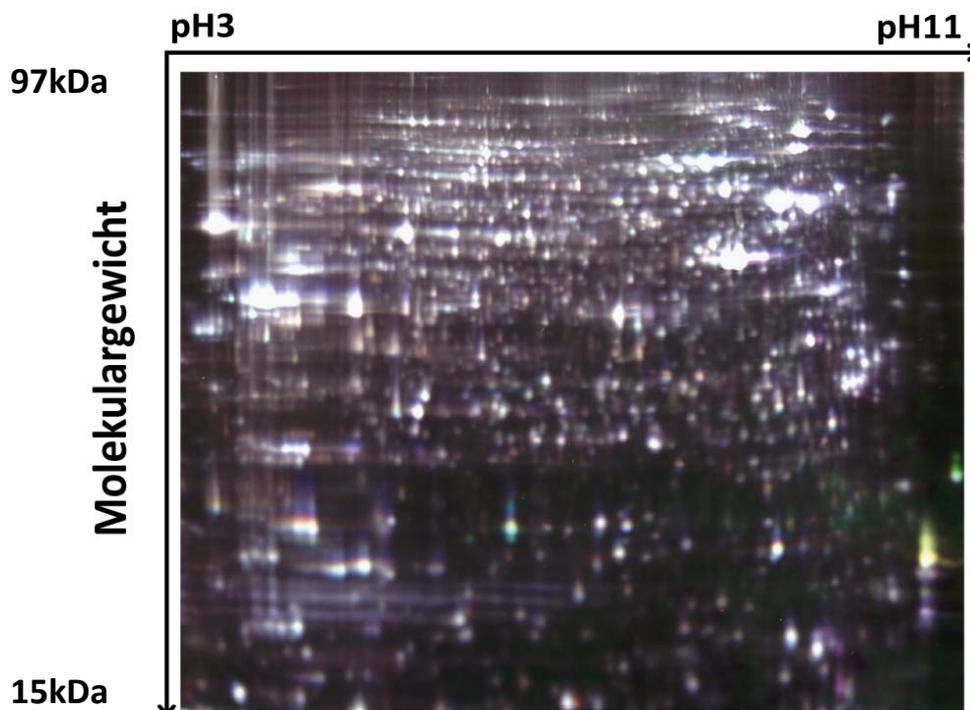


Abb. 4-36: 2D-DIGE-Beispielgel mit einem pH-Bereich von 3 bis 11. Durch die Überlagerung der drei Fluoreszenzmarkierungen wirken die unveränderten Proteinspots weiß. Veränderte Proteinspots erscheinen farbig.

4. Ergebnisse

In allen Ansätzen konnten ca. 1000 Proteinspots detektiert werden, was auf eine gute Qualität und Auflösung der 2D-Gele schließen lässt. Da es sich jedoch bei einigen Spots um posttranslationale Modifikationen oder Isoformen der Proteine handelt, ist die tatsächliche Anzahl an detektierbaren Proteinen geringer einzuschätzen (Fountoulakis et al., 2004). Proteinspots, die nach der Behandlung nicht verändert exprimiert werden, erscheinen bei einer überlagerten Darstellung aller drei Fluoreszenzsignale als weiße Proteinspots (Abbildung 4-36). Rote bzw. grüne Proteinspots entsprechen veränderten Proteinexpressionen. Proteinspots die innerhalb der drei biologischen Replikate eine Regulation von 1,3 oder mehr ($\leq -1,3$ oder $\geq 1,3$) und ein Wert von unter 0,05 im Student t-Test bei einem Vergleich der drei biologischen Replikate aufwiesen, wurden als signifikant verändert bewertet. Zusätzlich wurden diese Spots manuell kontrolliert, um zu verhindern, dass die Veränderungen auf Artefakte, wie zum Beispiel Staub, zurückzuführen waren. Um die veränderten Proteinspots zu identifizieren, wurden sie durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Insgesamt konnten 73 Spots identifiziert werden, die nach mindestens einer der in Tabelle 4-4 aufgezeigten Kombinationen als signifikant verändert detektiert werden konnten. Abbildung 4-37 zeigt die Lage der 73 Spots auf einem Beispielgel.

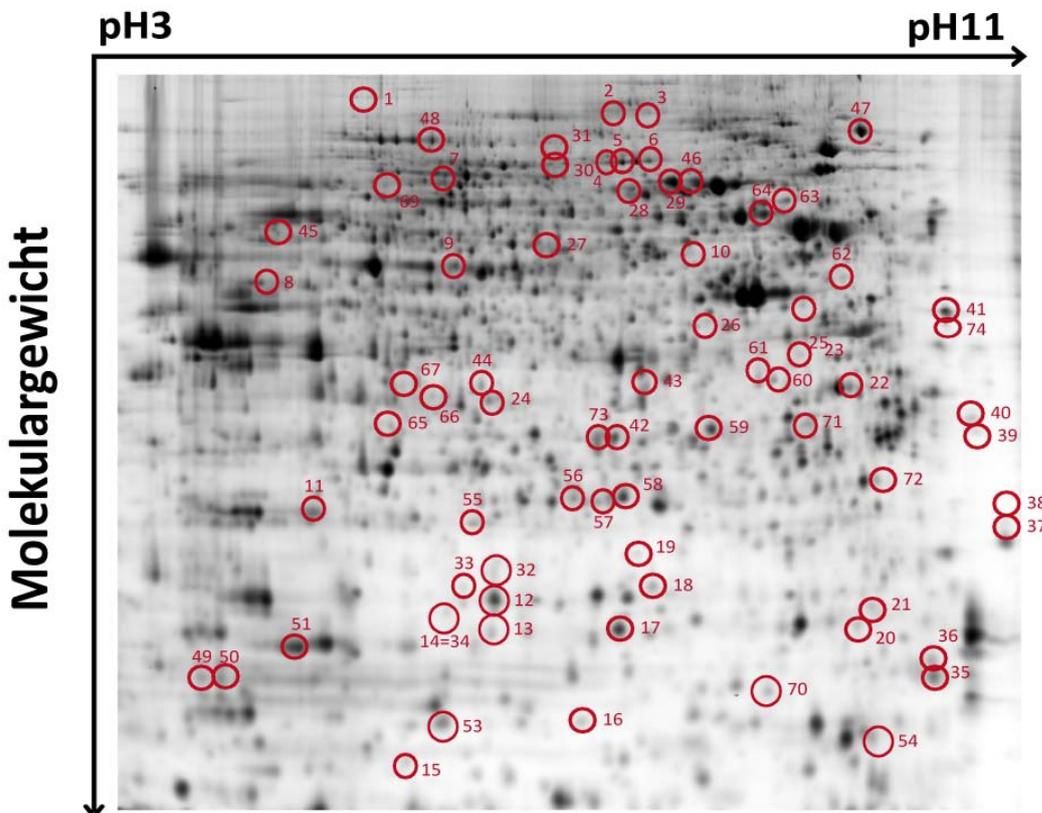


Abb. 4-37: 2D-DIGE-Gel mit markierten, differentiell exprimierten Proteinen. EA.hy926 Zellen wurden mittels 2D-DIGE (pH-Bereich 3 bis 11) analysiert. Die durch rote Kreise markierten Spots waren bei mindestens einer der analysierten Kombinationen signifikant

verändert. Die Nummerierung der veränderten Proteine auf dem Gel entspricht der Reihenfolge der Auswertung mittels des Analyseprogramms.

Die Identifizierung der *Spots* erfolgte mittels MALDI-Massenspektrometrie oder, falls damit keine eindeutige Identifikation möglich war, durch LC-MS/MS. Mittels MALDI-Massenspektrometrie wurden 17 Proteine mit einem *Mascot-Score* von über 63 eindeutig identifiziert. 22 *Spots* konnten über die Aufnahme zusätzlicher LC-MS/MS-Spektren einem Protein zugeordnet werden. Bei fünf *Spots* war eine eindeutige Zuordnung zu einem Protein nicht möglich und es wurden zwei (einmal drei) Proteine in die Identifikationstabelle aufgenommen. Zur eindeutigen Identifikation eines dieser Proteine müssten im Anschluss Western-Blot-Analysen angefertigt werden. Drei Proteine (*Spot* 8, 21 und 22) wurden mittels beider Verfahren analysiert und ergaben eine 100 %-ige Übereinstimmung. Von den 73 deregulierten *Spots* war somit für 44 *Spots* eine größtenteils eindeutige Zuordnung zu dem zugehörigen Protein möglich, was einer Gesamtdetektion von 60,3 % entspricht.

Zwei Proteine wiesen in allen vier untersuchten Kombinationen eine signifikante Veränderung auf (Obg-like ATPase 1 (OLA1) und cDNA FLJ51435, moderately similar to Cofilin-1). Zusätzlich zeigten einige Proteine wie Prefoldin subunit 2 (PFD2), Peroxiredoxin-1 (PRDX1), Destrin (DSTN) und Annexin A5 (ANXA5) in allen Kombinationen eine identische, wenn auch nicht immer statistisch signifikante, Veränderung der Proteinexpression.

Vier Proteine (das Chaperonin containing TCP1 (CCT2), das Heat shock 70 kDa protein 9 (HSPA9/Grp75), Thioredoxin-1 (TXN1) und Annexin A3 (ANXA3)) wiesen nach Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p (Kombination 2, 3 und 4) eine ähnliche Veränderung der Proteinmenge auf. Dies deutete auf eine gleiche Regulation dieser Proteine in der miRNA-vermittelten Strahlenantwort hin.

Andere Proteine waren hingegen Inhibitor-spezifisch verändert. So zeigten zwei Proteine (Lamin A/C (LMNA) und Inner membrane protein (IMMT)) nur nach Inhibition mit Anti-miR-216a (Kombination 2) eine Hochregulierung. Ebenfalls hochreguliert war das T-complex protein 1 subunit delta (CCT4), das Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 und der Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) nach Transfektion mit dem miR-518d-5p-Inhibitor (Kombination 3). Das SET nuclear oncogene (SET/IGAAD) zeigte hier eine Herunterregulierung. Bei Kombination 3 sind somit insgesamt vier Proteine Inhibitor-spezifisch verändert. Ausschließlich nach Inhibition der miRNA miR-525-3p waren sechs Proteine (das mitochondriale SCO1 homolog (SCOD1), die

Esterase D (ESD), das Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRPA2B1), das Histon H2A, die Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPIG) und das Histidine triad nucleotide binding protein 1 (HINT1) dereguliert.

Das X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5/KU80) zeigte lediglich nach Bestrahlung ohne spezifische Inhibition einer miRNA eine Hochregulierung. Nach Inhibition der miRNAs miRNAs miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p blieb XRCC5 hingegen unverändert. Dessen Induktion könnte somit von einer Hochregulierung der untersuchten miRNAs nach Bestrahlung abhängig sein. Wird die Funktion dieser miRNAs mittels spezifischer Inhibitoren unterbunden, könnte in diesem Fall keine strahleninduzierte Veränderung der Proteinexpression von XRCC5 mehr erfolgen.

Tabelle 4-5 zeigt eine Auflistung aller in den vier Kombinationen identifizierten *Spots*.

Spot-nummer	Proteinname	Zugangsnummer	Kontrolle + bestrahlt		Kontrolle + bestrahlt mit Anti-miR-216a		Kontrolle + bestrahlt mit Anti -miR-518d-5p		Kontrolle + bestrahlt mit Anti-miR-525-3p	
			Regulation	t-Test	Regulation	t-Test	Regulation	t-Test	Regulation	t-Test
5	X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5/KU80)	P13010	1,33	*	1,18	0,31	1,19	0,36	1,09	0,23
8	Obg-like ATPase 1 (OLA1)	Q9NTK5	1,46	*	1,32	*	1,41	*	1,4	**
11	Peroxiredoxin-1 (PRDX1)	Q06830	1,31	**	1,29	0,26	1,35	0,29	1,66	*
12	cDNA FLJ51435, moderately similar to Cofilin-1	B4E112	-2,28	*	-2,11	*	-3,52	**	-2,26	**
13	Prefoldin subunit 2 (PFD2)	Q9UHV9	-3,06	**	-1,81	0,26	-4,6	**	-3,13	**
14=34	Destrin (DSTN)	B7Z9M9	-2,63	**	-1,71	0,30	-3,7	**	-2,98	**
15	C-type lectin domain family 11 member A (CLEC11A)	Q9Y240	-1,49	*	n.d.	n.d.	-1,45	0,32	-1,51	0,055
17	Stathmin (STMN)	P16949	-1,51	**	-1,53	0,34	-1,24	0,39	1,19	0,43
18	Acireductone dioxygenase 1 (ADI1)	Q9BV57	-1,58	*	-1,03	0,48	-1,46	0,13	-1,06	0,49
19	Calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa (CRHSP1)	Q9Y2V2	-1,33	*	-1,27	0,30	-1,23	0,29	1,18	0,35
20	Gem associated protein 6 (GEMIN6)	Q8WXD5	-1,31	*	-1,22	0,28	-1,29	0,45	1,12	0,39
21	Myosin, light chain 12A (MLC20)	Q53HL1	-1,5	*	-1,55	0,34	-1,21	0,36	1,31	0,15
22	Annexin A5 (ANXA5)	E7ENQ5	1,34	*	1,4	*	1,25	0,15	1,47	*
23	WD repeat domain 77 (WD77) HSPA (heat shock 70kDa) binding protein, cytoplasmic cochaperone 1 (HSPBP1)	Q9BQA1 B4DG11	1,34	**	1,10	*	-1,03	0,15	1,17	*
24	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1 (PSMA1)	P25786	1,19	0,068	1,47	*	1,39	0,31	1,26	0,089
26	Cytokine induced apoptosis inhibitor 1 (CIAPIN1)	Q6FI81	-1,03	0,60	1,37	*	1,05	0,41	1,20	0,11
27	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (CCT2) Arrestin, beta 1 (ARRB1)	B5BTY7 P49407	1,10	0,26	1,32	*	1,33	*	1,44	*
28	Glycyl-tRNA synthetase (GARS) Minichromosome maintenance complex binding protein (MCMBP)	P41250 Q9BTE3	1,26	0,78	2,06	*	2,74	**	1,12	0,12
29	Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin) (HSPA9/Grp75)	P38646	1,06	0,11	1,76	*	1,83	**	1,21	0,16
30	Lamin A/C (LMNA)	P02545	1,13	0,069	1,32	*	1,14	0,34	1,12	0,45

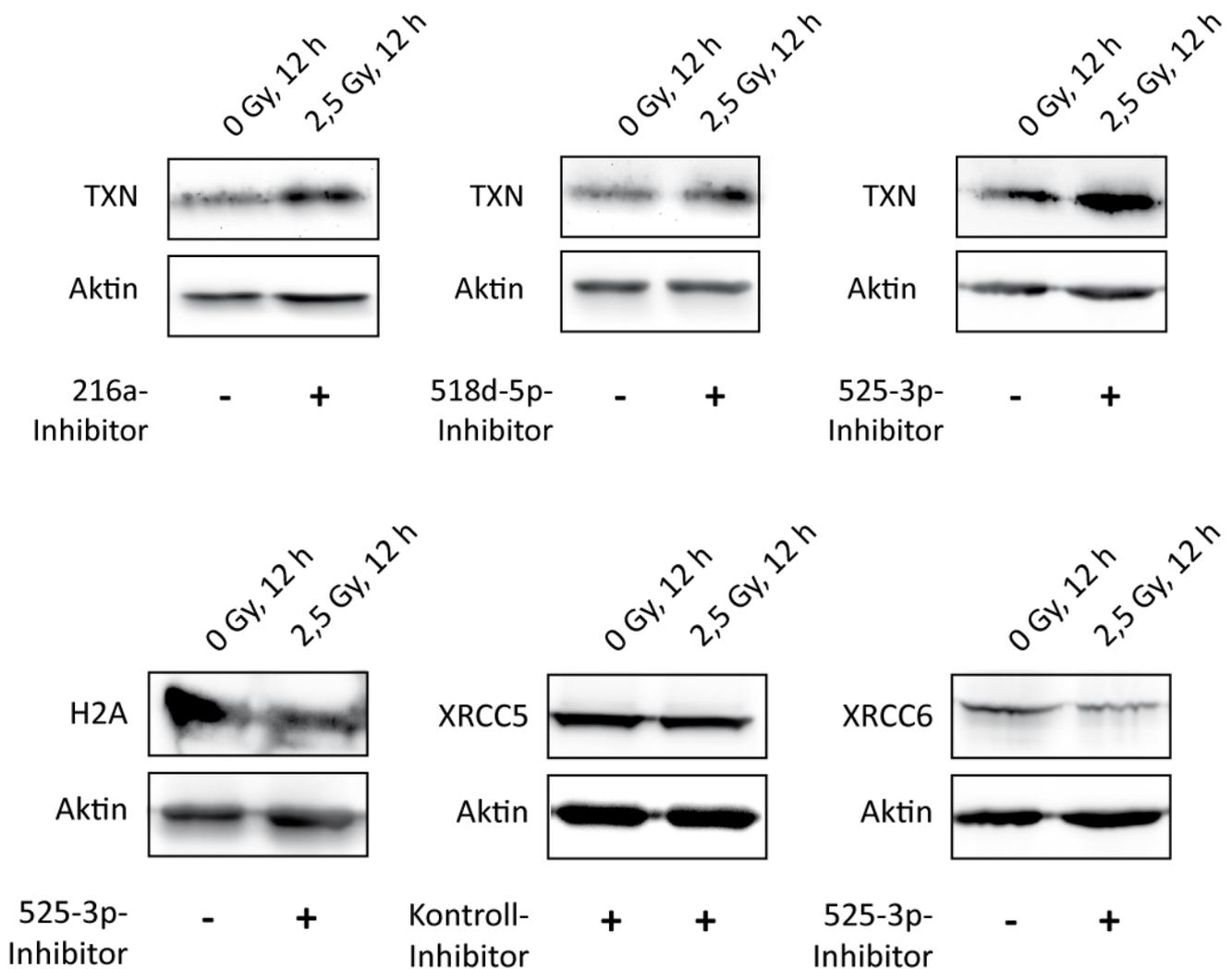
31	Inner membrane protein, mitochondrial (IMMT)	Q16891	1,15	0,29	1,34	*	1,17	0,24	1,02	0,79
32	cDNA FLJ51435, moderately similar to Cofilin-1	B4E112	-2,00	0,084	-1,20	0,60	-2,98	**	-2,75	*
35	Astrocytic phosphoprotein PEA-15 (PEA15/PED)	Q6FHL9	-1,40	*	1,07	0,17	-1,99	*	1,20	0,56
39	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B (ANP32B)	Q53F35	-1,24	*	-1,24	0,12	-1,48	**	-1,38	*
40	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A (ANP32A)	P39687	-1,49	0,30	-1,02	0,82	-1,62	*	-1,39	*
41	SET nuclear oncogene (SET/IGAAD)	A6NGV1	-1,06	0,44	-1,05	0,48	-1,38	*	-1,14	0,38
43	Annexin A3 (ANXA3)	P12429	-1,08	0,28	-1,41	0,35	-1,37	**	-1,28	0,23
45	T-complex protein 1 subunit delta (CCT4) Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (SERBP1/PAIRPB1)	P50991 Q8NC51	1,17	0,10	1,12	0,29	1,54	*	-1,02	0,82
46	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant Annexin A6	Q53GZ6 A6NN80	1,12	*	1,06	0,25	1,41	**	1,09	0,14
48	Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)	B4DPU3	1,08	0,098	1,08	0,29	1,4	**	1,28	*
49	Histone H2A Profilin-1 (PFN1)	B2R5B3 P07737	1,13	*	1,07	0,46	1,09	0,28	-1,54	*
51	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIG)	Q13427	-1,27	0,33	1,07	0,41	1,01	0,44	1,7	**
53	Histidine triad nucleotide binding protein 1 (HINT1)	P49773	-1,13	0,16	-1,04	0,72	-1,10	0,41	1,44	*
54	Thioredoxin-1 (TXN1)	P10599	1,14	0,23	1,50	0,25	1,40	0,32	1,8	*
56	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2 (RRAS2) Glutathione S-transferase P (GSTP1) Peroxiredoxin 3 (PRDX3)	B7Z5Z2 P09211 P30048	1,15	*	1,20	n.d.	1,23	0,14	1,32	*
58	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10 (PSMD10)	O75832	1,32	0,51	1,03	0,67	1,51	0,35	1,56	*
59	Proteasome activator complex subunit 2 (PA28gamma)	P61289	1,21	0,63	1,06	0,21	1,01	0,53	1,44	*
63	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)	P61978	1,42	0,38	1,13	0,15	1,26	0,39	1,32	*
64	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) (HAPD1)	P10809	1,27	0,25	1,07	0,28	1,17	0,12	1,4	*

65	Protein SCO1 homolog, mitochondrial precursor (SCOD1)	O75880	1,02	0,79	1,14	0,12	1,21	*	-1,9	*
66	Esterase D (ESD)	P10768	1,04	0,41	1,18	0,062	1,09	0,32	1,41	*
67	Thymidylate synthase	A8K9A5	1,12	0,14	-1,29	0,16	1,11	0,39	-2,36	*
68	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRPA2B1)	P22626	1,05	0,33	-1,10	0,32	-1,15	0,35	-1,31	*
69	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (XRCC6/KU70)	B1AHC9	1,16	**	-1,31	0,33	1,15	0,39	-1,44	*
72	Tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)	Q5W0H4	1,29	*	1,48	0,21	1,27	0,15	1,77	*
73	Proteasome subunit beta type	Q86U62	1,21	**	1,22	0,22	1,07	0,62	1,42	**

Tabelle 4-5: Identifizierung der 44 durch Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p bzw. miR-525-3p mittels Anti-miRs regulierten Proteinspots 12 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy im pH-Bereich von 3 bis 11. In dunkelgrau eingefärbte *Spot*nummern wurden durch MALDI-Analyse, hellgrau eingefärbte *Spot*nummern wurden durch LC-MS/MS identifiziert. Ungefärbte *Spot*nummern wurden durch beide Methoden identifiziert. Bei der Regulation zeigen negative Werte eine Herunterregulierung und positive Werte eine Hochregulierung des Proteins an. Der Student t-Test bezieht sich auf drei biologische Replikate, wobei * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ entspricht. Blau eingefärbte Proteinregulationen entsprechen einer signifikanten Veränderung, die zusätzlich mindestens 1,3-fach oder mehr ($\leq -1,3$ oder $\geq 1,3$) verändert waren. Mit einer blauen Schrift wurden signifikante Proteinregulationen beschrieben wenn diese zwischen 1,2- bis 1,29-fach lag und wenn eine signifikante Regulation dieses Proteinspots (mindestens 1,3-fach) bei einer anderen Kombination detektiert werden konnte. Außerdem wurden nicht signifikante Proteinregulationen von 1,2-fach oder mehr ($\leq -1,2$ oder $\geq 1,2$) mit einer blauen Schrift markiert, wenn eine signifikante Regulation dieses Proteinspots bei einer anderen Kombination detektiert werden konnte und sie eine ähnliche Tendenz aufwiesen.

4.3.5 Validierung der 2D-DIGE Resultate durch quantitative Western-Blots

Um die Ergebnisse der differentiellen 2D-DIGE-Analyse zu validieren, wurden einige Proteine mittels Western-Blot untersucht. Aus den 44 veränderten Proteinen (siehe Tabelle 4-5) wurden fünf und kommerziell erhältliche, im Western-Blot getestete, Antikörper ausgewählt, die zusätzlich von funktionellem Interesse waren. Die 1D-Western-Blot-Analysen wurden mit Lysaten durchgeführt, die mit der Inhibitor-Kontrolle oder Anti-miRs transfiziert und unbestrahlt bzw. bestrahlt nach 12 h geerntet worden waren. Zur Normalisierung der Blots diente Aktin, da es nach Bestrahlung nicht differentiell exprimiert wird. Abbildung 4-38 zeigt die Ergebnisse der fünf analysierten Proteine im Western-Blot.



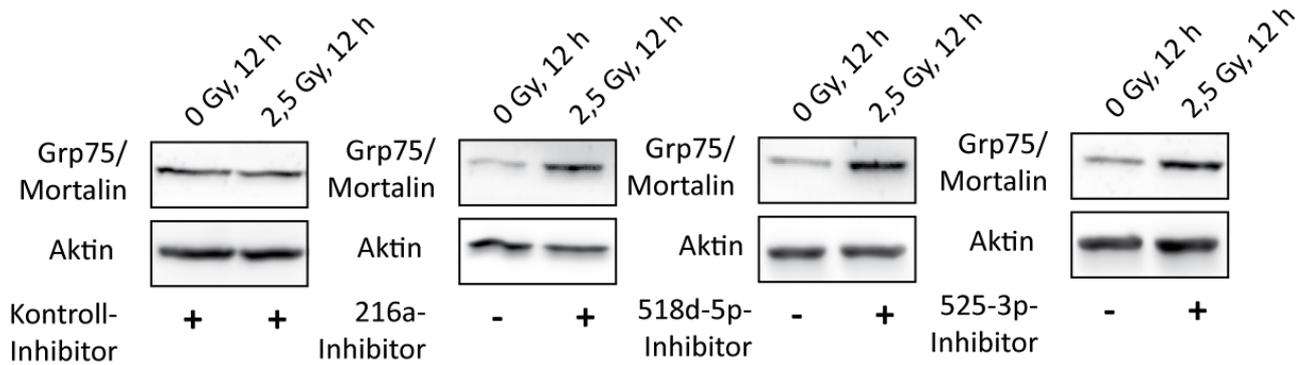


Abb. 4-38: Western-Blots zur Validierung ausgewählter Proteine, die in der 2D-DIGE-Analyse als differentiell exprimiert analysiert worden waren. Gesamtzellextrakte von EA.hy926 Zellen mit und ohne Bestrahlung und nach vorheriger miRNA-Inhibition wurden nach 12 h gewonnen. Die Abbildung zeigt repräsentative Beispielblots der im Western-Blot analysierten Proteine H2A, Grp75, TXN1 (TXN), XRCC5 und XRCC6. Die Proteinexpression von β -Aktin, die als Normalisierung der Proteinbanden verwendet wurde, ist zu jedem Blot gezeigt.

Alle fünf Proteine konnten eindeutig im Western-Blot detektiert werden (Abb. 4-38). Die quantitativen Auswertungen der Expressionsänderungen der Proteine H2A, Grp75, TXN1, XRCC5 und XRCC6 sind in Tabelle 4-6 ersichtlich. Sie erfolgte mit dem Analyseprogramm TotalLab TL100 (Phoretix). Die Normierung wurde auf die Signalstärke der Ladekontrolle (Aktin) durchgeführt. Die relativen Expressionsänderungen für H2A, Grp75, TXN1, XRCC5 und XRCC6 sind immer im Verhältnis zur jeweiligen unbestrahlten Inhibitor-Kontrolle (Inh-Kontrolle) dargestellt.

Tabelle 4-6: Relative Expressionsänderungen der Proteine mit und ohne Bestrahlung und vorheriger Behandlung von EA.hy926 Zellen mit Inhibitor-Kontrolle oder Anti-miRs. Die Standardabweichung wurde aus den quantitativen Auswertungen zweier biologischer Replikate mittels Student t-Test generiert.

Proteinname	Behandlung	Regulation Western-Blot	Standard- Abweichung	Regulation 2D-DIGE
Histon H2A	Anti-miR-525-3p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	-1,24	0,014	-1,54 *
Mortalin (Grp75)	Inh-Kontrolle (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	0,97	0,099	1,06
Mortalin (Grp75)	Anti-miR-216a (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	2,12	0,634	1,76 *
Mortalin (Grp75)	Anti-miR-518d-5p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1,94	0,563	1,82 **
Mortalin (Grp75)	Anti-miR-525-3p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1,91	0,293	1,21
Thioredoxin-1 (TXN1)	Anti-miR-216a (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1,45	0,167	1,5
Thioredoxin-1 (TXN1)	Anti-miR-518d-5p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1,46	0,122	1,4
Thioredoxin-1 (TXN1)	Anti-miR-525-3p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1,59	0,147	1,8 *
X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5/KU80)	Inh-Kontrolle (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1,21	0,019	1,33 *
X-ray repair cross-complementing protein 6 (XRCC6/KU70)	Anti-miR-525-3p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	-1,28	0,171	-1,44 *

Bei allen Ansätzen war im Western-Blot, verglichen mit den Regulationen im 2D-Gel, eine gute Übereinstimmung zu detektieren (Vergleich Regulation im Western Blot (dritte Zeile) und Regulation im 2D-Gel (letzte Zeile), Tabelle 4-6).

Um den zeitlichen Verlauf der Deregulationen nach Bestrahlung und gleichzeitiger Transfektion besser beschreiben zu können, wurden mit vier Proteinen weitere Analysen angeschlossen, da diese zum Teil wichtige Funktionen in der Strahlenantwort von Zellen besitzen. Hierfür wurde die Proteinexpression von H2A, TXN1, XRCC5 und XRCC6 in transfizierten und bestrahlten Proben durchgeführt, die 4 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung geerntet worden waren. Als Kontrolle dienten immer unbestrahlte Proben der Inhibitor (Inh)-Kontrolle. Zur Normalisierung der Blots wurde Aktin verwendet (siehe Anhang

Abbildung 7-3). Die durch die quantitative Auswertung ermittelten Regulationen der Proteinexpression von H2A, TXN1, XRCC5 und XRCC6 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung sind im Anhang in Tabelle 7-1 aufgeführt, wobei die relative Expressionsänderungen für H2A, TXN1 XRCC5 und XRCC6 immer im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle (0 Gy, Inh-Kontrolle) dargestellt wurde. Es zeigte sich für alle untersuchten Proteine auch im zeitlichen Verlauf eine wie schon in Abbildung 4-38 gezeigte Dereglulation.

4.3.6 Bioinformatische GO-Term-Analyse der differentiell exprimierten Proteine

Um die in der 2D-DIGE-Analyse identifizierten strahlen- und miRNA-regulierten Proteine bestimmten biologischen Prozessen zuzuordnen, wurde mit diesen eine *Gene Ontology (GO)-Term*-Analyse durchgeführt. Die Anreicherung von hoch- oder herunterregulierten Genen mit einer bestimmten *GO*-Annotation kann unter ausgewählten Bedingungen Hinweise auf die in der Zelle stattfindenden biochemischen Reaktionen geben (Beissbarth, 2006). Mittels dieser Technik können also nicht nur einzelne Gene, sondern ganze biologische Prozesse als differentiell reguliert erkannt werden. In allen vier experimentell analysierten Kombinationen (siehe Tabelle 4-4) konnten viele der veränderten Proteine biologischen Prozessen wie der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur zugeordnet werden, die alle im untersuchten biologischen Zusammenhang der Strahlenantwort von besonderem Interesse sind. Weiterhin waren bei allen vier untersuchten Kombinationen Proteine, die eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und dem Zellwachstum besitzen, dereguliert. Einige Proteine sind an mehreren biologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. XRCC5 (Regulation des Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur), andere Proteine sind auf einen oder auf einige wenige Prozesse spezialisiert, wie z.B. Olg-like ATPase 1 (OLA1) (Reduktion und Biosynthese von kleinen Metaboliten). Die Zuordnung der veränderten Proteine zu einem biologischen Prozess ist im Anhang (Tabelle 7-2 bis Tabelle 7-5) dargestellt.

Abbildung 4-39 A-D zeigt eine Übersicht über die Zuordnung der durch Strahlung veränderten Proteine zu bestimmten biologischen Prozessen. In Abbildung 4-39 A sind die biologischen Funktionen der veränderten Proteine nach Bestrahlung und Transfektion mit Kontroll-Inhibitor dargestellt. Sie betreffen vor allem Proteine, die zur Aufrechterhaltung der Zellmorphologie (21 %), für Apoptose- und Zelltodprozesse (28 %) und der Zellzyklusregulation (28 %) notwendig sind. Proteine die eine Funktion in der Faltung und Modifikation von anderen Proteinen (7 %) und der Reduktion/Biosynthese von kleinen Metaboliten besitzen (3,6 %), machen einen geringen Anteil der gesamten veränderten Proteine aus. 12 % der veränderten Proteine konnten keiner biologischen Funktion zugeordnet werden.

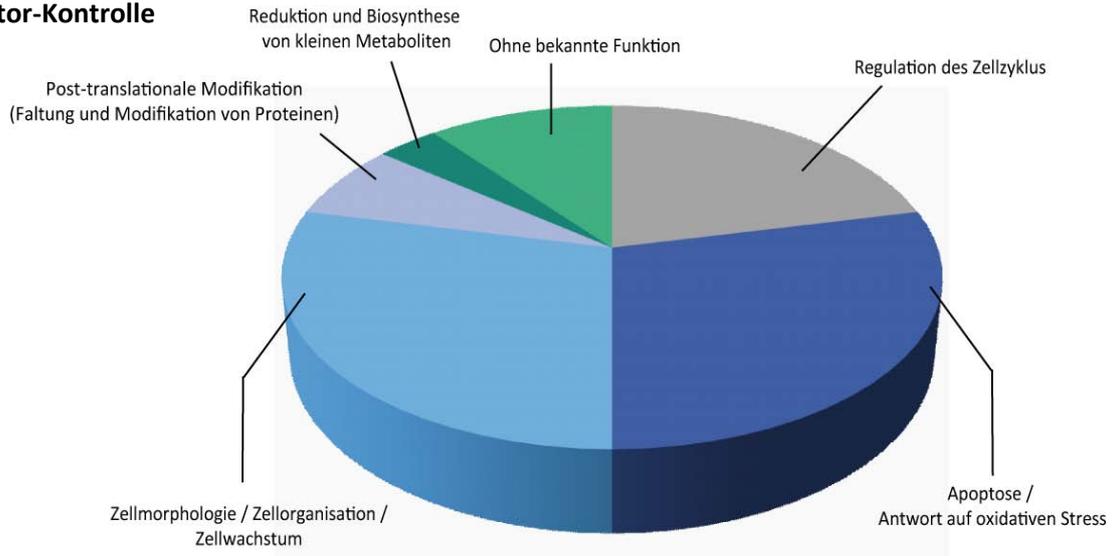
In Abbildung 4-39 B sind die betroffenen biologischen Prozesse nach Bestrahlung und vorheriger Transfektion mit Anti-miR-216a gezeigt (Kombination 2). Sie umfassen ebenfalls Prozesse wie die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie (27 %), die Apoptose (28 %) und die Regulation des Zellzyklus (17 %) (Abb. 4-39 B). Die Analyse von Anti-miR-518d-5p-behandelten Zellen (Kombination 3) zeigt, dass sie einen größeren Anteil an veränderten Proteinen, die eine Funktion in der Faltung und Modifikation von Proteinen und der Reduktion/Biosynthese von kleinen Metaboliten besitzen (14,3 % bzw. 9,5 %) (Abb. 4-39 C). Aus Abbildung 4-39 D ist die Verteilung der biologischen Funktionen für signifikant veränderte Proteine nach der Transfektion mit Anti-miR-525-3p ersichtlich. Hierbei sind vor allem Proteine verändert, die an der Apoptose, der Antwort auf oxidativen Stress (40,5 %) und der Reduktion/Biosynthese von kleinen Metaboliten (21,4 %) beteiligt sind, während kein dereguliertes Protein der Zellzyklusregulation zugeordnet werden konnte.

Die Analyse der Daten zeigt, dass nach Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p, sowie der Behandlung mit dem Kontroll-Inhibitor, viele Proteine verändert sind, die einen Einfluss auf die Regulation der Apoptose haben. Dies ist in Übereinstimmung mit den experimentellen Apoptosedaten (SubG1-Analyse und Caspase-3-Induktion) nach Bestrahlung und gleichzeitiger Transfektion mit Anti-miRs und Kontroll-Inhibitor. Zusätzlich sind die Daten konsistent mit den Ergebnissen des Apoptosearrays, wobei hier eine erhöhte Menge an aktiver Caspase-3 nach Bestrahlung detektiert wurde (siehe 4.3.3). Des Weiteren ergab die *in silico*-Identifizierung der potentieller *Target*gene der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p (siehe 4.3.2) ebenfalls eine Vielzahl von potentiellen Zielgenen, die eine Funktion in ähnlichen biologischen Signal- oder Regulationswegen besitzen. Auch die Regulation des Zellzyklus und die Antwort auf Stress sind bei der *GO-Term*-Analyse (dieses Kapitel) und der *in silico*-Identifizierung potentieller *Target*gene (siehe Kapitel 4.3.2) als Prozess der veränderten Proteine bzw. Prozess der potentiellen Zielproteine immer vertreten.

Eine Ausnahme stellt die Zuordnung der veränderten Proteine zu einem biologischen Prozess nach Inhibition von miR-525-3p dar (Kombination 4). Hier zeigt sich, dass eine Inhibierung dieser miRNA eine andere Gewichtung der beteiligten biologischen Prozesse nach Bestrahlung bewirkte, wenn man sie mit Proteinen, die nach Transfektion mit Kontroll-Inhibitor und Bestrahlung dereguliert waren, vergleicht. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der *in silico*-Analyse der potentiellen Zielproteine (siehe 4.3.2). Auch hier hatte die miRNA miR-525-3p deutlich mehr *Target*proteine, die einen Einfluss auf strahlenregulierte Prozesse haben könnten, als die miRNAs miR-216a und miR-518d-5p.

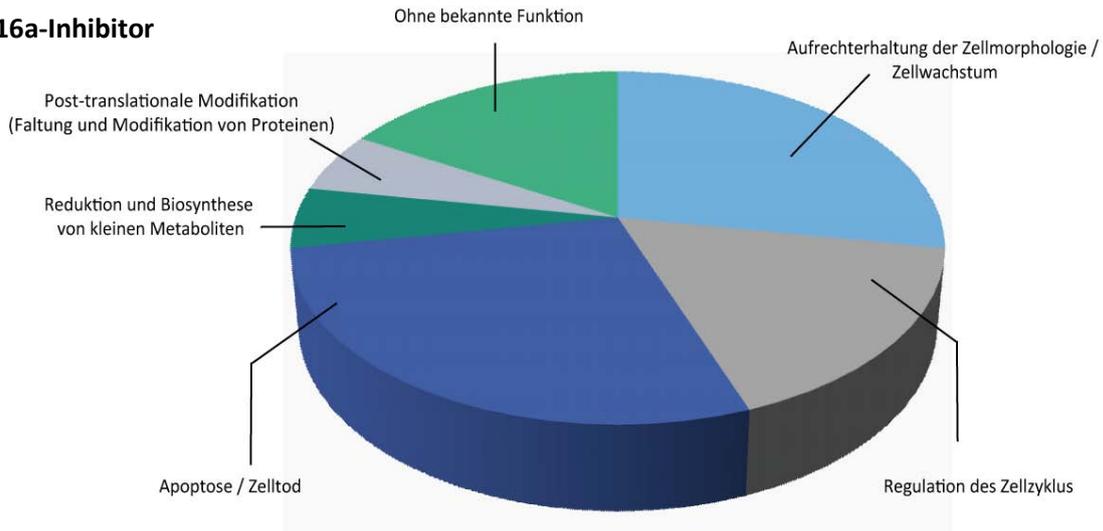
A

Inhibitor-Kontrolle



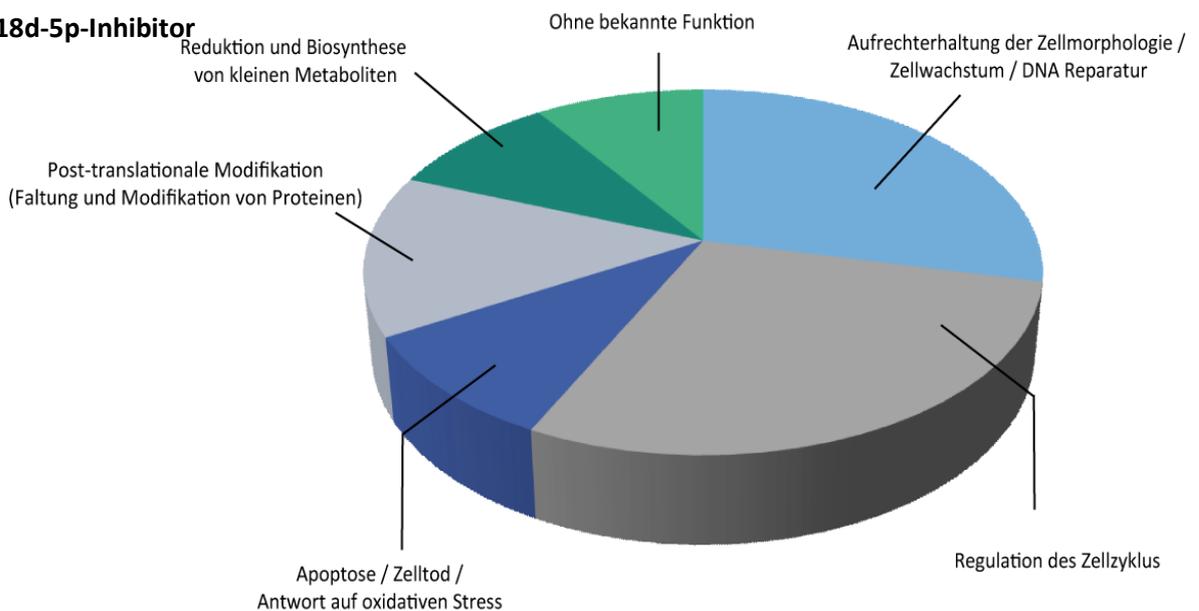
B

216a-Inhibitor



C

518d-5p-Inhibitor



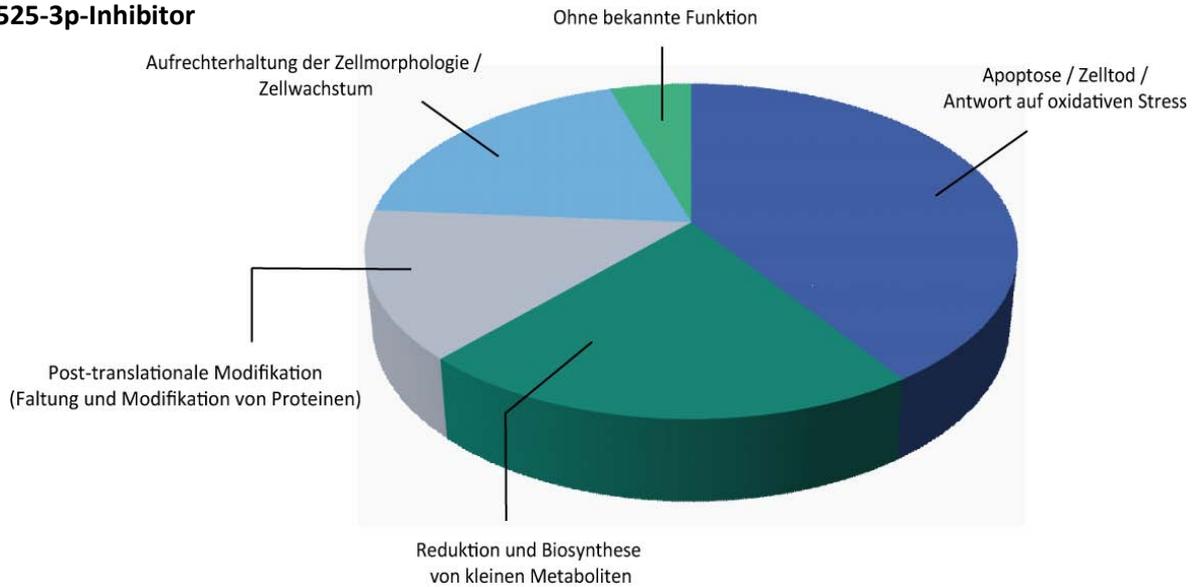
D**525-3p-Inhibitor**

Abb. 4-39: Biologische Funktionen von deregulierten Proteinen nach Bestrahlung und Transfektion mit Inhibitor-Kontrolle bzw. spezifischen Anti-miRs in Endothelzellen. **A** zeigt die biologischen Funktionen der veränderten Proteine nach Bestrahlung von EA.hy926 Zellen mit 2,5 Gy. In **B** sind die biologischen Funktionen nach Bestrahlung und vorheriger Transfektion mit Anti-miR-216a gezeigt. **C** fasst die biologischen Prozesse nach einer Transfektion mit Anti-miR-518d-5p und Bestrahlung, **D** die biologischen Prozesse nach einer Transfektion mit Anti-miR-525-3p und einer anschließenden Bestrahlung zusammen.

Die mittels 2D-DIGE analysierten deregulierten Proteine sind bei allen vier analysierten Kombinationen an ähnlichen biologischen Prozessen beteiligt. Die Proteine von Proben, die parallel zur Inhibitor-Kontroll-Transfektion mit 2,5 Gy bestrahlt worden waren, zeigten verglichen mit Proben, die zusätzlich zur Bestrahlung mit der spezifischen Anti-miRs gegen miR-216a und miR-518d-3p transfiziert worden waren nur wenige Verschiebungen bei den veränderten Funktionen. So war bei diesen Kombinationen immer die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie, Apoptose- und Zelltodprozesse, die Zellzyklusregulation, Faltung und Modifikation von anderen Proteinen und die Reduktion/Biosynthese von kleinen Metaboliten beteiligt. Lediglich die Transfektion mit einem Inhibitor gegen miR-525-3p führte zu einer Änderungen der Anteile an denen deregulierten Proteine beteiligt waren. Hier war der Prozess der Zellzyklusregulation nicht, die Reduktion/Biosynthese von kleinen Metaboliten mit 21,4 % dafür umso stärker vertreten.

4.3.7 Bioinformatische Analyse differentiell exprimierter Proteine mittels der Ingenuity Software

Um die veränderten Proteine weiter zu charakterisieren wurden sie für die jeweiligen Kombinationen mittels der Software *Ingenuity Pathway Analysis* in Protein-Interaktionsnetzwerke eingebunden. Grundlage des Programms ist eine umfangreiche Datenbank, welche auf dem aktuellen Kenntnisstand der wissenschaftlichen Literatur (U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA) basiert und die biologische Verbindung zwischen einzelnen Faktoren in einer zweidimensionalen Grafik visualisiert. So kann anhand unterschiedlicher Symbole zwischen den Faktoren die Art der Verbindung (z.B. Aktivierung, Deaktivierung, Phosphorylierung) charakterisiert werden. Ziel dieser Analyse ist es, die große Anzahl an veränderten Proteinen, die aus den *2D-DIGE*-Experimenten generiert wurden, biologischen Netzwerken zuzuordnen. Bewertet die Software ein Netzwerk mit einer Punktzahl von über 10 wird es als hochsignifikant angesehen.

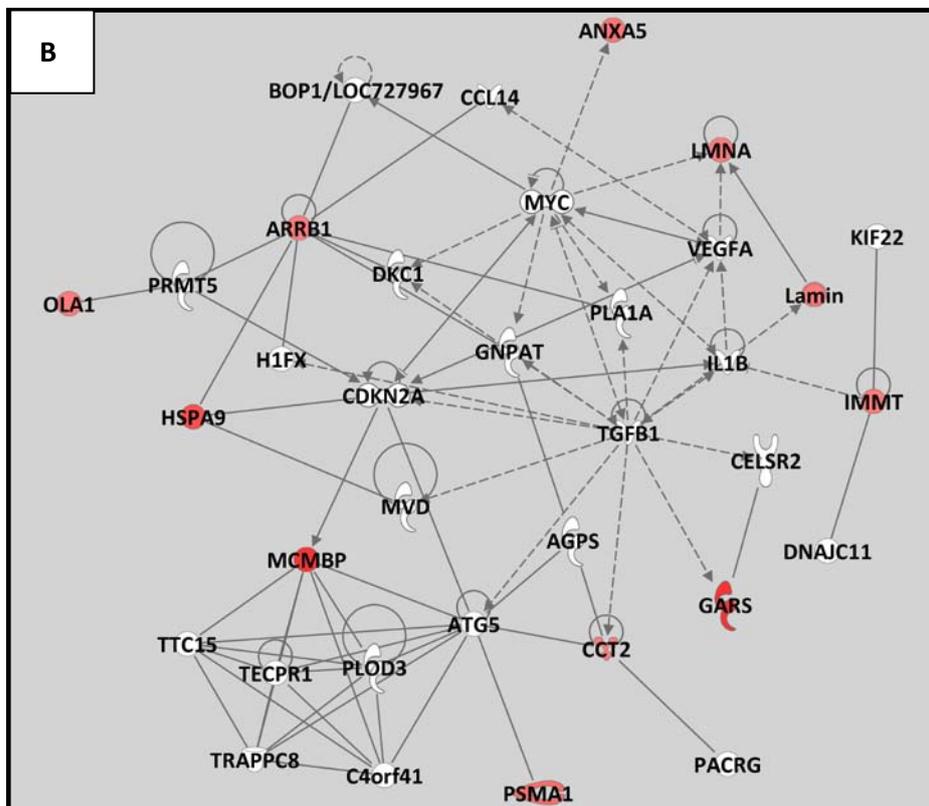
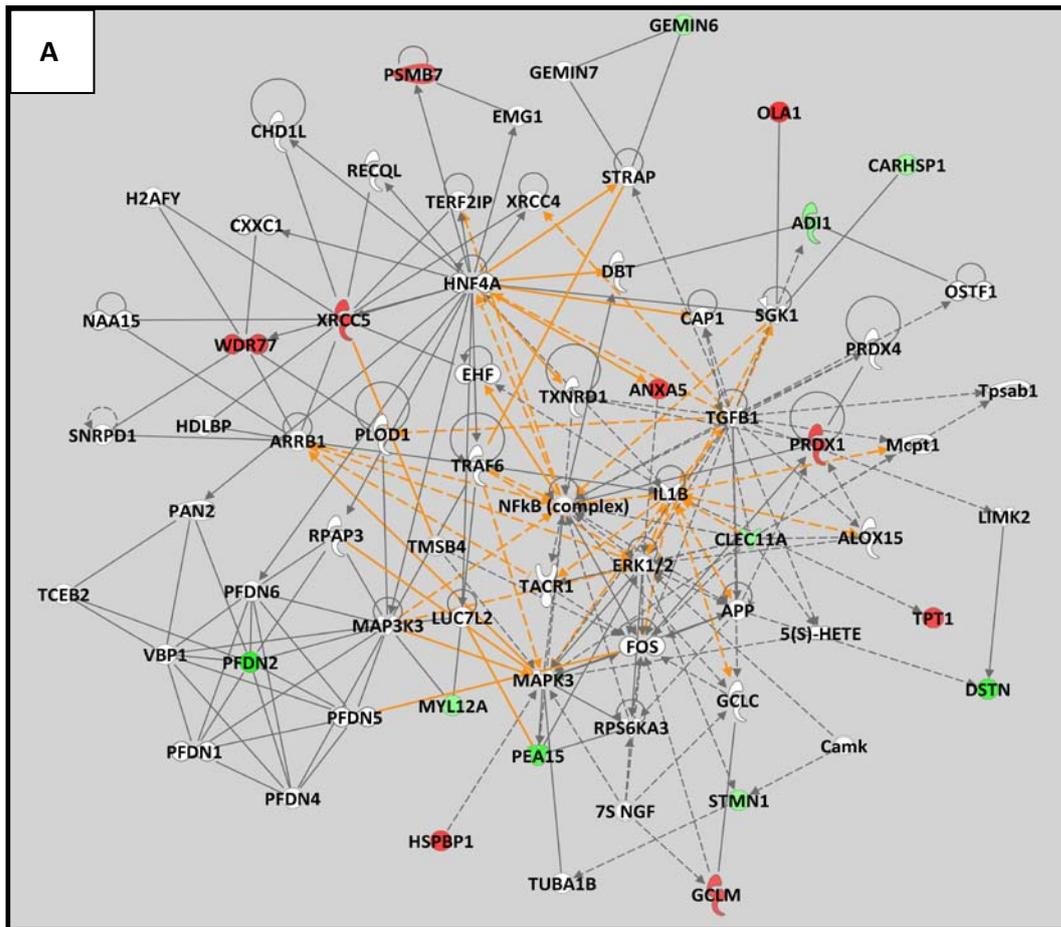
Die nach Bestrahlung und Behandlung mit dem Kontroll-Inhibitor signifikant veränderten 18 Proteine (Kombination 1) wurden in die Netzwerkanalyse eingebracht. Die Ingenuity-Signalweganalyse dieser Proteine ergab zwei hochsignifikante Netzwerke. Das erste Netzwerk mit einer Relevanzpunktzahl von 24 beinhaltet die biologischen Funktionen „Zelltod, Lipidstoffwechsel und Biochemie kleiner Moleküle“ und umfasst 10 deregulierte Proteine. Das zweite Netzwerk setzt sich aus den biologischen Funktionen „Gen-Expression, „cellular compromise“, DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur“ zusammen, besitzt eine Relevanzpunktzahl von 19 und enthält acht deregulierte Proteine. In diesem Netzwerk umfassen die primär betroffenen Signalwege die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, die Antwort auf oxidativen Stress, die Zellzyklusregulation und den Metabolismus von Kohlenhydraten. Einige der wichtigsten Schlüsselproteine sind apoptose- und proliferationsregulierende Faktoren wie NF-kappa-B (NF-κB), Proteine des MAPK-Signalweges (ERK1/2, MAP3K3, FOS und TRAF6), Proteine der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (XRCC5, XRCC4), Chaperone (PFDN1, 2, 4, 5 und 6) und Transkriptionsfaktoren wie TGFB1. In Abbildung 4-40 A ist eine Zusammenfassung beider betroffener Netzwerke gezeigt, die nach Transfektion mit dem Kontroll-Inhibitor in EA.hy926 Zellen durch Bestrahlung verändert waren.

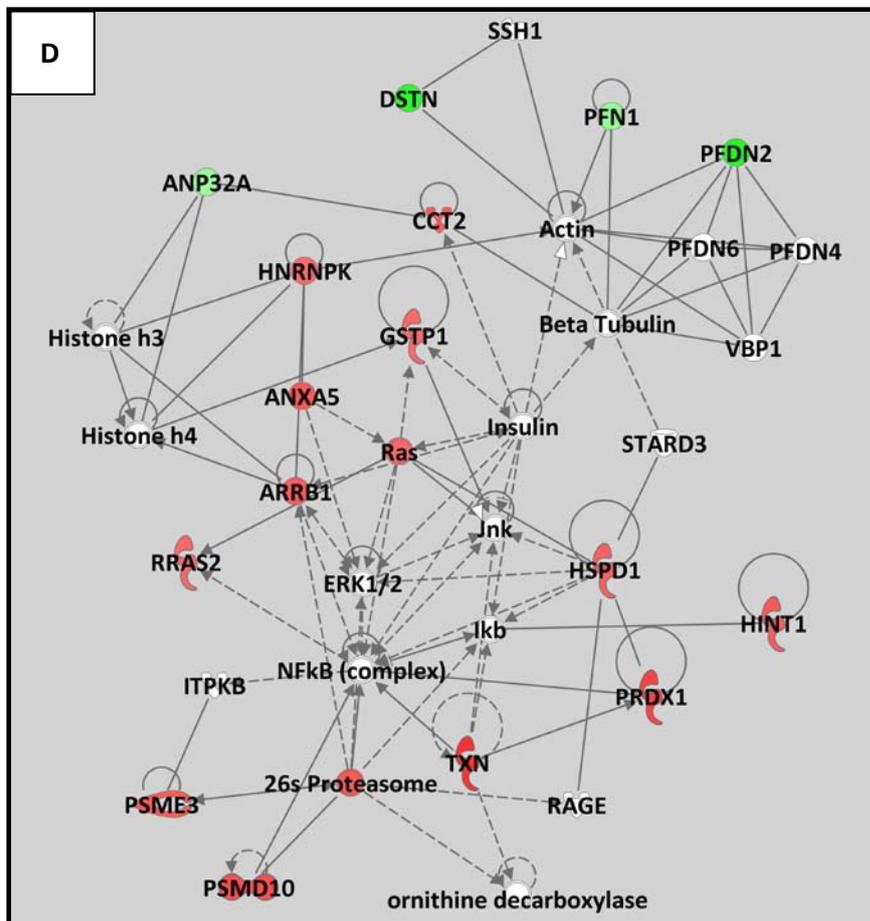
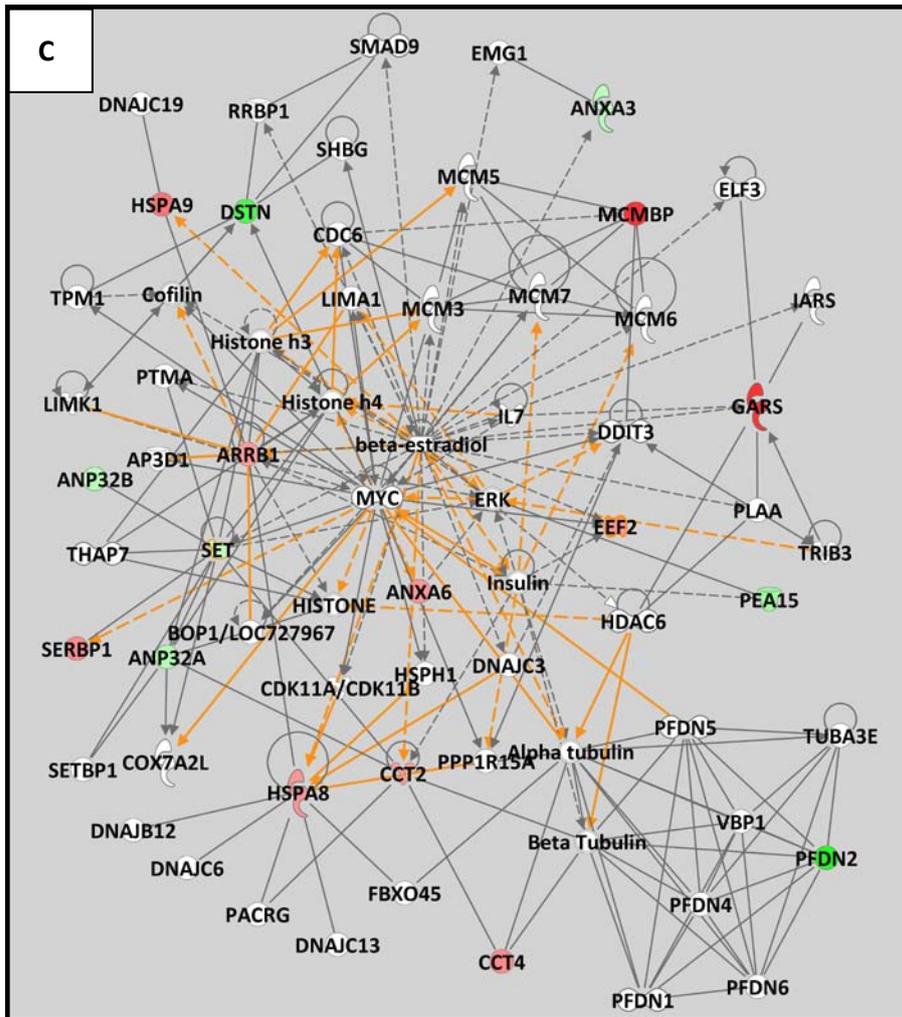
Nach Bestahlung und Inhibition von miR-216a (Kombination 2) konnten elf deregulierte Proteine identifiziert werden. Die Ingenuity-Signalweg-Analyse dieser Proteine ergibt deren Beteiligung an einem signifikant veränderten Netzwerk mit den biologischen Funktionen „Zelluläres Wachstum und Proliferation, Zellzyklus und Krebs“. Es besitzt eine Relevanzpunktzahl von 29 und enthält zehn

deregulierte Proteine. Die wichtigsten betroffenen Signalwege steuern die Proteinubiquitinierung, die Biosynthese von Aminosäuren, den Metabolismus von Kohlenhydraten und die Apoptose. Einige der wichtigsten Schlüsselproteine stellen MYC, Transkriptionsfaktoren wie TGF β 1, der vascular endothelial growth factor (VEGF) und Apoptose-faktoren wie der der Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) dar. Abbildung 4-40 B zeigt das betroffene Netzwerk.

Nach Bestrahlung und gleichzeitiger Behandlung mit Anti-miR-518d-5p (Kombination 3) wurden mittels 2D-DIGE 17 deregulierte Proteine detektiert. Die Signalweganalyse ergab die Beteiligung dieser Proteine an zwei signifikanten Netzwerken. Das erste, mit 34 Relevanzpunkten hochsignifikante Netzwerk umfasst die Funktionen „Posttranskriptionelle Modifikation, Faltung von Proteinen und die Assemblierung und Organisation von Zellen“ und enthält 13 deregulierte Proteine. Das zweite Netzwerk hat eine Relevanzpunktzahl von 13 und setzt sich aus den biologischen Funktionen „DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur, der Expression von Genen und Zelltod“ zusammen und enthält sechs deregulierte Proteine. Primär betroffene Signalwege umfasst die Induktion von Zelltod, den Natriumimport in Endothelzellen und die Protein-Ubiquitinierung. Wichtige Schlüsselproteine sind Proteine des MAPK-Signalweges (ERK1, MYC), Histon-Proteine (Histon h3, h4), Chaperone (PFDN1, 2, 4, 5 und 6), Hitzeschockproteine (HSPA8, HSPH1) und Replikation-Initiationsproteine (MCM3, 6, 7, MCMBP). Abbildung 4-40 C zeigt eine Zusammenfassung beider betroffener Netzwerke.

Die Proteomanalyse nach Bestrahlung und vorheriger Inhibition von miR-525-3p ergab 17 deregulierte Proteine. Ein Netzwerk ist mit einer Relevanzpunktzahl von 43 hochsignifikant und umfasst 16 Proteine. Die assoziierten biologischen Funktionen sind „Biochemie kleiner Moleküle, Lipidmetabolismus, zelluläre Entwicklung, Zellwachstum und Proliferation“. Die wichtigsten betroffenen Signalwege umfasst die Antwort auf oxidativen Stress und den SAPK/JNK-Signalweg. Einige der wichtigsten Schlüsselproteine sind Ras, Apoptose und Proliferation regulierende Faktoren wie NF- κ B, Proteine des MAPK-Signalwegs (ERK1, ERK2), das Hitzeschockprotein (HSPD1) und Chaperone (PFDN1, 2, 4 und 6). Abbildung 4-40 D zeigt das betroffene Netzwerk. Es enthält 16 der 17 deregulierten Proteine. In Abbildung 4-40 E wird die Legende für alle vier Netzwerke dargestellt.





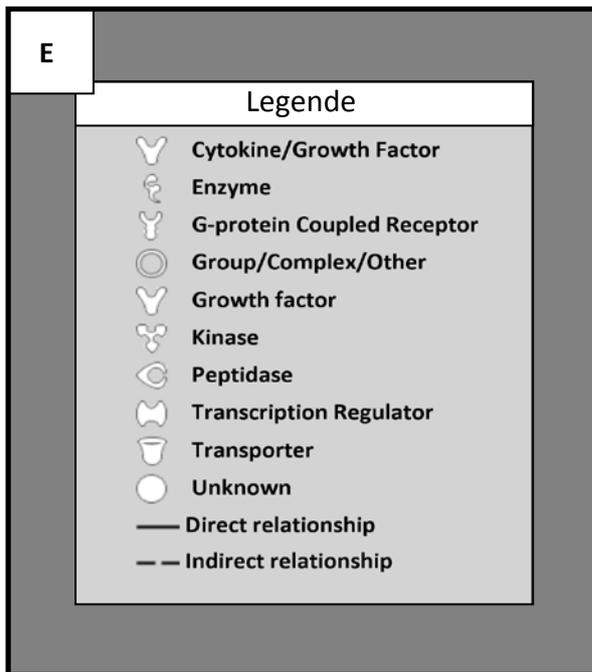
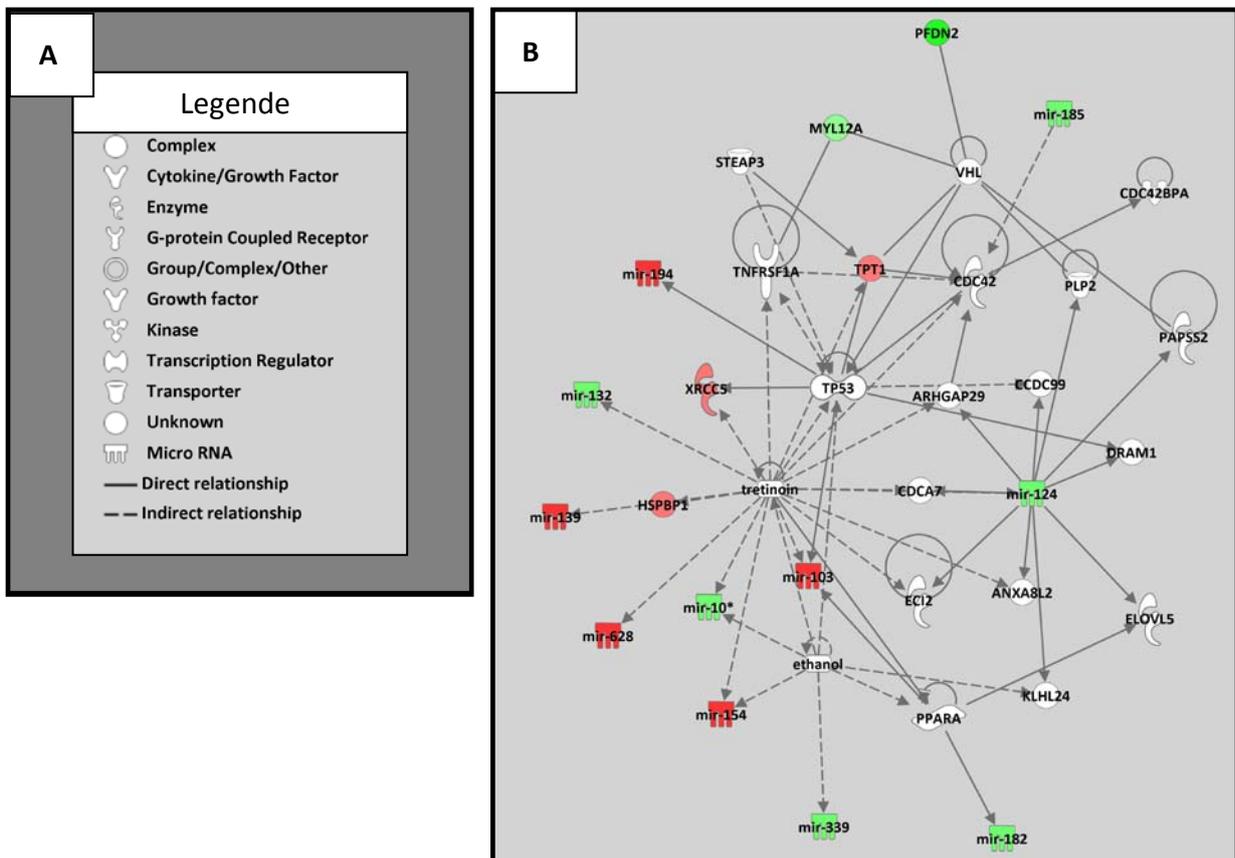


Abb. 4-40: Interaktionsnetzwerke der im 2D-DIGE veränderten Proteine. Es ist die Ingenuity-Netzwerkanalyse 12 h nach Bestrahlung von EA.hy926 Zellen dargestellt. Rote Symbole zeigen hochregulierte Proteine, grüne Symbole herunterregulierte Proteine an. Die Ingenuity-Netzwerkanalyse zeigt die direkte (durchgezogener Pfeil) und indirekte (gestrichelter Pfeil) Interaktion der veränderten Proteine mit anderen Molekülen (weiße Symbole). In **A** sind die Proteinnetzwerke zusammenfasst, die die veränderten Proteine nach vorheriger Transfektion mit Kontroll-Inhibitor beinhalten. **B** zeigt das Netzwerk von deregulierten Proteinen, die vorher mit Anti-miR-216a transfiziert wurden. **C** bildet die 17 deregulierten Proteine nach gleichzeitiger Transfektion mit Anti-miR-518d-5p in einem Netzwerk ab. **D** zeigt das entsprechende Netzwerk nach Inhibition von miR-525-3p, **E** die Legende der Proteine.

4.3.8 Bioinformatische Netzwerkanalyse der deregulierten Proteine und miRNAs nach Bestrahlung

In dieser Netzwerkanalyse sind die Daten der signifikant veränderten Proteine und der im TaqMan® *Low Density Array* 12 h nach Bestrahlung veränderten miRNAs kombiniert und auf Interaktionen hin analysiert. Insgesamt wurden 33 signifikant veränderte miRNAs und 18 veränderte Proteine nach Transfektion mit Kontroll-Inhibitor gemeinsam untersucht. Die Analyse ergibt drei hochsignifikante Netzwerke. Das erste Netzwerk hat eine Punktzahl von 36, beinhaltet die biologischen Funktionen „Krebs und Zellwachstum“ und umfasst fünf deregulierte Proteine und 11 deregulierte miRNAs. Das zweite Netzwerk setzt sich aus den biologischen Funktionen „Posttranskriptionelle Modifikation von RNA und Regulation des Zellzyklus“ zusammen, besitzt eine Punktzahl von 28 und

enthält sieben deregulierte Proteine und sechs deregulierte miRNAs. Das dritte signifikante Netzwerk hat ebenfalls eine Punktzahl von 28, enthält sieben veränderte Proteine und sieben deregulierte miRNAs und umfasst die biologischen Funktionen „Zelltod, Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und DNA-Schadensreparatur“. Die betroffenen Prozesse sind die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, die Antwort auf oxidativen Stress, die Zellzyklusregulation und der Metabolismus von Kohlenhydraten. Einige der wichtigsten Schlüsselproteine sind apoptose- und proliferationsregulierende Faktoren wie TP53, NF-κB, Proteine des MAPK-Signalweges (ERK1/2, P38MAPK, MYC), Proteine der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur wie z.B. XRCC5, Akt, Ras, Jnk und Transkriptionsfaktoren wie TGFB1. In Abbildung 4-41 B-C sind die betroffenen Netzwerke aufgeführt. Die dazugehörige Legende ist in Abbildung 4-41 A dargestellt.



4. Ergebnisse

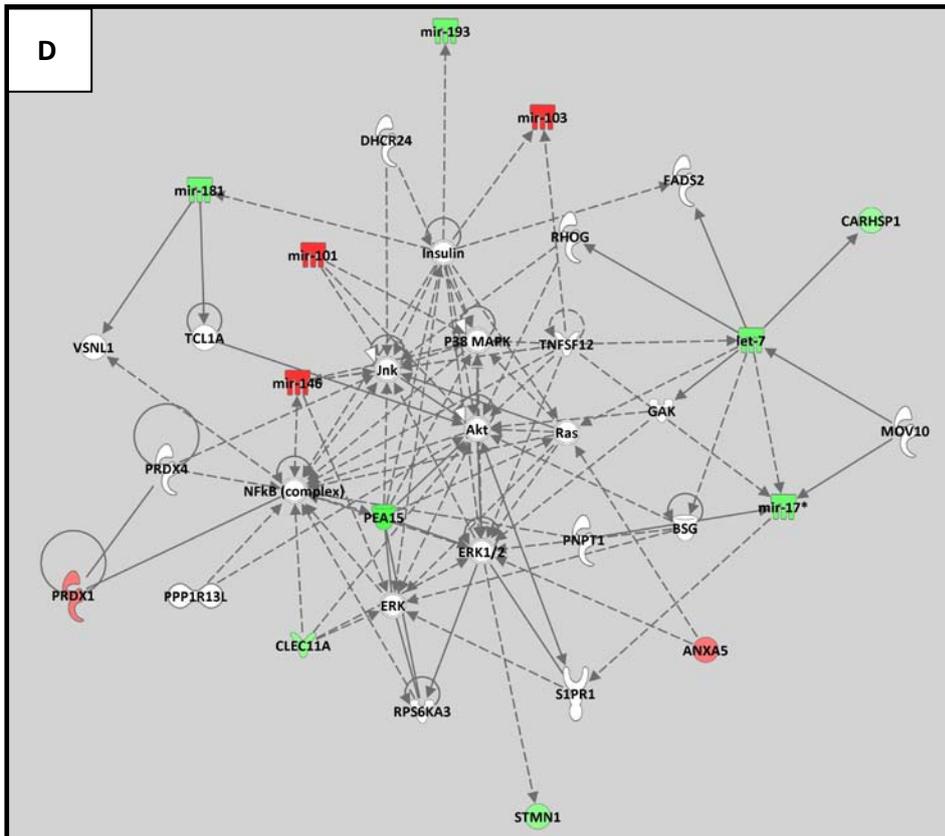
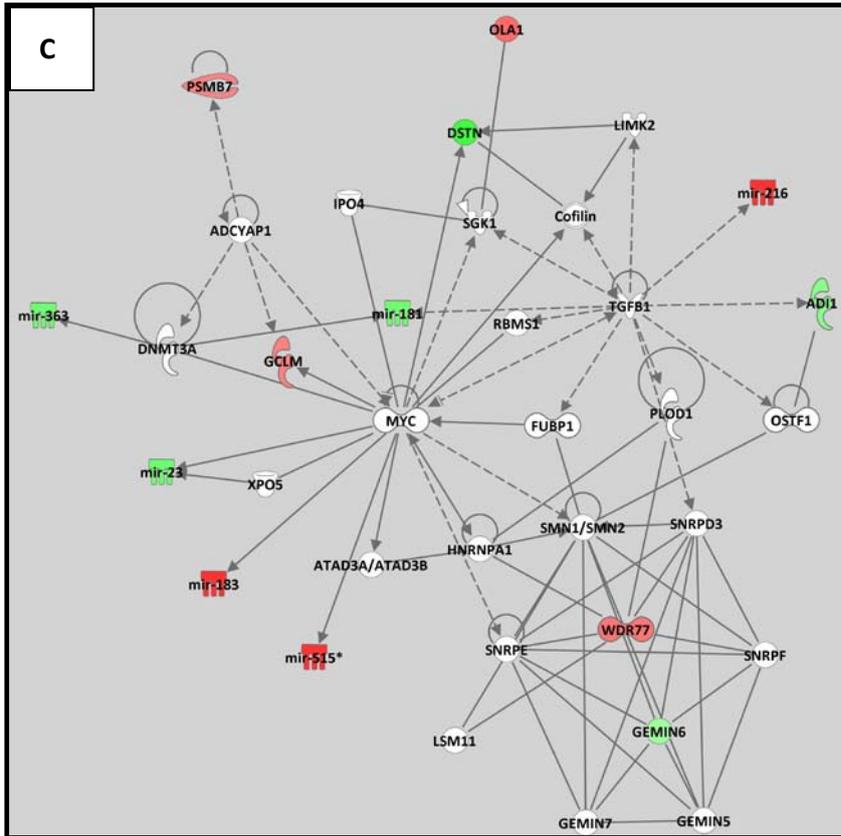


Abb. 4-41: Interaktionsnetzwerke der in 2D-DIGE und TaqMan® Low Density Array-veränderten Proteine und miRNAs. Es ist die Ingenuity-Netzwerkanalyse von deregulierten Proteinen und miRNAs 12 h nach Bestrahlung in EA.hy926 Zellen dargestellt. Die Ingenuity-Netzwerkanalyse zeigt die direkte (durchgezogener Pfeil) und indirekte (gestrichelter Pfeil) Interaktion mit anderen Molekülen (weiße Symbole). Rote Symbole stellen hochregulierte miRNAs oder Proteine, grüne Symbole herunterregulierte miRNAs oder Proteine dar. **A** zeigt die Legende der Proteine und miRNAs. In **B** ist das erste betroffene miRNA-Protein-Netzwerk „Krebs und Zellwachstum“ dargestellt. In **C** wird das Netzwerk „Posttranskriptionelle Modifikation von RNA und Regulation des Zellzyklus“ aus deregulierten miRNAs und Proteinen abgebildet. **D** zeigt die 14 deregulierten Proteine und miRNAs, die eine Funktion in der „Posttranskriptionellen Modifikation von RNA und Regulation des Zellzyklus“ aufweisen.

4.4 Bildung von Stress-Granula nach Bestrahlung

4.4.1 *MiRNA-abhängige Bildung von Stress-Granula in EA.hy926 Zellen nach ionisierender Strahlung*

Processing Bodies (PBs) und Stress-Granula (SG) sind Mitglieder einer Klasse von RNA-Granula, die auch als mRNA-*Silencing*-Foci bekannt sind. Diese zytoplasmatischen Granula enthalten Proteinbestandteile des RISC-Komplexes sowie miRISC-assoziierte mRNAs. Nach der Induktion von zellulärem Stress, wie z.B. Hypoxie oder UV-Strahlung bilden die Zellen SG und PBs. Hier wurde analysiert, ob auch ionisierende Strahlung die Bildung von SG oder PBs in der endothelialen Zelllinie EA.hy926 beeinflusst. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Bildung von Stress-Granula von miRNAs abhängig ist.

Für eine Visualisierung von Stress-Granula wurde das Stress-Granula-assoziierte, RNA-bindende Protein Tia-1 durch Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Als Marker für Ago2 enthaltende RNA-Aggregate (Stress-Granula und *Processing Bodies*) wurden EA.hy926 Zellen transient mit dem Plasmid eGFP-Ago2 transfiziert. Die Bildung von Stress-Granula und *Processing Bodies* wurde 1 h, 2 h, 4 h und 6 h nach Bestrahlung mit 5 Gy analysiert. Es zeigte sich, dass Tia-1 unter normalen, unbestrahlten Bedingungen in der Zelllinie EA.hy926 überwiegend im Zellkern lokalisiert vorlag. Ohne Bestrahlung waren nur wenige Tia-1-positive, Stress-Granula enthaltende Zellen vorhanden. Nach Bestrahlung war eine transiente Bildung von Stress-Granula in den EA.hy926 Zellen zu detektieren (Abb. 4-42).

Processing Bodies (nachweisbar durch das eGFP-Signal des Ago2-Plasmids) konnten sowohl in bestrahlten als auch in unbestrahlten Zellen als kleine subzelluläre Strukturen detektiert werden und lagen gleichmäßig verteilt im ganzen Zytoplasma vor. Nach Bestrahlung mit 5 Gy war keine statistisch signifikante Änderung der Anzahl an Ago2-eGFP-Aggregaten im Vergleich zu unbestrahlten Zellen (Abb. 4-42) erkennbar. Eine genauere Analyse der Ago2 enthaltenden, zytoplasmatischen Strukturen zeigte, dass sie häufig mit Tia-1 kolokalisierten. Dies lässt daher auf eine enge Beziehung zwischen Stress-Granula und *Processing Bodies* nach ionisierender Strahlung schließen.

Abbildung 4-42 zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von SG und PBs tragenden Zellen mit und ohne Bestrahlung.

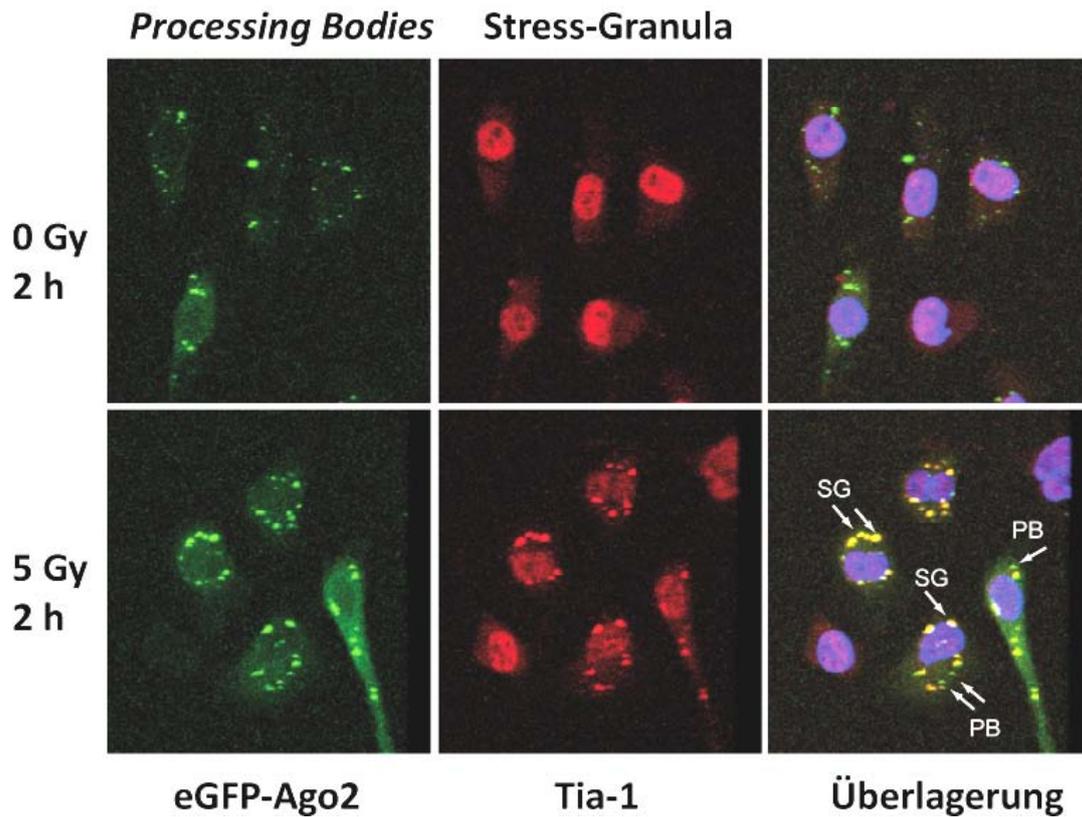


Abb. 4-42: Bildung von zytoplasmatischen RNA-Granula nach ionisierender Strahlung. Nachweis von *Processing Bodies* (PB) (eGFP-Ago2 positiv) und Stress-Granula (SG) (Tia-1-positiv) nach 2 h ohne und mit Bestrahlung (5 Gy) mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Mikroskopie.

Abbildung 4-43 zeigt die Kinetik der Stress-Granula-Bildung in der humanen Endothelzelllinie EA.hy926 2 h, 4 h und 6 h nach Bestrahlung mit 5 Gy. In unbestrahlten Zellen war das Stress-Granula-Markerprotein Tia-1, wie beschrieben, fast vollständig im Zellkern lokalisiert. Nur in 2-3 % der Zellen wurden zytoplasmatische Stress-Granula detektiert. Bereits zwei Stunden nach Bestrahlung waren in 10-12 % der EA.hy926 Zellen Stress-Granula zu finden. Anschließend ging die Zahl der Stress-Granula enthaltenden Zellen zurück. Vier Stunden nach Bestrahlung enthielten 9-10 % der Zellen SG, nach sechs Stunden ging die Anzahl auf 6-8 % zurück.

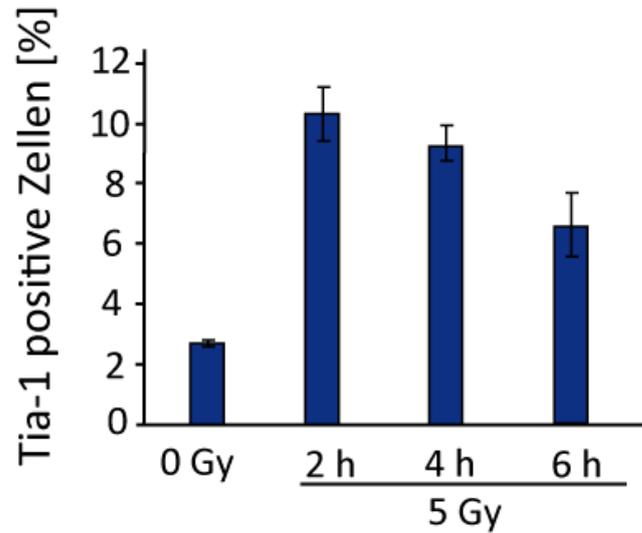
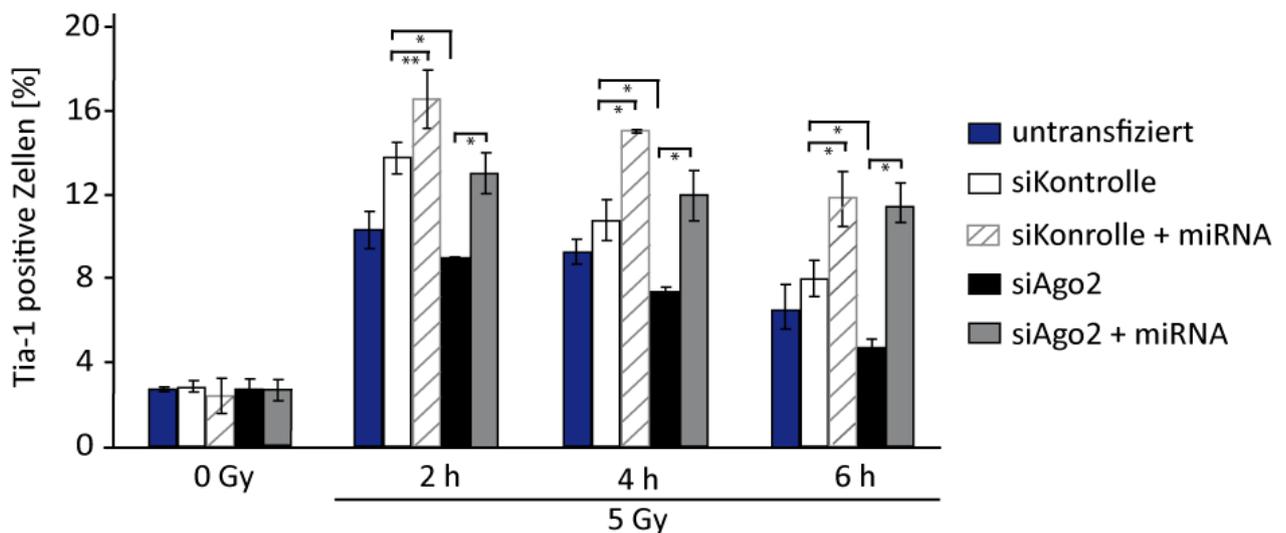


Abb. 4-43: Kinetik der Aggregation von Stress-Granula in der humanen Endothelzelllinie EA.hy926 nach Bestrahlung mit 5 Gy. Die Quantifizierung der Zellen mit Stress-Granula in EA.hy926 Zellen erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden jeweils etwa 200 Zellen zu jedem Zeitpunkt ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Zur weiteren Untersuchung der Beziehung zwischen miRNAs und Stress-Granula nach ionisierender Strahlung wurde die Bildung von Stress-Granula nach Bestrahlung in Ago2-herunterregulierten oder Dicer-herunterregulierten Zellen (Abb. 4-44 A und B) analysiert.

A



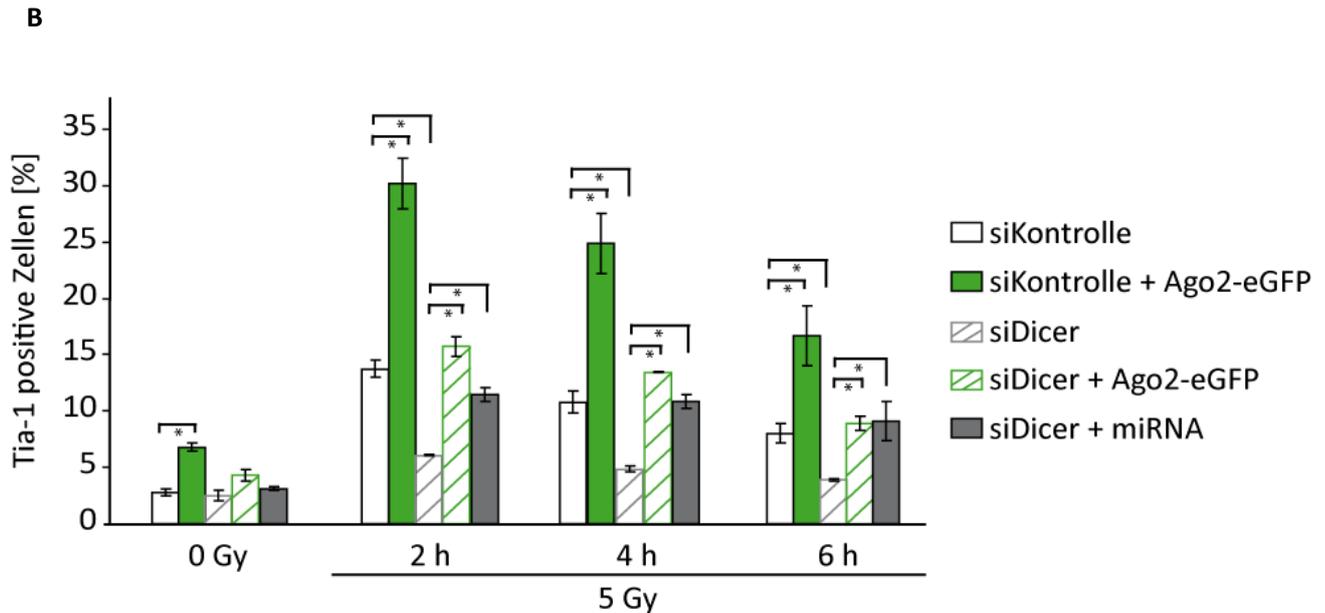


Abb 4-44: Bildung von zytoplasmatischen Stress-Granula in Dicer- oder Ago2-herunterregulierten Zellen nach ionisierender Strahlung. A: Anzahl der Zellen mit Stress-Granula in untransfizierten, Kontroll-siRNA- (siKontrolle), siAgo2- und Kontroll-miRNA (miRNA)-transfizierten Zellen 2 h, 4 h und 6 h nach Bestrahlung mit 5 Gy. **B:** Anzahl der Zellen mit Stress-Granula in Kontroll-siRNA (siKontrolle)-, siDicer-, Kontroll-miRNA- oder mit Ago2- eGFP-Plasmid transfizierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden jeweils etwa 200 Zellen zu jedem Zeitpunkt ausgezählt. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD dar. Die Signifikanz wurde mittels des Student t-Test ermittelt, wobei * $p < 0,01$ ** $p < 0,05$ entspricht.

In Ago2-herunterregulierten Zellen (Abb. 4-44 A, schwarze Balken) waren, verglichen mit der Kontrolle, weniger Tia-1-positive Zellen zu detektieren. Nach Bestrahlung mit 5 Gy waren nach 2 h in siAgo2-transfizierten Zellen 9 % Stress-Granula positiv, während 14 % der Kontroll-transfizierten Zellen Stress-Granula aufwiesen.

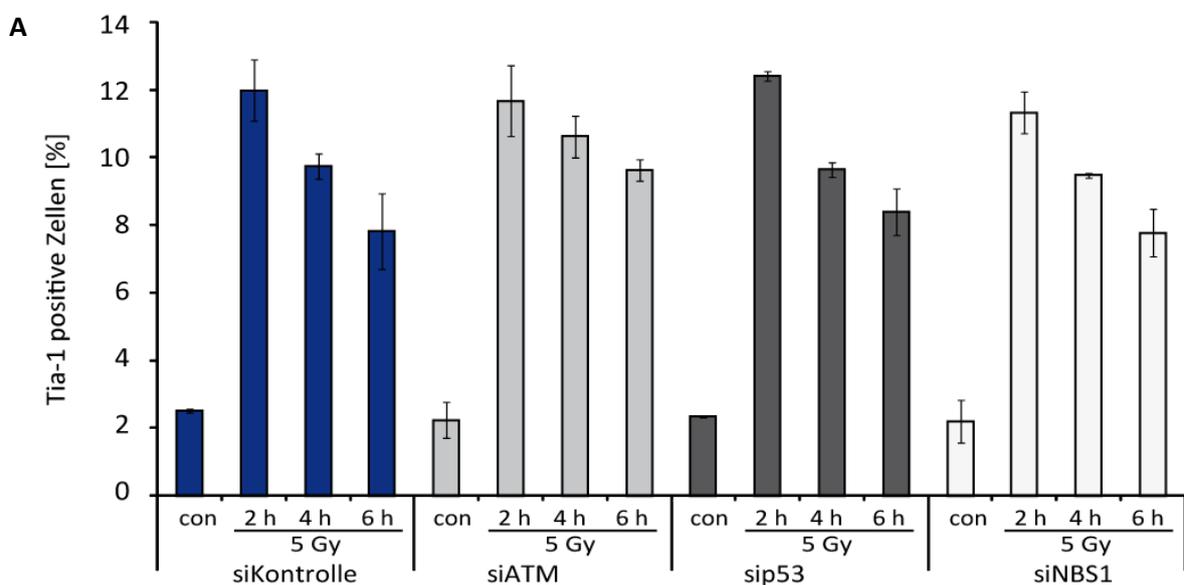
Auch eine Reduktion von Dicer (grau schraffierte Balken, Abb. 4-44 B) führte zu einer Abnahme an Stress-Granula enthaltenden Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy. Nach Transfektion mit siDicer wiesen weniger als 7 % der Zellen Stress-Granula auf (Fig. 4-44 B). Dagegen konnte die Anzahl an Stress-Granula enthaltenden Zellen durch eine Überexpression von endogenen Ago2 mittels eines Ago2-eGFP-Plasmids (Ago2-eGFP) (Fig. 3-44 B) signifikant erhöht werden (grüne Balken). Zwei Stunden nach Bestrahlung waren in etwa 30 % aller Zellen Stress-Granula zu detektieren. Verglichen mit 14 % Tia-1-positiven Zellen in Kontroll-transfizierten Zellen waren somit in Ago2 überexprimierenden Zellen 2 h nach Bestrahlung doppelt so viele Zellen Tia-1-positiv. Bereits ohne Bestrahlung war jedoch nach einer Überexpression von Ago2 die Zahl der Stress-Granula

4. Ergebnisse

enthaltenden Zellen verglichen mit Kontroll-transfizierten Zellen erhöht. So wiesen nach Kontroll-Transfektion 3 % der Zellen und nach Ago2-eGFP-Transfektion 7 % Zellen Tia-1 positive zytoplasmatische Aggregate auf. Interessanterweise konnte eine Expression von eGFP-Ago2 der geringeren Aggregation von Stress-Granula in Dicer-depletierten Zellen entgegenwirken (grün schraffierte Balken). In eGFP-Ago2 und siDicer kotransfizierten Zellen waren, wie in Kontroll-transfizierten Ansätzen, 2 h nach Bestrahlung etwa 15 % aller Zellen Stress-Granula-positiv.

Wie in Abbildung 4-2 gezeigt, führte eine Herunterregulierung von Dicer oder Ago2 zu einer reduzierten miRNA-Biogenese. Um zu untersuchen, ob die Bildung von SG nach ionisierender Strahlung vom Gesamtgehalt an miRNAs einer Zelle abhängt, wurden Dicer- oder Ago2-depletierte Zellen mit einer unspezifischen Kontroll-miRNA ko-transfiziert (graue Balken, Abb. 4-44 A und Abb. 4-44 B). Aus Abbildung 4-44 A und B ist ersichtlich, dass eine Transfektion von unspezifischen miRNAs in Dicer- oder Ago-herunterregulierten Zellen auf zellulärer Ebene eine signifikante Erhöhung der SG-positiven Zellen bewirkt (grau schraffierte Balken).

Um zu ermitteln, ob für die Bildung von Stress-Granula Proteine die an Strahlenantwort beteiligt sind benötigt werden, wurden weitere Untersuchungen zur Bildung von Stress-Granula nach Bestrahlung durchgeführt. Hierbei wurde die Menge an Tia-1-positiven EA.hy926 Zellen nach Herunterregulierung der Proteine p53, ATM und NBS1 untersucht (Abb. 4-45). Zusätzlich wurde auch die SG-Bildung nach einer gleichzeitigen Herunterregulierung von Ago2 oder Dicer detektiert.



4. Ergebnisse

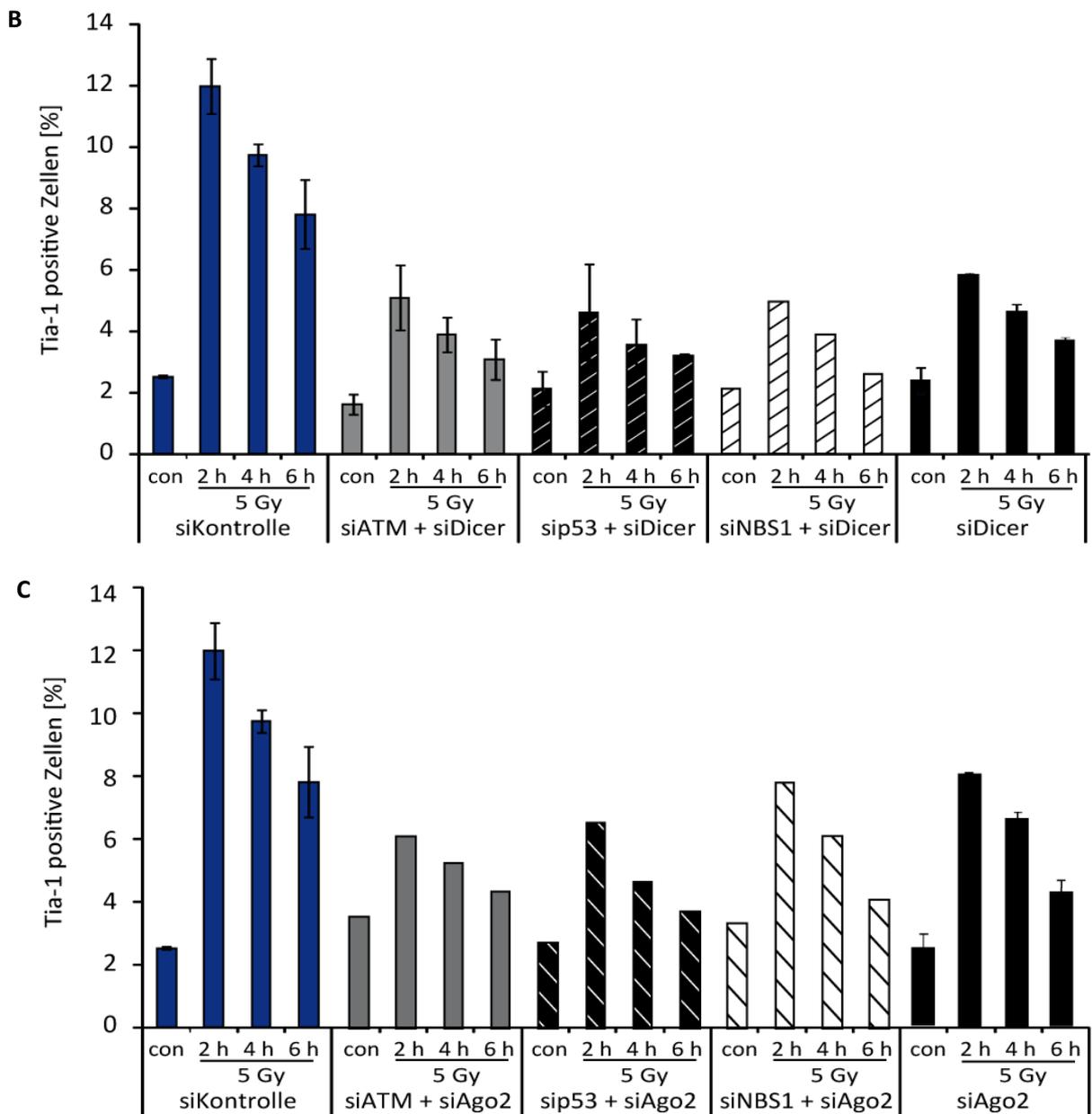


Abb. 4-45: Bildung von zytoplasmatischen Stress-Granula nach ionisierender Strahlung in Abhängigkeit von ATM, p53 und NBS1, sowie miRNAs. A: Quantifizierung der strahleninduzierten Stress-Granula-Bildung nach Behandlung mit Kontroll-siRNA (siKontrolle, blaue Balken), siATM (hellgraue Balken), sip53 (dunkelgraue Balken) sowie siNBS1 (weiße Balken). **B:** Analyse SG-positiver Zellen nach Behandlung mit Kontroll-siRNA (siKontrolle, blaue Balken), siDicer (schwarze Balken) und den Ko-Transfektionen siATM und siDicer (grau), sip53 und siDicer (schwarz schraffiert) sowie siNBS1 und siDicer (weiß schraffiert). **C:** Anteil an Zellen mit SG nach Behandlung mit Kontroll-siRNA (siKontrolle, blaue Balken), siAgo2 (schwarze Balken) und den Ko-Transfektionen siATM und siAgo2 (grau), sip53 und siAgo2 (schwarz schraffiert) sowie siNBS1 und siAgo2 (weiß

schräffiert). Die SG-positiven Zellen wurden 2 h, 4 h und 6 h nach Bestrahlung mit 5 Gy bestimmt. Es wurden jeweils etwa 200 Zellen zu jedem Zeitpunkt ausgezählt.

Nach Transfektion mit siKontrolle wiesen 12-13 % der EA.hy926 Zellen 2 h nach Bestrahlung Stress-Granula auf (Abb. 4-45 A). Nach Reduktion der Proteine ATM, p53 und NBS1 zeigte sich keine Veränderung in der SG-Bildung. Eine gleichzeitige Herunterregulierung von Dicer und den Proteinen ATM, p53 oder NBS1 lieferte dieselben Ergebnisse wie bei Zellen in denen nur eine Dicer-Herunterregulierung erfolgt war. Auch eine gleichzeitige Herunterregulierung von Ago2 und den Proteinen ATM, p53 oder NBS1 zeigte keine veränderte Kinetik in der SG-Bildung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ionisierende Strahlung die Stress-Granula-Bildung zeitabhängig induziert und dass deren Bildung von Komponenten der miRNA-Prozessierung, wie z.B. Ago2 oder Dicer abhängig ist. Darüber hinaus deuten die beobachteten Effekte nach einer Dicer- oder Ago2-Herunterregulierung sowie der Überexpression von unspezifischer miRNA darauf hin, dass für die miRNA-abhängige Bildung von Stress-Granula in Reaktion auf ionisierende Strahlung eine wichtige Rolle spielt. Des Weiteren scheinen die Proteine ATM, p53 und NBS1 keinen Einfluss auf die Bildung von Stress-Granula zu haben.

4.4.2 Bildung von Stress-Granula in primären Endothelzellen nach ionisierender Strahlung

Um zu untersuchen, ob eine Bildung von strahlungsinduzierten Stress-Granula auch in primären Endothelzellen stattfindet, wurden HUVECs bestrahlt und anschließend wurde das Stress-Granula-assoziierte Markerprotein Tia-1 durch Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Die Bildung von Stress-Granula wurde 1 h, 2 h, 4 h und 6 h nach Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 5 Gy analysiert (Abb. 4-46).

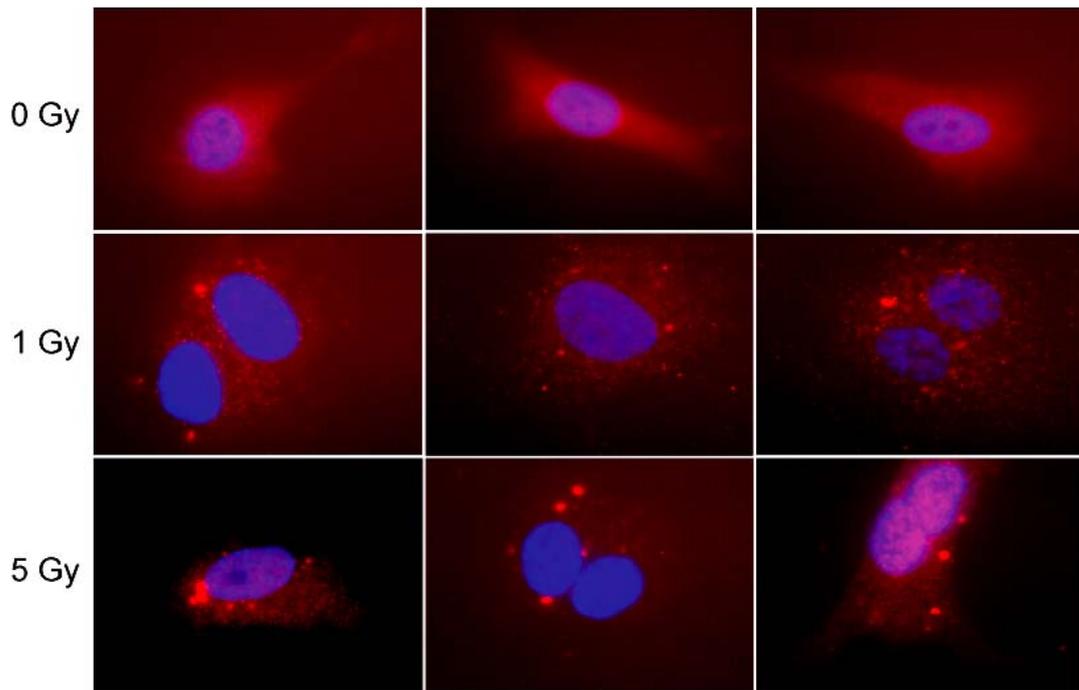


Abb. 4-46: Bildung von zytoplasmatischen SG nach ionisierender Strahlung in primären Endothelzellen (HUVECs). Der Nachweis von Tia-1-positiven Stress-Granula erfolgte nach 2 h ohne und mit Bestrahlung (1 Gy und 5 Gy) mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Mikroskopie.

In Kontrollen (0 Gy) waren kaum Tia-1-positive, Stress-Granula enthaltende Zellen nachzuweisen. Erst nach Bestrahlung war eine zeitabhängige Induktion von Stress-Granula in den primären Endothelzellen (HUVECs) zu detektieren (Fig 4-47).

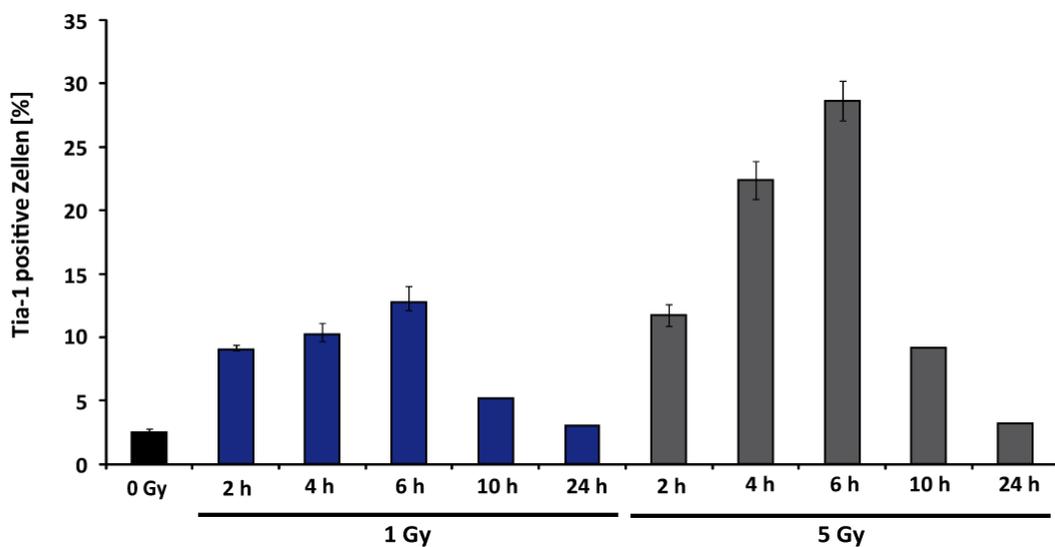


Abb. 4-47: Bildung von zytoplasmatischen Stress-Granula nach ionisierender Strahlung in primären Endothelzellen. Die Quantifizierung der Bildung von strahleninduzierten Stress-Granula erfolgte 2 h, 4 h, 6 h, 10 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy (blaue

4. Ergebnisse

Balken) und 5 Gy (graue Balken). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten \pm SD dar. Der 10 h und 24 h Zeitwert wurde nur einmal analysiert.

Wie in EA.hy926 Zellen war in unbestrahlten HUVECs das Stress-Granula-Markerprotein Tia-1, fast vollständig im Zellkern lokalisiert. Nur 2-3 % der Zellen wiesen ohne Bestrahlung Stress-Granula im Zytoplasma auf. Bereits zwei Stunden nach Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 5 Gy konnten Zellen mit SG detektiert werden. Das Maximum an Stress-Granula-positiven Zellen war bei beiden Dosen 6 h nach der Bestrahlung zu detektieren (13 % bzw. 29 %). Anschließend ging die Zahl der Stress-Granula enthaltenden Zellen zurück. Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung beider Dosen waren in den Zellen eine vergleichbare Anzahl positiver Zellen wie in den unbestrahlten Proben zu detektieren. Außerdem deutet der Vergleich der beiden Kinetiken auf eine Dosisabhängigkeit bei der SG-Bildung in primären Endothelzellen hin.

5. Diskussion

Endothelzellen im Tumor-Gefäßsystem stellen ein kritisches Ziel bei der Strahlentherapie von Tumoren dar. Auch die Endothelzellen im Normalgewebe, wie zum Beispiel die Endothelzellen des Darms (Paris et al., 2001), sind bei einer Strahlentherapie ionisierender Strahlung ausgesetzt. Abdollahi et al. untersuchten die Proliferation und das klonogene Überleben von Endothelzellen nach ionisierender Strahlung *in vitro* und *in vivo*. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass Zellen des Endothels, im Vergleich mit Zellen aus anderen Geweben, deutlich sensibler auf Strahlung reagieren (Abdollahi et al., 2003). Dies hat eine Limitierung der eingesetzten Dosis bei der Antitumorthherapie zur Folge, um die Endothelzellen im angrenzenden gesunden Gewebe zu schützen.

In dieser Arbeit wurde daher angestrebt ein besseres Verständnis für die Strahlenempfindlichkeit in Endothelzellen zu erzielen, um so zu einer verbesserten Strahlentherapie beitragen zu können. Hierfür wurden die biologischen Funktionen von miRNAs in der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung in der endothelialen Zelllinie EA.hy926 und in primären Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) untersucht. Zusätzlich wurde die Beteiligung von RNA-Granula an der miRNA regulierten Strahlenantwort analysiert.

Die microRNA-Forschung konzentriert sich meist auf die Identifizierung neuer miRNAs und die Aufklärung ihrer relativen Expressionsmengen, besonders als Indikator und prognostischer Marker bei Erkrankungen und deren therapeutische Implikationen (Chen und Stallings, 2007, Lagos-Quintana et al., 2003, Pallante et al., 2006, Wang und Wu, 2009). Das fehlende Bindeglied zwischen diesen Forschungsbereichen stellt die Identifizierung von miRNA-Zielgenen und die Analyse ihrer biologischen Funktionen dar.

5.1 Funktion von Dicer und Argonaut-2 in der zellulären Strahlenantwort in Endothelzellen

Zellen verfügen über ein komplexes Netzwerk von Prozessen, die strahleninduzierte Schäden detektieren und ihre Reparatur vermitteln. Diese Signalwege induzieren unter anderem die posttranskriptionelle Modifikation von Proteinen und die Transkription von Genen (Amundson et al., 2003, Harper und Elledge, 2007, Matsuoka et al., 2007, Smirnov et al., 2009). Auch die Expression von miRNAs wird nach DNA-Schädigung reguliert (Wan et al., 2011). Da

bereits bekannt war, dass Dicer eine wichtige Rolle bei der miRNA-Prozessierung spielt und auch Ago2 auf einem Dicer-unabhängigen Weg die Produktion von reifen miRNAs vermitteln kann (Bosse und Simard, 2010), wurde die allgemeine Bedeutung von miRNAs für die Strahlenantwort durch eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Dicer und Ago2 untersucht. Die verminderte Expression der willkürlich ausgewählten, in Ago2- und Dicer-profizienten Zellen hoch exprimierten miRNAs miR-10b, miR-101, miR-518b und miR-523-5p zeigte, dass eine Herunterregulation von Dicer und Ago2 in EA.hy926 Zellen in einer Reduktion des gesamten miRNA-Gehaltes resultiert (siehe Kapitel 4.1.1). Asada et al. konnten ebenfalls eine starke Verringerung der Expression von let-7a und miR-221, zwei in primären Endothelzellen abundant exprimierten miRNAs, nach Dicer-Herunterregulierung nachweisen. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass der Dicer-Knockdown zu einer signifikanten Abnahme in der Akkumulation von reifen miRNAs und zu einer Erhöhung von Vorläufern dieser miRNAs führte (Asada et al., 2008).

Die Herunterregulierung der miRNA-prozessierenden Proteine Dicer oder Ago2 führte in der Endothelzelle EA.hy926 zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit und einer gesteigerten strahleninduzierten Apoptose (Kapitel 4.1.1 und 4.1.2). Der gleiche Phänotyp konnte auch in primären HUVECs nach der Herunterregulation von Dicer detektiert werden (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2). MiRNAs haben daher einen positiven Einfluss auf das Überleben in Endothelzellen nach einer Exposition mit ionisierender Strahlung, und sie unterdrücken die Apoptose.

Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, die einen protektiven Effekt von miRNAs zeigen. So konnten Asada et al. zeigen, dass die Herunterregulation von Dicer in Endothelzellen zu einer erhöhten stressinduzierten Apoptose nach Serumentzug führt (Asada et al., 2008). Anhand von Mausexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust des Dicer-Gens schon im Embryo letal ist. Die Autoren stellen hierbei die Hypothese auf, dass als Grund für diese embryonale Letalität die mangelhafte Bildung und Aufrechterhaltung von Blutgefäßen in Frage kommt (Yang et al., 2005). Ein Herz-spezifischer Knockout von Dicer induzierte eine progressive dilatative Kardiomyopathie (DCM), Herzinsuffizienz und eine veränderte Expression von herzspezifischen Proteinen im Mausmodell, was ebenfalls auf eine erhöhte Apoptose hindeutet (Chen et al., 2008). Kuehbacher et al. wiesen nach, dass Dicer *in vivo* und *in vitro* einen wichtigen Regulator des endothelialen Wachstums und der Netzbildung in HUVEC Zellen darstellt (Kuehbacher et al., 2007). Weiterhin führte die siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Ago2 ebenfalls zu einer Induktion der Apoptose in myeloischen Leukämiezellen (HL-60) und in HEK-293 Zellen. Die Autoren führten dies darauf

zurück, dass die Expression von Oncomirs (mit Krebs assoziierte miRNAs), die in Krebszellen oft überexprimiert sind, durch die Ago2-Herunterregulierung gehemmt wird (Naoghare et al., 2011).

Nach der Herunterregulierung von Dicer oder Ago2 konnte in der Endothelzelllinie EA.hy926 neben einem Anstieg der Apoptose zusätzlich eine veränderte Zellzyklusverteilung als Reaktion auf die Bestrahlung detektiert werden. Wie erwartet, wird in Kontrollzellen nach ionisierender Strahlung das p21^{Cip}-Protein stabilisiert. Trotz einer intakten Stabilisierung des p53-Proteins fehlte diese p21^{Cip}-Akkumulation in EA.hy926 Zellen nach Herunterregulierung von Dicer oder Ago2. Dies legt nahe, dass miRNA-vermittelte Prozesse an der Stabilisierung von p21^{Cip} beteiligt sind (Kapitel 4.1.2). In primären HUVEC Zellen konnte dieses Ergebnis ebenfalls bestätigt werden. So war auch hier in Dicer-herunterregulierten Zellen keine p21^{Cip}-Stabilisierung nach Bestrahlung detektierbar (siehe Kapitel 4.2.2). Dieses Ergebnis stimmt mit einer 2011 erschienenen Publikation überein die zeigt, dass die Stabilisierung von p21^{Cip} nach Stress von einer Überexpression spezifischer miRNAs abhängig ist (Li et al., 2011).

Auch die erhöhte Apoptoserate, die jedoch nicht mit einer geringeren DNA-Reparatureffizienz nach dem *Knockdown* von Ago2 oder Dicer einher geht, könnte mit der deutlichen Reduktion von p21^{Cip} in diesen Zellen erklärt werden. So konnten Detjen et al. zeigen, dass eine Herunterregulierung von p21^{Cip} die Apoptose in HepG2 Zellen induziert. Wurde p21^{Cip} in diesen Zellen überexprimiert, konnte die Apoptose verhindert werden (Detjen et al., 2003). So wurde in den gleichen Zellen gezeigt, dass p21^{Cip} an die Procaspase-3-Vorstufe bindet. Durch diese Bindung wird die Caspase-3-Aktivierung verhindert und die Zellen werden vor Fas-induzierter Apoptose geschützt (Suzuki et al., 1998). Der Verlust des CDK-Inhibitors p21^{Cip}, der an der Kontrolle des Zellzyklus, der Unterdrückung von Tumoren, zellulärem Stress, der Apoptose und der Seneszenz beteiligt ist (Dotto, 2000), könnte daher sowohl den G1-Phase-Arrest, als auch die erhöhte Apoptose nach Bestrahlung in Zellen mit einem geringerem miRNA-Gehalt erklären.

Sowohl Ago2 als auch Dicer scheinen jedoch in Endothelzellen eine untergeordnete Bedeutung für die Aufrechterhaltung ihrer normalen Proliferation zu besitzen. Zumindest für den begrenzten Analysezeitraum von drei bis fünf Tagen konnte nach Inhibition der beiden Proteine weder im primären, noch im immortalisierten Zellsystem ein beeinträchtigtes Zellwachstum gemessen werden (Kapitel 4.1.1 und 4.2.1). Diese Ergebnisse werden durch andere Publikationen bestätigt, die zeigen, dass miRNAs eine Anpassung an physiologische Bedürfnisse in der Zelle bewirken, indem sie die Regulation des Zellzyklus und die Apoptose beeinflussen (Kasinski und Slack, 2010, Subramanian und Steer, 2010, Yu et al., 2010).

Zusammengefasst legen die Ergebnisse nahe, dass eine durch Dicer- und Ago2-vermittelte miRNA-Prozessierung, bzw. ein Pool an reifen miRNAs für die Regeneration der Zellen nach Bestrahlung erforderlich ist. Für das zelluläre Überleben von Endothelzellen unter stressfreien Bedingungen scheinen diese Prozesse jedoch eine geringere Bedeutung zu haben.

5.2 MiRNA-Expressionsanalyse nach ionisierender Strahlung in Endothelzellen

Expressionsänderungen von miRNAs als Reaktion auf ionisierende Strahlung wurden bereits in unterschiedlichen zellulären Systemen über einen weiten Dosisbereich beschrieben (Maes et al., 2008, Shin et al., 2009, Simone et al., 2009, Wagner-Ecker et al., 2010, Weidhaas et al., 2007). Die in dieser Arbeit durchgeführten miRNA-Expressionsanalysen zeigten, dass nach einer Bestrahlung mit der klinisch relevanten Dosis von 2,5 Gy in EA.hy926 und HUVEC Zellen eine Reihe von miRNA-Änderungen induziert wurden.

Die miRNA-Expressionsanalysen wurden mit miRNA-Arrays durchgeführt, um einen Gesamtüberblick über die exprimierten miRNAs zu erhalten. Die Expressionsdaten der miRNAs miR-10b, miR-518b und miR-146b-5p konnten anschließend mittels *Single Primer Assays* validiert werden (siehe Kapitel 4.1.4). Die relativen Expressionsänderungen der miRNA-Arrays entsprachen zwar nicht exakt den durch *Single Primer Assays* ermittelten Werten, sie wiesen jedoch für alle analysierten miRNAs die gleiche Tendenz auf. Diese Abweichungen könnten auf die unterschiedliche Art der Primer während der cDNA-Synthese bei beiden Analysemethoden zurückgeführt werden. Während bei miRNA-Arrays ein Primer-Gemisch verwendet wird, erfolgt die cDNA-Synthese bei *Single Primer Assays* mit spezifischen Primern. Dies zeigt, dass die mit dem microRNA-Array generierten Daten zwar keine Aussage über die Expressionsstärke der miRNAs zulassen, sie tendenziell jedoch mit den Ergebnissen der *Single Primer Assays* übereinstimmen.

MiRNAs stellen meist negative Regulatoren der Genexpression dar (wenn die Ziel-mRNA keinen Repressor kodiert). In EA.hy926 und HUVEC Zellen waren zu allen Zeitpunkten nach Bestrahlung auch eine große Anzahl an miRNAs herunterreguliert. Dies lässt darauf schließen, dass zu allen drei untersuchten Zeitpunkten auch eine Hochregulierung der Genexpression von Zielproteinen erfolgt. Dieses Ergebnis deckt sich mit Daten, die aussagen, dass als Strahlenantwort eine große Anzahl an Proteinen stärker exprimiert wird (Matsuoka et al., 2007). Somit könnte die Herunterregulierung von miRNAs ein wichtiger Mechanismus der zellulären Antwort auf

Abb. 5-1: Venn-Diagramm von differentiell exprimierten miRNAs 4 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy in der Endothelzelllinie EA.hy926 und primären Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs). Das Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs zum frühen Zeitpunkt nach Bestrahlung (4 h) in EA.hy926 (schwarz) und in HUVECs (orange). Die veränderten miRNAs zum 24 h-Zeitpunkt nach Bestrahlung in EA.hy926 Zellen sind blau und in HUVECs rot umkreist. Die Schnittmenge der sechs nach 4 h veränderten miRNAs in EA.hy926 und HUVEC Zellen ist orange/schwarz schraffiert. Fünf miRNAs sind 24 h nach Bestrahlung in der Zelllinie und den primären Zellen verändert (blau/rot schraffierter Bereich).

Sechs miRNAs (miR-23a, miR-32, miR-339-5p, miR-146a, miR-216a und miR-525-3p (schwarz/orange schraffiert)) waren nach Bestrahlung zum Zeitpunkt von 4 h in EA.hy926 (schwarz) und auch in HUVECs (orange) signifikant verändert. Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung zeigten fünf miRNAs (miR-93, miR-20b, miR-139-3p, miR-628-5p und miR-301) sowohl in der Endothelzelllinie (dunkelblau) als auch in den primären Zellen (rot) eine signifikante Expressionsänderung. Keine miRNA wies zu beiden Zeitpunkten in beiden Zellsystemen eine Deregulation auf.

Die Schnittmenge aller differentiell exprimierten miRNAs in EA.hy926 und HUVEC Zellen entspricht einer identischen miRNA-Regulation von 36 % bezogen auf die Endothelzelllinie EA.hy926 zum 4 h-Zeitpunkt sowie zum 24 h-Zeitpunkt. Eine Analyse der Schnittmenge der 4 h-Werte zwischen EA.hy926 und HUVEC Zellen ergab, dass sieben miRNAs (miR-32, miR-339-5p, miR-146a, miR-216a, miR-525-3p, miR-519e und miR-337-5p) eine identische Veränderung zeigten, was einer Überlappung von 36 % bzw. 30 % entspricht. Eine Gegenüberstellung der 24 h Werte beider Zellsysteme ergab ebenfalls eine deutliche Schnittmenge von 32 % bzw. 41 %, die sieben deregulierte miRNAs (miR-93, miR-20b, let-7d, miR-628-5p, miR-301, miR-10b und let 7d) beinhaltet. Diese Ergebnisse stützen die Annahme einer zeitabhängigen, regulatorischen Funktion mit einer frühen und einer späten Reaktion der miRNAs innerhalb der Strahlenantwort in Endothelzellen.

Vergleich der miRNA-Expressionsänderungen in Endothelzellen nach Bestrahlung mit anderen Studien

MiRNA-Expressionsänderungen nach Bestrahlung wurden schon in anderen endothelialen Systemen analysiert. Wagner-Ecker et al. untersuchten das miRNA-Expressionsprofil in primären humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC9) 6 h nach Bestrahlung mit der

therapeutisch relevanten Dosis von 2 Gy. Sie konnten elf miRNAs detektieren, die signifikant verändert waren (Wagner-Ecker et al., 2010). Ein Vergleich dieser elf in HDMEC9 Zellen deregulierten miRNAs mit den in EA.hy926 Zellen veränderten miRNAs ergab jedoch keine Übereinstimmungen. So waren acht der in HDMEC9 Zellen nach Bestrahlung deregulierten miRNAs in EA.hy926 Zellen zwar exprimiert, wiesen jedoch zu keinem Zeitpunkt eine veränderte Expression nach 2,5 Gy auf. Drei in HDMEC9 nach Bestrahlung deregulierte miRNAs konnten in EA.hy926 Zellen weder vor noch nach Bestrahlung detektiert werden.

Auch bei einem Vergleich der miRNA-Expression der beiden primären Endothelzellen (HDMEC9 und HUVECs) wurde keine Überschneidung der deregulierten miRNAs gefunden. Eine mögliche Erklärung dafür, dass keine der deregulierten miRNAs in beiden primären Endothelzellen übereinstimmend verändert ist, könnten die unterschiedlichen Zeitpunkte sein, an denen die miRNA-Messung nach Bestrahlung erfolgte. Eine weitere mögliche Interpretation der Ergebnisse ist, dass die Regulation stark abhängig vom Zelltyp erfolgt. Dafür spricht, dass einige miRNAs in HUVECs gar nicht exprimiert wurden.

Vincenti et al. konnten ebenfalls eine deutliche Veränderung der miRNA-Expressionsprofile nach 1 Gy Röntgenstrahlung in HUVEC Zellen detektieren (Vincenti et al., 2011). Ein Vergleich der durch die beiden unterschiedlichen Strahlenarten induzierten miRNA-Veränderungen zeigt, dass lediglich eine miRNA (miR-27b) sowohl nach 1 h Röntgenstrahlen als auch nach 4 h gamma-Bestrahlung eine Hochregulation zeigt. MiR-22 zeigt hingegen zu den gleichen Zeitpunkten eine gegensätzliche Regulation. Alle anderen miRNAs, die nach 30 min oder 1 h Röntgenstrahlung verändert waren, wiesen nach gamma-Bestrahlung keine Veränderung auf. Dies bestätigt den transienten Charakter der strahleninduzierten miRNA-Expression und legt nahe, dass die miRNA-Regulation auch von der Art der Strahlung oder dem Zelltyp abhängig ist.

Die große Zahl an deregulierten miRNAs nach gamma-Bestrahlung wirft für zukünftige Forschungsansätze die Frage nach den Mechanismen auf, die zu diesen schnellen Expressionsveränderungen führen. Erste Befunde zeigen eine Funktion der Proteine ATM und p53 für die Regulation von miRNAs. So wird die miRNA-Biogenese nach der Einführung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) auf eine ATM-abhängige Weise induziert (Liu und Liu, 2011, Zhang et al., 2011). p53 reguliert nach genotoxischem Stress (z.B. durch Behandlung mit genotoxischen Agenzien wie Desoxirubicin oder Camptothecin) ebenfalls die Expression bestimmter miRNAs (Braun et al., 2008, Georges et al., 2008, Hermeking, 2007, 2010).

ATM und p53 spielen eine große Rolle in der Strahlenantwort von Zellen, was darauf hindeuten könnte, dass beide Proteine auch im Zusammenhang mit strahleninduzierten miRNA-Veränderungen stehen. Bis jetzt wurden jedoch noch keine Untersuchungen durchgeführt, die den Zusammenhang zwischen ATM, p53 und der miRNA-Expression nach Bestrahlung zum Thema haben. Der Mechanismus, wie miRNAs reprimiert bzw. degradiert werden ist bisher wenig untersucht, aber erste Arbeiten charakterisierten bereits Enzyme, die gezielt miRNAs degradieren (Cerutti und Ibrahim, 2011, Ibrahim et al., 2010, Kai und Pasquinelli, 2010).

5.3 Der Einfluss von spezifischen miRNAs auf die Strahlensensitivität und die Apoptose in Endothelzellen

Um weitere funktionelle Analysen deregulierter miRNAs durchzuführen, wurden aus beiden Zellsystemen (HUVECs und EA.hy926) miRNAs ausgewählt, die eine starke Hochregulierung nach Bestrahlung aufwiesen (siehe Kapitel 4.1.3 und 4.2.3). Aufgrund ihrer deutlichen Induktion in EA.hy926 Zellen wurden acht miRNAs (miR-146a, miR-146b-5p, miR-216a, miR-301b, miR-518b, miR-518d-5p, miR-525-3p und miR-628-5p) für eine Einzelanalyse herangezogen. In den primären Zellen wurden fünf miRNAs (miR-146a, miR-216a, miR-301b, miR-525-3p und miR-628-5p) untersucht.

MiR-216a, miR-518d-5p, miR-525-3p und miR-628-3p haben eine antiapoptotische Funktion

Die Inhibition der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p hatte einen strahlensensitivierenden Effekt auf EA.hy926 Zellen (siehe Kapitel 4.1.5). In primären HUVEC Zellen führte die Inhibierung der miRNAs miR-216a, miR-525-3p und miR-628-3p zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit (siehe Kapitel 4.2.4). Somit waren zwei der drei miRNAs, die nach ihrer Inhibierung das Überleben von Zellen nach Bestrahlung verringerten, in ihrer Wirkung in beiden Zellsystemen identisch. Zusätzlich waren in EA.hy926 Zellen alle drei miRNAs, in HUVEC Zellen zwei der drei miRNAs, die nach ihrer spezifischen Inhibierung einen Einfluss auf das Zellüberleben hatten zum 4 h-Zeitpunkt nach Bestrahlung dereguliert. Dies könnte darauf hindeuten, dass besonders die früh nach Behandlung hochregulierten miRNAs eine wichtige Funktion für das Überleben von Endothelzellen besitzen. Auch Wagner-Ecker et al. konnten zeigen, dass das klonogene Überleben von HDMEC9 Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy bereits durch die Inhibierung einer einzigen miRNA deutlich vermindert war (Wagner-Ecker et al., 2010).

Alle sechs untersuchten miRNAs, die nach Bestrahlung einen Einfluss auf das Überleben von Endothelzellen hatten, besaßen auch eine wichtige Funktion bei der Unterdrückung der Apoptose in der Zelllinie EA.hy926 und in HUVEC Zellen (siehe Kapitel 4.1.6 und 4.2.4). Dies bestätigt die Ergebnisse der Dicer- und Ago2-*Knockdown*-Experimente, die darauf hingedeutet hatten, dass die Apoptose nach Bestrahlung durch miRNAs reguliert wird.

Die Expression aller drei miRNAs, die in EA.hy926 Zellen einen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit hatten, wurde nach Transfektion mit spezifischen Inhibitoren bzw. Kontroll-Inhibitor mittels *Single Primer Assays* kontrolliert (siehe Kapitel 4.3.1). Während nach Bestrahlung mit 2,5 Gy in Kontrollzellen alle drei miRNAs eine Induktion aufwiesen, wurde in Anti-miR-216a- und Anti-miR-518d-5p-transfizierten Proben mit und ohne Bestrahlung eine verringerte miRNA-Expression gemessen. In Anti-miR-525-3p-transfizierten Zellen war zumindest nach Bestrahlung der Gehalt an miR-525-3p reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transfektion von Anti-miRs nicht nur die Funktion von miRNAs blockiert, sondern auch zu deren Destabilisierung führen kann.

Publizierte miRNA-Targets

Von den drei miRNAs, die in EA.hy926 Zellen einen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit hatten, konnte bisher nur die regulatorische Funktion der miR-216a auf das apoptose-induzierende Protein PTEN experimentell nachgewiesen werden (Kato et al., 2009, Weng et al., 2001, Yang et al., 2004). Darüber hinaus wurde für alle drei miRNAs gezeigt, dass diese in verschiedenen Krebsarten, darunter Brust- und Eierstockkrebs (mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir), dereguliert sind. Eine Zusammenfassung der publizierten *Targets* der in dieser Arbeit funktionell analysierten miRNAs ist aus Tabelle 5-1 ersichtlich.

Tabelle 5-1: Zusammenfassung der publizierten *Targets* der untersuchen miRNAs.

analysierte microRNAs	experimentell verifizierte <i>Targets</i>	Publikationen
hsa-miR-146a	TRAF6, IRAK1, IRAK2, NOX4	Hou et al. 2008, Paik et al. 2011, Vasa Nicotera et al., 2011
hsa-miR-146b-5p	MMP16, EGFR	Lin etl al., 2011, Katakowski, 2010
hsa-miR-216a	PTEN, Ybx1	Kato et al., 2009, Kato et al., 2010
hsa-miR-301b	MEOX2	Cao et al., 2011
hsa-miR-518b	-	
hsa-miR-518d-5p	-	
hsa-miR-525-3p	-	
hsa-miR-628-5p	-	

Auch die anderen analysierten miRNAs besitzen publizierte *Targets*, die einen Einfluss auf die Apoptose haben, oder zeigten in anderen Zelltypen einen Einfluss auf die Apoptoserate. So konnte für die miRNAs miR-146b-5p und miR-301 eine Beteiligung an strahlenrelevanten Prozessen, wie die Aktivierung des EGFR- (Katakowski et al., 2010) und des ERK/CREB-Signalweges (Cao et al., 2010), experimentell nachgewiesen werden. Des Weiteren hatten die miRNAs miR-146a, miR-146b-5p und miR-301 einen Einfluss auf die Proliferation, die Migration und die Apoptose in Krebszellen (Hou et al., 2011, Lin et al., 2011, Shi et al., 2011). Zudem konnte für die miRNA miR-146a gezeigt werden, dass sie in primären Endothelzellen (HUVECs) eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Seneszenz spielt und das Altern von Zellen beeinflussen kann (Vasa-Nicotera et al., 2011). Die Inhibierung dieser miRNAs zeigte jedoch keinen Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der primären Endothelzellen (HUVECs) und der Endothelzelllinie EA.hy926.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass strahlenregulierte Veränderungen in der miRNA-Expression die funktionellen Eigenschaften von Zellen verändern. Eine künstliche Hemmung von miRNAs resultierte z.B. in einer erhöhten Apoptoserate und einem verringerten Überleben von Endothelzellen. Interessanterweise wurde der Einfluss von miRNAs in den untersuchten Zellsystemen erst nach der Induktion von zellulärem Stress offensichtlich, während die Zellen im stressfreien Zustand Veränderungen ihres miRNA-Pools tolerierten. Dieses Resultat eröffnet vielseitige zukünftige Anwendungsmöglichkeiten von miRNAs in der Strahlentherapie. So könnte durch die Modulation von spezifischen miRNAs die Strahlenempfindlichkeit von Tumoren erhöht werden. Entsprechend könnte durch eine gezielte Veränderung spezifischer miRNAs die Strahlensensitivität von Normalgewebe in der Tumorumgebung verringert und somit unerwünschte Nebeneffekte der Therapie minimiert werden.

5.4 Identifikation von *Target*transkripten der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p

Um die Wirkungsweise von miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p in der Strahlenantwort genauer zu charakterisieren, sollten die entsprechenden *Target*transkripte identifiziert werden. Der Einfluss von spezifischen miRNAs auf das Gesamtproteom wurde bereits in einigen Arbeiten untersucht. Diese Proteom-Analysen, die den Einfluss der Inhibition oder Überexpression einer spezifischen miRNA in kultivierten Zellen untersuchten, konnten

zeigen, dass die modulierten miRNAs schon bei einer moderaten (~2-fachen) Veränderung einen Einfluss auf ihre individuellen Gentranskripte besaßen. Diese kleinen miRNA-Änderungen hatten zum Teil Auswirkungen auf hunderte Gentranskripte (Baek et al., 2008, Selbach et al., 2008). Daher ist anzunehmen, dass miRNAs möglicherweise eher ganze Prozesse durch eine Regulation vieler Zielgene unterdrücken, als wenige Zielproteine stark zu modulieren.

computergestützte Vorhersagen zu potentiellen Zielgenen der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p zeigten, dass sie zahlreiche potentielle Zielproteine mit Funktionen in der Induktion von Apoptose, der DNA-Reparatur, der Zellzykluskontrolle und der Antwort auf Stress betreffen (siehe Kapitel 4.3.2).

Zur experimentellen Überprüfung dieser Vorhersagen wurden Zellen mit Anti-miRNAs, Pre-miRNAs oder Kontroll-miRNAs behandelt und die Expression der potentiellen *Targets* überprüft. Von acht untersuchten potentiellen *Targets* konnte jedoch kein einziges verifiziert werden, was die reale Bedeutung von *in silico*-Vorhersagen von Zielgenen in Frage stellt.

Anschließend erfolgte mittels *Human Apoptosis Arrays* eine Analyse apoptoserelevanter Proteine oder Signalwege, die von den miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p reguliert werden (Kapitel 4.3.3). Diese Untersuchung ergab, dass nach einer Inhibierung aller drei miRNAs die p53-Phosphorylierung an den Serinen 15, 46 und 392 zu beiden untersuchten Zeitpunkten (4 h und 24 h) in größerem Umfang erfolgte. Die Menge an gespaltener Caspase-3 war nach Inhibierung der miRNAs, im Vergleich zu den bestrahlten Kontrollzellen, deutlich höher und die Menge an Pro-Caspase-3 geringer.

Diese Ergebnisse stützen die Daten der Apoptosemessungen, die gezeigt hatten, dass alle drei miRNAs einen Einfluss auf die strahleninduzierte Apoptose besitzen. Die Induktion der p53-Phosphorylierung führt zu einer Erhöhung der Apoptose, indem aktiviertes p53 z.B. die Hemmung der Transkription des anti-apoptotischen Bcl-2 und die Expression des pro-apoptotischen Bax reguliert (Miyashita et al., 1994, Miyashita und Reed, 1995). Das Bcl-2-Protein verursacht wiederum die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol und fördert damit weitere Caspase-Aktivität. Eine Veränderung der Proteinmenge von Bcl-2 oder Bax, die sich von der Expression der beiden Proteine nach Transfektion mit Kontroll-Inhibitor unterschied, konnte jedoch nach Inhibierung von miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p und anschließender Bestrahlung mittels des Apoptose-Array nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte mittels des *Human Apoptosis Arrays* lediglich eine Caspase3- und p53-Aktivierung detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass nur stark deregulierte Proteine in dem verwendeten experimentellen Aufbau gezeigt werden können. Da miRNAs jedoch oft nur geringe Proteinveränderungen, diese jedoch bei vielen Proteinen induzieren, ist die Sensitivität der Methode möglicherweise nicht hoch genug, um diese Regulationen zu detektieren.

5.5 2D-DIGE von miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p regulierten Proteinen nach Bestrahlung

Die 2D-DIGE Methode wurde in dieser Arbeit angewendet, da sie einige Vorteile gegenüber der klassischen zweidimensionalen Gelelektrophorese besitzt. Zum Beispiel werden Gel-zu-Gel Variationen durch die Verwendung eines internen Standards vermieden und durch die Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen wird eine höhere Sensitivität erreicht. In den durchgeführten 2D-DIGE Experimenten sollte mit einem pH-Bereich von 3-11 in der ersten Dimension (IEF) ein möglichst breites Spektrum an Proteinen abgedeckt werden. In Folgeexperimenten wäre es jedoch möglich, durch die Verwendung kleinerer pH-Bereiche eine höhere Auflösung zu erzielen oder durch Zellfraktionierung auch weniger abundante Proteine zu analysieren. Um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können, wurden je untersuchter Kombination drei biologische Replikate analysiert (siehe Kapitel 4.3.4).

Die bis jetzt durchgeführten quantitativen Proteom-Studien analysierten nur eine begrenzte Anzahl von miRNAs in wenigen Zellsystemen (Lossner et al., 2011, Selbach et al., 2008, Vinther et al., 2006, Yang et al., 2009). Die Proteomanalysen umfassen Arbeiten, die indirekt die globale Rolle von miRNAs in Zellen detektieren, andere Ansätze basieren auf einer direkten Detektion von miRNA-Zielproteinen durch die Deregulation spezifischer miRNAs. So untersuchten Nakahara et al. eine globale Herunterregulierung aller miRNAs mittels Dicer-Knockout-Mutanten, um die Zielproteine der miRNAs in *Drosophila* zu detektieren (Nakahara et al, 2005). Tian et al. wiesen miRNA-Zielproteine nach, indem sie miRNA-Profile zweier verschiedener Gewebe miteinander verglichen (Tian et al., 2008). Eine direkte Detektion von miR-21-Zielproteinen wurde in der Brustkrebslinie MCF-7 durch Zhu et al. mittels 2D-DIGE durchgeführt. Dabei wurden MCF-7 Zellen in Nacktmäuse injiziert, die mit Anti-miRs gegen die entsprechenden miRNAs behandelt waren (Zhu et al., 2007). In der Arbeit von Zhu et al. wurden veränderte Proteine erst ab einer 2-fachen Regulation berücksichtigt, was einem deutlich höheren Schwellenwert der Regulationsstärke als in der vorliegenden Arbeit entspricht. Daher ist auch die Anzahl der regulierten Proteinen nicht mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen

vergleichbar (siehe Kapitel 4.3.4). Kanzaki et al. untersuchten *Targets* der miRNAs des miR-17-92 Clusters in Lungenkrebszellen. Durch die Herunterregulierung der miRNAs konnten sie 112 hochregulierte Proteine detektieren und potentielle Zielproteine dieser miRNAs validieren (Kanzaki et al., 2011).

Alle diese oben aufgeführten Veröffentlichungen, in denen 2D-DIGE angewendet wurde, um miRNA-Zielproteine zu identifizieren, sind kaum mit den Experimenten in dieser Arbeit zu vergleichen, da hier zusätzlich zur Inhibierung von spezifischen miRNAs mittels Anti-miRs die Zellen mit einer Dosis von 2,5 Gy bestrahlt wurden. In den vier Versuchsansätzen konnten insgesamt 39 regulierte *Spots* eindeutig einem Protein zugeordnet werden, bei fünf *Spots* war keine eindeutige Identifikation möglich. Alle *Spots* die in einer Kombination eine Veränderung zeigten wurden zusätzlich in allen anderen Ansätzen analysiert. Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob sie in allen Ansätzen, in allen drei Inhibitor-transfizierten Ansätzen oder nur in einzelnen experimentellen Kombinationen eine Veränderung zeigten.

So waren die Proteine Ku80 (XRCC5/X-ray repair cross-complementing protein 5) und das heat shock 70kDa binding protein (HSPA) lediglich nach Bestrahlung in Kontroll-transfizierten Zellen und nicht nach Inhibierung einer miRNA dereguliert.

Zwei Proteine (Lamin A/C (LMNA) und Inner membrane protein (IMMT)) waren nach Inhibierung mit Anti-miR-216a (Kombination 2) verändert. Vier Proteine (das T-complex protein 1 subunit delta (CCT4), das Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1, der Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) und das SET nuclear oncogene (SET/IGAAD)) zeigten eine Inhibitor-spezifische Veränderung nach Transfektion mit Anti-miR-518d-5p. Ausschließlich nach Inhibierung der miRNA miR-525-3p waren sechs Proteine (das mitochondriale SCO1 homolog (SCOD1), die Esterase D (ESD), das Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRPA2B1), das Histone H2A, die Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPIG) und das Histidine triad nucleotide binding protein 1 (HINT1)) dereguliert. Diese Proteine stellen jeweils *Targets* der einzelnen miRNAs dar.

Vier Proteine (TCP1 (CCT2), das Heat shock 70kDa protein 9 (HSPA9/Grp75), Thioredoxin-1 (TXN1) und Annexin A3 (ANXA3)) waren in allen Anti-miR-behandelten Proben dereguliert. Dies deutet auf eine gemeinsame Funktion dieser miRNAs in der Strahlenantwort hin.

Bioinformatische Analyse miR-216a-, miR-518d-5p- und miR-525-3p-regulierter Proteine

Eine *GO-Term*-Analyse der quantitativ veränderten Proteine ergab, dass die nach der Herunterregulierung der drei miRNAs mit anschließender Bestrahlung deregulierten Proteine,

verglichen mit den veränderten Proteinen nach Bestrahlung ohne Inhibierung von miRNAs, an gleichen biologischen Prozessen beteiligt sind (siehe Kapitel 4.3.6). So waren vor allem Proteine, die zur Aufrechterhaltung der Zellmorphologie, für Apoptose- und Zelltodprozesse und der Zellzyklusregulation notwendig sind, verändert. Proteine, die eine Funktion in der Faltung und Modifikation von anderen Proteinen und der Reduktion/Biosynthese von kleinen Metaboliten besitzen, zeigten ebenfalls eine Deregulation.

Zusammenfassend zeigten die computergestützten *GO-Term*-Analysen somit, dass bei den deregulierten Proteinen aller untersuchten Kombinationen gleiche biologische Prozesse verändert sind. Dies weist darauf hin, dass die Wirkungsorte der untersuchten miRNAs genau in diesen strahlenregulierten Prozessen anzusiedeln sind.

Bei der Ingenuity-Netzwerkanalyse zeigte sich, wie schon bei der *GO-Term*-Analyse, dass bei allen Kombinationen die deregulierten Proteine an ähnlichen biologischen Funktionen beteiligt sind. So waren Funktionen wie Zelltod, Biochemie kleiner Moleküle, DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur, zelluläres Wachstum und Proliferation, sowie der Lipidmetabolismus mit fast allen deregulierten Proteinen, unabhängig von der Behandlung mit spezifischen Inhibitoren, involviert. Eine Ausnahme stellt die Kombination bei der miR-525-3p inhiert wurde dar. Diese Kombination ist die einzige, bei der Proteine verändert sind, die die biologischen Funktionen der posttranskriptionellen Modifikation und der Faltung von Proteinen betreffen.

Auffällig ist jedoch, dass in den Anti-miR-behandelten Proben deutlich mehr hochregulierte Proteine detektiert wurden. Zellen, die mit Anti-miR-216a transfiziert worden waren, zeigten sogar ausschließlich hochregulierte Proteine. In den Kontrollzellen, die lediglich bestrahlt worden waren, waren hingegen ähnlich viele Proteine hoch- wie herunterreguliert. Dies zeigt, dass die Funktion von miRNAs in der Strahlenantwort hauptsächlich in der negativen Regulation der *Target*expression liegt. Unter anderen Bedingungen sind miRNAs mittlerweile auch als positive Regulatoren der Expression beschrieben (Tu et al., 2009).

Für eine Validierung der *2D-DIGE*-Daten wurden die fünf Proteine H2A, Grp75, TXN1, XRCC5 und XRCC6 im Western-Blot analysiert (siehe Kapitel 4.3.5). Für alle getesteten Proteine konnten die mittels *2D-DIGE* erhobenen Proteom-Daten bestätigt werden. Nach derzeitigem Kenntnisstand stehen alle fünf Proteine im Zusammenhang mit Prozessen der Strahlenantwort.

Funktionen der miRNA-regulierten Proteine

Die Ku-Proteine bilden ein Heterodimer bestehend aus Ku70 und Ku80 (XRCC6 und XRCC5) und besitzen eine wichtige Funktion in der V(D)J-Rekombination, der Apoptose, der Telomer-Protektion und der nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ) als Reparaturweg von DNA-Doppelstrangbrüchen. Ein DNA-Doppelstrangbruch stellt den schwerwiegendsten Schaden nach ionisierender Strahlung dar. Das Ku-Heterodimer bindet während der NHEJ die DNA-Enden und koordiniert dadurch andere DNA-Reparaturproteine. Außerdem moduliert es die Expression von Apaf1, einem wichtigen Regulator des mitochondrialen, intrinsischen Weges der Apoptose (De Zio et al., 2011). Biochemische und genetische Studien konnten zeigen, dass Nagetier-Zelllinien, die eine Mutation im XRCC5- oder XRCC6-Gen tragen, empfindlicher auf ionisierende Strahlung reagieren (Featherstone und Jackson, 1999, Jeggo, 1998). Dass das Protein XRCC5 (Ku80) nur in bestrahlten Zellen hochreguliert war, in miRNA-inhibierten Zellen jedoch nach Bestrahlung unverändert blieb, könnte die erhöhte Strahlungssensitivität in EA.hy926 Zellen zumindest zum Teil erklären. Weiterhin war XRCC6 (Ku70) in Anti-miR-525-3p-behandelten Zellen herunterreguliert, was die Hypothese stützt, dass die miRNAs, die ein Einfluss auf das Überleben in Zellen haben, dies unter anderem über Ku vermitteln. Dagegen spricht jedoch, dass der *Knockdown* von Ago2 und Dicer keinen Einfluss auf die Effizienz der DSB-Reparatur in Endothelzellen hatte. Daher könnte die miRNA-vermittelte Regulation von Faktoren des NHEJ zu einer anderen Gewichtung von Reparatur-Wegen, z.B. für eine verstärkte Nutzung der homologen Rekombination, führen.

Das Histon-Protein H2A zeigte nur nach Inhibierung von miR-525-3p eine Deregulation. Eine Veränderung der Proteinexpression des Histons H2A nach Stress wurde bis jetzt noch in keiner Arbeit beschrieben. Eine Ubiquitinierung von H2A konnte jedoch als Reaktion auf DSB nachgewiesen werden (Mailand et al., 2007, Nicassio et al., 2007). Des Weiteren gibt es Untersuchungen, die eine NER (Nucleotide Excision Repair)-vermittelte Ubiquitinierung von H2A nach UV-Bestrahlung zeigen (Bergink et al., 2006). Der molekulare Mechanismus und die Funktion der beobachteten stressinduzierten H2A Ubiquitinierung sind jedoch noch nicht bekannt. Da im 2D-Gel auch posttranslationale Proteinmodifikationen als Veränderungen gemessen werden können, wenn sie das Elektrophoreseverhalten verändern, ist es möglich, dass diese detektiert worden ist. So könnte in diesem Fall auch eine veränderte H2A-Ubiquitinierung in miR-525-3p inhibierten Zellen vorliegen. Da diese posttranslationale Modifikation des Histons normalerweise nach Stressbedingungen induziert wird, könnte eine fehlende Ubiquitinierung einen Effekt auf das Überleben der Zellen haben.

Das Protein Mortalin (mthsp70/GRP75) zeigte nach Inhibierung von miR-216a und miR-518d-5p eine signifikante Veränderung der Proteinexpression, die Behandlung mit miR-525-3p-Inhibitor führte ebenfalls zu einer geringeren Expression des Proteins. Mortalin, ein mitochondriales Stressprotein, ist Mitglied der HSP70-Chaperonfamilie. Es ist unter anderem in Stress-Reaktionen, dem intrazellulären mitochondrialen Import von Proteinen, der Antigenprozessierung, der Kontrolle der Zellteilung, der Differenzierung und der Tumorgenese involviert (Wadhwa et al., 2002). Mortalin ist in vielen Tumoren stark exprimiert. Funktionell interagiert Mortalin mit dem Tumorsuppressorprotein p53 und inhibiert dessen Translokation in den Kern. Die Mortalin-p53-Interaktion, die zur Inaktivierung der p53-vermittelten Apoptose führt, ist vom zellulären Stress-Level abhängig (Lu et al., 2011). Nach gamma-Bestrahlung war eine Erhöhung der mRNA von Mortalin schon nach 15 min in HT29 Zellen zu detektieren, und ging dann innerhalb von 5 h auf das Basisniveau zurück (Sadekova et al., 1997). Carette et al. konnten außerdem zeigen, dass Mortalin nach Bestrahlung eine Funktion bei der *adaptive response* von Zellen besitzt (Carette et al., 2002). Da Mortalin in allen Anti-miR-behandelten Zellen eine verstärkte Proteinexpression nach Bestrahlung zeigte, könnte dadurch eine gestörte Strahlenantwort der Zellen verursacht werden.

Die Proteinexpression von Thioredoxin-1 (TXN1) war nach Inhibition von miR-525-3p signifikant, in Anti-miR-216a- und Anti-miR-518d-5p-behandelten Proben nicht signifikant, aber tendenziell in die gleiche Richtung dereguliert. Thioredoxin-1 ist an einer Reihe von Zellfunktionen, darunter der Proliferation, dem Überleben und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie p53, NF- κ B und dem *activation protein-1* (AP-1) beteiligt (Nakamura et al., 1997, Nishiyama et al., 2001). Mehrere Arbeiten wiesen bereits nach, dass Thioredoxin-1 durch seine Redox-Kontrollfunktionen eine anti-apoptische und anti-oxidative Funktion besitzt und das Zellwachstum und Überleben der Zellen durch Inhibierung von spezifischen Apoptose-Signalmolekülen, wie der Signaling Kinase-1, reguliert. Bei Stress (z.B. Behandlung mit reaktiven Sauerstoffspezies) kommt es zu einem Import von Thioredoxin-1 in den Nukleus (Andoh et al., 2002, Andoh et al., 2005, Yamada et al., 2007). Es gibt jedoch auch Arbeiten, die auf eine pro-apoptische Funktion von Thioredoxin-1 hindeuten. Byun et al. konnten zeigen, dass eine TRX1-Überexpression HT-1080 Zellen zwar resistent gegenüber oxidativem Stress, z.B. durch H₂O₂, macht, diese Zellen aber deutlich empfindlicher auf ionisierende Strahlung reagieren und der G2-Phase-Kontrollpunkt nicht mehr aktiviert werden kann (Byun et al., 2005). Alle mit Anti-miRs behandelten Zellen zeigten eine deutliche Apoptoseinduktion und eine verstärkte TXN1-Proteinexpression nach Bestrahlung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Protein

deutlich stärker exprimiert wird, um den oxidativen Stress der Zelle zu verringern. Eine andere Möglichkeit ist, dass Thioredoxin-1 in Endothelzellen, wie in HT-1080 Zellen, eine proapoptotische Funktion besitzt.

Zusammengefasst konnten durch die Proteomanalysen interessante Zielproteine der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p identifiziert werden. In Folgearbeiten muss nun die miRNA-Targettranskript-Wechselwirkung genauer analysiert werden. Hierbei stellt sich unter anderem die Frage, ob es sich bei den gefundenen Zielproteinen um direkte oder indirekte miRNA-Targets handelt. Außerdem sollte die Bedeutung der gefundenen Proteine in der Strahlenantwort durch Überexpressions- bzw. *Knockdown*-Experimente überprüft werden.

5.6 Übersicht der miRNA-vermittelten Funktionen in der Strahlenantwort von EA.hy926 und HUVEC Zellen

Eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ins in Abbildung 5-2 zu sehen.

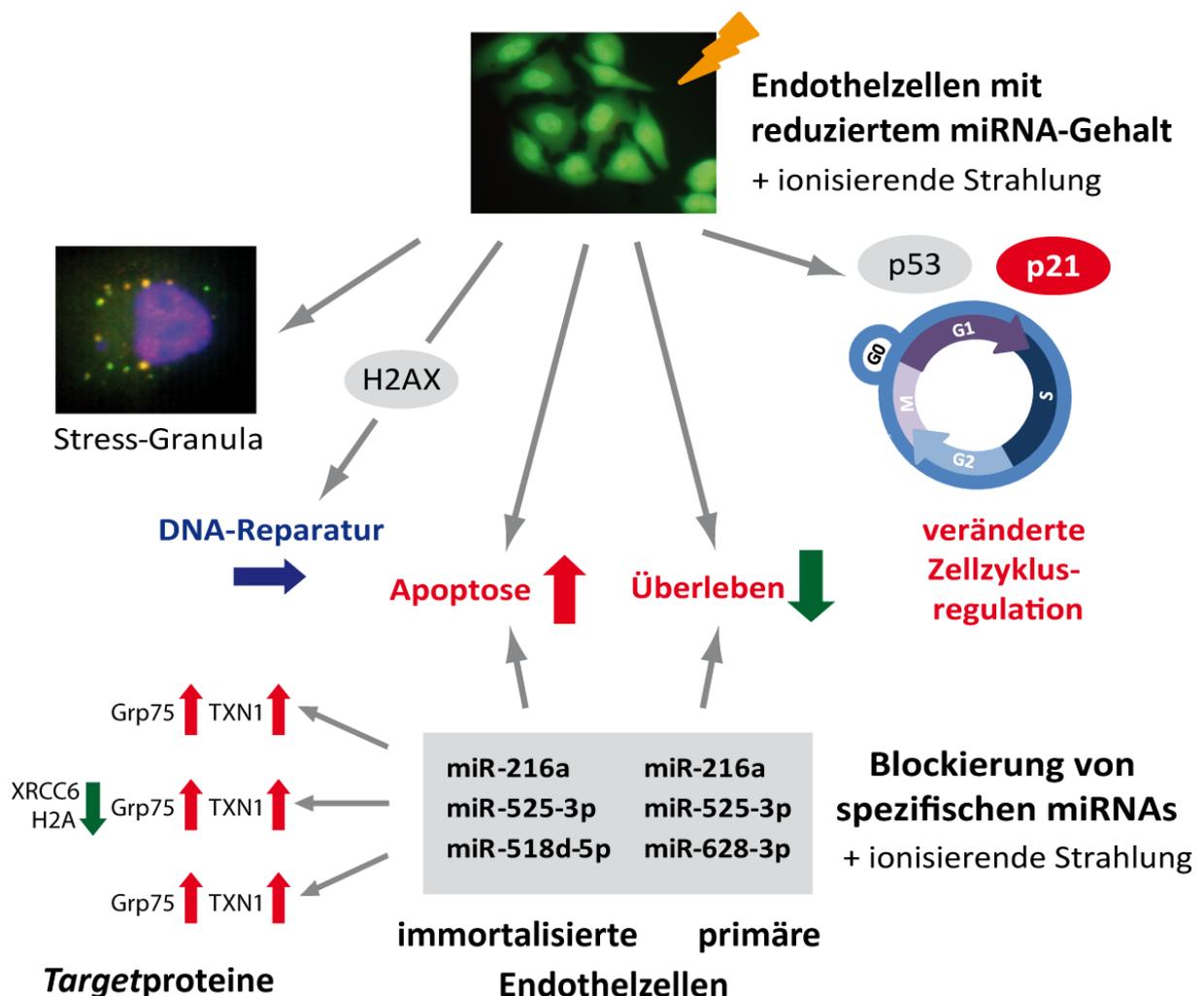


Abb. 5-2: Übersichtsschema der Rolle von miRNAs in der Strahlenantwort von Endothelzellen. Im oberen Teil der Abbildung sind die Ergebnisse nach Herunterregulierung der Gesamt-miRNAs mittels siDicer bzw. siAgo2 in EA.hy926 und HUVEC Zellen gezeigt. In diesen Zellen steigt, im Vergleich zur Kontrolle, nach Bestrahlung die Apoptose, während das Zellüberleben und die Stress-Granula-Bildung (siehe Kapitel 4.1.4 und 5.6) verringert ist. Durch eine verminderte p21-Stabilisierung ist der G1/S-Phase-Kontrollpunkt dereguliert, die DNA-Reparaturkapazität ist hingegen in Zellen mit einem geringeren miRNA-Gehalt nicht verändert. Im unteren Teil der Abbildung sind die Effekte nach Inhibierung spezifischer miRNAs in EA.hy926 und HUVEC Zellen zusammengefasst. Wird die Hochregulierung der miRNAs miR-216a, miR-525-3p und miR-518d-3p in EA.hy926 Zellen und die Hochregulierung der miRNAs miR-216a, miR-525-3p und miR-628-3p in HUVEC Zellen mittels miRNA-Inhibitoren verhindert, steigt, verglichen mit Kontrollzellen, nach Bestrahlung die Apoptose, während das Zellüberleben verringert ist. Der Zellzyklus ist hingegen unverändert. Im unteren Bild sind links die validierten Zielproteine der miRNAs miR-216a, miR-518d-5p und miR-525-3p aufgeführt.

5.7 MiRNA-abhängige Bildung von Stress-Granula in HUVEC und EA.hy926 Zellen nach ionisierender Strahlung

Eine weitere Möglichkeit für die Modulation der Genexpression als Reaktion auf Stressfaktoren ist die Regulation der Translation durch die Translokation spezifischer mRNAs in oder aus Stress-Granula (SG). Die SG-Bildung nach verschiedenen Stressoren, z.B. UV-Strahlung, Hitzeschock, Arsenit-Behandlung oder Hypoxie, wurde bereits intensiv untersucht. Es gibt jedoch erst wenige Analysen zur Aggregation von Stress-Granula nach ionisierender Strahlung. Eine Untersuchung zeigt die Bildung von SG in hypoxischen Tumorzellen nach Ganzkörper-Strahlentherapie bei Mäusen (Moeller et al., 2004). Pothof et al. waren hingegen nicht in der Lage SG in HeLa Zellen zu detektieren, nachdem diese mit einer supraletalen Dosis von 20 Gy bestrahlt worden waren (Pothof et al., 2009a). In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion von SG nach Bestrahlung mit einer klinisch relevanten Dosis von 1 Gy (HUVECs) und einer moderaten Dosis von 5 Gy (EA.hy926 und HUVECs) nachgewiesen (siehe Kapitel 4.4.1 und Kapitel 4.4.2). SG waren 2 h nach Bestrahlung in der Endothelzelllinie EA.hy926 nur in einer begrenzten Anzahl (12-14 %) von Zellen zu beobachten. Auch in primären Endothelzellen (HUVECs) waren SG nach ionisierender Strahlung nur in einer Subpopulation zu detektieren. Das Maximum an SG-positiven Zellen war bei beiden Dosen nach 6 h zu detektieren (13 % nach 1 Gy bzw. 29 % nach 5 Gy). Dies deutet darauf hin, dass die Bildung von SG nur unter bestimmten Bedingungen in der Zelle Teil der Strahlenantwort ist. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Pothof et al..

Sie konnten nachweisen, dass UV-Bestrahlung nur in einer Untergruppe von Zellen zu SG-Bildung führt, und dass sie in hohem Maße von der Zellzyklus-Phase abhängig ist. Dies lässt vermuten, dass SG eine Funktion neben dem miRNA-vermittelten Gen-*Silencing* nach UV-Bestrahlung der Zellen besitzen (Pothof et al., 2009a). Im Gegensatz dazu sind nach Arsenit-Behandlung nahezu 100 % der Zellen SG-positiv (Anderson und Kedersha, 2006).

Stress-Granula enthalten miRNAs und Komponenten des RISC-Komplexes (Leung et al., 2006, Valencia-Sanchez et al., 2006). Daher wurden weitere Untersuchungen an EA.hy926 Zellen durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen miRNAs und der Bildung von SG in Endothelzellen nach ionisierender Strahlung zu analysieren (siehe Kapitel 4.4.1). Die Bildung von SG nach Bestrahlung in Ago2- oder Dicer-herunterregulierten Zellen war deutlich verringert. Eine Überexpression von endogenem Ago2 mittels eines Ago2-eGFP-Plasmids (Ago2-eGFP) führte hingegen zu einer erhöhten Anzahl an Zellen mit SG. Wurde reife, unspezifische miRNA in Dicer- oder Ago2-herunterregulierte Zellen transfiziert, entsprach die SG-Bildung wieder der in Kontrollzellen. Somit konnte der negative Effekt auf die SG-Bildung, der nach einer globalen Reduktion des zellulären miRNA-Gehalts durch einen Ago2- oder Dicer-*Knockdown* detektiert wurde, durch die Transfektion von zusätzlichen, unspezifischen reifen miRNAs rückgängig gemacht werden. Auch konnte die Transfektion von unspezifischen miRNAs in Kontrollzellen eine signifikante Erhöhung der SG-positiven Zellen bewirken. Dies lässt darauf schließen, dass die Bildung von SG in Endothelzellen durch den zellulären miRNA-Gehalt moduliert wird und demnach ein enger Zusammenhang zwischen der miRNA-Prozessierung und der SG-Bildung nach Bestrahlung besteht. Außerdem scheinen eher die miRNAs selbst als die miRNA-prozessierenden Enzyme Dicer oder Ago2 wichtig für die Assemblierung von SG in Endothelzellen zu sein. Die Ergebnisse legen nahe, dass die spezifische miRNA-abhängige Lagerung von mRNAs in SG einen möglichen Mechanismus für die Genregulation nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung darstellt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Daten von Pothof et al., die nachwiesen, dass nach UV-Bestrahlung in Dicer-depletierten Zellen die SG-Bildung weiterhin wie in den Kontrollzellen erfolgt (Pothof et al., 2009b). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist, dass die miRNA-assoziierte SG-Bildung auch von der Art des Stresses, der Dosis oder dem Zelltyp abhängig ist. Die Ergebnisse von Pothof et al., die in HeLa Zellen nach einer supraletalen Dosis von 20 Gy ionisierender Strahlung keine SG nachweisen konnten, stützen diese Annahme (Pothof et al., 2009a).

Einfluss von ATM-, p53- und NBS1 auf die Stress-Granula-Bildung in Endothelzellen nach Bestrahlung

Ein wichtiger Schritt bei der Bildung von SG ist die Translokation des Tia-1-Proteins vom Zellkern in das Zytoplasma. Dies könnte durch bestimmte Faktoren, die eine Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung erkennen, vermittelt werden. Daher wurde untersucht, ob wichtige Proteine der DNA-Schadensantwort zur Relokalisation von Tia-1 und damit zur SG-Bildung beitragen. Hierfür wurde die SG-Bildung in ATM-, p53- und NBS1-depletierten Zellen analysiert (siehe Kapitel 4.4.1). Nach Herunterregulierung der Proteine ATM, p53 und NBS1 zeigte sich jedoch keine Veränderung in der Kinetik der SG-Bildung, was drauf schließen lässt, dass diese unabhängig von ATM, p53 und NBS1 erfolgt. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Arbeiten von Pothof et al., die zeigen konnten, dass nach UV-Schäden das Signal zur SG-Bildung ebenfalls unabhängig vom ATM/ATR-Signalweg oder von weiteren Proteinen der wichtigen DNA-Reparaturmechanismen vermittelt wird (Pothof et al., 2009a).

Im Gegensatz zu SG wurde die Bildung von *Processing Bodies* in den durchgeführten Versuchen in der Endothelzelllinie EA.hy926 nicht induziert. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass weder Hitzeschock-Behandlung noch die Behandlung mit dem mitochondrialen Gift Clotrimazol zu einer vermehrten Bildung von *Processing Bodies* führte, obwohl die Bildung von SG induziert wurde (Kedersha und Anderson, 2007). Dies lässt darauf schließen, dass bei einigen Stress-Faktoren, darunter auch ionisierende Strahlung, die Bildung von Stress-Granula und *Processing Bodies* unabhängig voneinander erfolgt und die Regulation der Assemblierung von der Art des Stresses abhängt.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass miRNAs eine wichtige Rolle bei der Bildung von SG nach Bestrahlung spielen. So induziert ionisierende Strahlung die Bildung von SG in Abhängigkeit vom miRNA-Gehalt in Endothelzellen. Es bleiben jedoch noch zahlreiche Fragen unbeantwortet. Ungeklärt ist z.B., warum nur eine Subpopulation der Zellen SG-Bildung nach Bestrahlung zeigt und welche Zellen dies sind. Des Weiteren stellt sich die Frage ob, und wenn ja, durch welchen Mechanismus SG-enhaltende Zellen einen Überlebensvorteil gegenüber anderen Zellen besitzen.

6. Literaturverzeichnis

- ABDOLLAHI, A., LIPSON, K. E., HAN, X., KREMPIEN, R., TRINH, T., WEBER, K. J., HAHNFELDT, P., HLATKY, L., DEBUS, J., HOWLETT, A. R. & HUBER, P. E. (2003) SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation in vitro. *Cancer Res*, 63, 3755-63.
- ALVAREZ-GARCIA, I. & MISKA, E. A. (2005) MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132, 4653-62.
- AMUNDSON, S. A. (2008) Functional genomics in radiation biology: a gateway to cellular systems-level studies. *Radiat Environ Biophys*, 47, 25-31.
- AMUNDSON, S. A., BITTNER, M. & FORNACE, A. J., JR. (2003) Functional genomics as a window on radiation stress signaling. *Oncogene*, 22, 5828-33.
- ANDERSON, P. & KEDERSHA, N. (2006) RNA granules. *J Cell Biol*, 172, 803-8.
- ANDOH, T., CHOCK, P. B. & CHIUHEH, C. C. (2002) The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Biol Chem*, 277, 9655-60.
- ANDOH, T., CHOCK, P. B., MURPHY, D. L. & CHIUHEH, C. C. (2005) Role of the redox protein thioredoxin in cytoprotective mechanism evoked by (-)-deprenyl. *Mol Pharmacol*, 68, 1408-14.
- ASADA, S., TAKAHASHI, T., ISODONO, K., ADACHI, A., IMOTO, H., OGATA, T., UEYAMA, T., MATSUBARA, H. & OH, H. (2008) Downregulation of Dicer expression by serum withdrawal sensitizes human endothelial cells to apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, H2512-21.
- BAEK, D., VILLEN, J., SHIN, C., CAMARGO, F. D., GYGI, S. P. & BARTEL, D. P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455, 64-71.
- BARTEK, J., BARTKOVA, J. & LUKAS, J. (2007) DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*, 26, 7773-9.
- BEISSBARTH, T. (2006) Interpreting experimental results using gene ontologies. *Methods Enzymol*, 411, 340-52.
- BEREZIKOV, E., CHUNG, W. J., WILLIS, J., CUPPEN, E. & LAI, E. C. (2007) Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*, 28, 328-36.
- BERGINK, S., SALOMONS, F. A., HOOGSTRATEN, D., GROOTHUIS, T. A., DE WAARD, H., WU, J., YUAN, L., CITTERIO, E., HOUTSMULLER, A. B., NEEFJES, J., HOEIJMAKERS, J. H., VERMEULEN, W. & DANTUMA, N. P. (2006) DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev*, 20, 1343-52.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S. M. & HANNON, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-6.
- BHATTACHARYYA, S. N., HABERMACHER, R., MARTINE, U., CLOSS, E. I. & FILIPOWICZ, W. (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 125, 1111-24.
- BOHMERT, K., CAMUS, I., BELLINI, C., BOUCHEZ, D., CABOCHE, M. & BENNING, C. (1998) AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J*, 17, 170-80.
- BOND, U. (2006) Stressed out! Effects of environmental stress on mRNA metabolism. *FEMS Yeast Res*, 6, 160-70.
- BORCHERT, G. M., LANIER, W. & DAVIDSON, B. L. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13, 1097-101.
- BOSSE, G. D. & SIMARD, M. J. (2010) A new twist in the microRNA pathway: Not Dicer but Argonaute is required for a microRNA production. *Cell Res*, 20, 735-7.
- BRAUN, C. J., ZHANG, X., SAVELYEVA, I., WOLFF, S., MOLL, U. M., SCHEPELER, T., ORNTOFT, T. F., ANDERSEN, C. L. & DOBBELSTEIN, M. (2008) p53-Responsive micrornas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res*, 68, 10094-104.

- BRENNECKE, J., HIPFNER, D. R., STARK, A., RUSSELL, R. B. & COHEN, S. M. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113, 25-36.
- BUCHAN, J. R. & PARKER, R. (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell*, 36, 932-41.
- BUENO, M. J. & MALUMBRES, M. (2011) MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 592-601.
- BUENO, M. J., PEREZ DE CASTRO, I. & MALUMBRES, M. (2008) Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle*, 7, 3143-8.
- BUSHATI, N. & COHEN, S. M. (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 175-205.
- BYUN, H. S., CHO, E. W., KIM, J. S., MOON, M. S., YUM, J. J., KIM, K. C. & KIM, I. G. (2005) Thioredoxin overexpression in HT-1080 cells induced cellular senescence and sensitization to gamma radiation. *FEBS Lett*, 579, 4055-62.
- CAI, X., HAGEDORN, C. H. & CULLEN, B. R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10, 1957-66.
- CALIN, G. A., LIU, C. G., SEVIGNANI, C., FERRACIN, M., FELLI, N., DUMITRU, C. D., SHIMIZU, M., CIMMINO, A., ZUPO, S., DONO, M., DELL'AQUILA, M. L., ALDER, H., RASSENTI, L., KIPPS, T. J., BULLRICH, F., NEGRINI, M. & CROCE, C. M. (2004) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11755-60.
- CAMON, E., MAGRANE, M., BARRELL, D., LEE, V., DIMMER, E., MASLEN, J., BINNS, D., HARTE, N., LOPEZ, R. & APWEILER, R. (2004) The Gene Ontology Annotation (GOA) Database: sharing knowledge in Uniprot with Gene Ontology. *Nucleic Acids Res*, 32, D262-6.
- CAO, G., HUANG, B., LIU, Z., ZHANG, J., XU, H., XIA, W., LI, J., LI, S., CHEN, L., DING, H., ZHAO, Q., FAN, M., SHEN, B. & SHAO, N. (2010) Intronic miR-301 feedback regulates its host gene, ska2, in A549 cells by targeting MEOX2 to affect ERK/CREB pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 396, 978-82.
- CARBONARO, M., O'BRATE, A. & GIANNAKAKOU, P. (2011) Microtubule disruption targets HIF-1alpha mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression. *J Cell Biol*, 192, 83-99.
- CARETTE, J., LEHNERT, S. & CHOW, T. Y. (2002) Implication of PBP74/mortalin/GRP75 in the radio-adaptive response. *Int J Radiat Biol*, 78, 183-90.
- CERUTTI, H. & IBRAHIM, F. (2011) Turnover of Mature miRNAs and siRNAs in Plants and Algae. *Adv Exp Med Biol*, 700, 124-39.
- CHA, H. J., SEONG, K. M., BAE, S., JUNG, J. H., KIM, C. S., YANG, K. H., JIN, Y. W. & AN, S. (2009a) Identification of specific microRNAs responding to low and high dose gamma-irradiation in the human lymphoblast line IM9. *Oncol Rep*, 22, 863-8.
- CHA, H. J., SHIN, S., YOO, H., LEE, E. M., BAE, S., YANG, K. H., LEE, S. J., PARK, I. C., JIN, Y. W. & AN, S. (2009b) Identification of ionizing radiation-responsive microRNAs in the IM9 human B lymphoblastic cell line. *Int J Oncol*, 34, 1661-8.
- CHAN, S. W., ZILBERMAN, D., XIE, Z., JOHANSEN, L. K., CARRINGTON, J. C. & JACOBSEN, S. E. (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science*, 303, 1336.
- CHEN, J. F., MURCHISON, E. P., TANG, R., CALLIS, T. E., TATSUGUCHI, M., DENG, Z., ROJAS, M., HAMMOND, S. M., SCHNEIDER, M. D., SELZMAN, C. H., MEISSNER, G., PATTERSON, C., HANNON, G. J. & WANG, D. Z. (2008) Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2111-6.
- CHEN, Y. & STALLINGS, R. L. (2007) Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res*, 67, 976-83.
- CHENDRIMADA, T. P., GREGORY, R. I., KUMARASWAMY, E., NORMAN, J., COOCH, N., NISHIKURA, K. & SHIEKHATTAR, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436, 740-4.
- CHU, C. Y. & RANA, T. M. (2006) Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol*, 4, e210.

- DE ZIO, D., BORDI, M., TINO, E., LANZUOLO, C., FERRARO, E., MORA, E., CICCOSANTI, F., FIMIA, G. M., ORLANDO, V. & CECCONI, F. (2011) The DNA repair complex Ku70/86 modulates Apaf1 expression upon DNA damage. *Cell Death Differ*, 18, 516-27.
- DETJEN, K. M., MURPHY, D., WELZEL, M., FARWIG, K., WIEDENMANN, B. & ROSEWICZ, S. (2003) Downregulation of p21(waf/cip-1) mediates apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in response to interferon-gamma. *Exp Cell Res*, 282, 78-89.
- DOENCH, J. G., PETERSEN, C. P. & SHARP, P. A. (2003) siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, 17, 438-42.
- DOTTO, G. P. (2000) p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*, 1471, M43-56.
- DU, T. & ZAMORE, P. D. (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132, 4645-52.
- EISINGER-MATHASON, T. S., ANDRADE, J., GROEHLER, A. L., CLARK, D. E., MURATORE-SCHROEDER, T. L., PASIC, L., SMITH, J. A., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., MACARA, I. G. & LANNIGAN, D. A. (2008) Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival. *Mol Cell*, 31, 722-36.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8.
- ESQUELA-KERSCHER, A. & SLACK, F. J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 259-69.
- EULALIO, A., BEHM-ANSMANT, I. & IZAURRALDE, E. (2007a) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 9-22.
- EULALIO, A., BEHM-ANSMANT, I., SCHWEIZER, D. & IZAURRALDE, E. (2007b) P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, 27, 3970-81.
- EYSTATHIOY, T., CHAN, E. K., TENENBAUM, S. A., KEENE, J. D., GRIFFITH, K. & FRITZLER, M. J. (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell*, 13, 1338-51.
- FABIAN, M. R., SONENBERG, N. & FILIPOWICZ, W. (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, 79, 351-79.
- FEATHERSTONE, C. & JACKSON, S. P. (1999) Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res*, 434, 3-15.
- FILIPOWICZ, W., BHATTACHARYYA, S. N. & SONENBERG, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9, 102-14.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- FOSHAY, K. M. & GALLICANO, G. I. (2007) Small RNAs, big potential: the role of MicroRNAs in stem cell function. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2, 264-71.
- FOUNTOULAKIS, M., TSANGARIS, G., OH, J. E., MARIS, A. & LUBEC, G. (2004) Protein profile of the HeLa cell line. *J Chromatogr A*, 1038, 247-65.
- FRIEDMAN, R. C., FARH, K. K., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19, 92-105.
- GEORGES, S. A., BIERY, M. C., KIM, S. Y., SCHELTER, J. M., GUO, J., CHANG, A. N., JACKSON, A. L., CARLETON, M. O., LINSLEY, P. S., CLEARY, M. A. & CHAU, B. N. (2008) Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. *Cancer Res*, 68, 10105-12.
- GREGORY, R. I., CHENDRIMADA, T. P., COOCH, N. & SHIEKHATTAR, R. (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123, 631-40.
- GRIFFITHS-JONES, S. (2006) miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*, 342, 129-38.
- GRIMM, D. & KAY, M. A. (2007a) RNAi and gene therapy: a mutual attraction. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 473-81.

- GRIMM, D. & KAY, M. A. (2007b) Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *J Clin Invest*, 117, 3633-41.
- GRIMSON, A., FARH, K. K., JOHNSTON, W. K., GARRETT-ENGELE, P., LIM, L. P. & BARTEL, D. P. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27, 91-105.
- GRISHOK, A., PASQUINELLI, A. E., CONTE, D., LI, N., PARRISH, S., HA, I., BAILLIE, D. L., FIRE, A., RUVKUN, G. & MELLO, C. C. (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106, 23-34.
- HAASE, A. D., JASKIEWICZ, L., ZHANG, H., LAINE, S., SACK, R., GATIGNOL, A. & FILIPOWICZ, W. (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep*, 6, 961-7.
- HAMILTON, A. J. & BAULCOMBE, D. C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286, 950-2.
- HAMMOND, S. M., BERNSTEIN, E., BEACH, D. & HANNON, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404, 293-6.
- HARPER, J. W. & ELLEDGE, S. J. (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, 28, 739-45.
- HE, L., HE, X., LIM, L. P., DE STANCHINA, E., XUAN, Z., LIANG, Y., XUE, W., ZENDER, L., MAGNUS, J., RIDZON, D., JACKSON, A. L., LINSLEY, P. S., CHEN, C., LOWE, S. W., CLEARY, M. A. & HANNON, G. J. (2007a) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447, 1130-4.
- HE, L., HE, X., LOWE, S. W. & HANNON, G. J. (2007b) microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer*, 7, 819-22.
- HERMEKING, H. (2007) p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell*, 12, 414-8.
- HERMEKING, H. (2010) The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*, 17, 193-9.
- HOCHBERG, Y. & BENJAMINI, Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57, 289-300.
- HOU, Z., XIE, L., YU, L., QIAN, X. & LIU, B. (2011) MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Med Oncol*.
- HUANG, L., MOLLET, S., SOUQUERE, S., LE ROY, F., ERNOULT-LANGE, M., PIERRON, G., DAUTRY, F. & WEIL, D. (2011) Mitochondria Associate with P-bodies and Modulate MicroRNA-mediated RNA Interference. *J Biol Chem*, 286, 24219-30.
- HUTVAGNER, G., MCLACHLAN, J., PASQUINELLI, A. E., BALINT, E., TUSCHL, T. & ZAMORE, P. D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293, 834-8.
- IBRAHIM, F., RYMARQUIS, L. A., KIM, E. J., BECKER, J., BALASSA, E., GREEN, P. J. & CERUTTI, H. (2010) Uridylation of mature miRNAs and siRNAs by the MUT68 nucleotidyltransferase promotes their degradation in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3906-11.
- INUI, M., MARTELLO, G. & PICCOLO, S. (2010) MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 252-63.
- IORIO, M. V., FERRACIN, M., LIU, C. G., VERONESE, A., SPIZZO, R., SABBIONI, S., MAGRI, E., PEDRIALI, M., FABBRI, M., CAMPIGLIO, M., MENARD, S., PALAZZO, J. P., ROSENBERG, A., MUSIANI, P., VOLINIA, S., NENCI, I., CALIN, G. A., QUERZOLI, P., NEGRINI, M. & CROCE, C. M. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 65, 7065-70.
- JACKSON, S. P. & BARTEK, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461, 1071-8.
- JEGGO, P. A. (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res*, 150, S80-91.
- JOHNSON, S. M., GROSSHANS, H., SHINGARA, J., BYROM, M., JARVIS, R., CHENG, A., LABOURIER, E., REINERT, K. L., BROWN, D. & SLACK, F. J. (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120, 635-47.

- JOSSON, S., SUNG, S. Y., LAO, K., CHUNG, L. W. & JOHNSTONE, P. A. (2008) Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines. *Prostate*, 68, 1599-606.
- KAI, Z. S. & PASQUINELLI, A. E. (2010) MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 5-10.
- KANELLOPOULOU, C., MULJO, S. A., KUNG, A. L., GANESAN, S., DRAPKIN, R., JENUWEIN, T., LIVINGSTON, D. M. & RAJEWSKY, K. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, 19, 489-501.
- KANZAKI, H., ITO, S., HANAFUSA, H., JITSUMORI, Y., TAMARU, S., SHIMIZU, K. & OUCHIDA, M. (2011) Identification of direct targets for the miR-17-92 cluster by proteomic analysis. *Proteomics*.
- KASINSKI, A. L. & SLACK, F. J. (2010) Potential microRNA therapies targeting Ras, NFkappaB and p53 signaling. *Curr Opin Mol Ther*, 12, 147-57.
- KATAKOWSKI, M., ZHENG, X., JIANG, F., ROGERS, T., SZALAD, A. & CHOPP, M. (2010) MiR-146b-5p suppresses EGFR expression and reduces in vitro migration and invasion of glioma. *Cancer Invest*, 28, 1024-30.
- KATO, M., PUTTA, S., WANG, M., YUAN, H., LANTING, L., NAIR, I., GUNN, A., NAKAGAWA, Y., SHIMANO, H., TODOROV, I., ROSSI, J. J. & NATARAJAN, R. (2009) TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol*, 11, 881-9.
- KEDERSHA, N. & ANDERSON, P. (2007) Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol*, 431, 61-81.
- KERTESZ, M., IOVINO, N., UNNERSTALL, U., GAUL, U. & SEGAL, E. (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*, 39, 1278-84.
- KETTING, R. F., FISCHER, S. E., BERNSTEIN, E., SIJEN, T., HANNON, G. J. & PLASTERK, R. H. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 15, 2654-9.
- KHVOROVA, A., REYNOLDS, A. & JAYASENA, S. D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115, 209-16.
- KLOOSTERMAN, W. P. & PLASTERK, R. H. (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*, 11, 441-50.
- KNIGHT, S. W. & BASS, B. L. (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 293, 2269-71.
- KREK, A., GRUN, D., POY, M. N., WOLF, R., ROSENBERG, L., EPSTEIN, E. J., MACMENAMIN, P., DA PIEDADE, I., GUNSALUS, K. C., STOFFEL, M. & RAJEWSKY, N. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 37, 495-500.
- KUEHBACHER, A., URBICH, C., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. (2007) Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*, 101, 59-68.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 853-8.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., MEYER, J., BORKHARDT, A. & TUSCHL, T. (2003) New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 9, 175-9.
- LALL, S., GRUN, D., KREK, A., CHEN, K., WANG, Y. L., DEWEY, C. N., SOOD, P., COLOMBO, T., BRAY, N., MACMENAMIN, P., KAO, H. L., GUNSALUS, K. C., PACHTER, L., PIANO, F. & RAJEWSKY, N. (2006) A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Curr Biol*, 16, 460-71.
- LAU, N. C., LIM, L. P., WEINSTEIN, E. G. & BARTEL, D. P. (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 858-62.
- LEE, R. C. & AMBROS, V. (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 862-4.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.

- LEUNG, A. K., CALABRESE, J. M. & SHARP, P. A. (2006) Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18125-30.
- LEWIS, B. P., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.
- LI, B., SHI, X. B., NORI, D., CHAO, C. K., CHEN, A. M., VALICENTI, R. & WHITE RDE, V. (2011) Down-regulation of microRNA 106b is involved in p21-mediated cell cycle arrest in response to radiation in prostate cancer cells. *Prostate*, 71, 567-74.
- LI, S. C., PAN, C. Y. & LIN, W. C. (2006) Bioinformatic discovery of microRNA precursors from human ESTs and introns. *BMC Genomics*, 7, 164.
- LIN, F., WANG, X., JIE, Z., HONG, X., LI, X., WANG, M. & YU, Y. (2011) Inhibitory effects of miR-146b-5p on cell migration and invasion of pancreatic cancer by targeting MMP16. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 31, 509-14.
- LIU, J., RIVAS, F. V., WOHLSCHEGEL, J., YATES, J. R., 3RD, PARKER, R. & HANNON, G. J. (2005a) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*, 7, 1261-6.
- LIU, J., VALENCIA-SANCHEZ, M. A., HANNON, G. J. & PARKER, R. (2005b) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7, 719-23.
- LIU, Y. & LIU, Q. (2011) ATM signals miRNA biogenesis through KSRP. *Mol Cell*, 41, 367-8.
- LLAVE, C., KASSCHAU, K. D., RECTOR, M. A. & CARRINGTON, J. C. (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 14, 1605-19.
- LOSSNER, C., MEIER, J., WARNKEN, U., ROGERS, M. A., LICHTER, P., PSCHERER, A. & SCHNOLZER, M. (2011) Quantitative Proteomics Identify Novel miR-155 Target Proteins. *PLoS One*, 6, e22146.
- LU, C., TEJ, S. S., LUO, S., HAUDENSCHILD, C. D., MEYERS, B. C. & GREEN, P. J. (2005) Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*, 309, 1567-9.
- LU, W. J., LEE, N. P., KAUL, S. C., LAN, F., POON, R. T., WADHWA, R. & LUK, J. M. (2011) Mortalin-p53 interaction in cancer cells is stress dependent and constitutes a selective target for cancer therapy. *Cell Death Differ*, 18, 1046-56.
- MAES, O. C., AN, J., SAROJINI, H., WU, H. & WANG, E. (2008) Changes in MicroRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation. *J Cell Biochem*, 105, 824-34.
- MAILAND, N., BEKKER-JENSEN, S., FAUSTRUP, H., MELANDER, F., BARTEK, J., LUKAS, C. & LUKAS, J. (2007) RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, 131, 887-900.
- MANIATAKI, E. & MOURELATOS, Z. (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*, 19, 2979-90.
- MATHONNET, G., FABIAN, M. R., SVITKIN, Y. V., PARSYAN, A., HUCK, L., MURATA, T., BIFFO, S., MERRICK, W. C., DARZYNKIEWICZ, E., PILLAI, R. S., FILIPOWICZ, W., DUCHAINE, T. F. & SONENBERG, N. (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317, 1764-7.
- MATSUOKA, S., BALLIF, B. A., SMOGORZEWSKA, A., MCDONALD, E. R., 3RD, HUROV, K. E., LUO, J., BAKALARSKI, C. E., ZHAO, Z., SOLIMINI, N., LERENTHAL, Y., SHILOH, Y., GYGI, S. P. & ELLEDGE, S. J. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316, 1160-6.
- MCINERNEY, G. M., KEDERSHA, N. L., KAUFMAN, R. J., ANDERSON, P. & LILJESTROM, P. (2005) Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol Biol Cell*, 16, 3753-63.
- MEISTER, G., LANDTHALER, M., PETERS, L., CHEN, P. Y., URLAUB, H., LUHRMANN, R. & TUSCHL, T. (2005) Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol*, 15, 2149-55.
- MIRANDA, K. C., HUYNH, T., TAY, Y., ANG, Y. S., TAM, W. L., THOMSON, A. M., LIM, B. & RIGOUTSOS, I. (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*, 126, 1203-17.
- MIYASHITA, T., KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., WANG, H. G., LIN, H. K., LIEBERMANN, D. A., HOFFMAN, B. & REED, J. C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9, 1799-805.

- MIYASHITA, T. & REED, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80, 293-9.
- MOELLER, B. J., CAO, Y., LI, C. Y. & DEWHIRST, M. W. (2004) Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*, 5, 429-41.
- MURCHISON, E. P., PARTRIDGE, J. F., TAM, O. H., CHELOUFI, S. & HANNON, G. J. (2005) Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 12135-40.
- NAKAMURA, H., NAKAMURA, K. & YODOI, J. (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol*, 15, 351-69.
- NAOGHARE, P. K., TAK, Y. K., KIM, M. J., HAN, E. & SONG, J. M. (2011) Knock-Down of Argonaute 2 (AGO2) Induces Apoptosis in Myeloid Leukaemia Cells and Inhibits siRNA-Mediated Silencing of Transfected Oncogenes in HEK-293 Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.
- NESVIZHSKII, A. I., KELLER, A., KOLKER, E. & AEBERSOLD, R. (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 75, 4646-58.
- NICASSIO, F., CORRADO, N., VISSERS, J. H., ARECES, L. B., BERGINK, S., MARTEIJN, J. A., GEVERTS, B., HOUTSMULLER, A. B., VERMEULEN, W., DI FIORE, P. P. & CITTERIO, E. (2007) Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol*, 17, 1972-7.
- NISHIYAMA, A., MASUTANI, H., NAKAMURA, H., NISHINAKA, Y. & YODOI, J. (2001) Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins. *IUBMB Life*, 52, 29-33.
- OKAMURA, K., HAGEN, J. W., DUAN, H., TYLER, D. M. & LAI, E. C. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. *Cell*, 130, 89-100.
- PALLANTE, P., VISIONE, R., FERRACIN, M., FERRARO, A., BERLINGIERI, M. T., TRONCONE, G., CHIAPPETTA, G., LIU, C. G., SANTORO, M., NEGRINI, M., CROCE, C. M. & FUSCO, A. (2006) MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*, 13, 497-508.
- PARIS, F., FUKS, Z., KANG, A., CAPODIECI, P., JUAN, G., EHLEITER, D., HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., CORDON-CARDO, C. & KOLESNICK, R. (2001) Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science*, 293, 293-7.
- PASQUINELLI, A. E., REINHART, B. J., SLACK, F., MARTINDALE, M. Q., KURODA, M. I., MALLER, B., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., DEGNAN, B., MULLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E. & RUVKUN, G. (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-9.
- PAWLIK, T. M. & KEYOMARSI, K. (2004) Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59, 928-42.
- PETERS, L. & MEISTER, G. (2007) Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*, 26, 611-23.
- PETERSEN, C. P., BORDELEAU, M. E., PELLETIER, J. & SHARP, P. A. (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, 21, 533-42.
- PETROCCA, F., VISIONE, R., ONELLI, M. R., SHAH, M. H., NICOLOSO, M. S., DE MARTINO, I., ILIOPOULOS, D., PILOZZI, E., LIU, C. G., NEGRINI, M., CAVAZZINI, L., VOLINIA, S., ALDER, H., RUCO, L. P., BALDASSARRE, G., CROCE, C. M. & VECCHIONE, A. (2008) E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*, 13, 272-86.
- PILLAI, R. S., BHATTACHARYYA, S. N., ARTUS, C. G., ZOLLER, T., COUGOT, N., BASYUK, E., BERTRAND, E. & FILIPOWICZ, W. (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309, 1573-6.
- POLISENO, L., TUCCOLI, A., MARIANI, L., EVANGELISTA, M., CITTI, L., WOODS, K., MERCATANTI, A., HAMMOND, S. & RAINALDI, G. (2006) MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*, 108, 3068-71.

- POTHOF, J., VERKAIK, N. S., HOEIJMAKERS, J. H. & VAN GENT, D. C. (2009a) MicroRNA responses and stress granule formation modulate the DNA damage response. *Cell Cycle*, 8, 3462-8.
- POTHOF, J., VERKAIK, N. S., VAN, I. W., WIEMER, E. A., TA, V. T., VAN DER HORST, G. T., JASPERS, N. G., VAN GENT, D. C., HOEIJMAKERS, J. H. & PERSENGIEV, S. P. (2009b) MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *EMBO J*, 28, 2090-9.
- PRESTON, R. J. (2005) Radiation biology: concepts for radiation protection. *Health Phys*, 88, 545-56.
- REINHART, B. J., SLACK, F. J., BASSON, M., PASQUINELLI, A. E., BETTINGER, J. C., ROUGVIE, A. E., HORVITZ, H. R. & RUVKUN, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901-6.
- ROMANO, N. & MACINO, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, 6, 3343-53.
- RUBY, J. G., JAN, C. H. & BARTEL, D. P. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448, 83-6.
- SADEKOVA, S., LEHNERT, S. & CHOW, T. Y. (1997) Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radiat Biol*, 72, 653-60.
- SARIOGLU, H., BRANDNER, S., JACOBSEN, C., MEINDL, T., SCHMIDT, A., KELLERMANN, J., LOTTSPEICH, F. & ANDRAE, U. (2006) Quantitative analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced proteome alterations in 5L rat hepatoma cells using isotope-coded protein labels. *Proteomics*, 6, 2407-21.
- SATO, Y. (2001) Current understanding of the biology of vascular endothelium. *Cell Struct Funct*, 26, 9-10.
- SELBACH, M., SCHWANHAUSSER, B., THIERFELDER, N., FANG, Z., KHANIN, R. & RAJEWSKY, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455, 58-63.
- SHI, W., GERSTER, K., ALAJEZ, N. M., TSANG, J., WALDRON, L., PINTILIE, M., HUI, A. B., SYKES, J., P'NG, C., MILLER, N., MCCREADY, D., FYLES, A. & LIU, F. F. (2011) MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res*, 71, 2926-37.
- SHIN, S., CHA, H. J., LEE, E. M., LEE, S. J., SEO, S. K., JIN, H. O., PARK, I. C., JIN, Y. W. & AN, S. (2009) Alteration of miRNA profiles by ionizing radiation in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Int J Oncol*, 35, 81-6.
- SIMONE, N. L., SOULE, B. P., LY, D., SALEH, A. D., SAVAGE, J. E., DEGRAFF, W., COOK, J., HARRIS, C. C., GIUS, D. & MITCHELL, J. B. (2009) Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. *PLoS One*, 4, e6377.
- SLACK, F. J., BASSON, M., LIU, Z., AMBROS, V., HORVITZ, H. R. & RUVKUN, G. (2000) The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*, 5, 659-69.
- SMIRNOV, D. A., MORLEY, M., SHIN, E., SPIELMAN, R. S. & CHEUNG, V. G. (2009) Genetic analysis of radiation-induced changes in human gene expression. *Nature*, 459, 587-91.
- STURM, M., HACKENBERG, M., LANGENBERGER, D. & FRISHMAN, D. (2010) TargetSpy: a supervised machine learning approach for microRNA target prediction. *BMC Bioinformatics*, 11, 292.
- SUBRAMANIAN, S. & STEER, C. J. (2010) MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *J Cell Physiol*, 223, 289-98.
- SUZUKI, A., TSUTOMI, Y., AKAHANE, K., ARAKI, T. & MIURA, M. (1998) Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene*, 17, 931-9.
- TAGANOV, K. D., BOLDIN, M. P., CHANG, K. J. & BALTIMORE, D. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12481-6.
- TARASOV, V., JUNG, P., VERDOODT, B., LODYGIN, D., EPANCHINTSEV, A., MENSSEN, A., MEISTER, G. & HERMEKING, H. (2007) Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*, 6, 1586-93.

- TEMPLIN, T., PAUL, S., AMUNDSON, S. A., YOUNG, E. F., BARKER, C. A., WOLDEN, S. L. & SMILENOV, L. B. (2011) Radiation-induced micro-RNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 80, 549-57.
- THERMANN, R. & HENTZE, M. W. (2007) Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*, 447, 875-8.
- TIAN, Z., GREENE, A. S., PIETRUSZ, J. L., MATUS, I. R. & LIANG, M. (2008) MicroRNA-target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis. *Genome Res*, 18, 404-11.
- TOMARI, Y., MATRANGA, C., HALEY, B., MARTINEZ, N. & ZAMORE, P. D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 306, 1377-80.
- TOUSOULIS, D., BRIASOULIS, A., PAPAGEORGIOU, N., TSIIOUFIS, C., TSIAMIS, E., TOUTOUZAS, K. & STEFANADIS, C. (2011) Oxidative stress and endothelial function: therapeutic interventions. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 6, 103-14.
- TOUSOULIS, D., KOUTSOGIANNIS, M., PAPAGEORGIOU, N., SIASOS, G., ANTONIADES, C., TSIAMIS, E. & STEFANADIS, C. (2010) Endothelial dysfunction: potential clinical implications. *Minerva Med*, 101, 271-84.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, 24, 145-9.
- TU, K., YU, H., HUA, Y. J., LI, Y. Y., LIU, L., XIE, L. & LI, Y. X. (2009) Combinatorial network of primary and secondary microRNA-driven regulatory mechanisms. *Nucleic Acids Res*, 37, 5969-80.
- VALENCIA-SANCHEZ, M. A., LIU, J., HANNON, G. J. & PARKER, R. (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*, 20, 515-24.
- VASA-NICOTERA, M., CHEN, H., TUCCI, P., YANG, A. L., SAINTIGNY, G., MENGHINI, R., MAHE, C., AGOSTINI, M., KNIGHT, R. A., MELINO, G. & FEDERICI, M. (2011) miR-146a is modulated in human endothelial cell with aging. *Atherosclerosis*, 217, 326-30.
- VINCENTI, S., BRILLANTE, N., LANZA, V., BOZZONI, I., PRESUTTI, C., CHIARI, F., ETNA, M. P. & NEGRI, R. (2011) HUVEC respond to radiation by inducing the expression of pro-angiogenic microRNAs. *Radiat Res*, 175, 535-46.
- VINTHER, J., HEDEGAARD, M. M., GARDNER, P. P., ANDERSEN, J. S. & ARCTANDER, P. (2006) Identification of miRNA targets with stable isotope labeling by amino acids in cell culture. *Nucleic Acids Res*, 34, e107.
- VOUSDEN, K. H. & LANE, D. P. (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 275-83.
- WADHWA, R., TAIRA, K. & KAUL, S. C. (2002) An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperones*, 7, 309-16.
- WAGNER-ECKER, M., SCHWAGER, C., WIRKNER, U., ABDOLLAHI, A. & HUBER, P. E. (2010) MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells. *Radiat Oncol*, 5, 25.
- WALDMAN, T., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. (1995) p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, 55, 5187-90.
- WAN, G., MATHUR, R., HU, X., ZHANG, X. & LU, X. (2011) miRNA response to DNA damage. *Trends Biochem Sci*.
- WANG, V. & WU, W. (2009) MicroRNA-based therapeutics for cancer. *BioDrugs*, 23, 15-23.
- WEIDHAAS, J. B., BABAR, I., NALLUR, S. M., TRANG, P., ROUSH, S., BOEHM, M., GILLESPIE, E. & SLACK, F. J. (2007) MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res*, 67, 11111-6.
- WENG, L. P., GIMM, O., KUM, J. B., SMITH, W. M., ZHOU, X. P., WYNFORD-THOMAS, D., LEONE, G. & ENG, C. (2001) Transient ectopic expression of PTEN in thyroid cancer cell lines induces cell cycle arrest and cell type-dependent cell death. *Hum Mol Genet*, 10, 251-8.
- WIGHTMAN, B., HA, I. & RUVKUN, G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855-62.
- YAMADA, T., IWASAKI, Y., NAGATA, K., FUSHIKI, S., NAKAMURA, H., MARUNAKA, Y. & YODOI, J. (2007) Thioredoxin-1 protects against hyperoxia-induced apoptosis in cells of the alveolar walls. *Pulm Pharmacol Ther*, 20, 650-9.

- YANG, W. J., YANG, D. D., NA, S., SANDUSKY, G. E., ZHANG, Q. & ZHAO, G. (2005) Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*, 280, 9330-5.
- YANG, Y., CHAERKADY, R., BEER, M. A., MENDELL, J. T. & PANDEY, A. (2009) Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach. *Proteomics*, 9, 1374-84.
- YANG, Z. F., YI, J. L., LI, X. R., XIE, D. X., LIAO, X. F. & MA, X. (2004) [PTEN induces apoptosis and up-regulates p53 expression in HepG2 cells]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 12, 745-8.
- YU, Z., BASERGA, R., CHEN, L., WANG, C., LISANTI, M. P. & PESTELL, R. G. (2010) microRNA, cell cycle, and human breast cancer. *Am J Pathol*, 176, 1058-64.
- ZAMORE, P. D., TUSCHL, T., SHARP, P. A. & BARTEL, D. P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101, 25-33.
- ZHANG, B., WANG, Q. & PAN, X. (2007) MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol*, 210, 279-89.
- ZHANG, H., KOLB, F. A., JASKIEWICZ, L., WESTHOF, E. & FILIPOWICZ, W. (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118, 57-68.
- ZHANG, X., WAN, G., BERGER, F. G., HE, X. & LU, X. (2011) The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response. *Mol Cell*, 41, 371-83.
- ZHAO, Y., SAMAL, E. & SRIVASTAVA, D. (2005) Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 436, 214-20.
- ZHU, S., SI, M. L., WU, H. & MO, Y. Y. (2007) MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*, 282, 14328-36.

7. Anhang

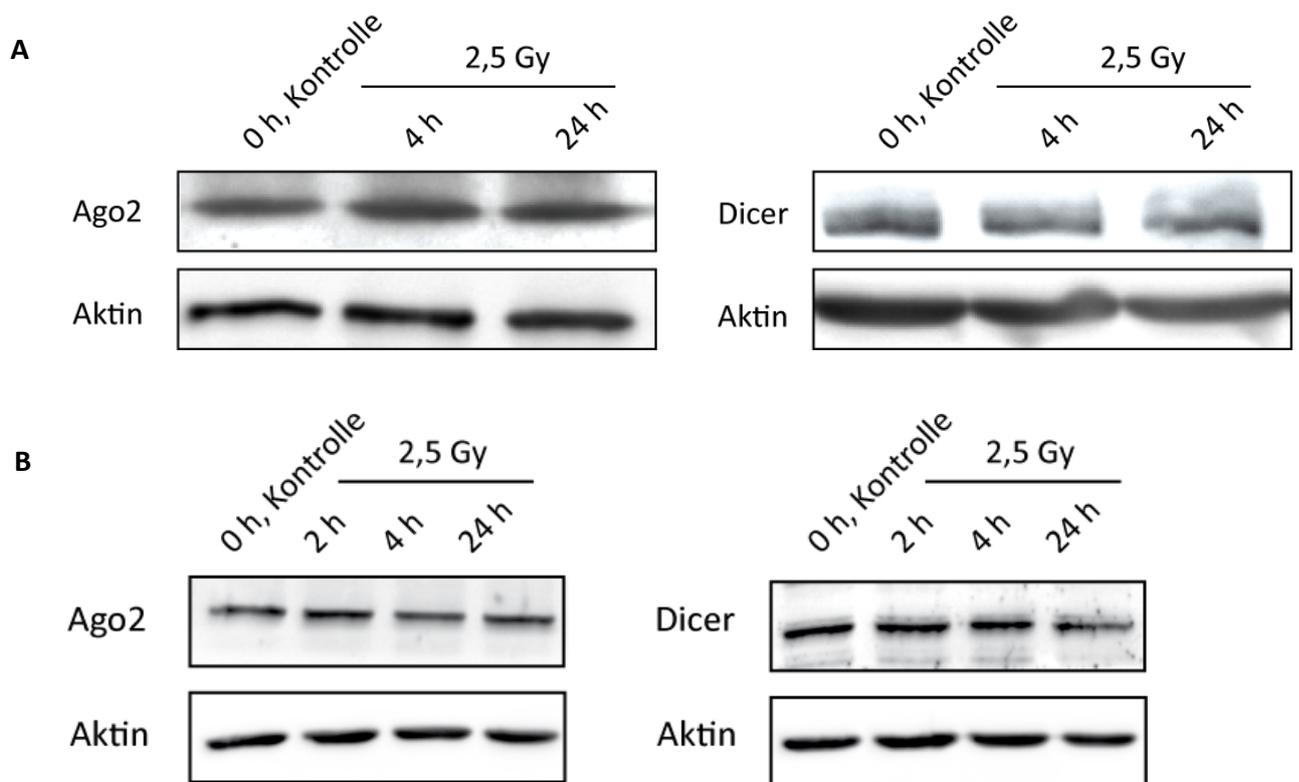


Abb. 7-1: Expressionsanalyse von Dicer und Ago2 nach Bestrahlung in EA.hy926 und HUVEC Zellen. **A** zeigt die Expression von Ago2 und Dicer in EA.hy926 Zellen, **B** in HUVEC Zellen. Die Proteinmenge von Dicer und Ago2 wurde nach Bestrahlung mit 2,5 Gy im Western-Blot detektiert. Hierzu wurden die Proteinextrakte zu den angegebenen Zeitpunkten hergestellt. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Ein repräsentativer Blot von zwei wird gezeigt.

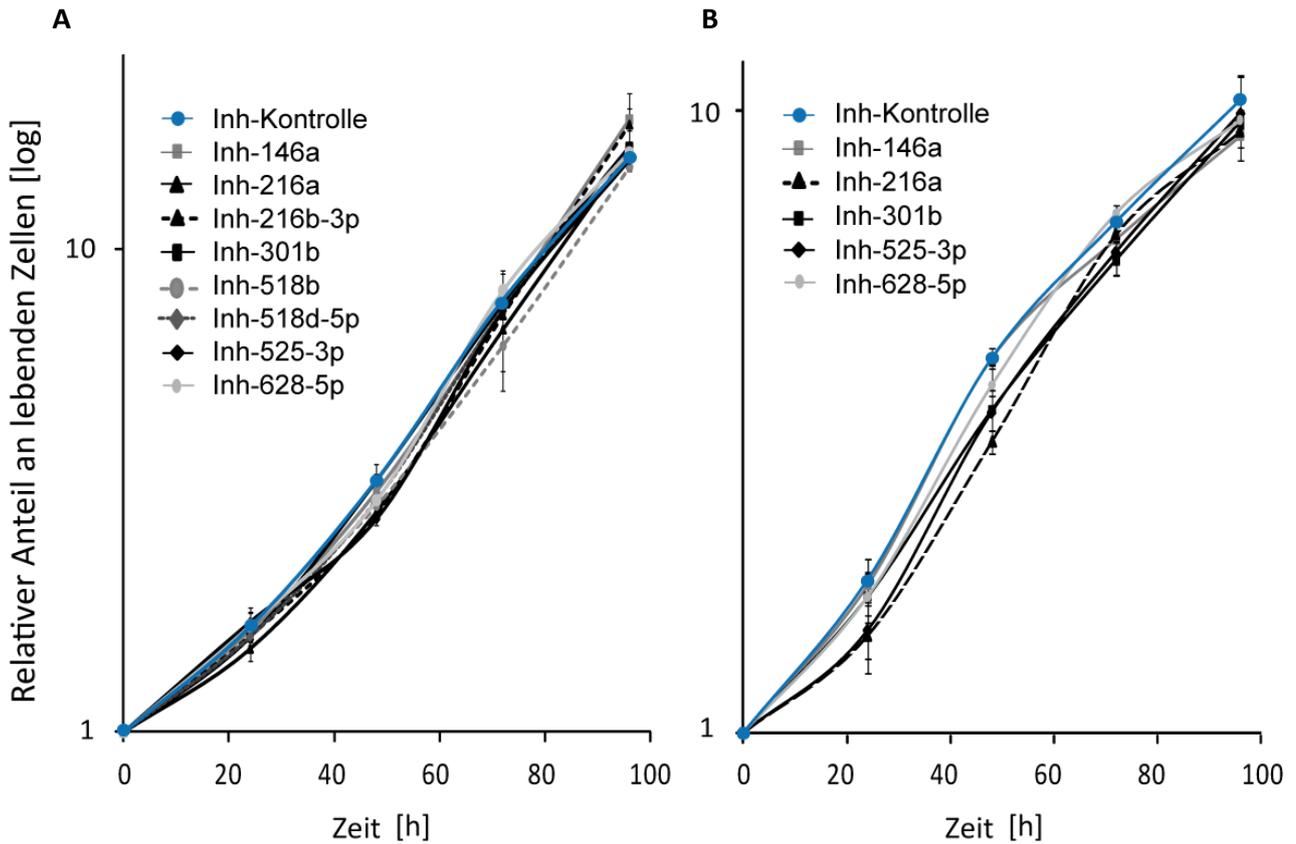


Abb. 7-2: Zellproliferation Anti-miR-transfizierten EA.hy926 bzw. HUVEC Zellen. Das Wachstum von EA.hy926 Zellen **A** und HUVEC Zellen **B** wurde nach Transfektion mit Kontroll-Inhibitor (Kontroll-Inh) oder spezifischen Anti-miRs in einem Zeitraum von 96 h ermittelt. Eine Inhibierung der spezifischen miRNAs mit Anti-miRs hatte ohne Bestrahlung innerhalb des analysierten Zeitrahmens keinen Einfluss auf das Zellüberleben. Das Diagramm zeigt das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

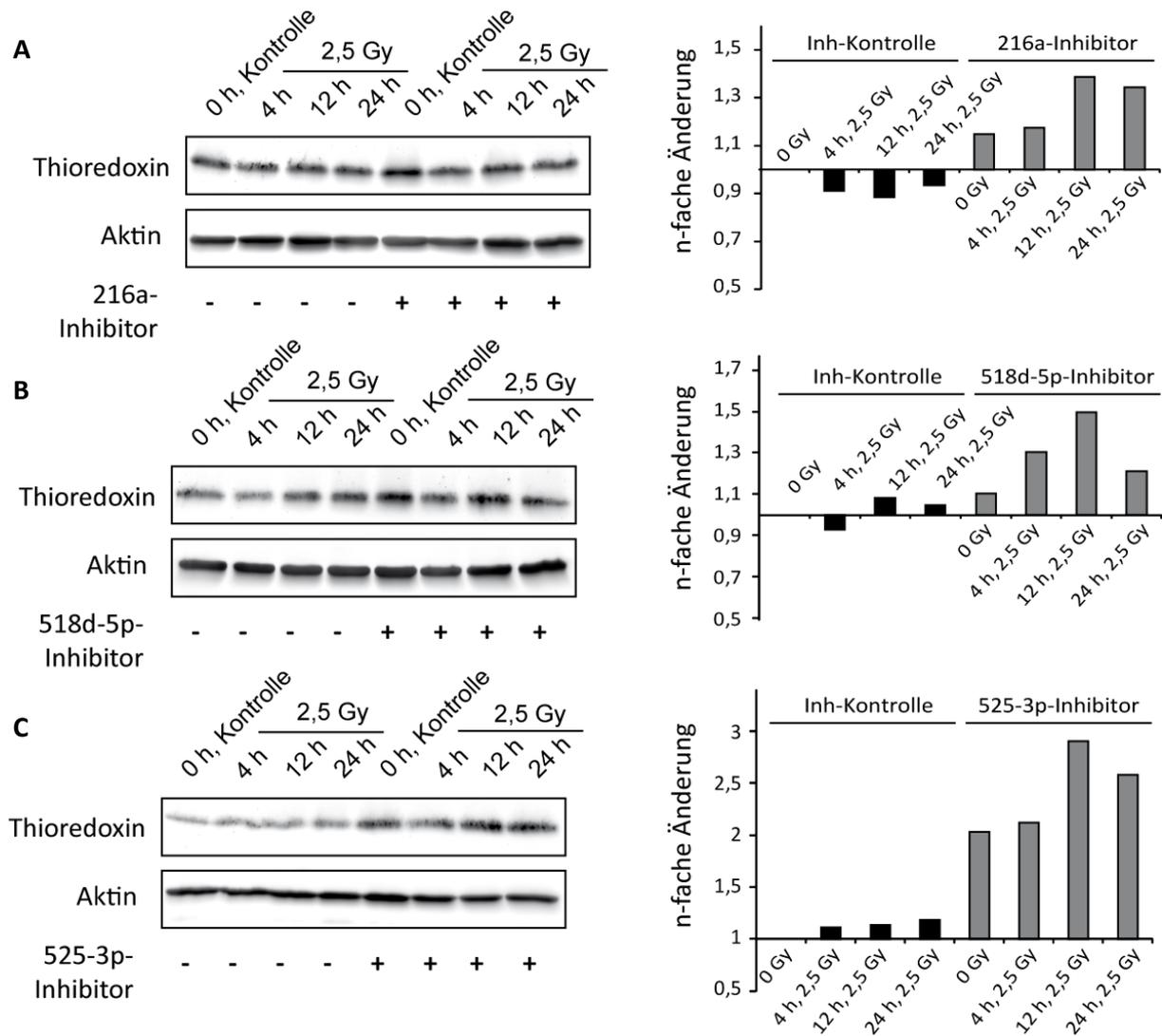


Abb. 7-3: Expressionskinetik des Proteins TXN1 mittels 1D-Western-Blot. Zu den Zeitpunkten von 4 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy wurde nach vorheriger Transfektion von EA.hy926 Zellen mit Inhibitor-Kontrolle (Inh-Kontrolle) oder Anti-miR-525-3p Gesamtzellextrakte gewonnen. Die Abbildung zeigt repräsentative Beispiel-Blots des im Western-Blot analysierten Proteins Thioredoxin-1 (TXN1). Die Proteinexpression von β -Aktin, die als Normalisierung der Protein-Banden verwendet wurde, ist unter jedem Blot gezeigt. Die Auswertung der Expressionsänderungen (normiert auf Aktin und die unbestrahlte Inhibitor-Kontrolle) des Proteins TXN1 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung ist neben jedem Blot als Balkendiagramm angegeben. Die Expression von TXN1 nach Transfektion mit Anti-miR-216a ist in **A**, nach Transfektion mit der Anti-miR-518d-5p in **B** und nach Transfektion mit dem Anti-miR-525-3p-Inhibitor in **C** gezeigt.

Tabelle 7-1: Relative Expressionsänderungen der Proteine ohne Bestrahlung (Kontr.) und zu den Zeitpunkten von 4 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2,5 Gy und vorheriger Behandlung von EA.hy926 Zellen mit Inhibitor-Kontrolle bzw. Anti-miRs. Die Werte geben den Mittelwert der relativen Quantifizierung der Proteinexpression von zwei biologischen Replikaten an.

		Regulation Inh-Kontrolle				Regulation Anti-miR			
		Kontr.	4 h	12 h	24 h	Kontr.	4 h	12 h	24 h
Histone H2A	Anti-miR-525-3p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1	0,87	0,74	0,71	0,46	0,47	0,51	0,45
Thioredoxin-1	Anti-miR-216a (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1	0,91	0,89	0,93	1,14	1,18	1,39	1,34
Thioredoxin-1	Anti-miR-518d-5p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1	0,92	1,08	1,04	1,10	1,29	1,49	1,20
Thioredoxin-1	Anti-miR-525-3p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1	1,12	1,13	1,18	2,04	2,13	2,92	2,59
XRCC5/ KU80	Anti-miR-518d-5p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1	1,09	1,22	1,26	1,11	0,85	0,86	1,03
XRCC6/ KU70	Anti-miR-525-3p (12 h, 2,5 Gy) gegen Inh-Kontrolle (unbestrahlt)	1	1,09	1,03	1,03	0,99	0,88	0,79	0,93

Tabelle 7-2: Zuordnung der nach Bestrahlung veränderten Proteine zu einem biologischen Prozess.

Zugangsnummer	Spot- Nummer	Proteinname	Quantitative Veränderung
Regulation des Zellzyklus			
B7Z9M9	14=34	Destrin (DSTN)	-2,68
Q9NXR1	23	Nuclear distribution protein nudE homolog 1 (NDE1)	1,34
Q6FHL9	35	Astrocytic phosphoprotein PEA-15 (PEA15/PED)	-2,4
P16949	17	Stathmin (STMN)	-1,51
P13010	5	X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5/Ku80)	1,33
P37108	13	Signal recognition particle 14kDa (STP14)	-3,06
Apoptose/Antwort auf oxidativen Stress			
Q9BV57	18	Acireductone dioxygenase 1 (ADI1)	-1,58
E7ENQ5	22	Annexin A5 (ANXA5)	1,34
Q9Y240	15	C-type lectin domain family 11 member A (CLEC11A)	-1,49
Q6FHL9	35	Astrocytic phosphoprotein PEA-15 (PEA15/PED)	-2,4
Q06830	11	Peroxiredoxin-1 (PRDX1)	1,31
P16949	17	Stathmin1 (STMN1)	-1,51
Q5W0H4	72	Tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)	1,3
P13010	5	X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5/Ku80)	1,33
Zellmorphologie, Zellorganisation und Zellwachstum			
E7ENQ5	22	Annexin A5 (ANXA5)	1,34
Q9Y240	15	C-type lectin domain family 11 member A (CLEC11A)	-1,49
B7Z9M9	14=34	Destrin (DSTN)	-2,68
Q53HL1	21	Myosin, light chain 12A (MLC20)	-1,5
Q06830	11	Peroxiredoxin-1 (PRDX1)	1,31
P16949	17	Stathmin (STMN)	-1,51
Q9BQA1	23	WD repeat domain 77 (WD77)	1,34
P13010	5	X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5/Ku80)	1,33
Post-translationale Modifikation (Faltung und Modifikation von Proteinen)			
B4DG11	23	HSPA (heat shock 70kDa) binding protein, cytoplasmic cochaperone 1 (HSPBP1)	1,31
Q9UHV9	13	Prefoldin subunit 2 (PFD2)	-3,06
Reduktion und Biosynthese von kleinen Metaboliten			
Q9NTK5	8	Obg-like ATPase 1 (OLA1)	1,46
Ohne bekannte Funktion			
Q9Y2V2	19	Calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa (CRHSP1)	-1,33
B4E112	12	cDNA FLJ51435, moderately similar to Cofilin-1	-2,28
Q8WXD5	20	Gem (nuclear organelle) associated protein 6 (GEMIN6)	-1,31

Tabelle 7-3: Zuordnung der nach Bestrahlung und Transfektion mit Anti-miR-216a veränderten Proteine zu einem biologischen Prozess.

Zugangsnummer	Spot-Nummer	Proteinname	Quantitative Veränderung
Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und der Zellorganisation			
E7ENQ5	22	Annexin A5 (ANXA5)	1,4
P49407	27	Arrestin, beta 1 (ARRB1)	1,3
Q16891	31	Inner membrane protein, mitochondrial (IMMT)	1,34
P02545	30	Lamin A/C (LMNA)	1,32
Q9BTE3	28	Minichromosome maintenance complex binding protein (MCMBP)	2,06
Zellzyklus			
P49407	27	Arrestin, beta 1 (ARRB1)	1,3
P02545	30	Lamin A/C (LMNA)	1,32
Q9BTE3	28	Minichromosome maintenance complex binding protein (MCMBP)	2,06
Zelltod/Apoptose			
E7ENQ5	22	Annexin A5 (ANXA5)	1,4
P49407	27	Arrestin, beta 1 (ARRB1)	1,3
Q6F181	26	Cytokine induced apoptosis inhibitor 1 (CIAPIN1)	1,37
P38646	29	Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin) (HSPA9)	1,76
Q16891	31	Inner membrane protein, mitochondrial (IMMT)	1,34
Reduktion und Biosynthese von kleinen Metaboliten			
Q9NTK5	8	Obg-like ATPase 1 (OLA1)	1,32
Post-translationale Modifikation (Faltung und Modifikation von Proteinen)			
B5BTY7	27	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta) (CCT2)	1,32
Ohne bekannte Funktion			
B4E112	12	cDNA FLJ51435, moderately similar to Cofilin-1	-2,11
P25786	24	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1 (PSMA1)	1,47
P41250	28	Glycyl-tRNA synthetase (GARS)	2,06

Tabelle 7-4: Zuordnung der nach Bestrahlung und Transfektion mit Anti-miR-518d-5p deregulierten Proteine zu einem biologischen Prozess.

Zugangsnummer	Spot-Nummer	Proteinname	Quantitative Veränderung
Zellmorphologie, Zellorganisation und Zellwachstum/DNA Reparatur			
P12429	43	Annexin A3 (ANXA3)	-1,37
A6NN80	46	Annexin A6 (ANXA6)	1,41
P49407	27	Arrestin, beta 1 (ARRB1)	1,33
B4DPU3	48	Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)	1,4
A6NGV1	41	SET nuclear oncogene (SET/IGAAD)	-1,38
Q9BTE3	28	Minichromosome maintenance complex binding protein (MCMBP)	2,74
Zellzyklus			
P39687	40	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A (ANP32A)	-1,62
Q53F35	39	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B (ANP32B)	-1,48
P49407	27	Arrestin, beta 1 (ARRB1)	1,33
Q6FHL9	35	Astrocytic phosphoprotein PEA-15 (PEA15/PED)	-1,99
B7Z9M9	14=34	Destrin (actin depolymerizing factor) (DSTN)	-3,7
Q9BTE3	28	Minichromosome maintenance complex binding protein (MCMBP)	2,74
Zelltod/Apoptose/Stress Antwort			
Q53GZ6	46	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant	1,41
P38646	29	Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin) (HSPA9)	1,83
Post-translationale Modifikation (Faltung und Modifikation von Proteinen)			
B5BTY7	27	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta) (CCT2)	1,33
Q9UHV9	13	Prefoldin subunit 2 (PFD2)	-4,6
P50991	45	T-complex protein 1 subunit delta (CCT4)	1,54
Reduktion und Biosynthese von kleinen Metaboliten			
Q9NTK5	8	Obg-like ATPase 1 (OLA1)	1,41
Q8NC51	45	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (SERBP1/PAIRPB1)	1,54
Ohne bekannte Funktion			
B4E112	12/32	cDNA FLJ51435, moderately similar to Cofilin-1	-3,53/-2,98
P41250	28	Glycyl-tRNA synthetase (GARS)	2,06

Tabelle 7-5: Zuordnung der nach Bestrahlung und Transfektion mit Anti-miR-525-3p veränderten Proteine zu einem biologischen Prozess.

Zugangsnummer	Spot- Nummer	Proteinname	Quantitative Veränderung
Zelltod/Apoptose/oxidativer Stress			
P39687	40	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A (ANP32A)	-1,39
Q53F35	39	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B (ANP32B)	-1,38
P49407	27	Arrestin, beta 1 (ARRB1)	1,44
B5BTY7	27	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta) (CCT2)	1,44
P48507	73	Glutamate-cysteine ligase (GCLM)	1,42
P09211	56	Glutathione S-transferase P (GSTP1)	1,32
P49773	53	Histidine triad nucleotide binding protein 1 (HINT1)	1,44
P10809	64	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) (HSPD1)	1,4
Q06830	11	Peroxiredoxin-1 (PRDX1)	1,66
P30048	56	Peroxiredoxin 3 (PRDX3)	1,32
O75880	65	Protein SCO1 homolog, mitochondrial precursor (SCOD1)	-1,9
A8K4W0	22	Ribosomal protein S3A (RPS3A)	1,47
B7Z5Z2	56	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2 (RRAS2)	1,32
Q5W0H4	72	Tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)	1,77
P10599	54	Thioredoxin (TXN)	1,8
A8K9A5	67	Thymidylate synthetase (TYMS)	-2,36
B1AHC9	69	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (XRCC6, Ku70)	-1,44
Reduktion und Biosynthese von kleinen Metaboliten			
P48507	73	Glutamate-cysteine ligase (GCLM)	1,42
P09211	56	Glutathione S-transferase P (GSTP1)	1,32
P22626	68	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRPA2B1)	-1,31
P61978	63	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)	1,32
Q9NTK5	8	Obg-like ATPase 1 (OLA1)	1,4
P00491	73	Proteasome subunit beta type	1,42
Q5W0H4	72	Tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)	1,77
P10599	54	Thioredoxin (TXN)	1,8
A8K9A5	67	Thymidylate synthetase (TYMS)	-2,36
Post-translationale Modifikation (Faltung und Modifikation von Proteinen)			
P49407	27	Arrestin, beta 1 (ARRB1)	1,44
B5BTY7	27	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta) (CCT2)	1,44
P10809	64	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) (HSPD1)	1,4
Q13427	51	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIG)	1,7
Q9UHV9	13	Prefoldin subunit 2 (PFD2)	-3,13
O75832	58	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10 (PSMD10)	1,56
Aufrechterhaltung der Zellfunktion und des Zellwachstums			
E7ENQ5	22	Annexin A5 (ANXA5)	1,47
B7Z9M9	14=34	Destrin (DSTN)	-2,98
P10768	66	Esterase D (ESD)	1,41
Q9NR50	22	Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma, 58kDa (EIF2B3)	1,44
B2R5B3	49	Histone H2A	-1,54
P07737	49	Profilin 1 (PFN1)	-1,54
O75880	65	Protein SCO1 homolog, mitochondrial precursor (SCOD1)	-1,9
A8K9A5	67	Thymidylate synthetase (TYMS)	-2,36
Ohne bekannte Funktion			
B4E112	12/32	cDNA FLJ51435, moderately similar to Cofilin-1	-2,26/-2,75

8. Publikationen

8.1 Veröffentlichungen

Quantitative proteomics identify miR-216a, miR-518d-5p and miR-525-3p target proteins in radiation response.

A. Kraemer, Z. Barjaktarovic, H. Sarioglu, K. Winkler, S. Tapio, M. J. Atkinson, F. Eckardt-Schupp and S. Moertl; Manuskript in Vorbereitung.

MicroRNA-Mediated Processes are Essential for the Cellular Radiation Response.

A. Kraemer, N. Anastasov, M. Angermeier, K. Winkler, M. J. Atkinson and S. Moertl
Radiat Res. 2011 Aug 19.

The WST survival assay: an easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals.

A. Guertler, A. Kraemer, U. Roessler, S. Hornhardt, U. Kulka, S. Moertl, A. Friedl, T. Illig, H.-E. Wichmann and M. Gomolka
Radiat Prot Dosimetry. 2011 Feb; 143(2-4):487-90

Low-dose irradiation causes rapid alterations to the proteome of the human endothelial cell line EA.hy926.

F. Pluder, Z. Barjaktarovic, O. Azimzadeh, S. Moertl, A. Kraemer, S. Steininger, H. Sarioglu, D. Leszczynski, R. Nylund, A. Hakanen, A. Sriharshan, M. J. Atkinson, S. Tapio
Radiat Environ Biophys. 2011 Mar; 50(1):155-66

8.2 Vorträge

The role of regulatory microRNA molecules in shaping the radiation response in the endothelial cell line EA.hy926

A. Kraemer, N. Anastasov, M. J. Atkinson, S. Moertl
14. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Köln, 2011

miRNAs are essential for radiation response in endothelial cells

A. Kraemer, N. Anastasov, M. J. Atkinson, S. Moertl
13. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Hamburg, 2010

miRNAs modulate radiation sensitivity in endothelial cells

A. Kraemer, N. Anastasov, M. J. Atkinson, S. Moertl
Association for Radiation Research (ARR), Glasgow, 2009

Modulation of miRNA expression after ionizing radiation

S. Mörtl, A. Krämer, N. Anastasov, F. Eckardt-Schupp
Women in Radiation sciences – a century after Marie Curie, München, 2009

8.3 Posterpräsentationen

The role of regulatory microRNAs in the radiation response of endothelial cells

A. Kraemer, Z. Barjaktarovic, S. Tapio, H. Sarioglu, M. J. Atkinson, S. Moertl
RNAi and miRNA Europe, München, 2011

The role of regulatory microRNA molecules in shaping the radiation response in the endothelial cells

A. Kraemer, Z. Barjaktarovic, S. Tapio, H. Sarioglu, M. J. Atkinson, S. Moertl
14th International Congress of Radiation Research, Polen, 2011

Molecular biomarkers for radiation sensitivity in human peripheral blood mononuclear cells

I. Summerer, A. Kraemer, H. Zitzelsberger, M. J. Atkinson, S. Moertl
14th International Congress of Radiation Research, Polen, 2011

Radiation-induced alterations in the proteome of a human endothelial cell line after exposure to 200mGy ionizing radiation

A. Sriharshan, A. Kraemer, K. Boldt, Z. Barjaktarovic, H. Sarioglu, O. Azimadeh, L. Hieber, H. Zitzelsberger, M. Ueffig, M. J. Atkinson, S. Moertl, S. Tapio
14th International Congress of Radiation Research, Polen, 2011

Multiparametric characterization of radiation sensitivity in lung cancer patients

A. Krämer, A. Guertler, I. Summerer, M. Gomolka, S. Hornhardt, U. Roessler, M. J. Atkinson, H.-E. Wichmann and S. Moertl
38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Stockholm, 2010

DNA repair under normoxic and hypoxic conditions in the endothelial cell line EA.hy926

F. Ahne, M. Angermeier, A. Krämer, I. Summerer, M. J. Atkinson and S. Moertl
38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Stockholm, 2010

miRNAs are essential for radiation response in endothelial cells

A. Krämer, N. Anastasov, M. J. Atkinson and S. Moertl
38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Stockholm, 2010

Radiation sensitivity and genetic predisposition in young lung cancer patients

S. Hornhardt, U. Roessler, A. Rosenberger, A. Guertler, U. Kulka, W. Sauter, H. Bickeboeller, T. Illig, H.-E. Wichmann, A. Kraemer, S. Moertl, A. Friedl and M. Gomolka
38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Stockholm, 2010

Characterization of radiation sensitivity in lung cancer patients

A. Krämer, A. Guertler, I. Summerer, M. Gomolka, S. Hornhardt, U. Roessler, M. J. Atkinson, H.-E. Wichmann and S. Moertl
13. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Hamburg, 2010

Are differentially regulated miRNAs responsible for increased radiosensitivity in endothelial EA.hy926 cells?

A. Krämer, N. Anastasov, S. Tapio, M. Atkinson, S. Mörtl
12. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Essen, 2009

miRNA response in primary human lymphocytes after ionizing radiation

S. Moertl, A. Kraemer, N. Anastasov and M. J. Atkinson

12. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Essen, 2009

Are differentially regulated let-7 miRNAs responsible for increased radiosensitivity in EA.hy926 compared to A549 cell line?

A. Krämer, F. Eckardt-Schupp, N. Anastasov, S. Mörtl

Women in radiation sciences – a century after Marie Curie, München, 2009

Changes in miRNA expression profiling after ionizing radiation in cardiac endothelial cell line

N. Anastasov, A. Krämer, S. Mörtl, J. Smida, M. Rosemann, M. J. Atkinson and S. Tapio

Women in radiation sciences – a century after Marie Curie, München, 2009

8.4 Preise

Travel Award der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung

13. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Hamburg, 2010

Travel Award der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung

12. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Hamburg, 2009

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Anne Krämer
*18.08.1983
in Darmstadt
Deutsch

Aktuelle Position

05/2009-dato **Ludwig-Maximilians-Universität München**

Promotion am Institut für Strahlenbiologie, Helmholtz Zentrum München
Vertrag am Institut für Epidemiologie, Ludwig-Maximilians-Universität
Betreuer: Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp; Dr. Simone Mörtl
Titel: Identifikation und funktionelle Analyse strahlenregulierter
microRNAs in Endothelzellen

10/2008-05/2009 **Helmholtz Zentrum München**
Doktorarbeit am Institut für Strahlenbiologie

Ausbildung

05/2005-09/2008 **Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

Hauptfach: Mikrobiologie
Diplom: Mikrobiologie (gut)
 Humangenetik (sehr gut)
 Zell- und Entwicklungsbiologie (sehr gut)
Zusatzfach: Physiologische Chemie
Diplomarbeit: Molekulare Dissektion des G2-Phase Arrestes von Fanconi
 Anämie (sehr gut)
Betreuer: Prof. Dr. Detlev Schindler

03/2007-07/2007 **Hilfswissenschaftliche Tätigkeit**, Institut für Humangenetik, Würzburg
Aufreinigung, Zellkultur und Messung von Lymphozyten zur Diagnostik der
Chromosomenbruch-Syndrome Fanconi-Anämie, Ataxia telangiectasia und
des Nijmegen breakage Syndroms

03/2007-07/2007 **Hilfswissenschaftliche Tätigkeit**, Institut für Infektionsforschung, Würzburg
Arbeiten zur Charakterisierung der Plasminogenbindung von *S. mutans*

03/2007-07/2007 **Hilfswissenschaftliche Tätigkeit**, Institut für Mikrobiologie, Würzburg
Betreuung des Anfängerpraktikums Mikrobiologie

05/2003–05/2005 **Johannes Gutenberg Universität Mainz**

Institut für Biologie, Grundstudium

05/2004-09/2004 **Hilfswissenschaftliche Tätigkeit**, Institut für Zoologie, Mainz

Betreuung des Grundpraktikums Tierbestimmung

Schulbildung

06/1995-05/2002 Max-Planck-Gymnasium, Groß-Umstadt

06/2002 Allgemeine Hochschulreife

Spachkenntnisse

Englisch verhandlungssicher in Wort und Schrift

Französisch Grundlagen vorhanden

EDV Kenntnisse

MS Office: Word, Excel, Power Point

Adobe: Photoshop, Illustrator

Literaturdatenbank (EndNote, Papers)

Zellzyklusauswertung: Multicycle AV, WinMDI 2.9,

2D-DIGE Analyse: DeCyder™ 2D Software, ProteinPilot™ Software 4.0,

Typhoon Scan control software

Zusätzliche Qualifikationen und Fortbildungen

06/2011-09/2011 **Betriebswissenschaftlicher Kurs**, Ludwig-Maximilians-Universität München

2010-2011 **Kurse am LMU Center for Leadership and People Management**, Ludwig-Maximilians-Universität München

12/2010 **Fortbildung Environmental Radiobiology**, Aas, Norwegen

09/2010 **Strahlenschutzkurs für den Umgang mit offenen und umschlossenen radioaktiven Stoffen (Technik)**, Helmholtz Zentrum München

03/2006 **Kurs Durchflusszytometrie „Neuere Methoden der Zellanalytik“**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

03/2005 **Methoden der Molekularbiologie und Molekulargenetik**, Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Johannes Gutenberg Universität Mainz

10. Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am Helmholtz Zentrum München am Institut für Strahlenbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Michael J. Atkinson anfertigt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp für die Überlassung des spannenden Themas, ihrem regen Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die mir stets gewährte Unterstützung.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Angelika Böttger für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit bedanken.

Dem BMBF danke ich für die Finanzierung im Rahmen des Kompetenzverbundes, das die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglichte.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Simone Mörtl für die ausgezeichnete Unterstützung und Förderung (auch mit „falschem“ Abitur), ihre wertvollen Vorschläge, sowie ihre stets vorhandene Gesprächsbereitschaft, die sie mir bei der Ausführung der Arbeit entgegenbrachte. Ihre freundliche Art, sowie die mir zugestandene wissenschaftliche Freiheit ermöglichten mir diese Arbeit in einem angenehmen Umfeld zu verfassen.

Ein großes „Dankeschön“ gilt unserer Chef-TA Klaudia Winkler für die Unterstützung, ihre ständige Hilfsbereitschaft und für die vielen kleinen und großen Dinge, die ich von ihr gelernt habe. Ohne ihren Beistand und ihre unerschöpflichen methodischen Kniffe wären viele Experimente nicht in dieser Art möglich gewesen.

Dr. Marita Angermeier möchte ich für ihre hervorragende Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Apoptose-Messungen und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Dr. Zarko Barjaktarovic und Dr. Soile Tapio ein großes Dankeschön für ihre Hilfe bei der Einführung in die zweidimensionale Gelelektrophorese Technik und für die bioinformatischen Hilfestellungen, Dr. Hakan Sarioglu gilt mein Dank für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Der gesamten Arbeitsgruppe, allen ehemaligen Mitgliedern der AG Strahlentherapie und allen Mitarbeitern des Instituts für Strahlenbiologie danke ich für den Zusammenhalt, die wunderschöne Zeit und die lustigen Gespräche, ohne die die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht hätte! Für die fröhliche Stimmung in Labor und Büro, die unterhaltsamen Kaffeepausen, die Feierabendbierchen und vor allem für die tolle Unterstützung aus den entstandenen Freundschaften möchte ich mich im Besonderen bei Marita, Klaudschi, Nancy, Anne G. und Sylvia, sowie meinen Kinderzimmer-Kolleginnen Isi und Arundhathi, bedanken.

Für die ständige Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit, kleinere und größere Motivationshilfen und ihr Verständnis, möchte ich mich in ganz besonderem Maße bei meinen Freunden, meiner Familie und meinem Mann Tom bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt zu haben.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und nicht veröffentlicht.

München, im Oktober 2011

Anne Krämer