

**TFF3 vermittelt seinen anti-apoptotischen Effekt
über eine miR-491-5p-abhängige Regulation
von PRINS in HT-29/B6-Zellen**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

M. Sc. Carlos Hanisch (Biologe/Toxikologe)

Aus Berlin

-2016-

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Zeitraum vom 01.10.2013 – 01.10.2016 an der Freien Universität Berlin, im Institut für Veterinär Biochemie, in der Arbeitsgruppe von Herrn PD. Dr. Soroush Sharbati bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier angefertigt.

1. **Gutachter:** Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

2. **Gutachter:** Prof. Dr. Tina Romeis

Disputation am: 03.11.2016

Für meine Familie

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	3
1. Einleitung	4
1.1 Der gastrointestinale Trakt (GI-Trakt)	4
1.2 Der Dickdarm und die Restitution des Epithels.....	4
1.3 Autoimmunerkrankungen und ihr Einfluss auf das Krebsrisiko	6
1.4 Der Wnt-Signalweg.....	7
1.5 Krebs: Seine Erforschung, Ursachen und Therapien	9
1.6 TNF- α	11
1.7 Der extrinsische und intrinsische Apoptose-Signalweg.....	12
1.8 Die Regulierung der Apoptose	13
1.9 <i>Trefoil</i> -Faktoren.....	14
1.10 Der PI3K-Signalweg	16
1.11 Nicht kodierende RNA.....	18
1.11.1 microRNA.....	18
1.11.2 lncRNA	19
2. Zielsetzung	22
3. Material und Methoden	24
3.1 Zellkultur	24
3.1.1 Transfektion.....	24
3.1.2 xCELLigence®	26
3.1.3 Behandlung mit kleinen inhibitorischen Molekülen.....	27
3.2 RNA.....	28
3.2.1 RNA-Isolation.....	28
3.2.2 Qualitäts- und Quantitätskontrolle	28
3.2.3 Reverse Transkription (cDNA Synthese).....	28
3.2.4 Reverse Transkription- quantitative PCR (RT-qPCR).....	29
3.2.5 RT-qPCR Array	30
3.2.6 Reverse Transkription für miRNA	32
3.2.7 RT-qPCR für miRNA (miR-Q).....	32
3.2.8 miR-Q-Array.....	34
3.2.9 Auswahl der lncRNA	34
3.2.10 Reverse Transkription für lncRNA.....	35
3.2.11 RT-qPCR für lncRNA.....	35
3.2.12 RT-qPCR für lncRNA Array	36

3.3	DNA	37
3.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Primer.....	37
3.3.2	Quantitäts- und Qualitätskontrolle	37
3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
3.3.4	Ethanol-fällung zur Isolierung von Nukleinsäuren.....	37
3.4	Proteine	38
3.4.1	Isolierung und SDS-PAGE	38
3.4.2	Western Blot.....	39
3.4.3	Western Blot Wiederverprobung	40
3.4.4	Isolierung nukleärer und zytoplasmatischer Proteine aus einer Probe.....	40
3.4.5	Protein-Silberfärbung nach Blum	42
3.4.6	Protein-Coomassie (G250)-Färbung	42
3.4.7	Protein-Ponceau-Färbung	43
3.4.8	Co-Immunpräzipitation durch magnetische Separierung	43
3.5	Fluoreszenzmikroskopie	46
3.5.1	Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) und Caspase-Assay.....	46
3.5.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Mashimo, Wu et al.)	47
3.5.3	FISH und IF zur Co-Lokalisierung von RNA und Proteinen.....	48
3.6	Reportergenassays	49
3.6.1	Klonierung und Konstruktion von Reporterplasmiden.....	49
3.6.2	Reportergen-Assays und Co-Transfektion	50
3.7	Statistik und <i>in silico</i> Analysen	52
4.	Ergebnisse	53
4.1	TFF3-überexprimierende Adenokarzinomzellen besitzen eine erhöhte Resistenz gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose	53
4.2	Die TFF3-Expression führt zu einer Dysregulation unterschiedlicher, Apoptose-relevanter, nicht kodierender RNAs	56
4.2.1	Die Auswahl nicht kodierender RNAs.....	56
4.2.2	Die TFF3-abhängige Regulation ausgewählter nicht kodierender RNAs	57
4.3	Untersuchung der gegenseitigen Regulation von TFF3-abhängigen miRNAs und lncRNAs ..	58
4.3.1	PRINS besitzt <i>in silico</i> Bindestellen für die miR-326, miR-329 und miR-491	58
4.3.2	Die endogene miR-491-5p-Expression führt zu einer signifikanten Herab-regulierung der PRINS-Expression	60
4.3.3	PRINS besitzt keinen Einfluss auf die miR-491-5p-Expression.....	61
4.3.4	miR-491-5p reguliert PRINS über eine direkte Interaktion	62
4.4	Eine TRAIL-induzierte Apoptose führt zu einem antikorrelierten Expressionsmuster der miR-491-5p und PRINS in HT-29/B6-Zellen.....	64

4.5	Die verringerte miR-491-5p- und die erhöhte PRINS-Expression sind für den TFF3-abhängigen, protektiven Effekt in HT-29/B6-Zellen mitverantwortlich	65
4.6	Die Regulation von PRINS durch miR-491-5p ist vom PI3K-Signalweg abhängig	69
4.7	PRINS reguliert pro- und anti-apoptotisch wirkende Proteine.....	73
4.8	TFF3 verhindert PRINS-abhängig die zytoplasmatische Akkumulierung von PMAIP1	83
4.9	PRINS beeinflusst direkt den TFF3-abhängigen PMAIP1-Gehalt	84
5.	Diskussion	86
5.1	Ausblick	94
6.	Zusammenfassung.....	98
7.	Summary	99
8.	Literaturverzeichnis.....	100
X	Anhang	110
X ₁	Zusätzliche Ergebnisse.....	110
X ₂	Abkürzungsverzeichnis.....	111
X ₃	Plasmidkarten	113
X ₄	Material.....	114
X ₅	Auswahl nicht kodierender RNAs (<i>in silico</i>).....	118
X ₆	Publikationsliste	123
X ₇	Danksagung.....	124
X ₈	Selbstständigkeitserklärung	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der epithelialen Restitution	5
Abbildung 2 Schematische Darstellung von Abschnitten des Wnt-Signalweges	8
Abbildung 3 Schematische Darstellung des PI3K-Signalweges.....	17
Abbildung 4 Schematische Darstellung des Co-IP-Prinzips	45
Abbildung 5 Beschreibung des Phänotyps von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hfff3 mittels xCELLigence®	54
Abbildung 6 Nachweis der Apoptoseinduktion von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hfff3.....	55
Abbildung 7 Expressionsanalyse verschiedener miRNA und lncRNA von HT-29/B6/mock bzw. HT-29/B6/hfff3	57
Abbildung 8 Schematische Darstellung der lncRNA PRINS.....	59
Abbildung 9 Darstellung der Bindestellen zwischen PRINS und miRNAs	60
Abbildung 10 Expressionsanalyse der lncRNA PRINS 24 h nach Transfektion.....	61
Abbildung 11 Expressionsanalyse der lncRNA PRINS und miR-491-5p 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen PRINS.....	62
Abbildung 12 Darstellung der potentiellen Bindedomänen	63
Abbildung 13 Darstellung der relativen Luziferaseaktivität 6 h nach Co-Transfektion	63
Abbildung 14 Expressionsanalyse von TFF3, miR-491-5p und PRINS 3 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α	64
Abbildung 15 Beschreibung des Phänotyps von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hfff3 mittels xCELLigence® 6 h nach Transfektion	66
Abbildung 16 Nachweis der Apoptoseinduktion von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hfff3 6 h nach Transfektion und 24stündiger Behandlung mit IFN- γ und TNF- α	67
Abbildung 17 Quantitative Auswertung des prozentualen Anteils aktive Caspase-3-positiver HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hfff3 6 h nach Transfektion und 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α mittels Immunfluoreszenzmikroskopie.....	68
Abbildung 18 Detektion von AKT, PDK1 und p70-S6K 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α in HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hfff3.....	69
Abbildung 19 Expressionsanalyse der miR-491-5p nach Behandlung mit unterschiedlichen Inhibitoren.....	70
Abbildung 20 Detektion von AKT, PDK1 und p70-S6K 24 h nach Transfektion.....	71
Abbildung 21 Schematische Darstellung des vermuteten Regulationsmechanismus	72
Abbildung 22 Expressionsanalyse verschiedener mRNAs von HT-29/B6/mock bzw. HT-29/B6/hfff3 24 h nach Transfektion	73
Abbildung 23 Expressionsanalyse verschiedener mRNAs von HT-29/B6/mock bzw. HT-29/B6/hfff3 24 h nach Transfektion als <i>vulcano plots</i>	74
Abbildung 24 Detektion von GAPDH, PMAIP1, FOXK1 und FOXK2 24 h nach Transfektion.....	75
Abbildung 25 Nachweis der PRINS-Lokalisierung in HT-29/B6/hfff3	76

Abbildung 26 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FOXK1, F-actin und Zellkernen	77
Abbildung 27 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FOXK1, PRINS und Zellkernen	78
Abbildung 28 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FOXK2, F-actin und Zellkernen	79
Abbildung 29 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FOXK2, PRINS und Zellkernen	80
Abbildung 30 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von PMAIP1, F-actin und Zellkernen.....	81
Abbildung 31 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von PMAIP1, PRINS und Zellkernen.....	82
Abbildung 32 Detektion von PMAIP1 24 h nach Transfektion und 6 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α	83
Abbildung 33 Silberfärbung von lysierten, fixierten bzw. lysierten, unfixierten HT-29/B6/htff3, von Überständen mit ungebundenen Proteinen und dem <i>pull down</i> aus der PMAIP1 Co-IP	84
Abbildung 34 Ergebnisse der PCR für GAPDH und PRINS nach Co-IP von PMAIP1	85
Abbildung 35 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von ausdifferenzierten HT-29/B6/mock und HT-29/B6/htff3 9 Tage nach Aussaat.....	110
Abbildung 36 Nachweis der Apoptoseinduktion von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/htff3 bei Subkonfluenz.....	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung von Zelllinien, Hersteller, Ursprung der Zelllinie und Kulturbedingungen	24
Tabelle 2 Darstellung aller miRNA-mimics unter Angabe der Sequenz in 5´-3´-Orientierung	25
Tabelle 3 Darstellung des verwendeten Amplifikations-Programmes für die RT-qPCR	29
Tabelle 4 Angabe eines Reaktionsansatzes für einen RT-qPCR Array	30
Tabelle 5 Auflistung aller mRNA-Primer unter Angabe der Sequenz in 5´-3´-Orientierung.....	31
Tabelle 6 Auflistung aller RT6-miR-x Primer unter Angabe der Sequenz in 5´-3´-Orientierung	32
Tabelle 7 Angabe eines einfachen Reaktionsansatzes für eine RT-qPCR zur Amplifikation von miRNA (miR-Q).....	33
Tabelle 8 Darstellung des für miR-Q verwendeten Amplifikations-Programmes	33
Tabelle 9 Auflistung aller miR-x-Rev Primer unter Angabe der Sequenz in 5´-3´-Orientierung	34
Tabelle 10 Auflistung aller lncRNA Primer unter Angabe der Sequenz in 5´-3´-Orientierung	35
Tabelle 11 Darstellung des für lncRNA verwendeten RT-qPCR Amplifikations-Programmes	36
Tabelle 12 Auflistung aller Chemikalien und Volumina, die für die Herstellung von 10%igen Acrylamid- Gelen zur Verwendung im SDS-Page eingesetzt werden.....	38
Tabelle 13 Auflistung aller Chemikalien und Volumina, die für die Herstellung von Tricin-Gelen zur Verwendung im SDS-Page eingesetzt werden	39
Tabelle 14 Auflistung aller verwendeten Antikörper	40
Tabelle 15 Auflistung aller Chemikalien und Konzentrationen, die für die Trennung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen benötigt werden (Puffer A und B)	41
Tabelle 16 Auflistung aller Chemikalien und Konzentrationen, die für die Trennung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen benötigt werden (Puffer C)	42
Tabelle 17 Auflistung der für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide mit Angabe der Sequenz in 5´-3´-Orientierung und der Position innerhalb der PRINS-Sequenz	47
Tabelle 18 Auflistung der verwendeten Primer zur Oligo-Assemblierung	49
Tabelle 19 Beispielhafte Darstellung einer Co-Transfektion, um die Interaktion der miR-491-5p und PRINS an der Bindestelle 1 (BS#1) im Rahmen eines Reporter-gen-Assays zu untersuchen	51
Tabelle 20 miRmap Analyse	118
Tabelle 21 DAVID-Analyse für miR-16, miR-20, miR-155, miR-326, miR-329, miR-491	121
Tabelle 22 DAVID-Analys für miR-326, miR-329, miR-491	121

1. Einleitung

1.1 Der gastrointestinale Trakt (GI-Trakt)

Sowohl die Zersetzung als auch Absorption von Nährstoffen setzt einen intakten, gesunden gastrointestinalen Trakt und ein speziell angepasstes Epithel voraus, das vor eigenen zersetzenden Sekreten schützt. Strukturell stellt der gastrointestinale Trakt eine lange, hohle Röhre dar, die eine Grenze zwischen Organismus und Umwelt bildet. Diese Grenze schirmt den Körper einerseits vor schädlichen Einflüssen ab, andererseits verhindert sie, dass Körperflüssigkeiten und Unverdauliches den Organismus unkontrolliert verlassen. Darüber hinaus werden im Verdauungstrakt Enzyme und Hormone produziert, Vitamine synthetisiert und gespeichert, Unverdauliches wird gesammelt und ausgeschieden. Zur besseren Veranschaulichung kann eine Unterteilung des Verdauungssystems in vier Teilbereiche erfolgen. Der obere Abschnitt mit dem Mund, der Speiseröhre und dem Magen; der mittlere Abschnitt mit dem Dünndarm (Intestinum tenue), Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Krummdarm (Ileum); der untere Abschnitt mit Blinddarm (Caecum), Grimmdarm (Colon) und Mastdarm (Rectum) sowie der vierte Bereich mit akzessorischen Organen wie den Speicheldrüsen, der Leber und Pankreas (Porth 1998). Nachfolgend soll nur auf die Histologie des unteren Abschnittes, der auch als Dickdarm (Intestinum crassum) bezeichnet wird, eingegangen werden.

1.2 Der Dickdarm und die Restitution des Epithels

Im Dickdarm wird der Speisebrei durch den Entzug von Wasser und Salzen verdickt. Er enthält unverdauliche Nahrungsreste, die durch Bakterien in Gärungs- und Fäulnisprozessen zersetzt werden. Um eine gute Gleitfähigkeit zu bewirken, wird dem Speisebrei zusätzlich Schleim beigemischt. Der Dickdarm setzt sich dabei aus verschiedenen Gewebeschichten zusammen, wobei das Peritoneum, die größte Membran im menschlichen Körper, mehr oder weniger der Größe der Haut entspricht. In Richtung Lumen folgt die Längs- und Quermuskulatur, die die Bewegung innerhalb des gastrointestinalen Traktes (GI-Traktes) erleichtern. Die Submucosa besteht aus zwei konnektiven Geweben und umfasst Blutgefäße, Nerven und Strukturen, die für die Sekretion von Verdauungsenzymen notwendig sind. Die innere luminale Schicht wird als Mucosa bezeichnet. Die epithelialen Zellen der Mucosa bilden eine dünne Zellschicht, die alle 4 – 5 Tage komplett ersetzt wird, wodurch insgesamt ca. 250 g zelluläre Bestandteile pro Tag über den Stuhl ausgeschieden werden. Die Schleimhaut des Dickdarms weist, anders als die des Dünndarms, keine Zotten, sondern tiefe Einsenkungen, die sogenannten Lieberkühn-

Krypten auf, die für eine Oberflächenvergrößerung sorgen. Das Schleimhautepithel besteht überwiegend aus schleimbildenden Becherzellen und aus Epithelzellen, die mit einem Bürstensaum ausgestattet sind (Porth 1998).

Aufgrund der extrem hohen regenerativen Kapazität des Epithels, insbesondere des Darmepithels, heilen Verletzungen normalerweise schnell und ohne Narbenbildung. Diese Heilung - auch Restitution genannt - ist essentiell, um die Homöostase zu erhalten und erfolgt durch Migration von intakten Zellen, die direkt an die Verletzung angrenzen. Proliferation ist für diesen Vorgang nicht notwendig und würde zusammen mit der nachfolgenden Zelldifferenzierung bis zur vollständigen Heilung zwischen 1 und 2 Tage beanspruchen. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Verletzungen des Epithels aber unter normalen Bedingungen bereits Minuten bis Stunden nach Beschädigungen behoben werden (Lipkin, Sherlock et al. 1963; Lacy 1988). Zur besseren Veranschaulichung sind die wichtigsten Etappen der Restitution in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

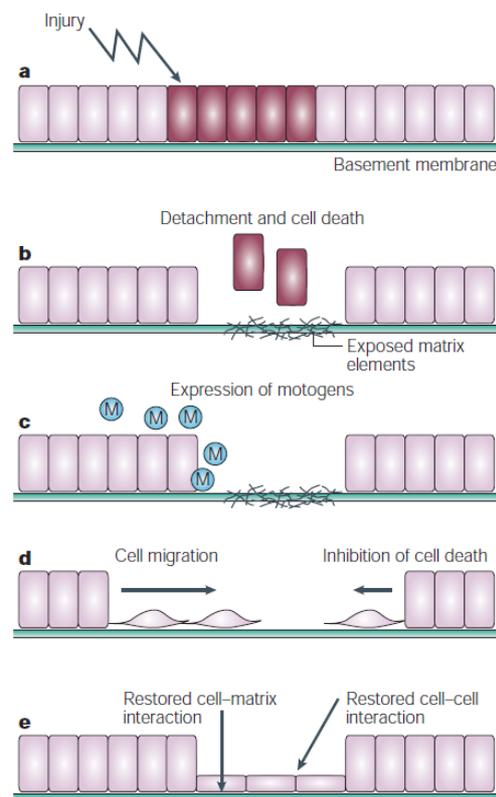


Abbildung 1 Schematische Darstellung der epithelialen Restitution. Auf eine Störung der epithelialen Integrität (a) folgen die Ablösung von Zellen von der Matrix und der Zelltod an der betroffenen Stelle (b). Die angrenzenden, intakten, epithelialen Zellen antworten mit der Expression von Motogenen und anderen Entzündungsmediatoren (c), die die Migration von Zellen über die Wunde und eine Inhibition des Zelltodes initiieren (d). Am Ende steht die Wiederherstellung der Zell-Matrix- und der Zell-Zell-Interaktion (e) (Taupin and Podolsky 2003).

Bei einer Verletzung des Epithels kommt es zur Ablösung epithelialer Zellen von der Basalmembran und zu Zelluntergängen unmittelbar am Ort der Beschädigung. Der *transforming growth factor* β (TGF- β) gehört sicherlich zu den bekanntesten und potentesten

Zytokinen, die eine Restitution des intestinalen Epithels und somit die Migration benachbarter, intakter Zellen antreiben kann (Ciacci, Lind et al. 1993). Darüber hinaus existiert eine Fülle weiterer regulatorischer Proteine, die an diesem komplexen Prozess beteiligt sind (Blay and Brown 1985; Basson, Modlin et al. 1992; Kartha and Toback 1992) zum Beispiel der *trefoil factor 3* (TFF3), der unabhängig von TGF- β agiert und unter anderem die Apoptose der Zellen inhibiert (Dignass, Lynch-Devaney et al. 1994). Unter normalen Bedingungen wird die Wunde durch eine Wiederherstellung der Zell-Matrix- bzw. der Zell-Zell-Interaktion kurze Zeit nach Beschädigung wieder geschlossen. Eine nicht physiologisch ablaufende Reparatur nach Verletzungen des Epithels bzw. der Mucosa-Schicht und eine damit einhergehende Störung der Homöostase scheinen dagegen eine große Rolle bei unterschiedlichen Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen und Krebs zu spielen.

1.3 Autoimmunerkrankungen und ihr Einfluss auf das Krebsrisiko

Es ist bekannt, dass eine fortlaufende und überschießende Immunreaktion des intestinalen Epithels zu chronisch inflammatorischen Erkrankungen führen kann, die allgemein als chronisch entzündliche Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*; IBD) bezeichnet werden. Die IBD unterteilt sich in die ulcerative Colitis und die Crohn's Krankheit mit Symptomen, die von einer Diarrhoe und Gewichtsverlust über Perforationen bis hin zur kompletten Obstruktion des Darms führen können (Farrell and Peppercorn 2002) und Patienten oft medizinische oder chirurgische Hilfe benötigen. Eine medizinische Behandlung mit Antibiotika und antiinflammatorisch oder immunsuppressiv wirkenden Medikamenten kann die Symptome zwar lindern, aber die IBD nicht heilen (Prantera, Scribano et al. 1997; Prantera, Lochs et al. 2006). Heute ist bekannt, dass die mikrobielle Zusammensetzung des Darmes im Zusammenhang mit entzündlichen Darmerkrankungen und einer überschießenden Immunreaktion steht (Harper, Lee et al. 1985; Blumberg, Saubermann et al. 1999). Weiterhin spielen die Genetik und immunrelevante Faktoren des Wirtes eine entscheidende Rolle (Dianda, Hanby et al. 1997). So konnte gezeigt werden, dass die IBD mit einer erhöhten Expression von Entzündungsmediatoren wie den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) einhergeht (MacDonald, Hutchings et al. 1990; Murch, Braegger et al. 1993) und unterschiedlichen TFFs, die unter anderem für die Restitution des beschädigten Epithels verantwortlich sind (Rio, Chenard et al. 1991; Dignass, Lynch-Devaney et al. 1994; Sands and Podolsky 1996). Überraschend erscheint, dass Autoimmunerkrankungen nicht nur generell einen Einfluss auf das Krebsrisiko betroffener Bereiche besitzen können. Patienten, die zum Beispiel unter der chronisch entzündlichen Hauterkrankung Psoriasis leiden, besitzen ebenfalls eine erhöhte Wahrscheinlichkeit im Laufe ihres Lebens Krebsarten des Verdauungstraktes zu entwickeln

(Hemminki, Liu et al. 2012). Hemminki und Kollegen stellten in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass die Medikation bei Autoimmunerkrankungen einen möglichen Einfluss auf das Krebsrisiko haben könnte. Den entscheidenden Hinweis lieferte die Beobachtung, dass Rheuma, im Gegensatz zu anderen Autoimmunerkrankungen, das Krebsrisiko nicht erhöht, sondern sogar bis zu 30 % verringern kann. Viele der angesprochenen Autoimmunerkrankungen werden mit Medikamenten therapiert, die das Immunsystem des Patienten unterdrücken. Das Immunsystem ist dadurch aber auch nicht mehr in der Lage, Tumorzellen effizient zu bekämpfen, was ein erhöhtes Tumorrisiko bedingt. Dagegen scheinen Medikamente, die antiinflammatorisch wirken, wie die in vielen Rheumamedikamenten verwendete Acetylsalicylsäure (ASS), Tumorerkrankungen vorzubeugen (Hemminki, Liu et al. 2012). Zur Behandlung der Psoriasis richten sich die sogenannten Biologika gegen eine überschießende Immunreaktion, indem Antagonisten gegen Interleukine aber auch Zytokine wie TNF- α eingesetzt werden. Die Psoriasis stellt die häufigste entzündliche Hautkrankheit der westlichen Welt dar, bei der die Patienten unter trockener, empfindlicher und schuppiger Haut leiden. Die Ursachen dieser Erkrankung sind multifaktoriell. Die genetische Prädisposition, die Umwelt und die generellen Lebensumstände spielen eine Rolle und können zu den typischen Symptomen wie epidermalen Hyperproliferationen und Entzündungen führen (Di Meglio, Villanova et al. 2014). Ähnlich der IBD-Therapie eignen sich für ihre Behandlung Antikörper gegen TNF- α wie Infliximab und Adalimumab oder der lösliche TNF- α -Rezeptor Etanercept. Augustin und Kollegen untersuchten, wie die äußeren Hautschichten mit dem Immunsystem in Verbindung stehen und stießen dabei auf die Beteiligung des Wnt- Signalweges (Wnt setzt sich aus Wg für wingless und Int-1 (heute Wnt-1) zusammen) (Augustin, Gross et al. 2013).

1.4 Der Wnt-Signalweg

Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung, bei der Regulation von Stammzellen im Darm und in der Haut, bei der Proliferation, Differenzierung und Zellerneuerung (Clevers 2006; Huang and He 2008; Nusse, Fuerer et al. 2008; Clevers and Nusse 2012). Zudem ist bekannt, dass Störungen im Wnt-Signalweg zu Brust- und Darmkrebs und verschiedenen degenerativen Prozessen führen können (Moon, Kohn et al. 2004; Nusse 2005; Clevers 2006; Clevers and Nusse 2012; Augustin, Gross et al. 2013). Die Schlüsselkomponente ist der transkriptionelle Co-Aktivator β -Catenin. Zur Veranschaulichung sind einige wichtige Etappen des Wnt-Signalweges in Abbildung 2 dargestellt.

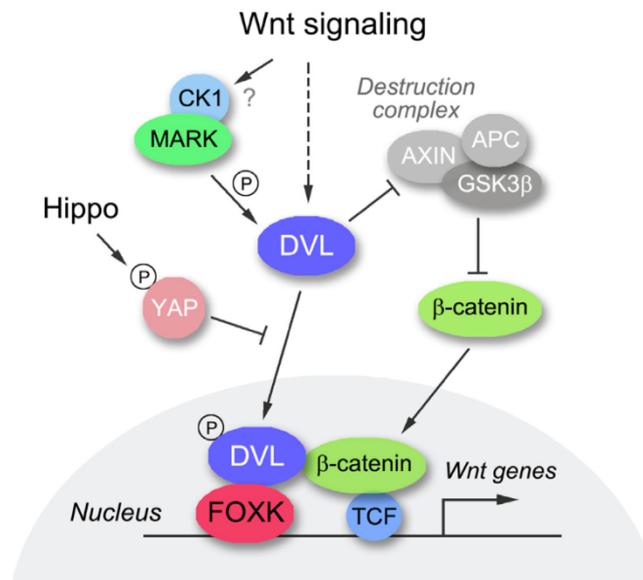


Abbildung 2 Schematische Darstellung von Abschnitten des Wnt-Signalweges. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von dishevelled (DVL), wodurch zytoplasmatisch der destruction complex inhibiert wird und eine Translokation von DVL in den Zellkern erfolgt. Dies führt zur Stabilisierung von β -Catenin im Zytoplasma, wodurch dieses gemeinsam mit TCF und FOXK einen transkriptional aktiven Komplex im Zellkern bilden kann, der unterschiedliche Gene transkribiert (Wang, Li et al. 2015).

Die Degradation von β -Catenin erfolgt durch den zytoplasmatischen *destruction complex*, der aus den Tumorsuppressoren AXIN, *adenomatosis polyposis coli* (APC) und den beiden Kinasen *casein kinase 1* (CK1) und *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) besteht. Eine Aktivierung des Wnt-Signalweges führt über die Phosphorylierung von *dishevelled* (DVL) zytoplasmatisch zu einer Inhibierung des *destruction complex* und somit zur Stabilisierung von β -Catenin (Nusse 2005; Clevers 2006). Dadurch ist eine Translokation in den Zellkern möglich und β -Catenin kann zusammen mit *T cell factor* (TCF) oder *lymphoid enhancer factor* (LEF) einen transkriptional aktiven Komplex bilden, der eine Batterie von Genen transkribiert, die im Wnt-Signalweg beteiligt sind (Moon, Kohn et al. 2004; Clevers 2006). Die Mechanismen, die mit einer Translokation von DVL in den Zellkern einhergehen, sind noch weitgehend unbekannt, es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Interaktionspartner *forkhead box k1* und *k2* (FOXK1 und FOXK2) als positive Regulatoren des Wnt-Signalweges in Betracht gezogen werden können (Wang, Li et al. 2015). *Forkhead box* Proteine stellen eine konservierte Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit einer *forkhead* DNA-Bindedomäne dar (Lehtinen, Yuan et al. 2006), die in der Lage sind, nach Stress-Stimuli die Expression pro-apoptotischer Proteine wie BIM (Obexer, Geiger et al. 2007), *FAS Ligand* (FASL) (Suhara, Kim et al. 2002) und den TNF- α verwandten, Apoptose-induzierenden Liganden (*TNF- α related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)) (Modur, Nagarajan et al. 2002) zu initiieren. Die Expression dieser Gene wiederum geht mit einer verringerten Aktivität der Proteinkinase B (PKB oder synonym AKT) einher (Raghavendra, Pathak et al. 2009). Interessanterweise konnten Barry und Kollegen *in vivo* feststellen, dass eine erhöhte Lokalisierung von DVL im Nucleus mit der

Regeneration des intestinalen Gewebes einhergeht und DVL vermutlich an der Bildung des β -Catenin/TCF-Komplexes beteiligt ist (Torres and Nelson 2000; Habas and Dawid 2005; Itoh, Brott et al. 2005; Gan, Wang et al. 2008; Barry, Morikawa et al. 2013). FOXK1 und FOXK2 dagegen werden beim Darmkrebs signifikant erhöht exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass FOXK2-überexprimierende Mäuse eine intestinale Hyperproliferation entwickeln (Wang, Li et al. 2015). Der Hippo-Signalweg und insbesondere das *Yes-associated protein* (YAP) und „*transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*“ (TAZ) stellen negative Regulatoren von DVL dar, indem sie durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion eine Translokation in den Zellkern und zudem eine Phosphorylierung durch CK1 verhindern (Varelas, Miller et al. 2010; Barry, Morikawa et al. 2013). Auf der anderen Seite ist aber auch bekannt, dass die Hippo/Mst1-Kinase in der Lage ist, direkt *forkhead box* Proteine (FoxO) zu phosphorylieren und somit zu aktivieren (Lehtinen, Yuan et al. 2006).

1.5 Krebs: Seine Erforschung, Ursachen und Therapien

Krebs ist eine äußerst vielseitige Erkrankung und stellt die zweithäufigste Todesursache weltweit dar (Louzada, Atega et al. 2012). Genauso vielseitig wie die Krebs- und Tumorerkrankungen sind auch die Ursachen für Krebs. Genetische und epigenetische Faktoren, unterschiedliche kanzerogene Substanzen und chronische Entzündungen führen zu verschiedenen Pathologien und klinischen Symptomen und machen eine einheitliche Therapie unmöglich. Entzündungen gehen mit der Rekrutierung von Immunzellen in die betroffene Region und der Ausschüttung unterschiedlicher Zellbotenstoffe einher. Zu diesen Botenstoffen gehören unter anderem auch Wachstumsfaktoren, die bei chronischen Entzündungen unter Umständen zum Wachstum von Tumoren beitragen können. Auch die Gefäßbildung kann während einer Entzündungsreaktion angeregt werden, wodurch auch Tumore mit Blut versorgt werden, was ab einer entsprechenden Größe überlebenswichtig für diese ist (Sgambato and Cittadini 2010). Für die Colitis ulcerosa, die Gastritis und Psoriasis konnte ein Zusammenhang zu Krebs belegt werden. Mit Bezug auf die Gastritis spielt die Autophagie eine entscheidende Rolle und kann einen tumorsuppressiven aber auch tumorfördernden Effekt besitzen (White 2012). *Helicobacter pylori* ist ein Bakterium der Ordnung *Campylobacterales* und ist in der Lage, durch die Virulenzfaktoren vakuolisierendes Zytotoxin (VacA) und Zytotoxin-assoziiertes Antigen (CagA) die Autophagie zu modulieren. Interessanterweise stellt das Bakterium den stärksten bekannten Risikofaktor für Magenkrebs dar und wurde 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in die Klasse 1 der Karzinogene eingestuft (Humans 2012). Neusten Erkenntnissen nach sind auch verschiedene Klassen nicht kodierender RNAs in der Lage, die Autophagie zu modulieren. Pawar und Kollegen konnten beobachten, dass

eine Reihe langer nicht kodierender RNAs (lncRNAs) wie *maternally expressed 3* (MEG3) und *Psoriasis susceptibility-related RNA Gene Induced by Stress* (PRINS) nach Infektion mit dem Mykobakterienstamm *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) signifikant herabreguliert wurden. In beeindruckender Weise konnte in der humanen monozytischen Zelllinie THP-1 gezeigt werden, dass die gezielte Herabregulierung von MEG3 durch *small interfering RNA* (siRNA) zu einer signifikanten Verringerung der zellulären Bakterienlast durch Autophagieinduktion führt (Pawar, Hanisch et al. 2016). Auf die lncRNA PRINS soll später noch detaillierter eingegangen werden. Dennoch soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass PRINS bereits in einem engen Zusammenhang mit einem möglichen anti-apoptotischen Effekt in Keratinozyten gebracht wurde. Die Regulierung von *interferon α -inducible protein* IFI6 (synonym *Glc7 Interacting Protein* (GIP3)) soll dabei für den beobachteten Effekt verantwortlich sein (Szegedi, Sonkoly et al. 2010). In einem Zeitalter der zunehmenden Antibiotikaresistenzen bieten die Regulierung der Autophagie und auch der Apoptose die Möglichkeit, neuartige Therapieansätze gegen bakterielle Infektionen zu entwickeln und somit auch präventiv gegen inflammatorisch-bedingte Krebserkrankungen vorzugehen.

Darmkrebs ist mit 16 % die zweithäufigste Krebserkrankung und mit 12 – 14 % die zweithäufigste Krebstodesursache bei Frauen und Männern in Deutschland gleichermaßen. Zu den Hauptrisikofaktoren gehören Übergewicht, Bewegungsmangel, ernährungsbedingte Faktoren und regelmäßiger Alkohol- und Tabakgenuss. Ob erbliche Faktoren eine Rolle spielen, konnte bisher noch nicht ausreichend geklärt werden. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen steigern ebenfalls das Erkrankungsrisiko (RKI, 2005). Auch die molekularen Grundlagen, die zu Krebs führen und die Entwicklung neuer Therapieoptionen erst ermöglichen könnten, variieren (Vargo-Gogola and Rosen 2007). Krebszellen unterscheiden sich von normalen Zellen in vielerlei Hinsicht. Sie benötigen zum Beispiel keine externen Wachstumssignale, um sich zu teilen, sie unterliegen keiner telomerabhängigen Teilungsbegrenzung, besitzen die Fähigkeit zur Angiogenese, Invasion und Metastasierung und sind in der Lage, sich der Apoptose zu entziehen (Hanahan and Weinberg 2000). Die Entstehung von Krebszellen konnte noch nicht ausreichend geklärt werden, es existieren jedoch zwei weitgehend anerkannte Modelle. Im stochastischen Modell geht man von einer oder mehreren spontan ablaufenden Mutationen aus, die einer Zelle zum Beispiel einen Überlebensvorteil gegenüber körpereigenen apoptoseinduzierenden Faktoren verleihen könnten. Im zweiten Modell geht man von der Existenz von Tumorstammzellen aus. Nur wenige entartete Stammzellen sind demnach in der Lage, die Zellen des Tumors zu bilden.

Um die molekularen Mechanismen der Krebsentstehung und die Veränderungen von Krebszellen im Laufe der Erkrankung zu verstehen, verwenden Wissenschaftler unter anderem Zelllinien (Fogh, Fogh et al. 1977; Trainer, Kline et al. 1988), primäre Zellkulturen aus gesundem Gewebe (Sharbati, Hanisch et al. 2015), aus Tumoren (McBain, Weese et al.

1984) oder Mausmodelle (Heyer, Yang et al. 1999). Zelllinien ermöglichen die Generierung von gut reproduzierbaren Ergebnissen ohne großen Zeitaufwand und lassen sich aufgrund ihrer begrenzten Komplexität verhältnismäßig schnell und einfach manipulieren und studieren (van Staveren, Solis et al. 2009). Somit ermöglichen sie es Wissenschaftlern, Grundlagenforschung zu basalen Signalwegen zu betreiben oder Gene zu identifizieren, die zum Beispiel maßgeblich an der Resistenzentwicklung von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika oder körpereigenen apoptoseinduzierenden Stimuli wie TNF- α beteiligt sind. Natürlich stellen Zelllinien stets nur Modelle dar, sodass Ergebnisse nicht auf komplexe Organismen übertragen werden können und eine erneute Verifizierung in diesen benötigen. Umso wichtiger ist es jedoch, dass die verwendeten Zelllinien möglichst realistisch *in vivo*-Situationen wiedergeben. Die colorectale Adenokarzinomzelllinie HT-29 beispielsweise entstand aus dem Tumor einer 44jährigen kaukasischen Frau. Die Zellen dieser Zelllinie wachsen als hoch-differenzierter, polarisierter Monolayer, der Subklon HT-29/B6 ist in der Lage, Mucin zu produzieren und stellt somit sehr gut die physiologische Barriere des Epithels dar (Kreusel, Fromm et al. 1991). Ionentransportmechanismen, Zell-Zell-Kontakte und die Mucinproduktion sind durch exogene Stimuli manipulierbar (Epple, Kreusel et al. 1997; Schmitz, Fromm et al. 1999) und zeigen dadurch physiologische Anpassungen an Veränderungen.

1.6 TNF- α

Zu den gängigen Pharmazeutika, um die IBD oder Psoriasis unter Kontrolle zu bringen, gehören diejenigen, die sich gegen eine überschießende Immunreaktion und somit gegen TNF- α richten (Lv, Qiao et al. 2014). Es verwundert daher nicht, dass TNF- α -Rezeptor-Antagonisten, lösliche TNF- α -Rezeptoren sowie TNF- α -Antikörper zu den effektivsten Therapiemaßnahmen gehören (Black, Rauch et al. 1997; Blam, Stein et al. 2001). TNF- α wurde erstmals in den 1970er-Jahren als ein von Immunzellen sekretiertes Zytokin beschrieben, das einen anti-proliferativen Effekt auf Krebszellen besitzt und die Tumورprogression verhindert (Matthews and Watkins 1978; Green, Dobrjansky et al. 1982). Zytokine spielen allgemein eine Schlüsselrolle im Immunsystem und können ein Grund für unkontrollierte inflammatorische Prozesse sein (Jump and Levine 2004). Sie werden größtenteils von Immunzellen gebildet, ermöglichen die Kommunikation zwischen ihnen und regulieren die Proliferation von Antigen-präsentierenden Zellen. Jedenfalls ist heute bekannt, dass die TNF-Superfamilie eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte aufweisen kann (Aggarwal 2003). Unter anderem beeinflusst TNF- α , das von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten produziert wird, Entzündungen, Autoimmunreaktionen und die Wundheilung (Heidecke,

Hensler et al. 1999; Kakutani, Takeuchi et al. 1999; McCourt, Wang et al. 1999; Williams, Cave et al. 1999; Yazlovitskaya, Pelling et al. 1999) und spielt eine Rolle beim Zellwachstum, der Differenzierung und Proliferation (Sugarman, Aggarwal et al. 1985; Kim, Linardic et al. 1991; Krasagakis, Garbe et al. 1995). Des Weiteren scheint der TNF- α -abhängige Tumorsupprimierende Effekt *in vivo* auf einer funktionalen Immunantwort zu beruhen und somit auch unabhängig von einer induzierten Apoptose in Tumorzellen ablaufen zu können (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Einer der von TNF- α beeinflussten Signalwege geht mit der Induktion von Ceramid einher (Hannun 1994; Heller and Kronke 1994; Kolesnick and Golde 1994), einem *lipid messenger*, der Apoptose in Tumorzellen induzieren kann (Obeid, Linardic et al. 1993) und für die Entstehung eines großen Anteils der sogenannten *stress fibers* verantwortlich ist (Hanna, Chan et al. 1999). *Stress fibers* sind kontraktile Aktin-Bündel, die bei der Adhäsion, Migration und Morphogenese eine Rolle spielen (Hotulainen and Lappalainen 2006; Tojkander, Gateva et al. 2012). Auf der anderen Seite kann eine erhöhte TNF- α -Expression zur Entstehung von inflammatorisch-bedingten Krebserkrankungen führen, somit TNF- α als endogener Tumor-Promotor fungieren und das Überleben, die Proliferation, das invasive Verhalten der Zellen, die Angiogenese und die Entstehung von Metastasen beeinflussen (Sethi, Sung et al. 2008). Von allen erwähnten Funktionen von TNF- α soll nachfolgend besonders auf seine Fähigkeit eingegangen werden, durch TRAIL in einer Vielzahl von Tumorzellen den extrinsischen Apoptose-Signalweg auszulösen (Jalving, de Jong et al. 2006).

1.7 Der extrinsische und intrinsische Apoptose-Signalweg

Der extrinsische Apoptose-Signalweg läuft unter der Beteiligung der transmembranen *death receptors* ab, die wiederum Mitglieder der TNF- α -Superfamilie darstellen. Werden Rezeptoren dieser Familie durch extrinsische Liganden aktiviert, werden intrazelluläre Signale weitergeleitet, die in der Zerstörung der Zelle enden (Bazzoni and Beutler 1996; Elmore 2007). Zu den am besten beschriebenen Liganden dieser Rezeptoren gehören unter anderem FasL, TNF- α , Apo3L und Apo2L (Roy and Nicholson 2000; Elmore 2007; Ashkenazi, Holland et al. 2008) und es werden intensive Anstrengungen unternommen, ihr Potential in der Krebstherapie zukünftig einsetzen zu können. Nach Bindung der Liganden kommt es zur Aggregation der *death receptors*. Der dabei entstandene Signalkomplex ermöglicht erst die Bindung der Procaspase-8 (der Name Caspase leitet sich von *cysteiny-directed aspartate-specific protease* ab) und bildet zusammen mit dem aus dem Zytosol rekrutierten *Fas-associated protein with death domain* (FADD) den *death-inducing signaling complex* (DISC) (Medema, Scaffidi et al. 1997; Mitsiades, Poulaki et al. 2000; Sprick, Weigand et al. 2000). Die Caspase-8 aktiviert wiederum Effektor-Caspasen, wie die Caspase-3 und -7 (Fernandes-

Alnemri, Armstrong et al. 1996; Muzio, Salvesen et al. 1997). Diese Aktivierung der Caspasen erfolgt meistens durch Spaltung zwischen der p10- und p20-Domäne (Earnshaw, Martins et al. 1999), wodurch es zu einer selektiven Aktivierung oder Inaktivierung von Zielproteinen kommt. Zu den an dieser Stelle nennenswerten Effektorproteinen gehört unter anderem die Caspasen-aktivierte DNase CAD, eine Nuklease, die in inaktiver Form vorliegt und ihre inhibitorischen Untereinheiten erst durch die aktive Form der Caspase-3 gespalten werden (Liu, Zou et al. 1997; Enari, Sakahira et al. 1998; Sakahira, Enari et al. 1998). Dagegen benötigt der intrinsische Signalweg des programmierten Zelltodes keine rezeptorvermittelten Signale, sondern basiert auf mitochondrialen Aktivitäten, die letztendlich Cytochrom C- vermittelt zur Apoptose führen (Elmore 2007). Stimuliert durch virale Infektionen, Toxine, freie Radikale, Beschädigungen der zellulären DNA oder Mitglieder der *B-cell lymphoma 2* Familie (Bcl-2-Familie) kommt es zu Veränderungen der mitochondrialen Membran und somit zum Verlust des Transmembran-Potentials (Saikumar, Dong et al. 1999; Goldstein, Waterhouse et al. 2000). Cytochrom C induziert die Bildung des Apoptosoms, wodurch die Procaspase-9 rekrutiert wird. Caspase-9 ist dann wiederum in der Lage, die Effektor-Caspasen-3 und -7 zu aktivieren (Cain, Brown et al. 1999).

1.8 Die Regulierung der Apoptose

Die Regulierung der Apoptose erfolgt unter anderem durch die Mitglieder der Bcl-2-Familie, die sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken können, und durch den Tumor-Suppressor p53. Auch diese werden als Zielmoleküle für die Krebstherapie intensiv erforscht (Lane 2004; Elmore 2007; Ashkenazi, Holland et al. 2008). Das *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like* (BNIP3L) beispielsweise steht durch seine Lokalisierung in der äußeren Mitochondrienmembran und seine Induzierbarkeit durch zellulären Stress im engen Zusammenhang zur Apoptose (Chinnadurai, Vijayalingam et al. 2008). Der pro-apoptotische Faktor *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1* (PMAIP1 synonym NOXA) stellt einen Regulator des pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedes *induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (Mcl-1) dar und scheint gerade in Bezug auf die TRAIL-induzierte Apoptose von besonderer Bedeutung zu sein, da PMAIP1 sogar in der Lage ist, Apoptose in Krebszellen auszulösen (Ploner, Kofler et al. 2008). PMAIP1 wird durch den Faktor FOXK2 inhibiert, wobei FOXK2 ebenfalls als negativer Regulator von p70-S6K bekannt ist und somit auf eine Beteiligung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweges geschlossen werden kann (van der Heide, Wijchers et al. 2015), auf den später noch näher eingegangen werden soll. Des Weiteren ist bekannt, dass TRAIL-resistente Glioblastomazellen, durch die gezielte Herabregulierung von Mcl-1 mittels siRNA oder den spezifischen Inhibitor R-roscovitine, ihre Sensitivität gegenüber einem TRAIL-induzierten Zelltod wieder erlangen können (Murphy,

Weyhenmeyer et al. 2014). Im Abschnitt 1.4 wurde bereits auf den Zusammenhang der Hippo/Mst1-Kinase als negativer Regulator von DVL eingegangen, der wiederum eng mit *forkhead box*-Proteinen im Wnt-Signalweg assoziiert ist. Greift man die Ergebnisse von Valis und Kollegen auf, dann wird daraus ersichtlich, dass PMAIP1 eine Bindestelle in seiner Promotorregion für FoxO-Proteine besitzt und es konnte eine hohe Affinität mittels Fluoreszenz-Anisotropie und Chromatin-Immunopräzipitation zu FoxO1 und FoxO3a festgestellt werden. Letztendlich konnte durch die gezielte Herabregulierung von FoxO1 durch siRNA seine Rolle in der PMAIP1-Aktivierung bestätigt werden. Auch hier ist die Hippo/Mst1-Kinase beteiligt, indem sie die Phosphorylierung von FoxO1 und seine Translokation in den Zellkern steuert, die essentiell für die nachfolgende Transkription von PMAIP1 sind (Valis, Prochazka et al. 2011). Auf der anderen Seite scheinen auch dysregulierte, antiapoptotische Faktoren eine Relevanz für die Krebsentstehung zu besitzen. So geht eine verringerte Expression des anti-proliferativen Faktors *B-Cell Translocation Gene 1* (BTG1) mit einer erhöhten Tumordinvasion und metastasierenden Leber- und Lymphknotenkrebs einher (Sun, Lu et al. 2014). Es konnte auch gezeigt werden, dass es durch Interferon- γ (IFN- γ) und TNF- α zu einer verringerten Expression des anti-apoptotischen Faktors BCL2L1 kommt und somit wesentlich mehr metastasierende Darmkrebszellen in Apoptose geschickt werden können (Liu, Hu et al. 2011). Bereits heute spielt IFN- γ eine vielversprechende Rolle, um die Effektivität einer TRAIL-basierten Krebstherapie zu erhöhen (Park, Seol et al. 2004). Es wurde jedoch ebenfalls beschrieben, dass es im Zuge der Tumorentwicklung und der möglichen Entstehung von Metastasen zu einer Herabregulierung der TRAIL-Rezeptor- und Caspase-8-Expression kommen kann und Tumorzellen somit ihre Sensitivität gegenüber IFN- γ verlieren können (Kaler, Galea et al. 2010; Xu, Zhou et al. 2010). Es existieren darüber hinaus noch viele weitere Moleküle, die in der Lage sind Zellen vor Schäden und Apoptose zu schützen und bei einer entsprechenden Überexpression eine Krebstherapie erschweren können, wie zum Beispiel die kleinen Protease-resistenten *trefoil*-Faktoren (TFF).

1.9 *Trefoil*-Faktoren

Bisher sind drei *trefoil*-Peptide beschrieben worden, unter anderem der intestinale *trefoil*-Faktor (ITF oder TFF3). Charakteristisch für diese ist die Anwesenheit sogenannter *trefoil*-Faktor-Domänen, die aufgrund ihrer drei Disulfidbrücken eine feste Struktur besitzen und den Peptiden somit eine Resistenz gegenüber thermaler und enzymatischer Zersetzung bieten (Buda, Jepson et al. 2012). Die Faktoren werden überwiegend von Mucin-sekretierenden Epithelzellen des Darms gebildet, sie können aber auch in geringem Maße in anderen Geweben vorkommen (Hoffmann, Jagla et al. 2001; Hoffmann and Jagla 2002). Eine Induktion der TFF3-Expression geht mit der Differenzierung von Becherzellen einher (Podolsky, Lynch-

Devaney et al. 1993) und da TFF3 auch bei mucosalen Verletzungen, unterschiedlichen ulcerativen Prozessen und Krebs vermehrt exprimiert wird, scheint dieser Faktor vor allem bei der Abwehr, Instandhaltung und Reparatur des intestinalen Epithels eine Relevanz zu besitzen, auch wenn die Mechanismen größtenteils unklar sind (Kim, Kim et al. 2004; May, Semple et al. 2004). TFF3 stellt ein potentes Mitogen dar und steht im engen Zusammenhang zur Tumorerkrankung, Apoptose-Resistenz und Metastasierungen (Wright, Hoffmann et al. 1997). In vielen Zelllinien konnte durch die Behandlung mit rekombinanten TFF3 zwar eine Verringerung der Proliferation (Uchino, Kataoka et al. 2000), jedoch keine erhöhte Migration festgestellt werden (Dignass, Lynch-Devaney et al. 1994; Playford, Marchbank et al. 1995; Marchbank, Westley et al. 1998). Umso überraschender erscheint es deshalb, dass in *in vitro*-Wundheilungsmodellen dennoch eine 3 – 6fach erhöhte Wundschließung nach Behandlung mit TFF2 oder TFF3 beobachtet werden konnte (Dignass, Lynch-Devaney et al. 1994; Ge, Gardner et al. 2015). Eine mögliche Erklärung liefert die Arbeit von Andoh und Kollegen. Die Autoren dieser Arbeit beschreiben, dass TFF3 nur bei baso-lateraler Stimulation einer konfluenten Zellschicht einen Effekt besitzt, während keine signifikanten Veränderungen bei apikaler Behandlung beobachtet werden konnten. Sie argumentieren nachvollziehbar sinnvoll, dass TFF3 normalerweise apikal bzw. zum Lumen hin abgegeben wird und ausschließlich bei Verletzungen der intakten Epithelschicht in der Lage sein könnte, die basalen und lateralen Bereiche der Zellen zu erreichen und somit seine Effekte zu zeigen (Andoh, Kinoshita et al. 2001). Migrierende Zellen verändern im Zuge einer epithelial mesenchymalen Transition durch die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten einen Großteil ihrer Polarisierung und entwickeln für die gerichtete Migration ein vorderes und hinteres Ende (Hay 1990). Das wirft die Frage auf, welche Auswirkungen TFF3 nachgeschaltet auf bereits migrierende Zellen haben könnte. Jedenfalls ist für die Migration von Zellen eine Vielzahl ablaufender zellulärer Vorgänge notwendig. Dazu gehören die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten und Zell-Oberflächen-Kontakten (Nobes and Hall 1995; Machesky and Hall 1997). In beiden Fällen obliegt E-Cadherin eine entscheidende Rolle. Die intrazelluläre Untereinheit von E-Cadherin bindet direkt an β -Catenin, wobei eine Phosphorylierung von β -Catenin mit der Auflösung von Zell-Zell- bzw. Zell-Oberflächen-Kontakten einhergeht (Behrens, Vakaet et al. 1993). Interessanterweise ist TFF3 in der Lage, β -Catenin und den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) zu phosphorylieren (Liu, el-Hariry et al. 1997) auch wenn die Aktivierung von EGFR nicht durch eine direkte Bindung mit TFF3 induziert wird (McKenzie, Marchbank et al. 1997). Eine Behandlung mit TFF3 für 24 h bewirkt eine Reduzierung von E-Cadherin, α -Catenin, β -Catenin und des APC-Genproduktes, das einen Effekt auf die Zellaggregation und die Ablösung von der Wachstumsfläche haben kann (Gajhede, Petersen et al. 1993).

Darüber hinaus wurde beschrieben, dass TFF3 nicht allein aktiv agieren, sondern erst synergistisch mit anderen Molekülen wie Mucin oder Matrixproteinen zu den erwähnten

Effekten führen kann (Dignass, Lynch-Devaney et al. 1994; Wong, Poulsom et al. 1999). Dafür spricht auch, dass Mucin-2 (MUC2) wie TFF3 in den Becherzellen des Colons gebildet wird und das gleiche regulatorische *goblet-cell-specific-enhancer element* (GCRE) in der Promotorregion besitzt (Tytgat, Buller et al. 1994; Gum, Hicks et al. 1997), was auf eine mögliche Co-Regulierung von MUC2 und TFF3 hindeutet. Muc2 $-/-$ Mäuse entwickeln trotz einer nachgewiesenen Anwesenheit von TFF3 in den Becherzellen nach ca. 5 Wochen spontan eine Colitis und auch Muc2 $+/-$ Mäuse weisen nach einer Dextran-Natriumsulfat-(DSS)-Behandlung, was zu Verletzungen der Mucosa führt, wesentlich häufiger eine Colitis auf als $+/+$ Mäuse (Van der Sluis, De Koning et al. 2006). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass TFF3 allein nicht ausreichend zu sein scheint, um einen anti-apoptischen, protektiven Effekt zu bieten, der vor ulcerativen Prozessen des Epithels schützt. Jedoch bewirkt TFF3 endogen exprimiert oder exogen verabreicht einen Schutz des intestinalen Epithels gegenüber Serummangel oder einer Ceramid-induzierten Apoptose. Zu diesem Sachverhalt passend konnte auch gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen eine Colitis künstlich durch die Behandlung mit Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) induziert wurde, nach intraperitonealer Injektion von TFF3, geringere TNF- α - und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B)-Werte im Gewebe aufwiesen und sich TFF3 somit als potentiell Therapeutikum bei der IBD eignen könnte (Teng, Xu et al. 2009). Darüber hinaus wiesen TFF3 $-/-$ Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Entwicklung intestinaler Zelluntergänge auf. Behandelte man diese Mäuse mit DSS entwickelten 60 % einen blutigen Durchfall, der mit dem Tod endete. Im Gegensatz dazu entwickelten nur 10 % der Wildtyp (Wt)-Mäuse diese Symptomatik (Mashimo, Wu et al. 1996). Dabei beschreiben Kinoshita und Kollegen, dass für die beschriebenen antiapoptischen Effekte von TFF3 ein intaktes TFF3-Dimer und eine Phosphorylierung von EGFR obligatorisch sein sollen (Kinoshita, Taupin et al. 2000). Mechanistisch betrachtet, zeigte die ektopische Expression in der humanen gastrointestinalen Krebszelllinie HT-29 einen Zusammenhang zu PI3K, auf die nachfolgend näher eingegangen werden soll (Taupin, Kinoshita et al. 2000). Lin und Kollegen konnten darüber hinaus zeigen, dass die Überexpression von TFF3 zu einer Inhibierung der Interleukin (IL)-1 β -induzierten TNF- α - Expression führt, die aber durch Vorbehandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 verhindert wird (Lin, Xu et al. 2013).

1.10 Der PI3K-Signalweg

Durch unterschiedliche Rezeptoren der Klasse I - III und eine substrat- und klassenspezifische Aktivierung (Engelman, Luo et al. 2006) reguliert dieser Signalweg eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie die Proliferation, das Überleben und die Apoptose von Zellen (Cantley 2002). Die wichtigsten Etappen sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Einmal aktiviert,

katalsiert PI3K die Bildung von Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP₃), Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP₂) und der Lipid-Phosphatase *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) als einen Tumor-Suppressor und negativen Regulator der *mechanistic Target Of Rapamycin* (mTOR)-Aktivität.

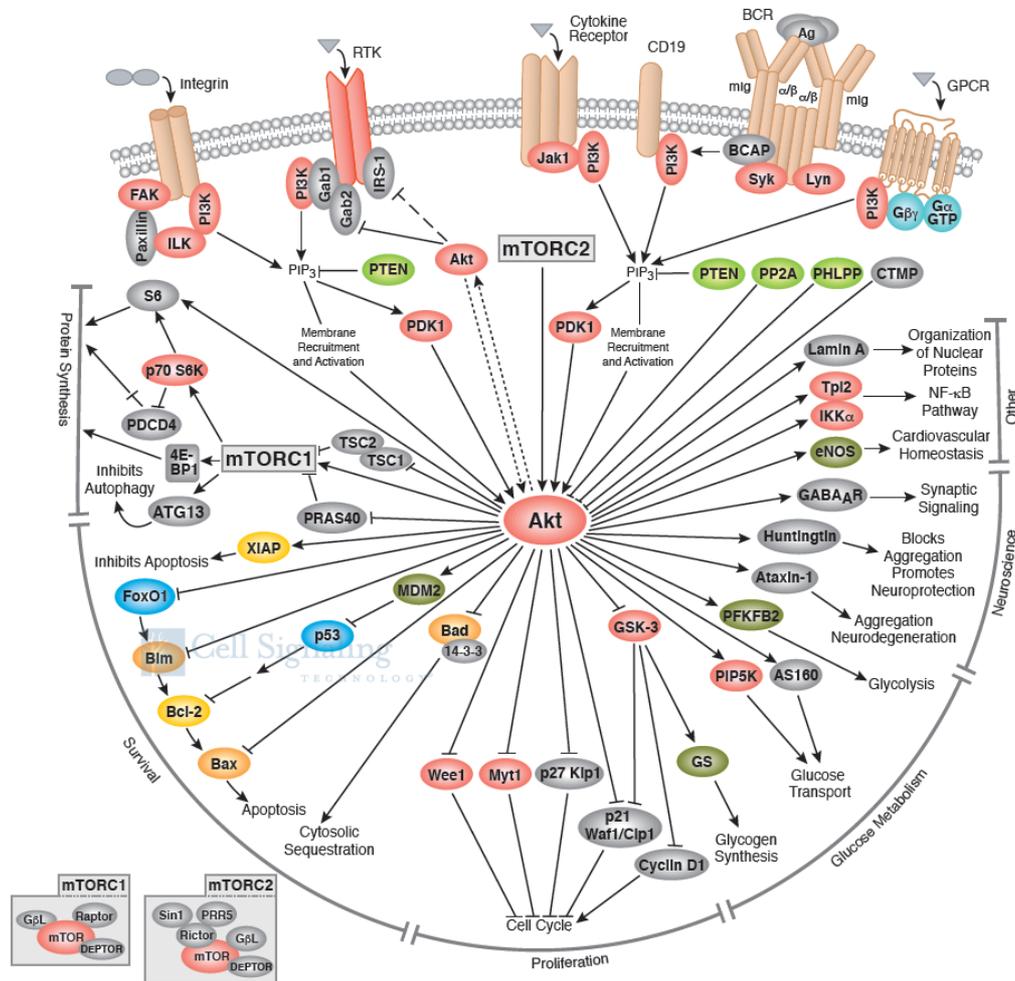


Abbildung 3 Schematische Darstellung des PI3K-Signalweges. Unterschiedliche Rezeptoren können den PI3K-Signalweg antreiben. Ihnen gemeinsam ist eine initiale Bildung von PIP₃. PTEN stellt unter anderem einen frühen negativen Regulator des Signalweges dar. Als zentralen Effektor steuert AKT nach Phosphorylierung durch PDK1 und mTORC2 die Signalweiterleitung über eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle wie zum Beispiel durch die Inhibierung von GSK-3, FoxO1 oder p53. Die Aktivierung von PDK1 führt direkt oder über AKT und mTORC1 zu einer Phosphorylierung von p70-S6K. "Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)."

Darüber hinaus agiert PTEN als zentraler negativer Regulator von PI3K durch Dephosphorylierung von PIP₃ und PIP₂ und steuert Wachstum-regulierende und Krebs-relevante Signalwege (Mora, Komander et al. 2004). Das konnte eindrucksvoll durch PTEN-/+ Mäuse verdeutlicht werden, die eine signifikant erhöhte Tumorprädisposition aufwiesen und bei homozygoter Deletion sogar embryonal letal waren (Di Cristofano, Pesce et al. 1998). Innerhalb der Signalkaskade stellt die Serin-Threonin Kinase AKT unterhalb von PIP₃ einen wichtigen Effektor dar. AKT wird durch PIP₃ zur Zellmembran rekrutiert und durch die 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)) am

Threonin 308 (Mora, Komander et al. 2004) und durch *rapamycin-insensitive mTOR complex2* (mTORC2) am Serin 473 phosphoryliert (Sarbasov, Guertin et al. 2005). Die AKT-vermittelte Phosphorylierung inhibiert wiederum die Aktivität der Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), die am Glukose-Metabolismus und an der Zell-Zyklus-Regulation beteiligt ist (Cohen and Frame 2001), p53 (Ogawara, Kishishita et al. 2002) und FoxO1 (Raghavendra, Pathak et al. 2009). Darüber hinaus kann eine PI3K-abhängige Aktivierung von PDK1 direkt oder über AKT und mTORC1 zu einer Phosphorylierung von p70-S6K führen, wodurch das Zellwachstum und die Proliferation initiiert werden (Pullen, Dennis et al. 1998; Dowling, Topisirovic et al. 2010). Eine Apoptoseinduktion geht jedoch ebenfalls mit einer verstärkten Phosphorylierung von p70-S6K einher, was auf einen Kompensationsmechanismus zurückzuführen sein könnte (van der Heide, Wijchers et al. 2015). Laut van der Heide kann die Herabregulierung von FOXK2 zur Aufhebung der PMAIP1-Inhibierung und somit zur Apoptose über Caspase-3 führen, wodurch es ebenfalls zur Phosphorylierung von p70-S6K kommen kann.

Ein Zusammenhang zwischen PI3K und Krebs wurde bereits 1980 vermutet, da diese durch epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren, *platelet-derived* Wachstumsfaktor-Rezeptoren und mesenchymal epitheliale Transitionsfaktoren aktiviert wird. Allgemein wurde sich in den letzten Jahren vermehrt um die Erforschung basaler, zellulärer Prozesse, die im Zusammenhang zur Krebsentstehung stehen, bemüht. So wurde unter anderem auch erkannt, dass die Entstehung maligner gastrointestinaler Tumore deutlich durch die Gruppe der sogenannten nicht kodierenden RNAs reguliert wird (Jiang, Wang et al. 2014).

1.11 Nicht kodierende RNA

1.11.1 microRNA

Gerade einmal 10 % der humanen RNA wird in funktionale Proteine transkribiert. Der Rest wird in die Gruppe der nicht kodierenden RNA kategorisiert wie zum Beispiel die der heute gut erforschten Untergruppe der microRNA (miRNA). Wie mRNAs werden auch miRNAs zunächst von der RNA-Polymerase II transkribiert. Die dabei entstehende Pri-miRNA wird enzymatisch durch die RNase III Drosha zur Pre-miRNA verkürzt und gelangt vom Zellkern in das Zytosol (Lee, Ahn et al. 2003), wo durch die RNA-Endonuklease Dicer ein 20 – 25 bp langes, doppelsträngiges RNA-Molekül entsteht (Hutvagner, McLachlan et al. 2001). Der 3´- und bzw. oder der 5´-Strang bilden je nach miRNA den *RNA-induced-Silencing-Complex* (RISC). Dieser besteht unter anderem aus Proteinen der Argonaut-Familie und sorgt in der direkten Interaktion mit der Ziel-mRNA für die Initialisierung und Stabilisierung des Komplexes (Lambert, Gu et al. 2011). Die miRNAs regulieren die Genexpression durch Degradation von

mRNA, durch Inhibierung der Translation oder Veränderungen in der Proteinsynthese. Dadurch obliegt ihnen eine zentrale Rolle bei Prozessen wie der Proliferation, Migration, Invasion und Apoptose, auch wenn diese einzelsträngigen RNA-Moleküle gerade einmal 20 Nukleotide (nt) kurz sind (Fabian, Sonenberg et al. 2010; Huang, Li et al. 2014). Der kanonische Mechanismus basiert auf einer perfekten Watson-Crick Basenpaarung zwischen der sogenannten *Seed* Sequenz der 5'-Nucleotide 2 – 8 und einer mRNA-Bindestelle, die sich typischerweise an der 3' untranslatierten Region (UTR) befindet. Auf dieser Gesetzmäßigkeit basierend findet man heute *in-silico* Analysewerkzeuge, die eine Vielzahl potentieller Interaktionspartner vorschlagen, unter anderem RNAhybrid (Kruger and Rehmsmeier 2006). Da jedoch der Anteil falsch-positiver Vorhersagen unverhältnismäßig groß ist, ist eine experimentelle Validierung dieser heute noch unumgänglich. Es ist wenig überraschend, dass auch miRNAs im Laufe der Tumorentstehung dysreguliert sein können und somit an der Entstehung von Tumoren beitragen oder Resistenzen gegenüber körpereigenen Abwehrmechanismen unter Umständen begünstigen oder erst ermöglichen können. Sharbati und Kollegen konnten zeigen, dass die zelluläre Konzentration der Caspase-3 und -7 mit der Expression von let-7e und miR-29a negativ korreliert (Sharbati, Lewin et al. 2011). Des Weiteren interagiert miR-491-5p beispielsweise direkt mit dem anti-apoptotischen Faktor BCL2L1 (Nakano, Miyazawa et al. 2010) und p53 (Guo, Wang et al. 2012). BCL2L1 akkumuliert dadurch in seiner dephosphorylierten Form (Denoyelle, Lambert et al. 2014), wodurch Apoptose in verschiedenen Krebszellen, unter anderem in colorectalen Tumorzellen, induziert werden kann. Die mit miR-491-5p transfizierte hepatozelluläre Krebszelllinie Huh7 zeigte zudem eine verringerte AKT-Phosphorylierung, wodurch diese miRNA eng mit dem PI3K-Signalweg in Verbindung zu stehen scheint (Ishida, Tatsumi et al. 2011). Auch die miR-155 ist bekannt dafür, dass sie in der Zelllinie HT-29 die Proliferation und Invasion beeinflusst. In den meisten colorectalen Tumorzellen wird sie verstärkt exprimiert und könnte somit essentiell für die Tumorentstehung sein (Qu, Wang et al. 2015). Die Gruppe der miRNAs besitzt darüber hinaus die Fähigkeit mit unterschiedlichen Klassen nicht kodierender RNAs, wie den langen nicht kodierenden RNAs (lncRNA), zu interagieren (Salmena, Poliseno et al. 2011), die ebenfalls eine regulierende Funktion innehaben und auch mit unterschiedlichen Autoimmun- oder Krebserkrankungen im Zusammenhang stehen können.

1.11.2 lncRNA

Obwohl die Klasse der langen nicht kodierenden RNAs (lncRNA) schon seit den 1980er Jahren bekannt ist und einen großen Teil des humanen Transkriptoms darstellt, ist bisher nur sehr wenig über ihre Funktion bekannt. Verschiedene Studien konnten aber zeigen, dass lncRNAs in vielen Schritten der physiologischen Entwicklung und auch der Karzinogenese beteiligt sind

und als essentielle Regulatoren, Onkogene oder Tumor-Suppressoren fungieren können (Prensner and Chinnaiyan 2011; Gutschner and Diederichs 2012). Wie miRNAs können auch lncRNAs die Aktivierung oder Inhibierung der Transkription regulieren. Ebenso kann die Lokalisierung und Aktivierung von Proteinen beeinflusst werden. Bemerkenswert ist jedoch ihre Fähigkeit, auch innerhalb der Regulationsebene nicht kodierender RNAs direkt mit miRNAs zu interagieren (Salmena, Poliseno et al. 2011), was die Vermutung nahelegt, dass es ein regulatorisches Netzwerk auf RNA-Ebene geben könnte. Viele lncRNAs sind art-, gewebe-, und krebsspezifisch und so wurde auch die Möglichkeit diskutiert, sie als neuartige Quelle von Biomarkern für unterschiedliche Erkrankungen und die Tumorprogression nutzen zu können. Dabei ist die Untersuchung des Expressionslevels in Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe eine denkbare, wenn auch nicht praktische, Möglichkeit wichtige Regulatoren und krebsspezifische lncRNAs zu entdecken und für die Diagnostik zu verwenden. Eine wichtige Eigenschaft von Biomarkern für die Routine-Diagnostik ist, neben einer hohen Spezifität, die leichte Zugänglichkeit der Matrix. Überraschenderweise sind heute bereits einige lncRNAs bekannt, die auch in Körperflüssigkeiten vorkommen wie zum Beispiel die *HOX antisense intergenic RNA* (HOTAIR). Svoboda und Kollegen konnten eine erhöhte Expression von HOTAIR im Blut von Patienten mit colorectalen Karzinomen im Vergleich zu gesunden Probanden feststellen (Svoboda, Slysokova et al. 2014). Salmena und Kollegen konnten im Jahre 2011 erstmals zeigen, dass eine direkte Interaktion von miRNAs und lncRNAs möglich ist (Salmena, Poliseno et al. 2011). Durch die Regulation von lncRNAs auf der Ebene der miRNAs ergibt sich daraus die Existenz eines noch unüberschaubar komplexen Interaktionsnetzwerks. Erst kürzlich fanden Wissenschaftler heraus, dass die lncRNA HOTAIR mit der miR-326 interagieren kann und durch die Beeinflussung von *Fibroblast Growth Factor 1* (FGF1) ein wichtiger Therapieansatz bei der Behandlung von Glioma darstellen könnte (Ke, Yao et al. 2015). Der Tumorsuppressor PTEN wird ebenfalls durch das Pseudogen PTENP1 reguliert, das potentielle miRNA-Bindestellen besitzt (Poliseno, Salmena et al. 2010). PRINS ist eine Primaten-spezifische lncRNA und weist je nach Gewebe unterschiedliche Expressionsmuster auf. In Venen wurde die bisher höchste Expression gemessen aber auch in männlichen und weiblichen Gonaden, im GI-Trakt und der Haut wurden hohe bis moderate Werte beobachtet. Im Gehirn konnte PRINS bisher nicht nachgewiesen werden. Es spielt eine Rolle bei zellulären Vorgängen wie der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten und ist in gesunden Gewebeabschnitten von Psoriasis-Patienten stärker exprimiert als in erkrankten Abschnitten (Sonkoly, Bata-Csorgo et al. 2005). Wie bereits beschrieben, gehören eine epidermale Hyperproliferation und Entzündungen zum typischen Krankheitsbild der Psoriasis und vermutlich sind eine abnormale Keratinozytenfunktion und infiltrierende Immunzellen dafür verantwortlich (Bata-Csorgo, Hammerberg et al. 1995; Bata-Csorgo, Cooper et al. 1998). Welche Rolle PRINS in dieser Symptomatik spielen könnte, untersuchen

Szegedi und Kollegen seit Jahren intensiv. Eine Inhibierung von PRINS durch RNA-Interferenz spricht für eine protektive Rolle dieser lncRNA gegenüber unterschiedlichen Stress-Stimuli. Szegedi und Kollegen nach könnte eine mögliche Regulation von GIP3 durch PRINS für die Schutzfunktion verantwortlich sein (Szegedi, Sonkoly et al. 2010). GIP3 stellt ein Interferon-induzierbares Gen mit anti-apoptischen Eigenschaften dar. Es ist bekannt, dass eine Herabregulierung von GIP3 zum Beispiel durch siRNA zu einer Inhibierung der spontanen Apoptose führt (Cheriyath, Glaser et al. 2007) und PRINS somit am veränderten Apoptoseverhalten von Keratinozyten bei der Psoriasis mitverantwortlich sein könnte (Szegedi, Sonkoly et al. 2010). Des Weiteren konnte für kultivierte Keratinozyten festgestellt werden, dass unterschiedliche Stimuli wie UV-B-Strahlung zu einer verringerten PRINS-Expression führen. Eine verringerte Expression von PRINS führt wiederum zu einer signifikant verringerten Überlebensrate von Keratinozyten gegenüber UV-B-Strahlung und Serummangel. Diese Herabregulierung von PRINS geht mit einer intrazellulären Umverteilung von Nucleophosmin (NPM) einher (Szegedi, Goblos et al. 2012). *In vitro*-Bindungs-Assays sowie die Tatsache, dass NPM (Nachweis durch immunhistochemische Färbung) und PRINS (Nachweis durch *in situ*-Hybridisierung) eine dominante Lokalisierung im Zellkern von Keratinozyten zeigen, weisen auf eine mögliche Interaktion bzw. Regulation untereinander hin (Beylot-Barry, Lamant et al. 1996; Szegedi, Goblos et al. 2012).

2. Zielsetzung

Krebs stellt neben Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache weltweit dar. Intensive Anstrengungen werden unternommen, um Ursachen und Therapieoptionen zu erforschen. Dabei scheinen Autoimmunerkrankungen einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung von Tumoren zu liefern. Eine mit Autoimmunerkrankungen einhergehende überschießende Immunreaktion geht oft mit einer erhöhten und unkontrollierten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie TNF- α einher, einem Zytokin, das in der Lage ist, Tumorzellen frühzeitig zu bekämpfen und dessen Effekt sich zusammen mit IFN- γ bei einer TRAIL-basierten Krebstherapie zu Nutze gemacht wird. Auf der anderen Seite ist TNF- α jedoch in der Lage, besonders bei langanhaltenden Entzündungsreaktionen zu der Entstehung von Tumoren beizutragen. Unbehandelte oder aber auch mit Immunsuppressiva bzw. mit gegen TNF- α -gerichteten Medikamenten behandelte Autoimmunerkrankungen scheinen dabei krebsfördernde Bedingungen zu bieten. Im Laufe der Tumorentstehung können sich zudem, aufgrund von Mutationen, Resistenzen entwickeln, sodass Zellen ihre Sensitivität gegenüber einem TNF- α -induzierten Zelltod verlieren können. Eine zusätzliche Behandlung mit IFN- γ kann die TRAIL-induzierte Apoptose zwar enorm steigern, jedoch können sich auch hierbei Resistenzen entwickeln, indem zum Beispiel TRAIL-Rezeptoren von Krebszellen verringert exprimiert werden.

In dieser Arbeit stehen das humane Epithel des gastrointestinalen Traktes und insbesondere seine Rolle bei Entzündungsreaktionen, der Krebsentstehung, Abwehrmechanismen und der Restitution nach Verletzungen im Vordergrund. Dabei existieren eine Vielzahl unterschiedlicher Kontroll- und Abwehrmechanismen, die vor negativen Stimuli und damit unter Umständen einhergehenden überschießenden und unkontrollierten Apoptosemomenten schützen sollen. Die Trefoil-Faktoren nehmen dabei eine Schlüsselrolle ein und so konnte gezeigt werden, dass sich TFF3 bei Autoimmunerkrankungen wie der IBD als Therapeutikum nutzen lassen könnte, auf der anderen Seite jedoch bei metastasierenden Krebsvarianten überexprimiert wird.

Zunächst sollten in dieser Arbeit generelle Unterschiede im Phänotyp von TFF3-überexprimierenden Adenokarzinomzellen zu Kontrollzellen untersucht werden. Aufgrund von bereits beschriebenen TFF3-abhängigen protektiven Effekten erschien die Testung der Zellen hinsichtlich eines möglichen anti-apoptotischen Effektes gegenüber unterschiedlichen negativen Stimuli zielführend. Da nicht kodierende RNAs wie miRNAs und lncRNAs hoch effiziente Regulatoren darstellen, stellten wir die Hypothese auf, dass das Zusammenspiel unterschiedlicher nicht kodierender RNAs für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein könnte. Unser Ziel war es, basale zelluläre Vorgänge, die TFF3-abhängig und auf Ebene nicht

kodierender RNAs einen Einfluss auf die Apoptose von Krebszellen haben könnten, zu verstehen. Literaturrecherchen und *in silico*-Analysen sollten eine Reihe vielversprechender miRNAs und lncRNAs in diesem Zusammenhang liefern. Eine antikorrelierte Expression dieser Kandidatengene und das Vorhandensein theoretischer Bindedomänen könnten Hinweise dazu liefern, ob eine gegenseitige Regulation nicht kodierender RNAs möglich ist. Reporterassays könnten zudem final den Beweis einer direkten Interaktion liefern. Die Rolle der identifizierten RNAs im Phänotyp TFF3-überexprimierender Adenokarzinomzellen könnte durch gezielte Herabregulierungen mittels siRNA oder aber simulierter Überexpression durch synthetisch hergestellte RNAs analysiert werden. Signalweganalysen mit Hilfe geeigneter chemischer Inhibitoren und Untersuchungen pro- und anti-apoptotisch wirkender Proteine könnten zusätzlich Rückschlüsse auf den Mechanismus der Regulation zulassen. Das gesammelte Wissen könnte eines Tages dazu beitragen, zum Beispiel eine TRAIL-basierte Krebstherapie noch effizienter zu gestalten. Unter Umständen wäre auch die direkte Beeinflussung der identifizierten, dysregulierten nicht kodierenden RNAs als neuartiger Therapieansatz bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorstellbar.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen (Sarstedt AG) kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen zu allen verwendeten Zelllinien befinden sich in Tabelle 1.

Tabelle 1 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, Hersteller, Ursprung der Zelllinie und Kulturbedingungen.

Zelllinie	Ursprung	Kulturbedingungen
HT-29/B6 (Kreusel, Fromm et al. 1991)	Humanes, epitheliales, colorectales Adenokarzinom	RPMI 1640 (F 1215, Biochrom AG) + 10 % FBS (FBS-Superior, S 0615, Biochrom AG) + 10 µg/ml Gentamycin (Biochrom)
HT-29/B6/htff3 (Meyer zum Buschenfelde, Tauber et al. 2006)	Humanes, epitheliales, colorectales Adenokarzinom	RPMI 1640 (F 1215, Biochrom AG) + 10 % FBS (FBS-Superior, S 0615, Biochrom AG) + 400 µg/ml Geneticin (G418)
HT-29/B6/mock	Humanes, epitheliales, colorectales Adenokarzinom	RPMI 1640 (F 1215, Biochrom AG) + 10 % FBS (FBS-Superior, S 0615, Biochrom AG) + 400 µg/ml Geneticin (G418)
HeLa (LGC Standards GmbH, ATCC® CCL-2TM)	Humanes Zervixkarzinom	RPMI 1640 (F 1215, Biochrom AG) + 10 % FBS (FBS-Superior, S 0615, Biochrom AG) + 10 µg/ml Gentamycin (Biochrom) + 200 mM L-Glutamin

Der Mediumwechsel erfolgte 2 – 3-mal pro Woche und die Zellen wurden wöchentlich bzw. bei einer erreichten Konfluenz zwischen 70 und 90 % passagiert. Zur Subkultivierung wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit warmem PBS (PAA Laboratories GmbH) gespült. Nach der Entfernung des PBS wurden die Zellen mit 3 ml Accutase (A6964, Sigma Aldrich GmbH) pro 75 cm² Kulturflasche überschichtet, 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und so von der Oberfläche abgelöst. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 9 ml Zellkulturmedium abgestoppt. 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau (0,5 %, Serva Heidelberg) vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.1.1 Transfektion

Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben mittels Elektroporation mit dem NucleofectorTM2b (Lonza Cologne AG). Hierzu wurden 2,25 x 10⁶ Zellen pro 75 cm² Kulturflasche zwei Tage vor geplanter Transfektion ausgesät und kultiviert. Die Zellen wurden

anschließend mit Accutase von der Oberfläche abgelöst, mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und 1×10^6 Zellen pro Transfektionsansatz für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Die Transfektion erfolgte in Elektroporationsküvetten (Lonza Cologne AG). Unmittelbar nach Transfektion wurden die Zellen mit vorgewärmtem Zellkulturmedium versorgt und für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss erfolgte, sofern nicht anders angegeben, die Überführung der Zellen in 6-Well Platten (Greiner Bio-One GmbH) in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml Kulturmedium pro Well, 96-Well E-plates des xCELLigence® Systems (ACEA Biosciences) oder 8-Well Objektträger (Sarstedt). Für die folgende Protein- oder RNA-Isolation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und lysiert.

3.1.1.1 HT-29/B6, HT-29/B6/htff3 und HT-29/B6/mock

HT-29/B6-Zellen und ihre Klone HT-29/B6/htff3 und HT-29/B6/mock wurden mit Kit L (Lonza Cologne AG) und dem Programm X-001 des Nucleofector™2b (Lonza Cologne AG) gemäß Herstellerangaben transfiziert.

3.1.1.2 HeLa

HeLa-Zellen wurden mit dem Kit R (Lonza Cologne AG) und dem Programm I-013 des Nucleofector™2b (Lonza Cologne AG) gemäß Herstellerangaben transfiziert.

3.1.1.3 miRNA-*mimics*

Die lyophilisierten miRNA-*mimics* (Life Technologies) wurden gemäß Herstellerangaben unter sterilen Bedingungen in nukleasefreiem Wasser in einer Konzentration von 50 pmol/μl (miRNA-*mimics*) gelöst. Für die Transfektion wurden 50 pmol miRNA-*mimics* und 50 pmol *nonsense*-Kontroll-RNA (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Sequenzen der verwendeten miRNA-*mimics* befinden sich in Tabelle 2.

Tabelle 2 Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten miRNA-*mimics* unter Angabe der Sequenz in 5´-3´-Orientierung

miRNA-<i>mimic</i>	Sequenz (5´-3´)
miR-326- <i>mimic</i>	CCU CUG GGC CCU UCC UCC AG
miR-329- <i>mimic</i>	AAC ACA CCU GGU UAA CCU CUU U
miR-491-5p <i>mimic</i>	AGU GGG GAA CCC UUC CAU GAG G

3.1.1.4 siRNA

Die kleine interferierende RNA (*small interfering RNA* (siRNA)) gegen PRINS (5'-UUUCUGGAAUGAUGUCCAA-3') (Eurofins Genomics) wurde gemäß Herstellerangaben unter sterilen Bedingungen in siRNA-Puffer (Eurofins Genomics) in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l aufgenommen. Für die Transfektion wurden 100 pmol siRNA und 100 pmol *nonsense*-Kontroll-RNA (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Für die Ergebnisse in Abschnitt 4.8 wurde eine siRNA gegen PRINS von Dharmacon in einer Konzentration von 100 pmol verwendet:

Sense Sequence: CCUAAACUGCUGUGUGAUUU

Antisense Sequence: UAUCACACAGCAGUUUAGGUU

3.1.2 xCELLigence®

Das xCELLigence® System (ACEA Biosciences) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die mit einem Gold-Sensor versehenen 96-Well E-plates (ACEA Biosciences) zeigen physiologische Veränderungen der Zellen durch Messung des elektronischen Widerstandes an, die durch den einheitslosen *cell index* repräsentiert werden. Der *cell index* wurde über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen alle 15 min gemessen. Zu Beginn wurde die E-plate mit 50 μ l Zellkulturmedium pro Well befüllt, um den Hintergrund ohne Zellen automatisch für die folgenden Messungen zu bestimmen und von den eigentlichen Messwerten abzuziehen. $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden in 50 μ l Zellkulturmedium pro Well hinzugegeben und für 20 min unter der Sterilbank stehen gelassen, um Verwirbelungen der Zellsuspension und somit heterogene Ergebnisse zu vermeiden. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen 4 Tage in der E-plate vorinkubiert, das Medium entfernt und die Zellen anschließend mit 40 ng/ml IFN- γ (CST) in Zellkulturmedium für 15 min präsensibilisiert. Das Medium wurde wiederum entfernt und es folgte die Behandlung mit 100 ng/ml TNF- α (Sigma Aldrich GmbH). Unbehandelte Kontrollen, die nur in Kulturmedium kultiviert wurden, dienten als Negativ-Kontrolle. Der *cell index* wurde, um Unterschiede im Proliferationsverhalten oder der anfänglich ausgesäten Zellzahl auszugleichen, unmittelbar nach Behandlung normalisiert.

Nach Transfektion wurden die Zellen 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend direkt in die E-plate überführt ($1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well). Nach weiteren 20 min Inkubation unter der Bank erfolgte der Beginn der Messungen. 24 h später wurden die Zellen wie oben bereits beschrieben mit IFN- γ vorsensibilisiert und mit TNF- α behandelt. Unbehandelte bzw. mit *nonsense*-Kontroll-RNA transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Normalisierung folgte ebenfalls unmittelbar nach Behandlung. Gegebenenfalls erfolgte eine

Basislinienkorrektur bezogen auf unbehandelte und mit *nonsense* RNA transfizierte HT-29/B6/mock ($cell\ index_{\text{Behandlung}} / cell\ index_{\text{mock nonsense, unbehandelt}}$).

3.1.3 Behandlung mit kleinen inhibitorischen Molekülen

Für die Behandlung mit kleinen inhibitorischen Molekülen wurden 5×10^5 HT-29/B6/htff3-Zellen pro Well einer 6-Well Platte (Greiner Bio-One GmbH) vier Tage vorinkubiert, das Medium entfernt, die Zellen mit vorgewärmtem PBS gespült und anschließend mit den in Kulturmedium gelösten Chemikalien behandelt. Alle Chemikalien stammten von Tocris Bioscience, dabei handelte es sich um AG490 mit einer finalen Konzentration von 50 μM , SCH7979 (1 μM), iCRT14 (50 μM) und LY-294002 (20 μM). Die Behandlung erfolgte für 90 min und 180 min.

3.2 RNA

3.2.1 RNA-Isolation

Das Zellmedium wurde entfernt und die zu lysierenden Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Zur Lyse und zur Isolierung der RNA wurde das miRVana miRNA Isolierungskit (Life Technologies GmbH) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.2 Qualitäts- und Quantitätskontrolle

Die Quantität und Qualität der isolierten RNA wurden zunächst mit dem Nano Drop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bei einer Absorption von 260 und 280 nm nach Herstellerangaben überprüft. Das Verhältnis der Absorption diente einer ersten Einschätzung, ob Kontaminationen der RNA durch Proteine oder Lösungsmittel vorliegen. Für Proben, die eine besonders hohe Reinheit der RNA für weiterführende Experimente voraussetzen, wurde zusätzlich der Agilent 2100 BioAnalyzer in Kombination mit dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent) nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.3 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

1 µg der gewonnenen RNA wurde hierzu vor der eigentlichen Synthese mit RNase freier DNase (Thermo Fisher Scientific), unter Verwendung von 10 X DNase Puffer mit MgCl₂ (Life Technologies), in einem Gesamtvolumen von 10 µl nach Herstellerangaben verdaut. Anschließend erfolgte die reverse Transkription. Bei mehr als zwei Proben pro Ansatz wurde zum Erreichen einer größeren Homogenität ein Mastermix vorbereitet. Um intra-experimentelle Abweichungen zu vermeiden und somit die Fehleranfälligkeit der Methode zu verringern, wurden durchgehend identische RNA-Konzentrationen eingesetzt. Die Proben wurden gründlich gemischt und anschließend bei 37 °C für 30 min mit Hilfe des Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies GmbH) inkubiert. Um die DNase-Reaktion abzustoppen, wurde anschließend 1 µl EDTA (25 mM) (Life Technologies) zu den Proben gegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für die nachfolgende reverse Transkription verwendet. Für die reverse Transkription DNase-behandelter RNA wurden hierzu 1 µl random Hexamere (0,2 µg) (Life Technologies) hinzugegeben und der Ansatz für 5 min bei 70 °C inkubiert.

In der fünfminütigen Inkubationszeit wurden 200 Units RevertAid™ reverse Transkriptase (Life Technologies), 0,2 µg random Hexamere (Life Technologies) und 200 µM dNTPs (Bioline GmbH) pro 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Als Negativkontrolle, um DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde eine Probe ohne reverse Transkriptase mitgeführt. Die Proben wurden

gut gemischt, kurz zentrifugiert und bei 25 °C für 10 min, 42 °C für 60 min und bei 70 °C für 10 min inkubiert. Die Proben wurden anschließend aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.4 Reverse Transkription- quantitative PCR (RT-qPCR)

Für die RT-qPCR wurde das StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies GmbH) mit dem SensiMix™SYBR Hi-ROX (Bioline GmbH) und MicroAmp® Fast96-Well Reaction Plates (Life Technologies GmbH) verwendet. Pro Reaktion wurden 0,2 mM genspezifische fw- und rev-Primer und der 2x Sensi Mix vermischt und 9 µl pro Well in die 96-Well Platte pipettiert. Die Primersequenzen für die verwendeten mRNA befinden sich in Tabelle 5. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma Aldrich GmbH bezogen. Am Ende wurde 1 µl der zuvor 1:5 verdünnten cDNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl am Rand jedes Wells hinzugegeben. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde folgendes Programm verwendet:

Tabelle 3 Darstellung des für die RT-qPCR verwendeten Amplifikations-Programmes. (*) steht für die Erfassung der Fluoreszenz

Temperatur	Zeit
95 °C	10 min
95 °C	15 sec
60 °C	20 sec
72 °C (*)	20 sec

x 40 Zyklen

Im Anschluss an die PCR folgte die Schmelzkurven-Analyse, um die Spezifität der RT-qPCR zu verfolgen. Die Schmelzkurve wurde erstellt, indem von 60 °C angefangen die Temperatur um 0,5 °C pro Minute auf 95 °C (gehalten für 15 sec) anstieg. Alle Reaktionen wurden mindestens als technische Duplikate und biologische Triplikate gemessen. Die Normalisierung erfolgte mittels $\Delta\Delta C_q$ -Methode. Die Berechnung hierzu ist folgend angegeben. Als Referenzgene wurden hierzu GAPDH, SDHA, B2M, SNORD44 und SNORD47 verwendet.

$$\Delta\Delta C_q = (C_qGOI(Probe) - C_qRef.(Probe)) - (C_qGOI(Kontrolle) - C_qRef.(Kontrolle))$$

C_q = Quantitation Cycle

GOI = Gene of interest (zu untersuchendes Gen)

Ref. = Referenzgen

Zur besseren Veranschaulichung wurde der x-fache Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle dargestellt, anhand der Formel:

$$x - \text{facher Unterschied} = 2^{-(\Delta\Delta C_q)}$$

3.2.5 RT-qPCR Array

Die Arrays wurden wie bereits oben beschrieben mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies GmbH), SensiMix™ SYBR Hi-ROX (Bioline GmbH) und MicroAmp® Fast96-Well Reaction Plates (Life Technologies GmbH) durchgeführt. Nach erfolgter reverser Transkription wurden 10 µl des gesamten cDNA-Ansatzes unverdünnt in die RT-qPCR eingesetzt und mit dem SensiMix und Wasser für eine komplette Platte wie folgt pipettiert:

Tabelle 4 Angabe eines typischen Reaktionsansatzes für einen kompletten RT-qPCR Array bei Verwendung einer 96-Well Platte nach erfolgter cDNA-Synthese.

Substanz	Volumen
cDNA	10 µl
2x SensiMix	480 µl
H ₂ O	374 µl

Gesamtvolumen 864 µl

Von dem unter Tabelle 4 aufgeführten Mastermix wurden 9 µl pro Well pipettiert und die Primer anschließend auf eine Arbeitskonzentration von 4 µM gebracht. Die passenden fw- und rev-Primer wurden im Verhältnis 1:2 vermischt und 1 µl dieser pro Well hinzugegeben. Die Normalisierung und Auswertung erfolgte wie bereits unter Punkt 3.2.4 beschrieben. Mindestens zwei technische und drei biologische Replikate wurden dabei pro Probe verwendet.

Tabelle 5 Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten mRNA-Primer unter Angabe der Sequenz in 5'-3'-Orientierung und der Accession Number (Accession No.).

mRNA Primer	Sequenz (5'-3')	Accession No.
BBC3 fw	CCT GGA GGG TCC TGT ACA ATC T	NM_014417.4
BBC3 rev	GCA CCT AAT TGG GCT CCA TCT	NM_001127242.2
BCL2 fw	GCC CTG TGG ATG ACT GAG TA	NM_000633.2
BCL2 rev	TCA CTT GTG GCC CAG ATA GG	
BCL2L11 fw	CAG ATC CCC GCT TTT CAT CT	NM_138621.4
BCL2L11 rev	TCT TGG GCG ATC CAT ATC TC	
BIRC3 fw	CCC TTT TCT TCC CCA TTC AT	NM_182962.2
BIRC3 rev	AAA CCA GCA CGA GCA AGA CT	NM_001165.4
BNIP3L fw	CGG CGG ACT CGG CTT GTT GT	NM_004331.2
BNIP3L rev	GCT CCA CCC AGG AAC TGT TGA GG	
BTG1 fw	CTG TTC AGG CTT CTC CCA AG	NM_001731.2
BTG1 rev	TCG TTC TGC CCA AGA GAA GT	
GAPDH fw	CCA TCT TCC AGG AGC GAG AT	NM_002046.5
GAPDH rev	CTA AGC AGT TGG TGG TGC AG	
IRAK3 fw	CTT CCG GTC CCA CCT AGA AC	NM_007199.2
IRAK3 rev	CCA GGC CTC TCT TCT CCA TC	
SDHA fw	TGG GAA CAA GAG GGC ATC TG	NM_001294332.1
SDHA rev	CCA CCA CTG CAT CAA ATT CAT G	NM_004168.3
PDGF2 fw	CTT GCA CAC TTC CCC ATC TT	NM_033016.3
PDGF2 rev	AGG GGG AAA GTG CAG TAG GT	NM_002608.3
PLCG2 fw	GCC TCA GAG AAC CGT GAA AG	NM_002661.4
PLCG2 rev	GGA TGG GAA GTA CTG CTG GA	
PMAIP1 fw	AAG AAG GCG CGC AAG AAC	NM_021127.2
PMAIP1 rev	TCA GGT TCC TGA GCA GAA GAG	
TFF3 fw	CTC CAG CTC TGC TGA GGA GT	NM_003226.3
TFF3 rev	GCT TGA AAC ACC AAG GCA CT	
TNF- α fw	CCC TGA AAA CAA CCC TCA GA	NM_000594.3
TNF- α rev	AAG AGG CTG AGG AAC AAG CA	
TNFRSF10c fw	CCT ACC GTT AGG GAA CTC TGG	NM_003841.3
TNFRSF10c rev	GGC AGT GGT GGC AGA GTA AG	
TNFRSF6 fw	TCA GTA CGG AGT TGG GGA AG	NM_000043.5
TNFRSF6 rev	CAG GCC TTC CAA GTT CTG AG	NM_152872.3
TP53 fw	GTT CCG AGA GCT GAA TGA GG	NM_001126118.1
TP53 rev	TCT GAG TCA GGC CCT TCT GT	

3.2.6 Reverse Transkription für miRNA

Der quantitative Nachweis der miRNA erfolgte nach Sharbati-Tehrani et al. (2008). 50 ng RNA wurden zunächst mit 250 fmol miRNA-spezifischem Primer (RT6-miR-x) und nukleasefreiem Wasser im Gesamtvolumen von 6 µl in einem Thermocycler bei 70 °C für 5 min inkubiert. Die Sequenzen der RT6-Primer befinden sich in Tabelle 6 und wurden von der Firma Sigma Aldrich GmbH bezogen. Anschließend wurden 1 mM dNTPs (Life Technologies), 100 U RevertAid™ reverse Transkriptase (Life Technologies), 2 µl 5 x RT Puffer (Life Technologies), Wasser und der RNA-Primer-Mix auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. Der komplette Ansatz wurde bei 37 °C für 5 min, 42 °C für 120 min und 70 °C für 10 min inkubiert. Der RT6-Primer bindet durch seine 6 komplementären Basen am 3' Ende der Ziel-miRNA und produziert zudem einen 5' Überhang.

Tabelle 6 Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten RT6-miR-x Primer unter Angabe der Sequenz in 5'-3'-Orientierung.

RT6-miR-x Primer	Sequenz (5'-3')
miR-16	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT CGC CAA
miR-21	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT TCA ACA
miR-124	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT GGC ATT
miR-155	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT ACC CCT
miR-326	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT CTG GAG
miR-329	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT AAA GAG
miR-491	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT CCT CAT
miR-506	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT TCT ACT
miR-539	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT ACA CAC
miR-629	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT AGT TCT
SNORD 44	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC AGT CAG
SNORD 47	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC AAC CTC

3.2.7 RT-qPCR für miRNA (miR-Q)

Für die RT-qPCR wurden 2 µl unverdünnter cDNA-Ansatz verwendet. Zuvor wurden pro Probe, die unter Tabelle 7 aufgeführten Substanzen zusammengemischt. Auch hier bietet sich die Herstellung eines Mastermixes bei mehreren Proben an. Um die miRNA zu quantifizieren ist der miRNA-spezifische Primer miR-x-Rev notwendig, der am 3' Ende der generierten cDNA hybridisiert und somit einen Überhang am 3' Ende produziert. Durch diesen und den zuvor bei der reversen Transkription gebildeten 5' Überhang kann die finale Amplifikation mit den beiden universellen Primern MP fw (5' TGTCAGGCAACCGTATTCACC 3') und MP rev

(5'CGTCAGATGTCCGAGTAGAGG 3') stattfinden. Die Sequenzen der miR-Rev-Primer befinden sich in Tabelle 9.

Tabelle 7 Angabe eines einfachen Reaktionsansatzes für eine RT-qPCR zur Amplifikation von miRNA (miR-Q).

Substanz	Volumen pro Reaktion
miR-x-Rev-Primer	0,4 µl
MP fw Primer	0,1 µl
MP rev Primer	0,1 µl
2x SensiMix	5,0 µl
H ₂ O	2,4 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	8 µl

Der gesamte Ansatz von 10 µl wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen inkubiert:

Tabelle 8 Darstellung des für miR-Q verwendeten Amplifikations-Programmes. (*) steht für die Erfassung der Fluoreszenz *

Temperatur	Zeit
95 °C	2 min
95 °C	15 sec
60 °C	20 sec
72 °C (*)	20 sec

x 40 Zyklen

Eine Schmelzkurve wurde erstellt, indem von 60 °C angefangen die Temperatur um 0,5 °C pro Minute auf 95 °C (gehalten für 15 sec) anstieg. Auch hier wurden pro Probe mindestens zwei technische und drei biologische Replikate verwendet. Die Normalisierung und Auswertung erfolgte anhand der Referenzgene SNORD44 und SNORD 47 wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben.

Tabelle 9 Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten miR-x-Rev Primer unter Angabe der Sequenz in 5'-3'-Orientierung

miR-Rev Primer	Sequenz (5'-3')
miR-16	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GTA GCA GCA CGT AAA TAT T
miR-21	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GTA GCT TAT CAG ACT GA
miR-124	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GTA AGG CAC GCG GTG AAT
miR-155	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GTT AAT GCT AAT CGT GAT AGG
miR-326	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GCC TCT GGG CCC TTC CTC
miR-329	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GAA CAC ACC TGG TTA ACC TC
miR-491	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GAG TGG GGA ACC CTT CCA TG
miR-506	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GTA AGG CAC CCT TCT GAG T
miR-539	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GGG AGA AAT TAT CCTTGG TG
miR-629	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GTG GGT TTA CGT TGG GAG A
SNORD 44	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG CCT GGA TGA TGA TAA GCA AAT G
SNORD 47	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG AAC CAA TGA TGT AAT GAT TCT GC

3.2.8 miR-Q-Array

Der miR-Q-Array erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie es bereits unter Punkt 3.2.5 beschrieben wurde. Die nach reverser Transkription entstandene cDNA wurde komplett oder zur Hälfte in einem Mastermix mit SensiMix™SYBR Hi-ROX (Bioline GmbH), je 100 nM eines MP-fw/rev Primer-Mixes und Wasser gemischt und 9 µl pro Well in eine MicroAmp® Fast96-Well Reaction Plate (Life Technologies GmbH) pipettiert. 1 µl der miRNA spezifischen Primer miR-x-Rev (finale Konzentration 5 nM) wurden am Ende pro Well hinzugegeben, die Platte kurz zentrifugiert und das unter Tabelle 8 angegebene Programm im StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies GmbH) durchgeführt. Alle Proben wurden als technische Duplikate gemessen, wobei die Anzahl der biologischen Replikate n=3 betrug. Die Normalisierung und Auswertung erfolgte anhand der Referenzgene SNORD44 und SNORD47 wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben.

3.2.9 Auswahl der lncRNA

Die Auswahl der getesteten lncRNA erfolgte nach Pawar und Kollegen (Pawar, Hanisch et al. 2016). Kurz zusammengefasst wurden 17 verschiedene lncRNA mit Hilfe der Datenbank lncRNADB mit immunrelevanter Funktion gesucht. Die Sequenzen wurden ebenfalls von dieser

Datenbank verwendet, wobei die Synthese der Oligonukleotide von der Sigma Aldrich GmbH durchgeführt wurde. Die Liste mit den verwendeten Primersequenzen befindet sich in Tabelle 10.

Tabelle 10 Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten lncRNA Primer unter Angabe der Sequenz in 5'-3'-Orientierung und der Accession Number.

lncRNA Primer	Sequenz (5'-3')	Accession No.
ANRIL fw	ACCCAGGCTGGAGTGTATTG	NR_003529.3
ANRIL rev	TAG TCC CAG CTG CTC AGG TT	
EGO fw	TAA TCA GCT CAG GGG GTC AC	NR_004428.1
EGO rev	ATACCCAATTCCCTGCCTTC	
GAS5 fw	AGAAATGCAGGCAGACCTGT	NR_002578.2
GAS5 rev	GCACTCTAGCTTGGGTGAGG	
H19 fw	TTCAAAGCCTCCACGACTCT	NR_002196.1
H19 rev	CTGAGACTCAAGGCCGTCTC	
NEAT1 fw	GTGGCTGTTGGAGTCGGTAT	NR_028272.1
NEAT1 rev	ATTCACTCCCCACCCTCTCT	
NRON fw	CCCCATTTACAGAGGAAGA	NR_045006.1
NRON rev	TTGGGCCTTCTTTACACCAC	
PRINS fw	GGAATGTGGCCTGTGTTCTT	NR_023388.1
PRINS rev	AGGGACAACCACATCAAAGC	
PTENP1 fw	AGTTCCTCAGCCGTTACCT	NR_023917.1
PTENP1 rev	AGGTTTCCTCTGGTCCTGGT	
SNORD 47 fw	TGATGTAATGATTCTGCCAAATG	NR_002746.1
SNORD 47 rev	ACCTCAGAATCAAATGGAACG	
WT1 fw	CCTGAGCTAAGCACCAGGAC	NR_023920
WT1 rev	GTACAGGAGAGCGCCTATCG	

3.2.10 Reverse Transkription für lncRNA

Für die reverse Transkription der lncRNA wurde aufgrund der geringen Expression das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Pro Reaktion wurde 1 µg RNA eingesetzt. Zudem wurde die Reaktionszeit von 15 auf 30 min verlängert und die Temperatur von 50 auf 60 °C erhöht.

3.2.11 RT-qPCR für lncRNA

Die Expressionsanalysen wurden mit dem SensiMix SYBR Hi-ROX Kit (Bioline GmbH) und dem StepOnePlus Cycler (Life Technologies) durchgeführt. Alle Experimente wurden in

MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plates (Life Technologies) angesetzt. Die Analyse fand in einem 10 µl Ansatz bestehend aus 2 x SensiMix SYBR Hi-ROX (Life Technologies), je 0,1 µM forward und reverse Primer und 1 µl der unverdünnten cDNA statt. Durch die Verwendung von mindestens drei biologischen und zwei technischen Replikaten bietet sich auch hier die Verwendung eines Mastermixes an, um eine größere Homogenität zu gewährleisten. Wasser anstelle der cDNA diente als Negativkontrolle. Das unter Tabelle 11 angegebene Programm wurde für die Real-time-Amplifikation verwendet.

Tabelle 11 Darstellung des für IncRNA verwendeten RT-qPCR Amplifikations-Programmes. (*) steht für die Erfassung der Fluoreszenz *

Temperatur	Zeit
95 °C	2 min
95 °C	15 sec
60 °C	20 sec
72 °C (*)	30 sec

x 40 Zyklen

Das Fluoreszenzsignal wurde bei 60 °C gemessen. Eine Schmelzkurve wurde erstellt, indem von 60 °C angefangen die Temperatur um 0,5 °C pro Minute auf 95 °C (gehalten für 15 sec) anstieg. Die Normalisierung und Auswertung erfolgte anhand der Referenzgene SNORD 47, GAPDH und SDHA wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben.

3.2.12 RT-qPCR für IncRNA Array

Der Array der IncRNA erfolgte größtenteils gemäß der Angabe von Punkt 3.2.5. Pro Platte wurde ein Mastermix in einem Gesamtvolumen von 675 µl hergestellt, bestehend aus 2 x SensiMix SYBR Hi-ROX (Life Technologies) und 20 µl der unverdünnten RT-Reaktion (aus 3.2.10). 9 µl des Mastermixes werden pro Well der 96 Well Platte vorgelegt und anschließend 1 µl eines 2 µM Primer Mixes hinzugegeben. Dieser Mix besteht aus den bereits erwähnten IncRNA-spezifischen forward und reverse Primern. Das Programm für die Real-time-Amplifikation stimmt mit dem unter Tabelle 11 beschriebenen überein. Alle Experimente wurden mit mindestens drei biologischen und 2 technischen Replikaten durchgeführt. Die Normalisierung und Auswertung erfolgte anhand der Referenzgene SNORD 47, GAPDH und SDHA wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben.

3.3 DNA

3.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Primer

Alle verwendeten Primer für PCR-Reaktionen stammen von der Sigma Aldrich GmbH. Die PCR wurde mit der OneTaq Polymerase (NEB) oder Q5 Polymerase (NEB) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Als Cycler wurde der T_{Gradient} Thermal Cycler (Biometra) und der Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies GmbH) verwendet. Die Sequenzierung der gewonnenen Amplifikate wurde von der GATC Biotech AG durchgeführt.

3.3.2 Quantitäts- und Qualitätskontrolle

Die Quantität und Qualität der isolierten DNA wurden zunächst mit dem Nano Drop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bei einer Absorption von 260 und 280 nm nach Herstellerangaben überprüft. Das Verhältnis der Absorption diente einer ersten Einschätzung, ob Kontaminationen der DNA durch Proteine oder Lösungsmittel vorliegen.

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde LE Agarose (Biozym Diagnostik GmbH) verwendet. Je nach erwarteter Amplifikatgröße wurden Agarosegele in einer Konzentration zwischen 1 und 2 % gegossen. Die Elektrophorese selbst fand bei 80 – 90 Volt mit TAE-Puffer (Carl Roth GmbH) in horizontalen Elektrophoresekammern statt. Sobald die Lauffront des Ladepuffers das Ende des Gels erreicht hatte, folgte die Visualisierung der DNA durch Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) (Carl Roth GmbH). Je nach Verwendung wurden DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) aufgereinigt.

3.3.4 Ethanolfällung zur Isolierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurehaltige Lösungen wurden hierzu mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 4 Volumen eiskaltem Ethanol (95 %) versetzt. Es folgte die Inkubation bei -20 °C über Nacht. Anschließend wurden die Proben bei 16.000 x g für 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.4 Proteine

3.4.1 Isolierung und SDS-PAGE

Die Zellen wurden zunächst mit Accutase behandelt und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultivierungsmedium aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 500 x g. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert wurden, wurde das Zellpellet in, mit Protease Inhibitor Cocktail (P8340, Sigma Aldrich GmbH) vermengten, RIPA Puffer (Cell Signaling Technology) aufgenommen und auf Eis für 60 min zur Lyse inkubiert. Die Quantifizierung des Gesamtproteins erfolgte mit dem 2-D Quant Kit (GE Healthcare Europe GmbH) gemäß Herstellerangaben. Die Proben wurden mit 4 x Roti-Load I (Carl Roth GmbH) versetzt und im Wasserbad für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Hierzu wurden Trenngele mit einer Acrylamid-Konzentration von 8 – 15 % (Carl Roth GmbH) verwendet und Sammelgele mit einer Konzentration von 5 % (siehe Tabelle 12). Zur Herstellung der Gele sollten alle benötigten Substanzen, wenn möglich, gekühlt verwendet werden, um die Polymerisierung zu verzögern. Zunächst wurde die Trenngellösung in die entsprechende Gießvorrichtung gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Isopropanol abgegossen, die Sammelgellösung hinzugegeben und die Kämme (0.75 mm Dicke; 10 Zähne) eingeführt.

Tabelle 12 Auflistung aller Chemikalien und Volumina, die für die Herstellung von 10%igen Acrylamid-Gele zur Verwendung im SDS-Page eingesetzt werden.

Acrylamid-Gele	Trenngellösung (10 %)	Sammelgellösung (5 %)
Acrylamid 40 %	7.5 ml	2.5 ml
ddH ₂ O	14.4 ml	14.5 ml
Trenngelpuffer (1.5 M Tris/HCl, pH 8.8)	7.5 ml	-
Sammelgelpuffer (1 M Tris/HCl, pH 6.8)	-	2.5 ml
SDS 10 %	0.3 ml	0.2 ml
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	0.12 ml	0.12 ml
TEMED	0.04 ml	0.04 ml

Alternativ wurden für Proteine < 20 kDa Tricin-Gele hergestellt. Die Herstellung erfolgt nach demselben Schema wie die für SDS-Gele nur mit den unter Tabelle 13 angegebenen Chemikalien.

Tabelle 13 Auflistung aller Chemikalien und Volumina, die für die Herstellung von Tricin-Gelen zur Verwendung im SDS-Page eingesetzt werden.

Tricin-Gele	Trenngellösung	Sammelgellösung
Acrylamid 40 %	4,5 ml	0,972 ml
Tris/HCl-SDS-Puffer	3,33 ml	1,86 ml
ddH ₂ O	1,1 ml	4,67 ml
Glycerol	1,05 ml	-
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	0,05 ml	0,04 ml
TEMED	0.045 ml	0.045 ml

Die Elektrophorese mit der GE Amersham, SE 250-Apparatur erfolgte unter Kühlung (10 °C) und Elektrodenpuffer (25 mM Tris; 250 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) bei einer Stromstärke von 20 mA. Anstelle des Elektrodenpuffers wurden für die Elektrophorese von Tricin-Gelen Anodenpuffer (0,2 M Tris-HCl, pH 8,9) und Kathodenpuffer (0,1 M Tris; 0,1 M Tricin; 0,1 % SDS) verwendet.

3.4.2 Western Blot

Der Transfer der Proteine auf 0,2 µm (Proteine < 20 kDa) oder 0,45 µm (> 20 kDa) PVDF Membranen (Amersham HybondTM-P, GE Healthcare Europe GmbH) wurde mit Hilfe der TE 77 ECL Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH) und Towbinpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) bei 0,8 mA/cm² für 25 - 75 min durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran 5 min in TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 + 0,1 % Tween 20) gewaschen. Zur Blockierung der Membran wurde 5%ige Milchpulverlösung (Carl Roth GmbH) in TBS-T verwendet und über Nacht bei 4 °C und leichtem Schütteln oder für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper wurde in 5 % Milchpulverlösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Nachdem die Membran 3-mal 15 min mit TBS-T gewaschen wurde, folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers in 5 % Milchpulverlösung mit der Membran für 1 h bei Raumtemperatur. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Antikörper sowie deren genutzte Verdünnung befinden sich unter Tabelle 14. Die Detektion erfolgte nach 3maligem Waschen mit TBS-T

(5 min) mit Hilfe des ECL Select™ Western Blot Detection Reagent (GE Healthcare) gemäß Herstellerangaben.

Tabelle 14 Auflistung aller verwendeten Antikörper zur Detektion von Proteinen im Western Blot oder durch Immunfluoreszenzmikroskopie unter Angabe der optimalen Verdünnung. Zusätzlich ist die Position der phosphorylierten Aminosäure angegeben und die Artikelnummer des Herstellers.

Antikörper	Verdünnung
β-Actin (Santa Cruz)	1:500
GAPDH (CST # D16H11)	1:2000
Pho-AKT (Ser473) (CST # D9E)	1:2000
Pan-AKT (CST # C67E7)	1:1000
Pho-PDK1 (Ser241) (CST #C49H2)	1:1000
Pan-P70-S6K (CST # 49D7)	1:1000
Pho-P70-S6K (Ser371) (CST # 9208)	1:1000
Pho-P70-S6K (Thr389) (CST # 108D2)	1:2000
HRP markierter anti-Mouse IgG (NEB)	1:2000
HRP markierter anti-Rabbit IgG (NEB)	1:2000 – 1:10000
PMAIP1 (CST #D8L7U)	1:750
FOXK1(CST #12025)	1:1000
FOXK2(CST #12008)	1:1000
PCNA (ab92552)	1:3000

3.4.3 Western Blot Wiederverprobung

Es ist möglich einen Blot neu mit Antikörpern zu beproben, um weitere Proteine zu detektieren. Um das Antikörpersignal der ersten Detektion zu löschen, wurde das Western Blot Reprobing Protocol von Cell Signaling verwendet. Nach erfolgter Detektion wurde die Membran 5-mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 30 min unter leichtem Schütteln in Stripping Buffer (63 mM Tris, 2 % SDS und 0,7 % β-Mercaptoethanol, pH 6,8) bei 50 °C inkubiert und anschließend 4-mal 5 min mit TBS-T gewaschen. Um zu überprüfen, ob das Originalsignal tatsächlich vollständig verschwunden ist, ist eine weitere Detektion mit Hilfe des ECL Select™ Western Blot Detection Reagent (GE Healthcare) möglich. Für die Detektion eines weiteren Proteins konnte die Membran nun erneut verwendet und mit dem Blockierschritt in 5 % Milchpulverlösung fortgefahren werden.

3.4.4 Isolierung nukleärer und zytoplasmatischer Proteine aus einer Probe

Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Accutase von ihrer Wachstumsfläche abgelöst und anschließend bei 550 x g für 5 min zentrifugiert, mit PBS

resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde, zur Trennung der nukleären und zytoplasmatischen Proteine, zunächst in PBSI (Tabelle 16) resuspendiert und anschließend 5 min bei 550 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer A (Tabelle 15) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis folgte die Zentrifugation für 30 sec bei 2600 x g. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und beinhaltete die zytosolischen Proteine. Das Pellet wurde mit 66 µl Puffer B (Tabelle 15) resuspendiert und 5 sec mit Ultraschall behandelt (constant duty cycle, output control 1; Branson Sonifier 250). Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 10.400 x g. Der gewonnene Überstand enthielt die nukleären Proteine und wurde im Verhältnis 1:2 mit Puffer C (Tabelle 16) verdünnt. Die Überstände wurden bei -20 °C gelagert. SDS-PAGE und Western Blot-Analysen sind den Punkten 3.4.1 und 3.4.2 zu entnehmen. Als Ladekontrolle wurde eine Ponceau- und Coomassie-Färbung durchgeführt, um den Gesamtproteingehalt der Proben zu überprüfen und vergleichen zu können.

Tabelle 15 Auflistung aller Chemikalien und Konzentrationen, die für die Trennung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen benötigt werden. Dargestellt ist die Zusammensetzung von Puffer A und B.

Puffer A	Puffer B
10 mM HEPES	20 mM HEPES
1,5 mM MgCl ₂ x6H ₂ O	1,5 mM MgCl ₂ x6H ₂ O
10 mM KCl	420 mM NaCl
300 mM Saccharose	0,2 mM EDTA
0,5 % IGEPAL	2,5 % Glycerin
1 mM Na-Vanadat	1 mM Na-Vanadat
0,5 mM DTT	0,5 mM DTT
1x Protein Inhibitor Cocktail (PIC)	1x Protein Inhibitor Cocktail (PIC)
25 mM β-Glycerophosphat-dinatriumsalz	25 mM β-Glycerophosphat-dinatriumsalz
10 mM NaF	10 mM NaF

Tabelle 16 Auflistung aller Chemikalien und Konzentrationen, die für die Trennung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen benötigt werden. Dargestellt ist die Zusammensetzung von Puffer C und PBSI.

Puffer C	PBSI
20 mM HEPES	PBS
100 mM KCl	1x Protein Inhibitor Cocktail (PIC)
0,2 mM EDTA	25 mM β -Glycerophosphat- dinatriumsalz
8 % Glycerin	10 mM NaF
1 mM Na-Vanadat	
0,5 mM DTT	
1x Protein Inhibitor Cocktail (PIC)	
25 mM β -Glycerophosphat- dinatriumsalz	
10 mM NaF	

3.4.5 Protein-Silberfärbung nach Blum

Nach durchgeführter Proteinisolierung und SDS-PAGE wurde das Gel aus der Gießapparatur entfernt und anschließend für mindestens 2 h oder über Nacht in Fixierlösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure in Wasser) inkubiert. Nachdem das Gel 3-mal für 20 min mit 30%igem Ethanol gewaschen wurde, folgte eine Inkubation für 1 min in einer 0,02%igen Natriumthiosulfatlösung (Carl Roth GmbH). Die Lösung wurde durch dreimaliges Waschen in Wasser entfernt und das Gel anschließend für 20 min in einer 0,2%igen Silbernitratlösung (Carl Roth GmbH) inkubiert. Auch diese Lösung wurde anschließend durch kurze Waschschrte mit Wasser entfernt und das Gel ca. 5 min in Entwicklerlösung (3 % Natriumcarbonat (Carl Roth GmbH), 0,05 % Formaldehyd (Carl Roth GmbH), 0,0004 % Natriumthiosulfat) inkubiert. Die Entwicklung richtete sich nach rein subjektiven Einschätzungen, je nachdem wie intensiv die Färbung der Proteinbanden ausfallen sollte. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem das Gel kurz mit Wasser gespült und anschließend für 5 min in einer 0,05%igen Glycinlösung inkubiert wurde.

3.4.6 Protein-Coomassie (G250)-Färbung

Nachdem das Gel für 10 min in Fixierlösung (40 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) fixiert wurde, erfolgte die Färbung der SDS-Gele durch Kochen in einer 0,1%igen Coomassie G250-Färbelösung (Merck KGaA) in einer Mikrowelle für 30 – 60 sec. Für die Entfärbung wurde das Gel in 10%iger Essigsäure (Carl Roth GmbH) bei ständigem Schütteln solange inkubiert, bis der Hintergrund vollständig entfärbt war.

3.4.7 Protein-Ponceau-Färbung

Für die Ponceau-Färbung wurde eine Fertiglösung von Sigma Aldrich GmbH verwendet. Die PVDF-Membran wurde nach dem Transfer der Proteine mit TBS-T gewaschen. Trockene Membranen wurden so lange in TBS-T inkubiert bis eine komplette Durchnässung der Membran sichtbar war. Es folgte die Inkubation in Ponceau-Färbelösung für 5 - 10 min. Die Färbelösung wurde abgegossen und die Membran so lange mit Wasser entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abgehoben haben. Um den Kontrast zu verstärken, wurden die Membranen bei Raumtemperatur getrocknet.

3.4.8 Co-Immunpräzipitation durch magnetische Separierung

Bei der Durchführung der Experimente wurde sich am Protokoll von CST (*Immunoprecipitation Protocol Utilizing Magnetic Separation For Analysis By Western Immunoblotting*) orientiert (<http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=ip-magnetic>).

3.4.8.1 Herstellung von Zelllysaten

Um eine direkte Protein-RNA-Interaktion nachzuweisen, wurden 8×10^6 HT-29/B6/hTff3 pro 75 cm^2 Kulturflasche ausgesät und für vier Tage bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5 \text{ } \%$ CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1-mal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und mit Formaldehyd ($3,7 \text{ } \%$ in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Unfixierte Zellen dienten als Kontrolle und wurden hierfür mit dem gleichen Volumen PBS überschichtet. Nach zwei Waschschrritten mit kaltem PBS wurden $750 \text{ } \mu\text{l}$ Cell Lysis Buffer (NEB; 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, $1 \text{ } \%$ Triton X-100, $2,5 \text{ mM}$ Natriumpyrophosphat, 1 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Na_3VO_4 , $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 mM frisch hinzugegebenes PMSF (Sigma Aldrich GmbH)) pro 75 cm^2 Kulturflasche hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt) wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst, in $1,5 \text{ ml}$ Eppendorfgefäße überführt und das Lysat anschließend 3-mal für 5 sec ultraschallbehandelt (constant duty cycle, output control 1; Branson Sonifier 250). Nach einem 10minütigen Zentrifugationsschritt bei $14.000 \times g$ wurde der Überstand in ein frisches $1,5 \text{ ml}$ Eppendorfgefäß überführt.

3.4.7.1 Vorreinigungen der magnetischen Teilchen und der Zelllysate

$40 \text{ } \mu\text{l}$ magnetische Teilchen (Protein G Magnetic Beads; NEB) pro Ansatz wurden 1-mal mit Cell Lysis Buffer (NEB) gewaschen. Um die Proteine zu entfernen, die unspezifische Bindungen zu den magnetischen Teilchen eingehen können, wurden $200 \text{ } \mu\text{l}$ Lysat für 2 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und langsamer Rotation gemeinsam mit den gewaschenen magnetischen Teilchen

inkubiert. Die magnetischen Teilchen wurden entfernt und das gereinigte Lysat konnte für die Präzipitation verwendet werden.

3.4.8.2 Immunpräzipitation

Das vorgereinigte Lysat wurde mit anti-PMAIP1 Primärantikörper (CST) in einer Verdünnung von 1:100 über Nacht bei vorsichtiger Rotation und 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 40 µl gewaschene magnetische Teilchen hinzugegeben und die Mischung für 4 h bei 4 °C und langsamer Rotation inkubiert. Der Überstand wurde als spätere Kontrolle in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die magnetischen Teilchen 3-mal mit Cell Lysis Buffer gewaschen. Am Ende folgte die Resuspendierung der magnetischen Teilchen in 3 x SDS-Probenpuffer (187.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6 % w/v SDS, 30 % Glycerol, 150 mM DTT, 0.03 % w/v Bromphenolblau; (#7722, Blue Loading Buffer Pack)) und das Erhitzen auf 95 °C für 5 min. Die magnetischen Teilchen wurden kurz herunterzentrifugiert. Das vorgereinigte Lysat, der Überstand nach Kopplung der magnetischen Teilchen an die Lysat-Antikörper-Mischung und die Überstände von diversen Waschschritten dienten als Kontrolle und wurden zusammen mit der präzipitierten Probe auf ein Tricin-Gel aufgetragen. Nachfolgend wurden Silberfärbungen zum Gesamtproteinnachweis und Western Blot-Analysen zum Nachweis von PMAIP1 durchgeführt.

3.4.8.3 Nachweis von PRINS nach PMAIP1-Präzipitation

Um die RNA am präzipitierten Protein analysieren zu können, wurden die Punkte aus Abschnitt 3.4.8, abgesehen von der Aufnahme der magnetischen Teilchen in 3 x SDS-Probenpuffer, mit unfixierten Proben befolgt. Stattdessen wurden die magnetischen Teilchen und der Überstand für 60 min bei 37 °C mit RNase A (20 ng/ml) in RNase-Puffer (50 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) behandelt, um den nicht-proteingebundenen RNA-Anteil zu entfernen. Nach der Inkubation folgten diverse Waschschrritte (1 x 5 min mit Cell Lysis Buffer unter leichter Rotation, 2 x 5 min mit dem Stellaris® Waschpuffer A, 1 x 5 min mit dem Stellaris® Waschpuffer B) und die Behandlung mit 200 µg/ml Proteinase K in Cell Lysis Buffer (NEB), um die Bindung zwischen dem präzipitierten Protein (RNA Binding Proteins (RBP)) und der RNA zu lösen. Hierzu wurden die Proben bei 37 °C für 30 min erwärmt. Anschließend folgte für alle Ansätze eine Ethanolfällung, um die Präzipitation von Nukleinsäuren zu erreichen. Das entstandene Pellet wurde in 300 µl Lysepuffer aus dem miRVana miRNA Isolierungskit (Life Technologies GmbH) resuspendiert und die RNA gemäß Herstellerangaben isoliert. Die isolierte und gereinigte RNA wurde gemäß Punkt 3.2.3 durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Amplifizierung PRINS-spezifischer Sequenzen erfolgte durch eine PCR gemäß Punkt 3.3.1 unter Verwendung der Q5 Polymerase (NEB) und der PRINS-Primer PRINS fw (5'-AGCGACTGGGAACAATGAC-3') und PRINS rev (5'-

ACAGGAGTGGCCTGATTCG-3'). Grundlage für die Generierung der Primer war der Datenbankeintrag für die PRINS-Sequenz HG975433.1. Die Detektion des Amplikons wurde nach Punkt 3.3.3 mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur besseren Übersicht sind die wichtigsten Schritte der Methode unter Abbildung 4 zusammengefasst.

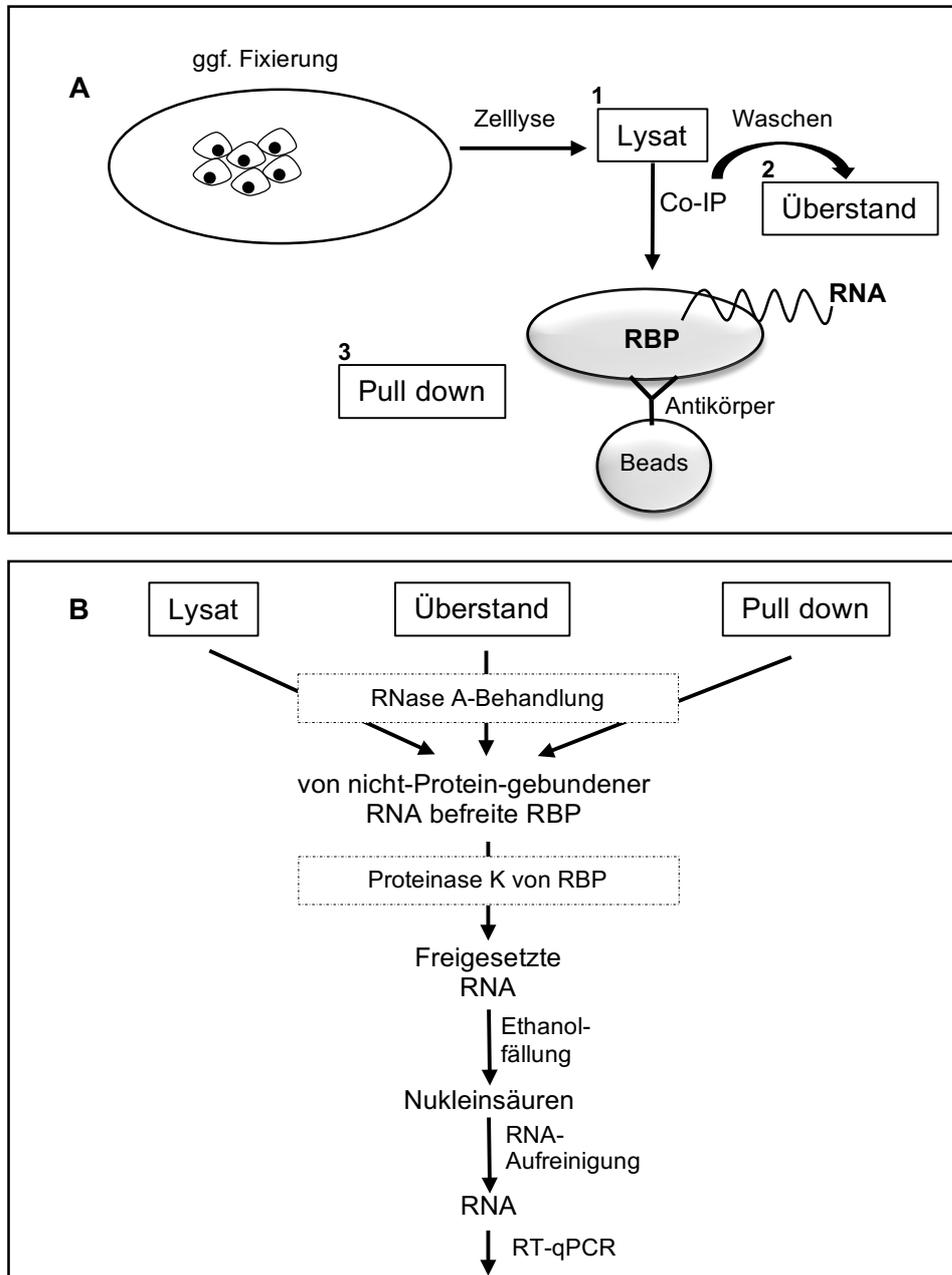


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Co-IP-Prinzips (A). Nach der ggf. erfolgten Fixierung der Zellen mit Formaldehyd folgte die Lysierung der Zellen und die weitere Aufbereitung der Proben durch eine Co-IP. In Rechtecken und nummeriert sind die Proben gekennzeichnet, die im weiteren Vorgehen zum RNA-Nachweis verwendet wurden (B).

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

3.5.1 Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) und Caspase-Assay

Sofern nicht anders angegeben, wurden 5×10^4 Zellen pro Well eines 8-Well tissue culture chamber slides (Sarstedt) 6 h nach Transfektion oder nach viertägiger Vorinkubation mit 40 ng/ml IFN- γ für 15 min behandelt, kurz mit PBS gewaschen und anschließend für 24 h inkubiert in 100 ng/ml TNF- α in RPMI-Medium, supplementiert mit 10 % FCS und G418. Medium ohne IFN- γ und TNF- α diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und für mindestens 10 min bei Raumtemperatur in 3,7 % Formaldehyd fixiert. Das Formaldehyd wurde entfernt, die fixierten Zellen 2-mal 5 min mit PBS gewaschen und diese anschließend 30 min in 0,1 % Tween-100 in 1 % BSA in PBS blockiert und permeabilisiert, um nachfolgende unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern und zytosolische Proteine zugänglich zu machen. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper anti-Caspase-3 (NEB) (1:1000), anti-FOXK1 (1:400), anti-FOXK2 (1:400) oder anti-PMAIP1 (1:400) verdünnt in 1 % BSA in PBS. Es folgten zwei Waschschrte für jeweils 5 min mit PBS und eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Rabbit 594 (NEB) bzw. anti-Rabbit 488 (NEB) in einer Verdünnung 1:200 in 1 % BSA in PBS. Gegebenenfalls wurden die Zellen zur Färbung der Aktin-Fasern für 20 min bei Raumtemperatur mit Phalloidin (Phalloidin 488 #49409 Atto 488 von Sigma Aldrich GmbH) in einer finalen Konzentration von 2,5 U/ml inkubiert. Die Zellkerne wurden gefärbt, indem die Zellen für 4 min mit 0,5 μ g/ml DAPI (Roche GmbH) bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS für 5 min wurden alle Flüssigkeitsreste entfernt und ein Tropfen einer 50%igen Glycerollösung (verdünnt in PBS) auf den nun gefärbten Zellrasen gegeben. Vorsichtig wurde anschließend ein Deckgläschen luftblasenfrei auf den Objektträger gelegt.

Die Signale wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops DMI600 B (Leica) detektiert. Insgesamt wurden pro Ansatz mindestens drei biologische Replikate verwendet. Pro biologischem Replikat wurden mindestens zwei technische Replikate (2 Wells pro 8-Well Objektträger) angesetzt und pro Well mindestens vier zufällig ausgewählte Abschnitte fotografiert. Zur automatischen Auszählung der Signale wurde das Programm ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) verwendet. Die Anzahl der DAPI-gefärbten Zellkerne und der aktiven Caspase-3 positiven Zellen wurden verwendet, um den prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen zu ermitteln.

3.5.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Mashimo, Wu et al.)

Sofern nicht anders angegeben, wurden 5×10^4 Zellen pro Well eines 8-Well tissue culture chamber slides (Sarstedt) nach viertägiger Vorinkubation verwendet. Um die Lokalisierung der lncRNA PRINS in HT-29/B6-Zellen bzw. deren Subklonen zu ermitteln, wurde das Stellaris® RNA FISH System von Biosearch Technologies verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Das Prinzip beruht auf einer Hybridisierung von bis zu 35 unterschiedlichen PRINS-spezifischen Oligonukleotiden, die an der RNA binden und ein Fluoreszenzsignal mit Hilfe des Fluorophores CAL Fluor Red 610 produziert wird (Tabelle 17). Die Auswahl und Herstellung der Oligonukleotide wurde auf Basis der PRINS-Sequenz (HG975433.1) von Biosearch Technologies durchgeführt. Zusätzlich zum Standardprotokoll wurde neben der RNA der Zellkern für 4 min mit 0,5 µg/ml DAPI und F-actin für 20 min mit 2,5 U/ml Phalloidin (Atto 488) gefärbt. Des Weiteren wurden die angegebenen Waschschrte optimiert. Alle Waschschrte mit dem Waschpuffer A wurden 2-mal für 5 min durchgeführt. Als Negativkontrolle, um die Spezifität des Signals zu überprüfen, wurden die Zellen vor der Hybridisierung für 1h bei 37 °C mit 50 µg/ml RNase A (Qiagen) behandelt. Eine zusätzliche Negativkontrolle ohne PRINS-spezifische Oligonukleotide wurde ebenfalls mitgeführt.

Tabelle 17 Auflistung der für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide mit Angabe der Sequenz in 5'-3'-Orientierung und der Position innerhalb der kompletten PRINS-Sequenz.

PRINS		
Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Position
#1	TGCACATGGCTTTTTATACA	345
#2	CCTCTCTCTGATTTATTGGA	710
#3	TGTCCTCATTAGTCTTCTAG	732
#4	CAGGGCAACCATTTCTGTTT	839
#5	CCTCCCTGAAAGAACACAG	868
#6	GTGTGTGAGATGAAGGTACC	914
#7	TCAAAGCACAAATGCACGCC	941
#8	CCAAGAAGTGACTGATCCTA	1019
#9	GCCACTGGAAATGAGACTAC	1046
#10	ATTCCTTTTGCCAAGGGAAG	1068
#11	GTTTAGAAAGATGAGGTCCT	1095
#12	GCAAACATGGGATGGTTAGG	1131
#13	GTTGATAATTCCAGGCAACT	1165
#14	GAGTCAAAAGATGCCCTGAC	1207
#15	CTTTCCGTAGTTCTCACTG	1353
#16	GGGTTTAGGTAAATCCGGAT	1406

#17	TACTATGCAAATGCCACCTG	1430
#18	CACAGCTAGAAAATACCGGT	1457
#19	CGCTCAGGATTTGAAGTGTG	1480
#20	TTAATGTTCTGGGAGCAGTC	1595
#21	GATGTGGCATGGAACATCAG	1623
#22	CAGACATGGGTCTTCATGTC	1645
#23	CTTTGGCCCTTCTACAGAAG	1667
#24	CAGGGAAACCCCAAGATCAG	1763
#25	TCACACAGCAGTTTAGGGAC	1794
#26	GGAACAACCTGACTCTTGGGT	1840
#27	GAAAGAAACCAGATTGGCCC	1899
#28	TCATTCTCTGCTTGAGAAGC	1931
#29	CAAGGTTTAACTGCTGTGGG	1954
#30	ACCATACTTAGAAACATCCT	2062
#31	GGCAAGGTAAGATGAACTGA	2086
#32	CACACTCATTCTTTCAGAGC	2108
#33	GGCATTCTAAATCTGATCC	2130
#34	CACTCGGCTTTCTAACCTTT	2152
#35	CTGAGCTTGAGTTAATCGGC	2174

3.5.3 FISH und IF zur Co-Lokalisierung von RNA und Proteinen

Sofern nicht anders angegeben, wurden 5×10^4 Zellen pro Well eines 8-Well tissue culture chamber slides (Sarstedt) nach viertägiger Vorinkubation verwendet und gegebenenfalls mit IFN- γ und TNF- α für 3 bzw. 6 h behandelt. Es folgte die Entfernung des Kulturmediums und, nach einem kurzen Waschschrift mit PBS, die Fixierung der Zellen mit 3,7 % Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur. Das Formaldehyd wurde entfernt, die fixierten Zellen 2-mal 5 min mit PBS gewaschen und diese anschließend 30 min in 0,1 % Tween-100 in 1 % BSA in PBS permeabilisiert. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper anti-Caspase-3 (NEB) (1:1000), anti-FOXK1 (1:400), anti-FOXK2 (1:400) oder anti-PMAIP1 (1:400) verdünnt in 1 % BSA in PBS. Es folgten zwei Waschschriffe für jeweils 5 min mit PBS und eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Rabbit 488 (NEB) in einer Verdünnung 1:200 in 1 % BSA in PBS. Nach zwei Waschschriffen mit dem Waschpuffer A aus dem Stellaris® RNA FISH System von Biosearch Technologies, wurde die Hybridisierung zur Lokalisierung von PRINS gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Am Ende wurde der Zellkern für 4 min mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI gefärbt.

3.6 Reporterassays

3.6.1 Klonierung und Konstruktion von Reporterplasmiden

Mit Hilfe des Programmes RNAhybrid wurden insgesamt 3 potentielle Bindestellen für die miR-491-5p in der PRINS-Sequenz identifiziert. Hierfür wurde der Datenbankeintrag für die PRINS-Sequenz (HG975433.1) verwendet. Auf dieser Grundlage erfolgte die Generierung von Reporterplasmiden nach Sharbati und Kollegen (Sharbati et al., 2011). Die Linearisierung von 1000 ng pTK-Gluc Plasmid (NEB GmbH) wurde unter Verwendung der beiden Restriktionsenzyme *HF-NotI* und *XbaI* in *10 x Cut Smart Puffer* (NEB) mit dem Zusatz von BSA (NEB) durchgeführt. Nach einer Inkubation von 2,5 h bei 37 °C wurden die Enzyme durch Erhitzung auf 65 °C für 20 min inaktiviert. Die erfolgreiche Linearisierung wurde über eine Agarosegelelektrophorese (0,8 % Agarose) (siehe 3.3.3) überprüft. Es folgte die Gelextraktion des linearisierten Plasmids und die Aufreinigung mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

Für die Oligonukleotid-Assemblierung der drei potentiellen Bindestellen und der mutagenisierten Bindestelle 3 wurden je 100 pmol/µl der jeweiligen sense und anti-sense Oligonukleotide (siehe Tabelle 18) für 3 min bei 95 °C denaturiert und durch schrittweise Reduzierung um 1 °C pro 10 sec bis zu einer Temperatur von 22 °C hybridisiert. 200 ng linearisierter pTK-Gluc Vektor und 150 ng assemblierte Oligonukleotide wurden in 1 µl T4 DNA-Ligase (NEB GmbH) für 30 min bei 22 °C ligiert. Die Inaktivierung der Ligase wurde durch 10minütiges Erhitzen bei 65 °C erreicht.

Tabelle 18 Auflistung der verwendeten Primer zur Oligo-Assemblierung. Diese dienen der Herstellung eines Reporterplasmides für Interaktionsstudien zwischen PRINS und der miR-491-5p an drei *in silico* bestimmten potentiellen Bindestellen (BS). Die Sequenzen sind 5'-3'-orientiert.

Primer	Sequenz (5'-3')
PRINS_miR-491-5p_BS#1 sense	GGCCGCGGACGAGCTGGTTGTGGAGCGGGCGGGTCC CGCCACCCGTGGGCT
PRINS_miR-491-5p_BS#1 anti-sense	CTAGAGCCCACGGGTTGGCGGGACCCGCCCGCTCCAC AACCAGCTCGTCCGC
PRINS_miR-491-5p_BS#2 sense	GGCCGCTACAGGAGTGGCCTAATTCTGGGGTTTCCCTG CCCCCCTGT
PRINS_miR-491-5p_BS#2 anti-sense	CTAGACAGGGGGGGCAGGGAAACCCCAAGAATCAGGC CAACTCCTGTAGC
PRINS_miR-491-5p_BS#3 sense	GGCCGCTTTTTTAAATTTCTTTTTAGAGGCGGGGTCTCA CTGTGTTTTGCCCT

PRINS_miR-491- 5p_BS#3 anti-sense	CTAGAGGGCAAACACAGTGAGACCCCGCCTCTAAAAA GAAATTTAAAAAAGC
PRINS_miR-491- 5p_BS#3_mut sense	GGCCGCTTTTTTAAATTTCTTTTCTTTTAGCCCTTTCACCTATCTG CTGTTTTGCCCT
PRINS_miR-491- 5p_BS#3_mut anti-sense	CTAGAGGGCAAACAGCAGATAGTGAAAGGGCTAAAAAG AAATTTAAAAAAGC

Die Transformation in *Escherichia coli* K12 wurde nach Hanahan und Kollegen durchgeführt (Hanahan et al., 1983). Kurz zusammengefasst wurden kompetente *Escherichia coli* unmittelbar vor der Transformation auf Eis aufgetaut und zusammen mit dem Ligationsansatz für 30 – 45 sec bei 42 °C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden in vorgewärmtem SOC-Medium (2.5 mM KCl, 10 mM MgCl, 20 mM Glucose in LB Medium (Carl Roth GmbH)) aufgenommen und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die erfolgreich transformierten Klone wurden mit Hilfe ihrer erworbenen Ampicillin-Resistenz selektiert, indem sie auf LB-Agarplatten (Carl Roth GmbH) mit dem Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin (Sigma Aldrich GmbH) ausplattiert wurden. 24 h später wurden 3 – 5 der gewachsenen Kolonien in flüssiges LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Die Extraktion der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Kits NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey Nagel GmbH). Um zu überprüfen, ob die assemblierten Bindestellen erfolgreich in das Plasmid ligiert wurden, wurde ein Verdau mit FD-HindIII und FD-XbaI in 10x FD-Puffer (New England Biolabs GmbH) durchgeführt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und anschließenden Inaktivierung der Enzyme folgte eine Agarosegelelektrophorese. Positive Klone mit einer Bande >5000 bp und einer zweiten Bande <300 bp wurden sequenziert (GATC Biotech AG). Zur Herstellung endotoxinfreier Plasmide wurde das Kit NucleoBond® xtra Midi PlusEF (Macherey Nagel GmbH) nach Herstellerangaben verwendet.

3.6.2 Reporter-Gen-Assays und Co-Transfektion

Die Transfektion von HeLa-Zellen wurde mit Hilfe des Nukleofector™2b (Lonza) mit 1×10^6 Zellen pro Transfektion wie oben bereits beschrieben durchgeführt. 2 µg modifiziertes Reporterplasmid pTK-GLuc (Vektorkarte im Anhang X₃) (New England Biolabs GmbH), 200 ng Normalisierungsplasmid pTK-CLuc (Vektorkarte im Anhang X₃) (New England Biolabs GmbH) und 50 pmol synthetische miR-491-5p-*mimic* RNA oder 50 pmol *nonsense* RNA wurden für die Co-Transfektion eingesetzt. Die Kombination der Transfektionsansätze befindet sich beispielhaft für Bindestelle (BS) 1 in Tabelle 19.

Tabelle 19 Beispielhafte Darstellung einer Co-Transfektion, um die Interaktion der miR-491-5p und PRINS an der Bindestelle 1 (BS#1) im Rahmen eines Reporter-Gen-Assays zu untersuchen.

pTK-GLuc (2 µg) mit PRINS_miR-491-5p_BS#1	1.	<ul style="list-style-type: none"> • synthetische miR-491-5p-mimic (50 pmol) • pTK-CLuc (200 ng)
	2.	<ul style="list-style-type: none"> • nonsense RNA (50 pmol) • pTK-CLuc (200 ng)

Bis zur Durchführung des Luziferase-Assays erfolgte die Inkubation der Zellen wie unter 3.1.1 beschrieben. Die Messung der Luziferaseaktivität wurde 6 h und 24 h nach Transfektion als Dreifachbestimmung pro Probe unter Verwendung des Bioluminescence Assay Kits (New England Biolabs GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden weiße 96 Well Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One GmbH) und das FLUOstar OPTIMA Luminometer (BMG Labtech) verwendet. Für die Auswertung wurde der Quotient aus der gemessenen Luziferaseaktivität des Reporterplasmids pTK-GLuc und des Normalisierungsplasmids pTK-CLuc errechnet.

3.7 Statistik und *in silico* Analysen

Die statistische Auswertung der RT-qPCR und Reporter-Assays erfolgte nach dem ungepaarten t-Test mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 6.00 für Windows (La Jolla California USA, www.graphpad.com) und den Signifikanzwerten: *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ****: $P < 0,0001$.

Die *in silico* Voraussagen für miRNAs wurden mit Hilfe des Online-tools miRmap (<http://mirmap.ezlab.org/>) durchgeführt, mit der eine Liste aller theoretisch möglichen Zielgene ermittelt werden kann. Diese Liste wurde in die Online-Datenbank DAVID eingespeist, um die Signalwege zu identifizieren, in denen diese Zielgene akkumulieren (Huang da, Sherman et al. 2009).

Zur Untersuchung von miRNA-lncRNA-Bindesequenzen wurde das Online-tool RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) genutzt (Rehmsmeier, Steffen et al. 2004).

4. Ergebnisse

4.1 TFF3-überexprimierende Adenokarzinomzellen besitzen eine erhöhte Resistenz gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die humane, epitheliale, colorectale Adenokarzinomzelllinie HT-29/B6 untersucht, die nach Differenzierung eine starke Polarisierung aufweist (siehe Anhang X₁, Abbildung 35), Mucin produziert und sich somit hervorragend für Studien eignet, in denen eine möglichst *in vivo*-nahe Epithelschicht des Darms untersucht werden soll (Kreusel, Fromm et al. 1991). Diese Zellen wurden stabil mit *tff3* transfiziert und wiesen dadurch eine erhöhte Expression von TFF3 auf (HT-29/B6/*htff3*), einem kleinen mitogenen Protein, das besonders bei Abwehrmechanismen und Reparaturmechanismen des gastrointestinalen Epithels eine Rolle spielt. Als Kontrolle wurde die ebenfalls stabil transfizierte Zelllinie HT-29/B6/*mock* verwendet, die keine veränderte TFF3-Expression aufweist (Meyer zum Buschenfelde, Tauber et al. 2006). Wir untersuchten generelle Unterschiede im Phänotyp der beiden Zellvarianten HT-29/B6/*htff3* und HT-29/B6/*mock* mit Hilfe des xCELLigence® Systems. Da TFF3 besonders oft im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*; IBD) erwähnt und ein protektiver Effekt vermutet wird, war es naheliegend, die beiden Subklone auf ein unterschiedliches Apoptoseverhalten hin zu untersuchen. Nach einer viertägigen Vorinkubation, um eine ausreichende Differenzierung der Zellen zu gewährleisten, wurde der Verlauf des *cell index* bis zu 72 h nach Präsensibilisierung mit IFN- γ und Behandlung mit TNF- α beobachtet (Abb.5). Die langanhaltende, erhöhte Exposition der Zellen mit TNF- α spiegelt gut die physiologischen Bedingungen bei der IBD wieder. Die zusätzliche Präsensibilisierung mit IFN- γ führt bekannterweise zu einer Erhöhung des proapoptotischen Effektes von TNF- α , weshalb dieses Prinzip auch bei der TRAIL-basierten Krebstherapie Verwendung findet.

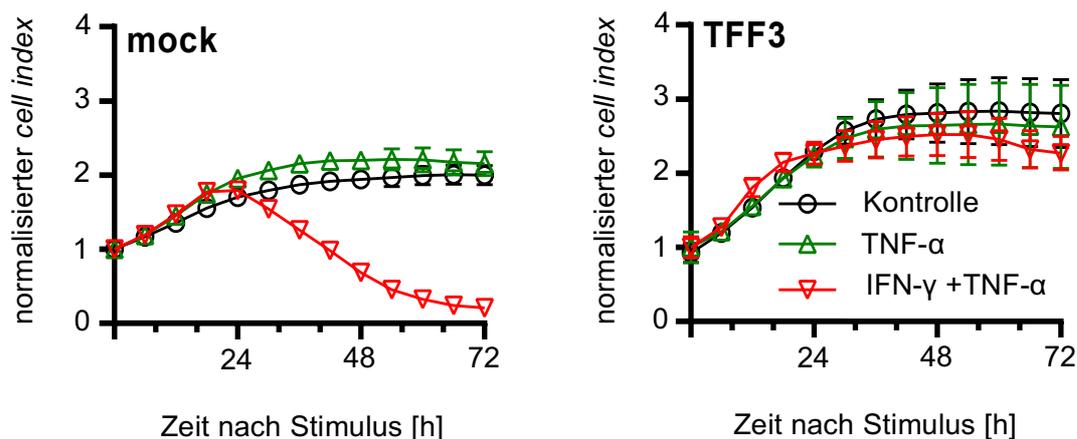


Abbildung 5 Beschreibung des Phänotyps von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/htff3 mittels xCELLigence®. Der cell index von HT-29/B6/mock bzw. HT-29/B6/htff3 nach 4 Tagen Vorinkubation und über einen Zeitraum von 72 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α wurde durch den Mittelwert der xCELLigence®-Analyse berechnet. Die Normalisierung wurde unmittelbar nach gesetztem Stimulus durchgeführt. Standardabweichungen wurden aus mindestens 4 Replikaten berechnet. Teilweise waren die Abweichungen zu gering, um sie bildlich darstellen zu können. HT-29/B6/htff3 zeigen keine Veränderungen im cell index nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α im Vergleich zu unbehandelten oder nur mit TNF- α behandelten Zellen. HT-29/B6/mock zeigen einen Abfall des cell index 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α . In beiden Subklonen kommt es zu einem Anstieg des cell index bis zu 24 h nach Stimulus mit IFN- γ und TNF- α im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Anstieg ist in HT-29/B6/mock auch nach Behandlung mit TNF- α ohne Präsensibilisierung mit IFN- γ zu beobachten.

Generell wiesen HT-29/B6/htff3 einen höheren maximalen cell index auf als HT-29/B6/mock (HT-29/B6/htff3 cell index_{max}= 3,2; HT-29/B6/mock_{max}=2,2). Der Stimulus mit IFN- γ und TNF- α führte zu einem leichten Anstieg des cell index unmittelbar nach gesetztem Stimulus bis zu einem Zeitpunkt von ca. 24 h in HT-29/B6/mock und HT-29/B6/htff3. Dieser Anstieg war auch durch die Behandlung mit TNF- α ohne vorherige Präsensibilisierung in HT-29/B6/mock aber nicht in HT-29/B6/htff3 zu beobachten. Die Behandlung mit TNF- α hatte keinen erkennbaren negativen Effekt auf beide Subklone. Die Vorsensibilisierung mit IFN- γ und die anschließende Behandlung mit TNF- α führte zu einem dramatischen Absinken des cell index in HT-29/B6/mock 24 h nach Behandlung, während keine Veränderungen in HT-29/B6/htff3 erkennbar waren. Die Ergebnisse weisen auf eine stattfindende Apoptoseinduktion durch IFN- γ und TNF- α in HT-29/B6/mock hin. Das xCELLigence®-System ist hervorragend dafür geeignet, Veränderungen der Zelle anzuzeigen. Veränderungen des cell index geben wertvolle Rückschlüsse darüber, ob und wann ein Effekt nach gesetztem Stimulus eintritt. Das System verwendet dabei den einheitslosen cell index, der die Widerstandsveränderungen auf der Oberfläche der Zellkulturplatte anzeigt. Veränderungen des Widerstandes treten zum Beispiel auf, wenn Zellen die Oberfläche berühren, anwachsen, sich ablösen, proliferieren, absterben, sich differenzieren, migrieren und so weiter. Es ist jedoch nicht ohne weiteres möglich, den Veränderungen im Kurvenverlauf einem der oben erwähnten Ereignisse vorbehaltlos zuzuordnen.

Deshalb wurde nach viertägiger Vorinkubation und 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α eine immunfluoreszenz-basierte Detektion der gespaltenen und somit aktiven Form der Caspase-3 als Apoptosemarker durchgeführt (zur Bruegge, Hanisch et al. 2014). Zusätzlich wurde F-actin mit Hilfe von Phalloidin angefärbt, da bekannt ist, dass epitheliale Zellen mit der Bildung der sogenannten *stress fibers* auf TNF- α reagieren können. Da die Fragmentierung von Zellkernen ein wichtiger zusätzlicher Marker für eine stattfindende Apoptose ist, wurden auch die Zellkerne gefärbt (DAPI) (Abb.6).

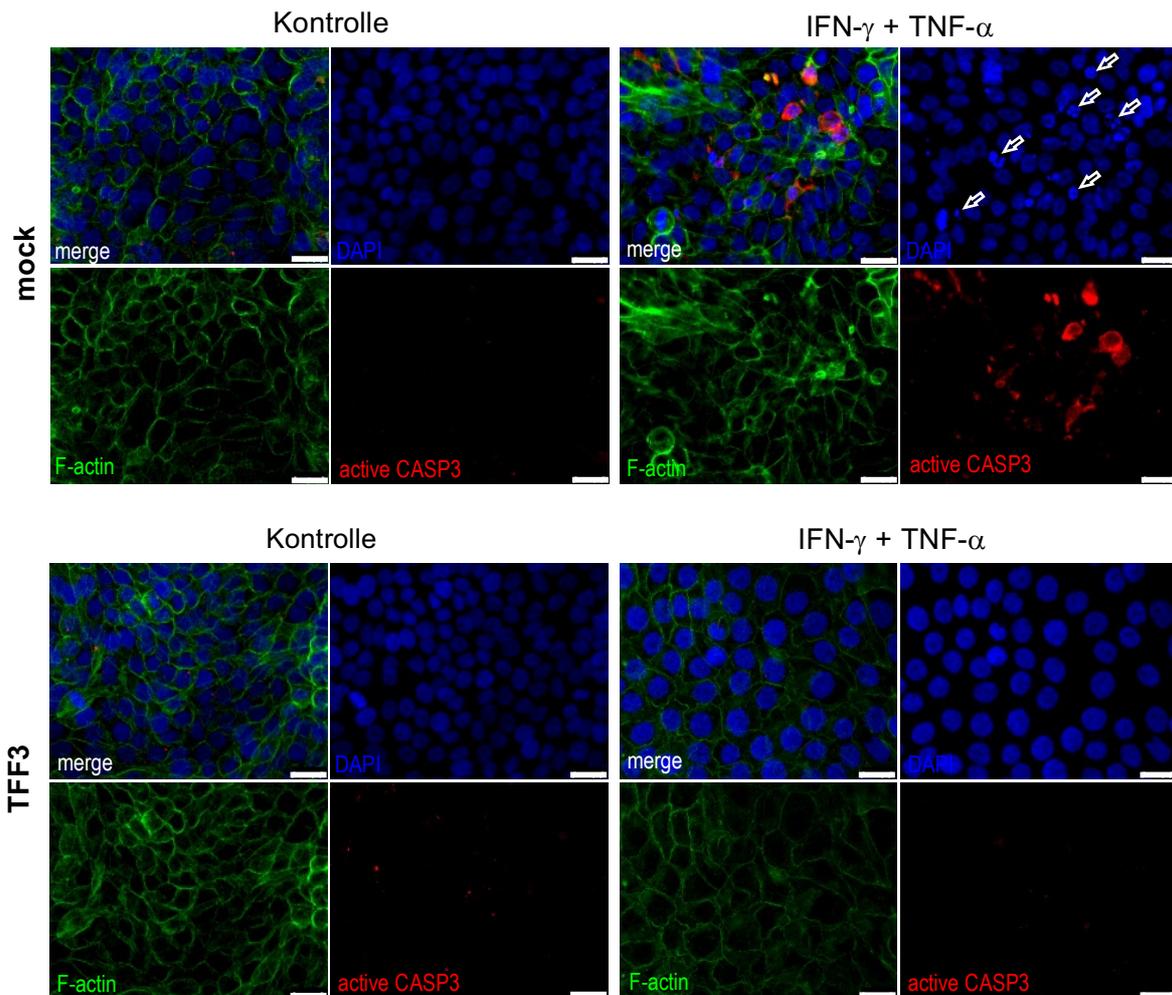


Abbildung 6 Nachweis der Apoptoseinduktion von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hfff3 nach Färbung der aktiven Caspase-3, F-actin und Zellkernen. Der Balken entspricht 25 μ m. Es ist die Entstehung von *stress fibers*, eine Zunahme des Caspase-3-Signals und die Fragmentierung von Zellkernen 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α in HT-29/B6/mock zu erkennen. Es sind keine Veränderungen des F-actin-Signals, des Caspase-3-Signals oder der Zellkerne 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α in HT-29/B6/hfff3 zu erkennen. Pfeile weisen auf fragmentierte Zellkerne hin.

Die Entstehung der *stress fibers* wurde durch ein wesentlich stärkeres und ubiquitär über die Zellen verteiltes F-actin-Signal (grün) deutlich, das ausschließlich in HT-29/B6/mock 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α vorkam (Abb.6). Für unbehandelte HT-29/B6/mock sowie unbehandelte und behandelte HT-29/B6/hfff3 konnte F-actin lediglich im Bereich der Zell-Zell-Kontakte detektiert werden. Zudem war die vermehrte Aktivierung der Caspase-3 (rot) und die

Fragmentierung der Zellkerne (blau) nur in behandelten HT-29/B6/mock nach Apoptoseinduktion zu beobachten (Abb.6), was die vorangegangene, durch den xCELLigence® gestützte Vermutung untermauert, dass HT-29/B6/hfff3 einen erhöhten Schutz gegenüber einer IFN- γ / TNF- α - induzierten Apoptose besitzen könnten.

Nicht kodierende RNAs sind als äußerst potente Regulatoren zellulärer Prozesse bekannt und so überrascht es nicht, dass ein Großteil der transkriptionellen Leistung der Zelle dieser Klasse gewidmet ist und nur gerade einmal 10 % des Genoms für funktionale Proteine kodiert. Um Anhaltspunkte darüber zu erhalten, ob nicht kodierende RNAs auch für den TFF3 vermittelten, antiapoptotischen Effekt verantwortlich sein könnten, wurden *in silico*-Analysen und Literaturrecherchen durchgeführt und verschiedene Kandidaten nicht kodierender RNAs ermittelt.

4.2 Die TFF3-Expression führt zu einer Dysregulation unterschiedlicher, Apoptose-relevanter, nicht kodierender RNAs

4.2.1 Die Auswahl nicht kodierender RNAs

Die Regulation von mRNAs durch miRNAs stellt einen zentralen Mechanismus dar, der eine Vielzahl zellulärer Prozesse steuert. Die mögliche Interaktion zwischen verschiedenen Klassen nicht kodierender RNAs erhöht die Komplexität dieser Regulationsebene. Um zu überprüfen, ob die beobachtete TFF3-abhängige Resistenz gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose in colorectalen Adenokarzinomzellen durch ein Zusammenspiel von miRNAs und lncRNAs reguliert sein könnte, wurden *in silico*-Analysen und Literaturrecherchen durchgeführt. Daraus ergab sich ein Satz aus den 3 gut erforschten miRNAs miR-16, miR-21 und miR-155, für die bereits eine Relevanz in Apoptosesignalwegen beschrieben wurde (Aqeilan, Calin et al. 2010);(Kroesen, Teteloshvili et al. 2015); (Pickard and Williams 2015) und den 3 weniger bekannten miRNAs miR-326, miR-329 und miR-491. Die drei letztgenannten besitzen laut *in silico*-Voraussagen (miRmap; DAVID) Ziele, die vor allem bei der Krebsentstehung, dem Wnt-Signalweg, Darmkrebs und auch der Apoptose eine Rolle spielen (Anhang Tabelle 20 - 22).

Die Auswahl der lncRNAs erfolgte nach einem expressionsbasierten Verfahren, das bereits von uns publiziert wurde (Pawar, Hanisch et al. 2016) und die Generierung eines Satzes von lncRNAs ermöglichte, das bei der Regulation der Apoptose beteiligt zu sein scheint. Da wir von einer gegenseitigen Regulation dieser verschiedenen Klassen nicht kodierender RNA ausgehen, wurden ausgewählte Kandidaten beider Sets hinsichtlich einer Antikorrelation in HT-29/B6/hfff3 und HT-29/B6/mock mittels miR-Q und RT-qPCR untersucht.

4.2.2 Die TFF3-abhängige Regulation ausgewählter nicht kodierender RNAs

Die Expressionsanalyse wurde 2, 4 und 7 Tage nach Aussaat der Zellen in HT-29/B6/hdff3 im Vergleich zu HT-29/B6/mock mittels RT-qPCR-Array für lncRNAs und miR-Q-Array für miRNAs durchgeführt (Abb.7). Zwar handelt es sich bei den Untersuchungen um stabil transfizierte Zellen, sodass eine Veränderung der TFF3-Expression unwahrscheinlich erscheint, jedoch besitzt die gewählte Zelllinie die Eigenschaft, sich über einen mehrtägigen Zeitraum zu differenzieren und Mucin zu produzieren. Veränderungen der endogenen Expression in Abhängigkeit zum Differenzierungsstatus der Zelle können auf diesem Weg berücksichtigt werden. Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, dass eine multifaktorielle Regulation die Expression über den Differenzierungszeitraum verändern könnte.

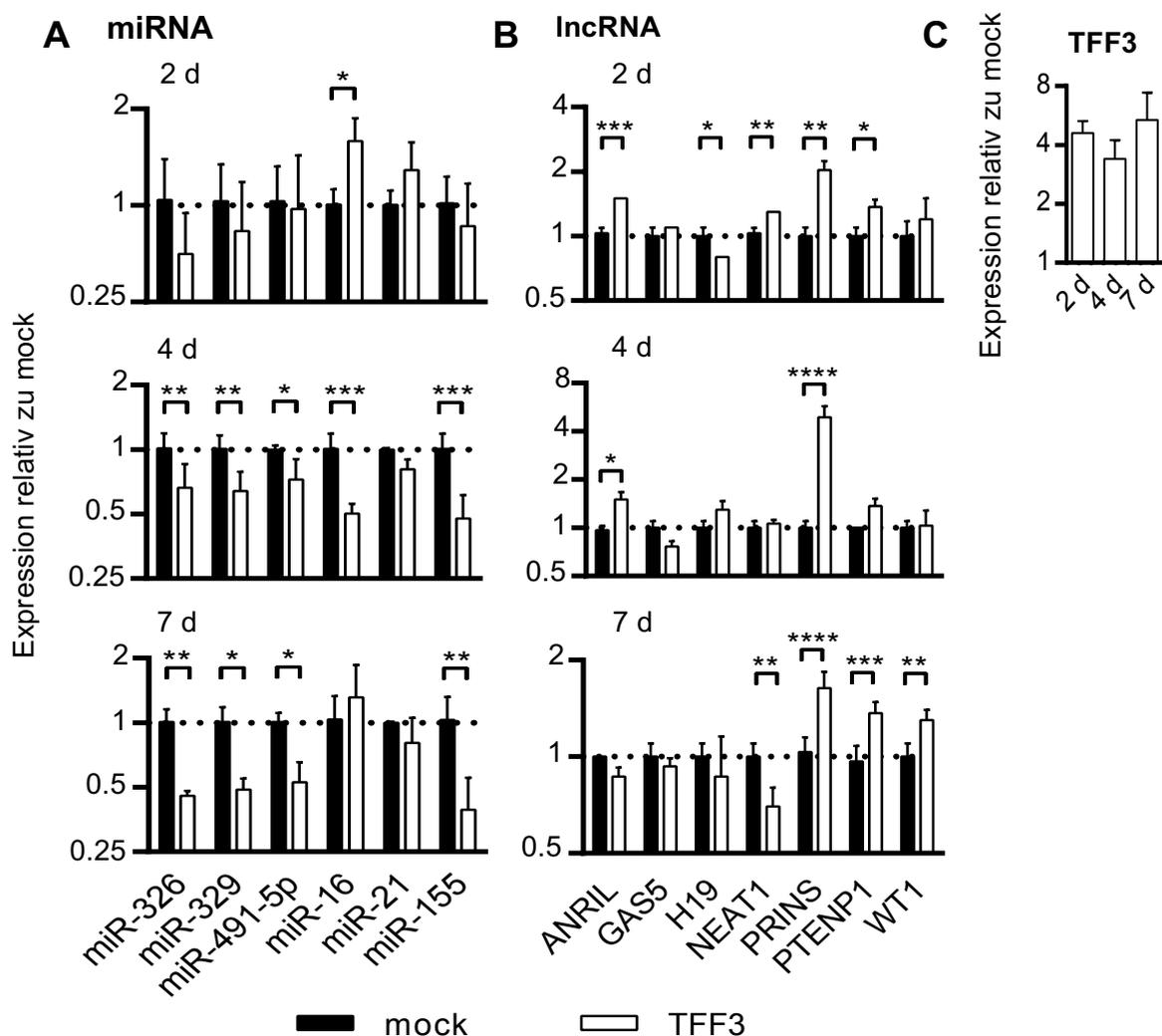


Abbildung 7 Expressionsanalyse verschiedener miRNA (A) und lncRNA (B) von HT-29/B6/mock bzw. HT-29/B6/hdff3. Die Expressionsanalyse der miRNAs und lncRNAs erfolgte 2, 4 und 7 Tage nach Aussaat mittels RT-qPCR-Arrays. Schwarze Balken zeigen den Mittelwert der Expression der HT-29/B6/mock relativ zu HT-29/B6/mock und weiße Balken den Mittelwert der Expression der HT-29/B6/hdff3 relativ zu HT-29/B6/mock. Die Expression von TFF3 zeigte eine stabile Überexpression in HT-29/B6/hdff3 über den Beobachtungszeitraum (C). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar und wurden durch die Verwendung von mindestens 3 biologischen Replikaten berechnet. Sterne kennzeichnen signifikante Ergebnisse nach ungepaartem t-Test (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ****: $P < 0,0001$).

Die verringerte Expression von vier miRNAs (miR-155, miR-326, miR-329 und miR-491) in HT-29/B6/tff3 im Vergleich zu HT-29/B6/mock wurde 4 und 7 Tage nach Aussaat deutlich (mindestens 0,67fache Veränderung; $P < 0,05$). Eine durchgehend erhöhte Expression einer miRNA konnte in TFF3-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen nicht festgestellt werden. Die miR-16 und miR-21 wurden für nachfolgende Experimente aufgrund ihrer heterogenen Expressionsmuster ausgeschlossen. Auf Grundlage der miR-Q-Daten und einer vermuteten Antikorrelation wurde sich bei der Betrachtung der lncRNAs nur auf diejenigen konzentriert, die eine deutliche Überexpression zeigten. Dabei zeigte allein PRINS eine erhöhte Expression gegenüber HT-29/B6/mock (mindestens 1,5fach) 2, 4 und 7 Tage nach Aussaat; $P < 0,01$), die ihr Maximum am Tag 4 erreichte. Nach einem Anstieg der PRINS-Expression nach 2 und 4 Tagen schien die erhöhte Expression nach 7 Tagen wieder abzunehmen, wobei sie dennoch im Vergleich zu HT-29/B6/mock signifikant erhöht blieb. Andere lncRNAs wie PTENP1, WT1 und ANRIL zeigten zwar vereinzelt signifikante Unterschiede, diese waren jedoch marginal und zudem nicht über den gesamten Differenzierungszeitraum konstant vorhanden. Die Expression von TFF3 wurde via RT-qPCR ebenfalls überprüft und zeigte eine durchgehend erhöhte Expression gegenüber HT-29/B6/mock über den gewählten Beobachtungszeitraum. Für alle nachfolgenden Experimente wurde, sofern technisch realisierbar, eine viertägige Vorinkubation eingehalten, um ein homogenes Expressionsverhalten der Zellen zu erreichen.

4.3 Untersuchung der gegenseitigen Regulation von TFF3-abhängigen miRNAs und lncRNAs

4.3.1 PRINS besitzt *in silico* Bindestellen für die miR-326, miR-329 und miR-491

Um zu untersuchen, ob eine direkte Interaktion zwischen den untersuchten, regulierten, nicht kodierenden RNAs besteht, wurde PRINS (HG975433.1) *in silico* nach potentiellen Bindestellen mittels RNAhybrid untersucht. In Abb. 8 sind die in Frage kommenden Bindestellen von PRINS und den zu untersuchenden miRNAs schematisch dargestellt. PRINS besteht seiner ersten Beschreibung nach aus 2199 bp, wobei die Bindestellen über die gesamte Sequenz verteilt sind.

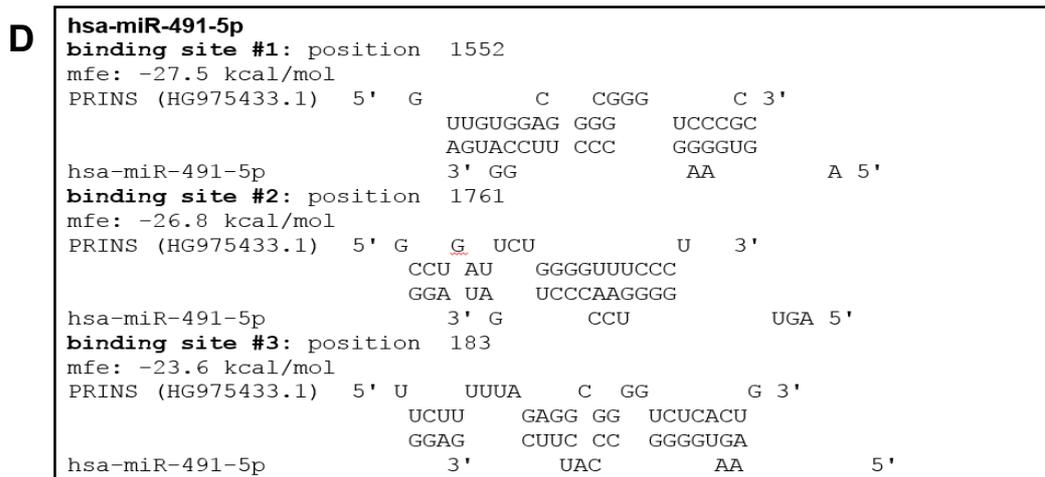


Abbildung 9 Darstellung der Bindestellen zwischen PRINS und der miR-155 (A), miR-326 (B), miR-329 (C) und miR-491-5p (D). Gezeigt werden die Sequenzabschnitte, die Position der Bindung und die Bindungsenergie. *In silico* ist keine Bindung der miR-155 und PRINS möglich. Für die miR-326 konnte eine, für die miR-329 zwei und für die miR-491-5p drei potentielle Bindestellen identifiziert werden.

4.3.2 Die endogene miR-491-5p-Expression führt zu einer signifikanten Herabregulierung der PRINS-Expression

Für die dysregulierten miRNAs (Abbildung 7), die zudem *in silico* zu einer direkten Interaktion mit PRINS in der Lage sind (Abbildung 8 - 9), wurde eine Kompensation der herabregulierten miRNAs in HT-29/B6/hTff3 simuliert, indem die Zellen mit miRNA-*mimics* transfiziert wurden. Eine anschließende Expressionsanalyse müsste, unserer Hypothese nach, erneut ein entgegengesetztes Expressionsverhalten der lncRNA PRINS zeigen, wenn eine direkte oder indirekte Regulation stattfinden sollte. Hierzu transfizierten wir miRNA-*mimics* und *nonsense*-Kontroll-RNA in HT-29/B6/hTff3 und letztgenannte auch in HT-29/B6/mock (Abb. 10). Obwohl miR-155 eine signifikante Regulierung in Abhängigkeit zum Differenzierungsstatus von TFF3-überexprimierenden Zellen zeigte, wurde auf eine Transfektion der Zellen mit miR-155-*mimic* verzichtet, da *in silico* keine Bindedomänen prognostiziert werden konnten (Abb. 8 und 9). 24 h nach Transfektion untersuchten wir die PRINS-Expression mittels RT-qPCR und konnten ausschließlich nach Transfektion mit miR-491-5p-*mimic* eine signifikante Herabregulierung um ca. 35 % feststellen ($P < 0,05$) (Abb.10).

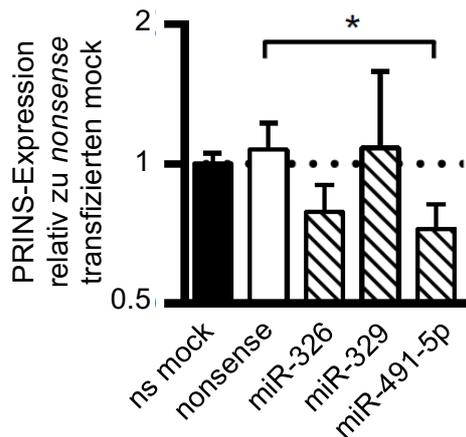


Abbildung 10 Expressionsanalyse der lncRNA PRINS 24 h nach Transfektion mit der miR-326, miR-329 oder miR-491-5p. Die Transfektion mit der miR-491-5p führte zu einer signifikanten Herabregulierung der PRINS-Expression. Schwarze Balken zeigen den Mittelwert der Expression der nonsense transfizierten HT-29/B6/mock, weiße Balken den der nonsense transfizierten HT-29/B6/hfff3 und gestreifte Balken den der miR-326, miR-329 oder miR-491-5p transfizierten HT-29/B6/hfff3. Alle Werte wurden bezogen auf nonsense transfizierte HT-29/B6/mock. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar und wurden durch die Verwendung von mindestens 3 biologischen Replikaten berechnet. Sterne kennzeichnen signifikante Ergebnisse nach ungepaartem t-Test (*: $P < 0,05$).

Die zuvor in Abbildung 7 beobachtete Antikorrelation wurde für die miR-491-5p und PRINS bestätigt. Auch nach Transfektion mit miR-326-mimic zeigte sich eine Herabregulierung der PRINS-Expression, die jedoch nicht signifikant zu sein schien. In diesem Versuch konnte keine erhöhte Expression von PRINS in HT-29/B6/hfff3 im Vergleich zu HT-29/B6/mock beobachtet werden. Die Vermutung liegt nahe, dass die miR-491-5p einen Einfluss auf PRINS haben könnte.

4.3.3 PRINS besitzt keinen Einfluss auf die miR-491-5p-Expression

Um untersuchen zu können, welchen Einfluss PRINS auf die Expression von miR-491-5p besitzt, wurde siRNA gegen PRINS eingesetzt und anschließend die Expression der miR-491-5p mittels miR-Q untersucht. Sollte PRINS tatsächlich einen Einfluss auf die miR-491-5p-Expression besitzen, sollte die Herabregulierung von PRINS durch siRNA zu einer erhöhten miR-491-5p-Expression führen.

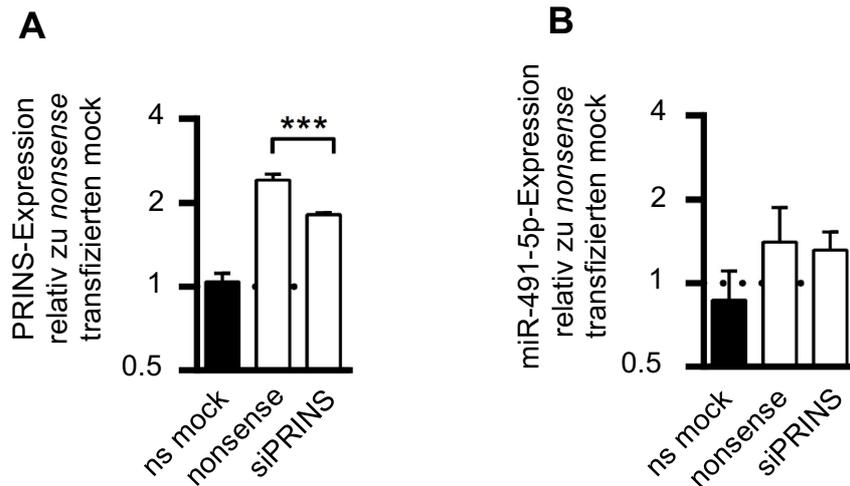


Abbildung 11 Expressionsanalyse der lncRNA PRINS (A) und miR-491-5p (B) 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen PRINS. Die Transfektion mit dieser siRNA führte zu einer signifikanten Herabregulierung der PRINS-Expression aber zu keiner signifikanten Veränderung der miR-491-5p-Expression. Schwarze Balken zeigen den Mittelwert der Expression der nonsense transfizierten HT-29/B6/mock relativ zu nonsense transfizierten HT-29/B6/htff3 und weiße Balken den Mittelwert der Expression der nonsense bzw. siPRINS transfizierten HT-29/B6/htff3 relativ zu nonsense transfizierten HT-29/B6/mock. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar und wurden durch die Verwendung von mindestens 3 biologischen Replikaten berechnet. Sterne kennzeichnen signifikante Ergebnisse nach ungepaartem t-Test (***: $P < 0,001$).

In Abbildung 11 wird deutlich, dass die siRNA gegen PRINS eine signifikante Herabregulierung von PRINS um ca. 25 % ($P < 0,001$) verursachte. Die PRINS-Expression in HT-29/B6/htff3 blieb nach Transfektion mit *nonsense* Kontroll-RNA oder mit siRNA gegen PRINS über dem Level der HT-29/B6/mock. Die Messung der miR-491-5p-Expression mittels miR-Q zeigte in keiner der Behandlungen eine signifikante Veränderung. Eine Herabregulierung der miR-491-5p in HT-29/B6/htff3 im Vergleich zu HT-29/B6/mock, wie sie in Abbildung 7 zu sehen ist, konnte nicht beobachtet werden.

4.3.4 miR-491-5p reguliert PRINS über eine direkte Interaktion

Um ermitteln zu können, welche Mechanismen die lncRNA PRINS und miR-491-5p beeinflussen, wurde eine mögliche direkte Interaktion der beiden nicht kodierenden RNAs überprüft. *In silico* existieren 3 potentielle Bindedomänen, die eine direkte Interaktion der beiden nicht kodierenden RNAs wahrscheinlich machen. Die Sequenz der drei Bindedomänen sowie die mutagenisierte Variante der BS-3 befinden sich in Abbildung 12.

```

Binding site #1:
GGCCGCgagacgagctggttgtggagcggggcgggtcccgccaccctgggcT
      CGcctgctcgaccaacacctcgcccgccaggcggtgggcacccgAGATC

Binding site #2:
GGCCGctacaggagtggcctgattctggggtttcctgccccctgT
      CGatgctctcacgggactaagaccccaaagggaagggggggacAGATC

Binding site #3:
GGCCGcttttttaaatttcttttagaggcgggtctcactgtgttttgcccT
      CGaaaaatttaagaaaaatctccgccccagagtgacacaaaacgggAGATC

Binding site #3m:
GGCCGcttttttaaatttcttttagCCCTTTCATATCTGctgttttgcccT
      CGaaaaatttaagaaaaatcGGGAAAGTGATAGACGacaaaacgggAGATC

```

Abbildung 12 Darstellung der potentiellen Bindedomänen zwischen der miR-491-5p und PRINS. Gelbe Abschnitte kennzeichnen die Sequenzen der nicht kodierenden RNAs, an denen eine direkte Interaktion möglich ist. Rote Schrift kennzeichnet den mutagenisierten Bereich der Bindestelle 3 (Binding site #3m).

Nach erfolgter Konstruktion und Klonierung der modifizierten Reporterplasmide auf der Basis von pTK-GLuc folgte die Co-Transfektion mit dem Normalisierungsplasmid pTK-CLuc und 50 pmol synthetischer miR-491-5p-mimic RNA oder 50 pmol nonsense RNA als Kontrolle. Die Ergebnisse der Luziferaseaktivität 6 h nach Transfektion sind in Abbildung 13 dargestellt. Eine Verringerung der Luziferaseaktivität deutet auf eine stattfindende Bindung hin.

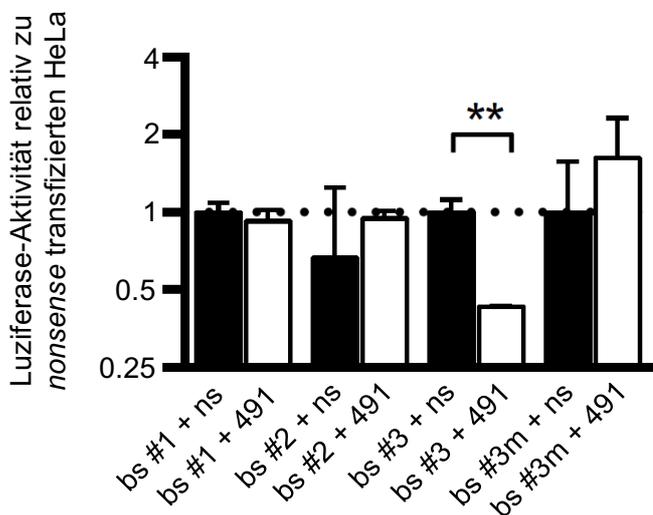


Abbildung 13 Darstellung der relativen Luziferaseaktivität 6 h nach Co-Transfektion von HeLa-Zellen mit dem Reporterplasmid pTK-GLuc, dem Normalisierungsplasmid pTK-CLuc, miR-491-5p-mimic und nonsense RNA. Ein signifikant verringertes Luziferasesignal konnte für die Bindestelle 3 (bs #3) nach Transfektion mit miR-491-5p-mimic im Vergleich zu nonsense transfizierten HeLa-Zellen festgestellt werden. Schwarze Balken kennzeichnen Mittelwerte der Luziferaseaktivität nach Transfektion mit nonsense RNA und weiße Balken nach Transfektion mit miR-491-5p. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe des Normalisierungsplasmids pTK-CLuc. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar und wurden durch die Verwendung von mindestens 3 biologischen Replikaten berechnet. Sterne kennzeichnen signifikante Ergebnisse nach ungepaartem t-Test (**: $P < 0,01$).

Allein das Reporter-Plasmid, das die BS-3 enthält, führte nach Co-Transfektion mit der miR-491-5p-*mimic* zu einer signifikanten Verringerung der Luziferaseaktivität um ca. 57 % ($P < 0,01$). Um die Spezifität der Interaktion der miR-491-5p mit der BS-3 zu untersuchen, wurde die Seed-Sequenz ausgetauscht und es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Luziferaseaktivität. Obwohl zwei weitere vielversprechende Bindestellen *in silico* vorausgesagt wurden, konnte keine veränderte Luziferaseaktivität und somit keine direkte Interaktion zwischen der miR-491-5p und PRINS an diesen Sequenzabschnitten festgestellt werden.

4.4 Eine TRAIL-induzierte Apoptose führt zu einem antikorrelierten Expressionsmuster der miR-491-5p und PRINS in HT-29/B6-Zellen.

Um den Einfluss eines TRAIL-induzierten Zelltodes auf die Expression der nicht kodierenden RNAs miR-491-5p und PRINS in HT-29/B6/*htff3* und HT-29/B6/*mock* zu untersuchen, wurden die Zellen nach einer viertägigen Vorinkubation für 3h mit $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ behandelt und die Expression anschließend via RT-qPCR und miR-Q untersucht (Abb.14). Zusätzlich wurde auch das Expressionsverhalten von TFF3 via RT-qPCR in HT-29/B6/*htff3* und HT-29/B6/*mock* analysiert.

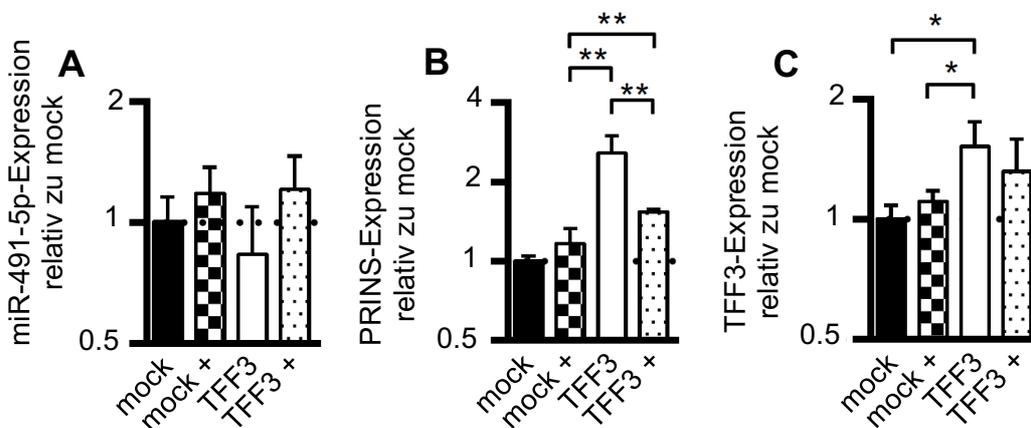


Abbildung 14 Expressionsanalyse von TFF3 (A), miR-491-5p (B) und lncRNA PRINS (C) 3 h nach Behandlung mit $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ (+). Die Expression von TFF3 in HT-29/B6/*htff3* ist im Vergleich zur HT-29/B6/*mock* signifikant erhöht. Nach Stimulus konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die miR-491-5p-Expression steigt nach Stimulus in HT-29/B6/*htff3* und HT-29/B6/*mock* an. Die PRINS-Expression zeigt eine signifikante Erhöhung in HT-29/B6/*htff3* im Vergleich zu HT-29/B6/*mock*. Eine signifikante Herabregulierung nach Stimulus konnte in HT-29/B6/*htff3* beobachtet werden, wobei der Unterschied zu behandelten und unbehandelten HT-29/B6/*mock* signifikant erhöht bleibt. Schwarze Balken zeigen den Mittelwert der Expression unbehandelter HT-29/B6/*mock*, weiße Balken den unbehandelter HT-29/B6/*htff3*, karierte Balken den behandelter HT-29/B6/*mock* und gepunktete Balken den behandelter HT-29/B6/*htff3*. Alle Werte wurden bezogen auf unbehandelte HT-29/B6/*mock*. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar und wurden durch die Verwendung von mindestens 3 biologischen Replikaten berechnet. Sterne kennzeichnen signifikante Ergebnisse nach ungepaartem t-Test (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$).

Interessanterweise führte die zuvor beschriebene Induktion der Apoptose in beiden Zelllinien zu einer Erhöhung der miR-491-5p-Expression, die jedoch nicht signifikant war. Diese Veränderung ging mit einer verringerten Expression von PRINS in HT-29/B6/hdff3 nach Stimulus im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um ca. 40 % einher ($P < 0,01$). Dennoch blieb die Expression von PRINS in IFN- γ /TNF- α -behandelten HT-29/B6/hdff3 gegenüber der Expression der HT-29/B6/mock mit oder ohne Stimulus erhöht ($P < 0,01$). In HT-29/B6/mock konnte durch den Stimulus keine Veränderung der PRINS-Expression festgestellt werden. Die hier beobachtete entgegengesetzte Expression der miR-491-5p und PRINS stützt die Ergebnisse aus Abbildung 7 und 10 und weist auf eine gegenseitige Regulation hin. Die Behandlung mit IFN- γ - und TNF- α hatte in keiner der beiden Zelllinien einen Effekt auf die Expression von TFF3, obwohl sich eine Tendenz in HT-29/B6/hdff3 anzudeuten schien. Durch die Abnahme der Expression um ca. 4 % konnte nach Stimulus mit IFN- γ - und TNF- α kein signifikanter Unterschied zwischen HT-29/B6/hdff3 und HT-29/B6/mock in ihrer TFF3-Expression festgestellt werden.

4.5 Die verringerte miR-491-5p- und die erhöhte PRINS-Expression sind für den TFF3-abhängigen, protektiven Effekt in HT-29/B6-Zellen mitverantwortlich

Um die Rolle der beiden nicht kodierenden RNAs am anfänglich festgestellten Phänotyp von TFF3-überexprimierenden Adenokarzinomzellen zu erforschen, wurde erneut das xCELLigence® System verwendet. Die Zellen wurden mit siRNA gegen PRINS, miR-491-5p-*mimic* oder *nonsense* RNA transfiziert, 6 h später für 15 min mit IFN- γ präsensibilisiert und für 36 h mit TNF- α behandelt. Der *cell index* wurde unmittelbar nach Behandlung normalisiert. Zur besseren Veranschaulichung sind in Abbildung 15 die Verläufe des *cell index* relativ zu *nonsense* transfizierten und unbehandelten HT-29/B6/mock zur Basislinienkorrektur dargestellt.

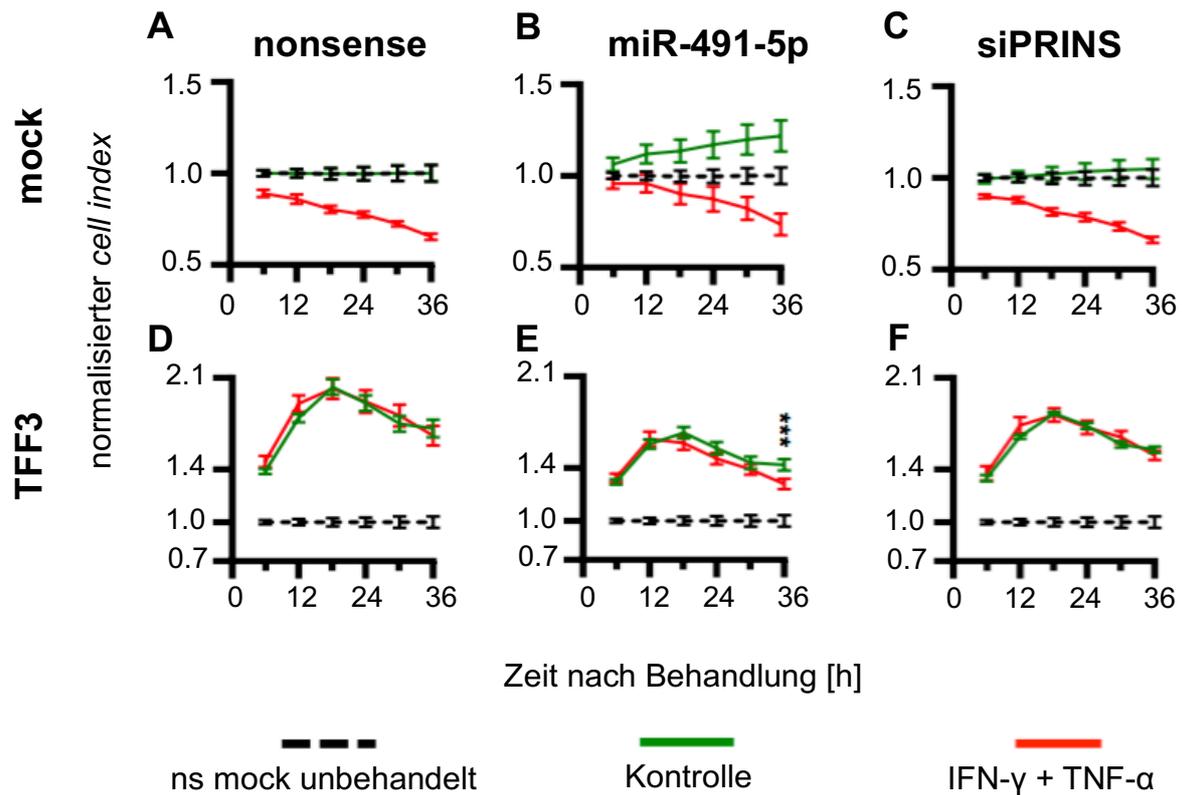


Abbildung 15 Beschreibung des Phänotyps von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hdff3 mittels xCELLigence® 6 h nach Transfektion mit nonsense RNA, miR-491-5p-mimic und siRNA gegen PRINS. Der cell index von HT-29/B6/mock bzw. HT-29/B6/hdff3 wurde über einen Zeitraum von 36 h nach Transfektion und Behandlung mit IFN- γ und TNF- α durch den Mittelwert der xCELLigence®-Analyse berechnet. HT-29/B6/mock zeigen einen Abfall des cell index nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α unabhängig von der Transfektion (A, B, C). Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen oder Transfektionen erkennbar. Mit nonsense (D) und mit siRNA (F) transfizierte HT-29/B6/hdff3 zeigen keinen Unterschied des cell index nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Transfektionen mit miR-491-5p-mimic (E) oder siRNA (F) führen zu einem verringerten cell index im Vergleich zu nonsense transfizierten HT-29/B6/hdff3 (D). Die Transfektion der HT-29/B6/hdff3 mit miR-491-5p-mimic führt zu einem signifikanten Abfall des cell index im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (E). Die Normalisierung wurde unmittelbar nach gesetztem Stimulus durchgeführt. Standardabweichungen wurden aus mindestens 4 Replikaten berechnet. Zur Basislinienkorrektur wurden nonsense transfizierte, unbehandelte HT-29/B6/mock verwendet. Sterne kennzeichnen signifikante Ergebnisse nach ungepaartem t-Test (***: $P < 0,001$).

Die Zytokin-Behandlung der HT-29/B6/mock führte unabhängig von der Transfektion zu einem Abfall des cell index ohne erkennbare Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Transfektionen. Die Transfektion der HT-29/B6/mock mit miR-491-5p-mimic ohne Behandlung mit IFN- γ und TNF- α führte zu einem Anstieg des cell index gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der cell index in HT-29/B6/hdff3 bleibt über den gesamten Beobachtungszeitraum über dem der HT-29/B6/mock. Des Weiteren war kein Unterschied im Verlauf des cell index in HT-29/B6/hdff3 nach Transfektion mit nonsense RNA oder siRNA gegen PRINS im Vergleich zu ihren IFN- γ - und TNF- α - behandelten Varianten zu erkennen. Insgesamt verlief der cell index jedoch nach Transfektion mit siRNA gegen PRINS im Vergleich zur nonsense transfizierten Kontrolle flacher. Dieser Effekt verstärkte sich nach Transfektion mit miR-491-5p-mimic. In HT-29/B6/hdff3 führte die Behandlung mit IFN- γ und TNF- α nach Transfektion mit

miR-491-5p-*mimic* zu einer signifikanten Reduzierung des *cell index* nach 36 h im Vergleich zur transfizierten aber unbehandelten Kontrolle ($P < 0,001$).

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Abfall des *cell index* auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen ist, wurde 6 h nach Transfektion, Vorsensibilisierung mit IFN- γ und 24stündiger Behandlung mit TNF- α , die aktive Form der Caspase-3 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 16). Des Weiteren diente dieser Ansatz der quantitativen Analyse des prozentualen Anteils Caspase-3-positiver Zellen.

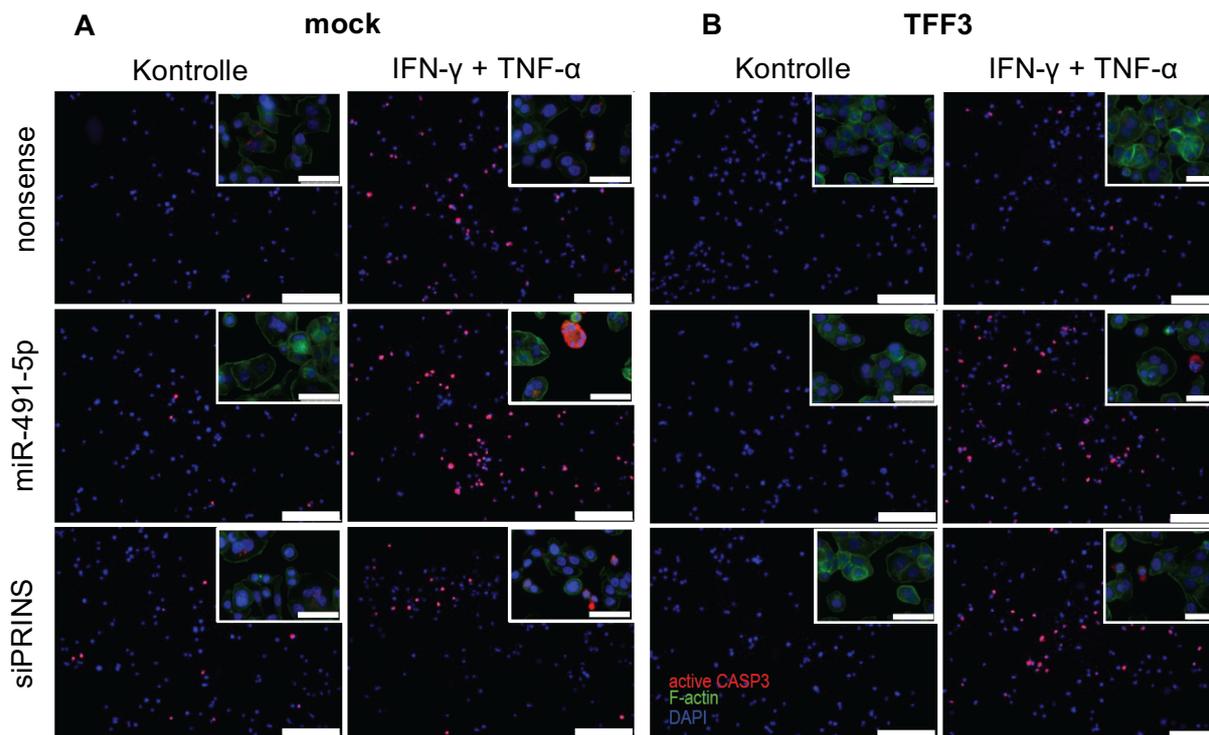


Abbildung 16 Nachweis der Apoptoseinduktion von HT-29/B6/mock (A) und HT-29/B6/hfff3 (B) durch Färbung der aktiven Caspase-3 und Zellkernen 6 h nach Transfektion mit miR-491-5p, siRNA gegen PRINS und nonsense RNA und anschließender 24stündiger Behandlung mit IFN- γ und TNF- α . Der Balken entspricht 25 μm . Zunahme des Caspase-3-Signals und Fragmentierung von Zellkernen nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α in HT-29/B6/mock unabhängig von der Art der Transfektion im Vergleich zu transfizierten und unbehandelten Kontrollen. Zunahme des Caspase-3-Signals und Fragmentierung von Zellkernen nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α in HT-29/B6/hfff3 und Transfektion mit miR-491-5p und siRNA gegen PRINS. Zusätzlich wurde im oberen rechten Bereich jedes Bildes ein Ausschnitt eingefügt, der die Zellen vergrößert und mit zusätzlicher Färbung von F-actin zeigt (siehe Anhang, Abbildung 36).

Wie deutlich zu erkennen ist, stieg der Anteil der aktiven Caspase-3-positiven Zellen nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α in HT-29/B6/mock unabhängig von der Transfektion deutlich an. In HT-29/B6/hfff3 war ausschließlich nach Transfektion mit siRNA gegen PRINS und miR-491-5p-*mimic* in Kombination mit IFN- γ und TNF- α die erwähnte Zunahme zu beobachten. Zur Quantifizierung wurde der Mittelwert der Caspase-3-positiven Zellen in Abhängigkeit zur Behandlung mit Hilfe der Software ImageJ automatisch berechnet (Abbildung 17).

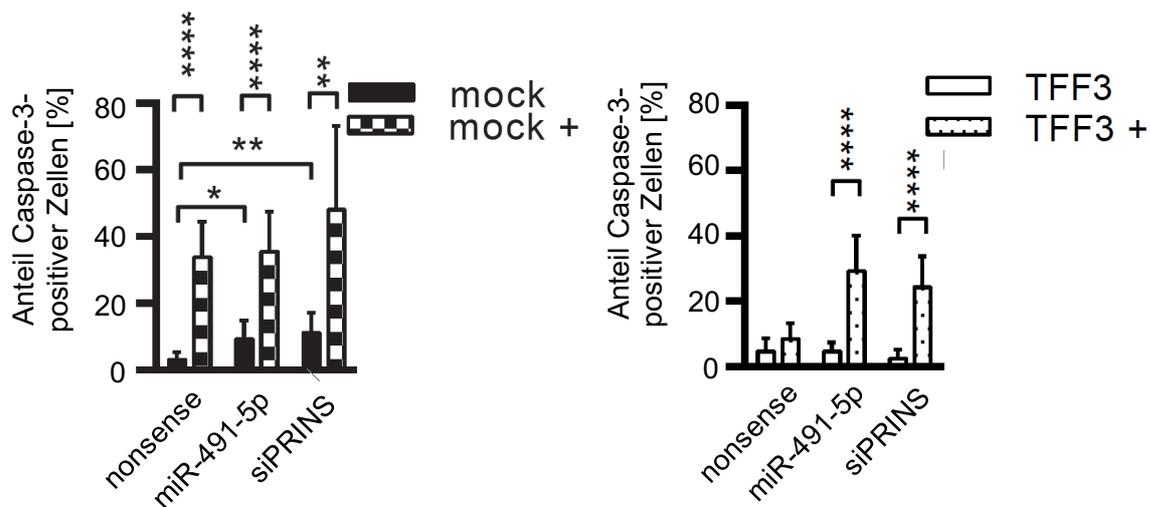


Abbildung 17 Quantitative Auswertung des prozentualen Anteils aktive Caspase-3-positiver HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hTFF3 6 h nach Transfektion mit miR-491-5p, siRNA gegen PRINS und nonsense RNA und 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Auswertung erfolgte automatisch mit Hilfe der Software ImageJ. Schwarze Balken stehen für den Mittelwert des prozentualen Anteils Caspase-3-positiver unbehandelter HT-29/B6/mock, karierte Balken für den IFN- γ und TNF- α behandelte HT-29/B6/mock, weiße Balken für den unbehandelte HT-29/B6/hTFF3 und gepunktete Balken für den behandelte HT-29/B6/hTFF3. Die Standardabweichung wurde aus mindestens 3 biologischen Replikaten berechnet. Die Behandlung führt unabhängig von der Transfektion in HT-29/B6/mock zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils Caspase-3-positiver Zellen. Die Transfektion allein führt ebenfalls zu einer Erhöhung im Vergleich zur nonsense transfizierten Kontrolle. In HT-29/B6/hTFF3 führt allein die Transfektion mit miR-491-5p-mimic und siRNA gegen PRINS mit anschließender IFN- γ - und TNF- α -Behandlung zu einem signifikanten Anstieg gegenüber der unbehandelten Kontrolle bzw. dem nonsense transfizierten und behandelten Ansatz. Sterne kennzeichnen signifikante Ergebnisse nach ungepaartem t-Test (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ****: $P < 0,0001$)

Die Transfektion der HT-29/B6/mock mit siRNA gegen PRINS oder miR-491-5p-mimic führte zu einem signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen ($P_{\text{miR-491-5p}} < 0,05$ und $P_{\text{siPRINS}} < 0,01$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die zusätzliche Behandlung mit IFN- γ und TNF- α führte unabhängig von der Transfektion zu einer mindestens dreifachen und ebenfalls signifikanten Erhöhung ($P < 0,01$). Wie auch zuvor schon beobachtet werden konnte, besitzen TFF3 überexprimierende Adenokarzinomzellen auch nach Transfektion mit nonsense RNA einen Schutz gegenüber einer IFN- γ - und TNF- α -induzierten Apoptose. Die Transfektion der HT-29/B6/hTFF3 mit siRNA gegen PRINS oder miR-491-5p-mimic führte jedoch zu einem dramatischen Anstieg des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (> 6-fach, $P < 0,0001$), auch wenn das Niveau der transfizierten und stimulierten HT-29/B6/mock nicht erreicht werden konnte.

Über die Funktionsweise von TFF3 ist bis heute erst wenig bekannt. Es existieren jedoch Hinweise, die auf eine enge Verbindung zum PI3K- und Wnt-Signalweg hindeuten. Die Aktivierung des PI3K-Signalweges beeinflusst unter anderem das Überleben und die Apoptose der Zellen. Im weiteren Vorgehen sollte überprüft werden, welche generellen Unterschiede HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hTFF3 in Bezug auf diesen Signalweg aufweisen, welche Auswirkung eine TRAIL-induzierte Apoptose auf die Regulation besitzt und welche

Rolle die beiden nicht kodierenden RNAs miR-491-5p und PRINS in diesem Zusammenhang spielen.

4.6 Die Regulation von PRINS durch miR-491-5p ist vom PI3K-Signalweg abhängig

Um die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges in HT-29/B6/hdff3 und HT-29/B6/mock mit und ohne Behandlung mit IFN- γ - und TNF- α zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt (Abbildung 18). AKT, PDK1 und p70-S6K bzw. ihre Phosphorylierungszustände wurden 24 h nach Behandlung detektiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die aktivierte Form der PDK1 kann sowohl AKT am Thr308 und Ser473 als auch direkt p70-S6K phosphorylieren. PDK1 bindet dabei direkt am phosphorylierten Thr389 von p70-S6K und phosphoryliert Thr229, was zu einer Aktivierung von p70-S6K führt. Durch die Aktivierung von AKT durch die Kinase PDK1 kann es unter anderem zur Inhibierung von p53, FOXO1 und GSK3 kommen, was einen Einfluss auf die Apoptose und die Zell-Zyklus-Regulation haben kann. P70-S6K, direkt durch PDK1 phosphoryliert, steht ebenfalls im Zusammenhang zur Apoptose aber auch Prozessen wie der Proliferation und dem Zellwachstum.

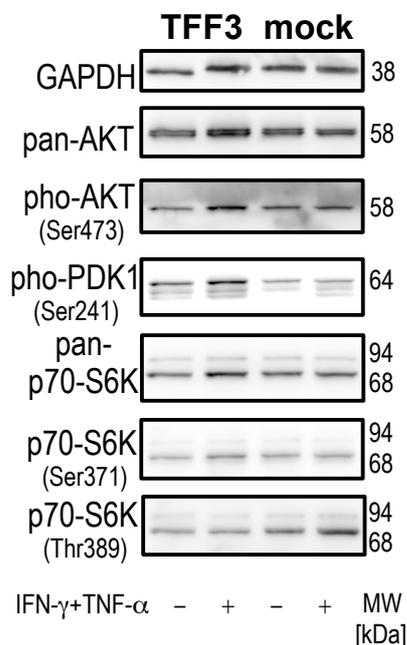


Abbildung 18 Detektion von AKT, PDK1 und p70-S6K bzw. ihrer phosphorylierten Formen 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α in HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hdff3. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die PDK1-Phosphorylierung (Ser241) ist in HT-29/B6/hdff3 deutlicher als in HT-29/B6/mock. HT-29/B6/mock weisen dagegen eine stärkere Phosphorylierung der p70-S6K (Thr389) im Vergleich zu HT-29/B6/hdff3 auf, wobei sich der Effekt durch den Stimulus mit IFN- γ und TNF- α noch verstärkt.

Es konnte kein Unterschied in der AKT-Phosphorylierung (Ser473) zwischen HT-29/B6/hdff3 und HT-29/B6/mock mit und ohne Stimulus festgestellt werden. Darüber hinaus konnte auch

kein Unterschied im Aktivierungsstatus von PDK1 (Ser241) zwischen IFN- γ - und TNF- α -behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet werden. HT-29/B6/hdff3 wiesen jedoch eine deutlich erhöhte Phosphorylierung und somit Aktivierung von PDK1 mit und ohne Stimulus im Vergleich zu HT-29/B6/mock auf. Der Phosphorylierungsstatus von p70-S6K (Ser371) erbrachte keine Unterschiede zwischen den Klonen und Behandlungen, während die Phosphorylierung am Thr389 in HT-29/B6/mock nach Stimulus deutlich zuzunehmen schien.

Um beurteilen zu können, ob die dysregulierte Expression der miR-491-5p und somit auch von PRINS vom PI3K/AKT oder einem anderen Signalweg abhängig ist, wurden eine Reihe kleiner molekularer Inhibitoren verwendet, um PI3K oder weitere TFF3-relevante Signalwege (JAK2, PAR1, β -Catenin) zu inhibieren. Die Expression der miR-491-5p, PRINS und TFF3 wurde 1,5 h und 3 h nach Behandlung via miR-Q bzw. RT-qPCR untersucht (Abbildung 19 A, B, C). Des Weiteren wurden Western Blot-Analysen durchgeführt, um die Effektivität des PI3K-Inhibitors LY294002 anhand des Aktivierungsstatus von AKT (Ser473) zu überprüfen (Abbildung 19 D).

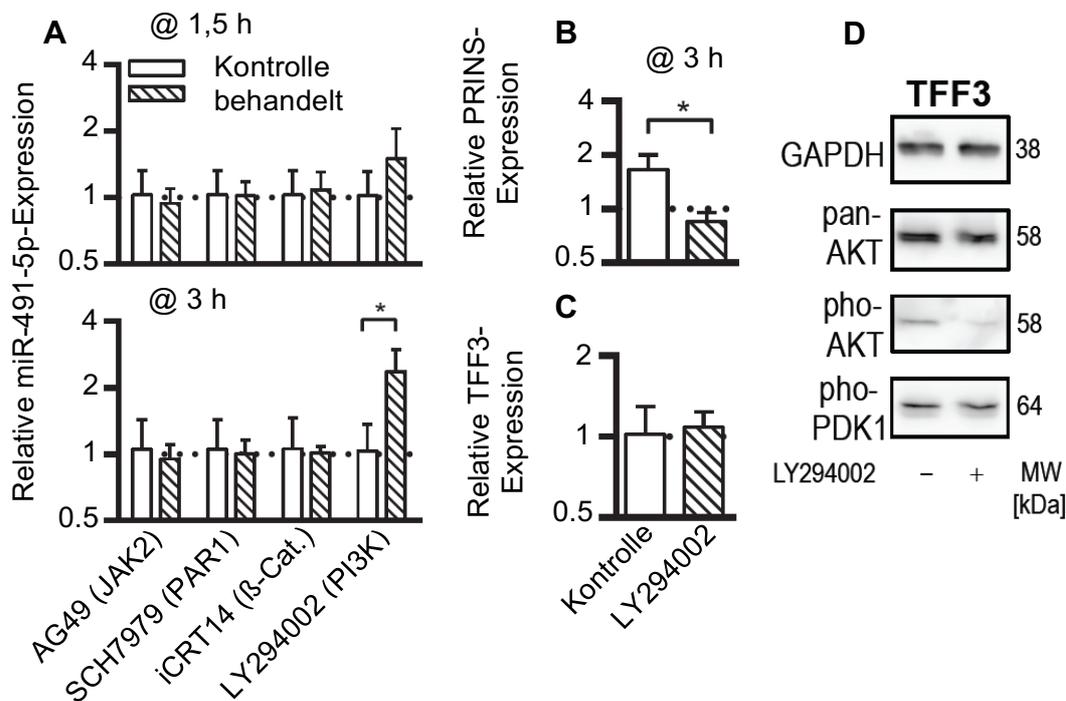


Abbildung 19 Expressionsanalyse der miR-491-5p 1,5 h und 3 h nach Behandlung mit unterschiedlichen Inhibitoren relativ zur DMSO-behandelten Kontrolle in HT-29/B6/hdff3. 1,5 h nach Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 ist eine Erhöhung der miR-491-5p-Expression zu erkennen, die 3 h nach Behandlung signifikant erhöht ist. Nach Behandlung mit AG49, SCH7979 und iCRT konnte keine Veränderung der miR-491-5p-Expression festgestellt werden. Die Expression von PRINS 3 h nach Behandlung mit LY294002 zeigte eine signifikante Herabregulierung im Vergleich zur Kontrolle. Die TFF3-Expression verbleibt 3 h nach PI3K-Inhibierung unreguliert. Weiße Balken stehen für den Mittelwert DMSO-behandelter HT-29/B6/hdff3 relativ zu DMSO-behandelten HT-29/B6/hdff3 und gestreifte Balken für den behandelten HT-29/B6/hdff3 relativ zu DMSO-behandelten HT-29/B6/hdff3. Western Blots zum Nachweis von AKT und PDK1 bzw. ihrer phosphorylierten Formen zeigten ein deutlich verringertes Signal der AKT-Phosphorylierung 3 h nach Inhibierung des PI3K-Signalweges. PDK1 zeigte keine Veränderung im Western Blot nach Behandlung mit LY294002. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar und wurden durch die Verwendung von mindestens 3 biologischen Replikaten berechnet. Sterne kennzeichnen signifikante Ergebnisse nach ungepaartem t-Test (*: $P < 0,05$)

Die Inhibierung des PI3K-Signalweges führte bereits 1,5 h nach Behandlung zu einer Erhöhung der miR-491-5p-Expression. 3 h nach Behandlung konnte eine mehr als 2fache und signifikante Erhöhung im Vergleich zu unbehandelten HT-29/B6/hTFF3 festgestellt werden ($P < 0,05$). Die Inhibierung des PI3K-Signalweges durch LY294002 schien die TFF3-abhängige miR-491-5p-Inhibierung nach 3 h aufzuheben. Western Blots konnten die Effizienz des Inhibitors LY294002 durch eine deutlich abnehmende Phosphorylierung von AKT bestätigen, wobei die Phosphorylierung von PDK1 keinen Unterschied erbrachte. Einhergehend mit der signifikant erhöhten miR-491-5p-Expression konnte 3h nach Inhibierung des PI3K-Signalweges eine signifikante Reduzierung des zellulären PRINS-Levels im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen werden. Der TFF3-Level blieb nach Behandlung mit LY294002 unverändert. Die Behandlung mit den Inhibitoren AG49, SCH7979 und iCRT erbrachte keine Veränderung der miR-491-5p-Expression.

Umgekehrt sollte überprüft werden, ob die miR-491-5p und PRINS einen Effekt auf den PI3K-Signalweg in den gewählten Zellmodellen ausüben. Dazu wurden HT-29/B6/hTFF3 und HT-29/B6/mock mit miR-491-p-mimic, siRNA gegen PRINS oder *nonsense* RNA transfiziert und PI3K-relevante Proteine im Western Blot detektiert (Abbildung 20).

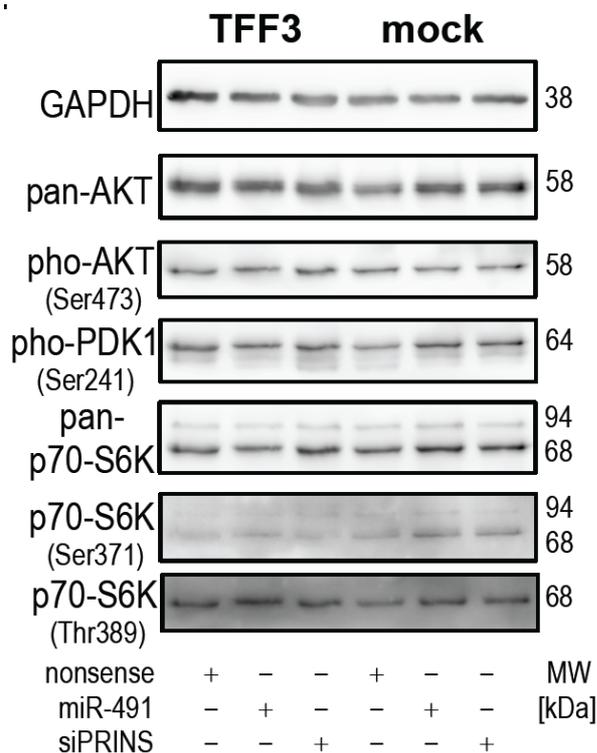


Abbildung 20 Detektion von AKT, PDK1 und p70-S6K bzw. ihrer phosphorylierten Formen 24 h nach Transfektion mit *nonsense* RNA, miR-491-5p-mimic und siRNA gegen PRINS in HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hTFF3. GAPDH diente der Ladekontrolle. Die AKT-Phosphorylierung verbleibt von der Transfektion unbeeinflusst. Eine Zunahme der PDK1-Phosphorylierung (Ser241) nach Transfektion mit miR-491-5p-mimic und siRNA gegen PRINS in HT-29/B6/mock ist zu erkennen. Sowohl in HT-29/B6/mock als auch HT-29/B6/hTFF3 nimmt die Phosphorylierung der p70-S6K (Thr389 und Ser371) nach Transfektion mit miR-491-5p-mimic und siRNA gegen PRINS zu. Die Phosphorylierung der p70-S6K am Ser371 ist darüber hinaus in HT-29/B6/mock höher als in HT-29/B6/hTFF3.

Die Transfektion hatte keinen erkennbaren Effekt auf den Phosphorylierungsstatus von AKT (Ser473). Die PDK1-Phosphorylierung (Ser241) nahm nach miR-491-5p-*mimic* und siRNA-Transfektion in HT-29/B6/mock deutlich zu. Auch die Phosphorylierung am Thr389 und Ser371 der p70-S6K fiel sowohl nach Transfektion mit miR-491-5p-*mimic* als auch siRNA gegen PRINS in HT-29/B6/hdff3 und HT-29/B6/mock stärker aus im Vergleich zur *nonsense* RNA-transfizierten Kontrolle. Die Phosphorylierung der p70-S6K am Ser371 war zudem insgesamt höher in HT-29/B6/mock als in HT-29/B6/hdff3 und verstärkte sich zusätzlich nach Transfektion mit miR-491-5p-*mimic* und siRNA gegen PRINS.

Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, dann weisen sie darauf hin, dass die Überexpression von TFF3 zu einer verringerten Expression der miR-491-5p führt und diese in der Lage ist, durch eine direkte Bindung, die Expression der lncRNA PRINS herabzuregulieren. Diese Regulation läuft unter dem Einfluss des PI3K-Signalweges ab und hat eine direkte Auswirkung auf die Apoptose von HT-29/B6-Zellen. Transfektionen mit miR-491-5p-*mimic* bzw. siRNA gegen PRINS führen dazu, dass signifikant mehr TFF3-überexprimierende HT-29/B6-Zellen in einen durch IFN- γ - und TNF- α -induzierten Zelltod geschickt werden konnten. Dieser Stimulus scheint zudem die Expression beider nicht kodierender RNAs zu regulieren, ohne dabei einen deutlichen Einfluss auf TFF3 zu besitzen. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 21 schematisch zusammengestellt.

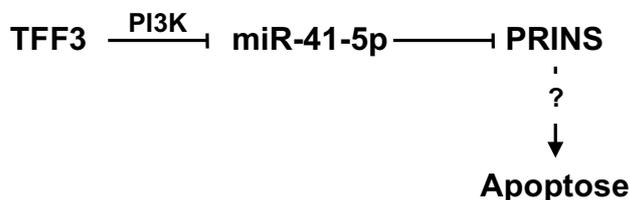


Abbildung 21 Schematische Darstellung des vermuteten Regulationsmechanismus anhand der bisherigen Ergebnisse. TFF3 führt PI3K-abhängig zu einer verringerten Expression der miR-491-5p. Diese ist in der Lage, die Expression von PRINS durch eine direkte Interaktion zu regulieren. Die verringerte Expression der miR-491-5p und die erhöhte Expression von PRINS in TFF3-überexprimierenden HT-29/B6-Zellen scheinen für eine verstärkte TRAIL-Resistenz mitverantwortlich zu sein.

Analysen auf Protein-Ebene geben darüber hinaus wichtige Hinweise darauf, wie die miR-491-5p und PRINS die Apoptose beeinflussen könnten. So konnten wir zeigen, dass überraschenderweise die p70-S6K eine stärkere Phosphorylierung nach Transfektion mit miR-491-5p-*mimic* bzw. siRNA gegen PRINS im Vergleich zur *nonsense* transfizierten Kontrolle aufwies. Auch die Behandlung mit IFN- γ und TNF- α führte zu einem verstärkten Signal der p70-S6K am Thr389 in HT-29/B6/mock im Western Blot. Des Weiteren konnten wir keine Veränderungen in der AKT-, dafür jedoch in der PDK1- Phosphorylierung zwischen HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hdff3 beobachten. Um die Rolle von PRINS weiter entschlüsseln zu können, stellten wir die Hypothese auf, dass PRINS an der Regulation pro- oder

antiapoptotisch-wirkender Proteine beteiligt sein könnte und darüber das Apoptoseverhalten TFF3-überexprimierender HT-29/B6-Zellen beeinflusst. Um dies zu überprüfen, wurde nachfolgend die Expression verschiedener Apoptose-relevanter Gene mittels RT-qPCR-Array untersucht.

4.7 PRINS reguliert pro- und anti-apoptotisch wirkende Proteine

Der folgende RT-qPCR-Array bestand aus Genen, die eine Relevanz in Prozessen wie der Apoptose und Zytokin-Zytokin-Rezeptor-Interaktion spielen (Sharbati, Lewin et al. 2011). Ihre Expression wurde 24 h nach Transfektion von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/htff3 mit *nonsense* RNA, miR-491-5p-*mimic* und siRNA gegen PRINS untersucht (Abbildung 22).

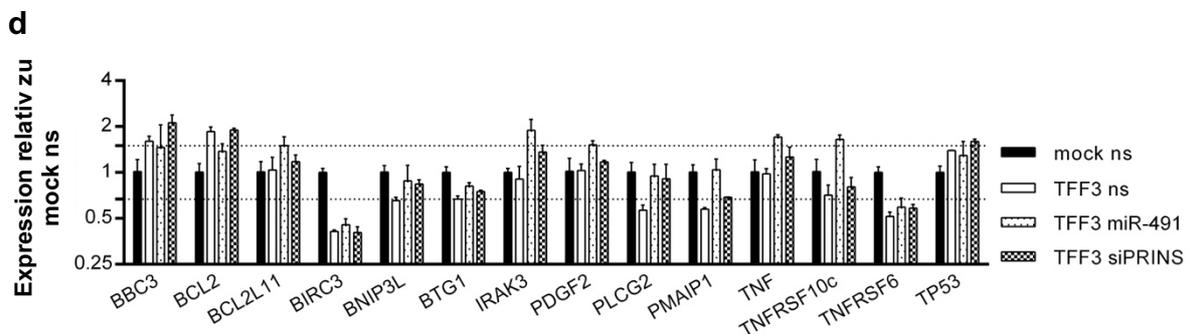


Abbildung 22 Expressionsanalyse verschiedener mRNAs (D) von HT-29/B6/mock bzw. HT-29/B6/htff3 24 h nach Transfektion mit *nonsense* RNA, miR-491-5p-*mimic* und siRNA gegen PRINS. Die Expressionsanalyse der mRNAs erfolgte mittels RT-qPCR-Array. Schwarze Balken zeigen den Mittelwert der Expression der *nonsense* transfizierten HT-29/B6/mock, weiße Balken den der *nonsense* transfizierten HT-29/B6/htff3, gepunktete Balken den miR-491-5p transfizierter HT-29/B6/htff3 und karierte Balken den siPRINS transfizierter HT-29/B6/htff3. Alle Werte wurden bezogen auf *nonsense* transfizierte HT-29/B6/mock. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar und wurden durch die Verwendung von mindestens 3 biologischen Replikaten berechnet.

In Abbildung 23 veranschaulichen *vulcano plots* die Regulation dieser Gene. Zur besseren Orientierung wurden alle Gene, die in HT-29/B6/htff3 im Vergleich zu HT-29/B6/mock signifikant verringert exprimiert wurden, mit einem grünen Punkt gekennzeichnet und alle signifikant hochregulierten Gene mit einem roten Punkt. Zusätzlich wurden die signifikant dysregulierten Gene beschriftet und die Quadranten kennzeichnen die Grenzen der Dysregulation.

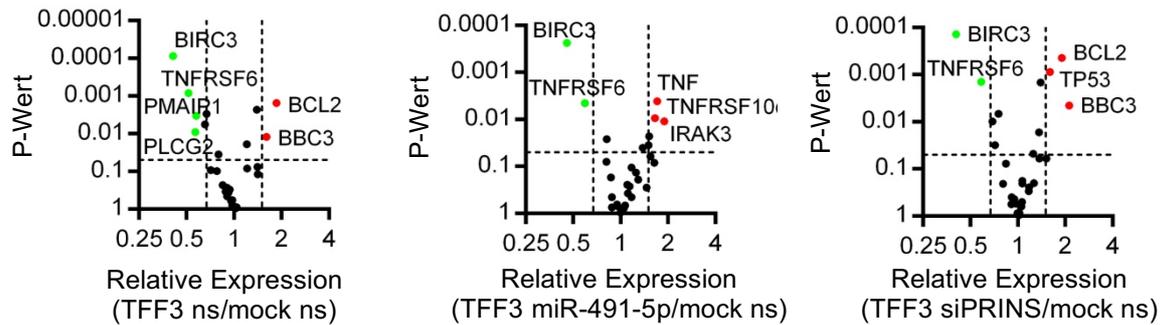


Abbildung 23 Darstellung der Expressionsanalyse verschiedener mRNAs von HT-29/B6/mock bzw. HT-29/B6/hfff3 24 h nach Transfektion mit nonsense RNA, miR-491-5p-mimic und siRNA gegen PRINS als volcano plots. Bereiche oben links im Diagramm stehen für signifikant herabregulierte Gene in HT-29/B6/hfff3 im Vergleich zu HT-29/B6/mock. Diese wurden beschriftet und mit einem grünen Punkt gekennzeichnet. Bereiche oben rechts im Diagramm stehen für signifikant hochregulierte Gene in HT-29/B6/hfff3 im Vergleich zu HT-29/B6/mock und wurden mit einem roten Punkt gekennzeichnet.

Die Überexpression von TFF3 führte zu einer signifikant erhöhten Expression von BCL2 und BBC3. Verschiedene andere pro- und anti-apoptotisch wirkende Faktoren wie PMAIP1, BIRC3, TNFRSF6 (Fas) und PLCG2 wurden signifikant herabreguliert im Vergleich zu *nonsense* transfizierten HT-29/B6/mock (Abbildung 23 a). Die Transfektion der HT-29/B6/hfff3 mit miR-491-5p-mimic glich die zuvor beobachtete Herabregulierung von PMAIP1 und PLCG2 und die Hochregulierung von BCL2 und BBC3 vollständig wieder aus (Abbildung 23 b). Die Transfektion mit siRNA gegen PRINS führte ebenfalls zu einem vollständigen Kompensationseffekt für PLCG2 und PMAIP1 (Abbildung 23 c). Durch dieses Experiment konnten Gene identifiziert werden, die in HT-29/B6/hfff3 deutlich dysreguliert zu sein schienen und sich sowohl nach Transfektion mit miR-491-5p-mimic als auch mit siRNA gegen PRINS dem Expressionsmuster der HT-29/B6/mock annäherten oder sogar komplett anglichen. Einen ähnlichen Kompensationseffekt konnten wir bereits in Abbildung 14 und 15 beobachten. Hierbei schien sich das Apoptoseverhalten von HT-29/B6/hfff3 dem der HT-29/B6/mock anzugleichen. Im weiteren Verlauf wurde sich auf die Untersuchung von PMAIP1 konzentriert, da dieses bereits als eindeutig apoptotischer Faktor beschrieben wurde. Anschließend wurden Western Blots durchgeführt, um die beobachtete Expressionsveränderung bzw. Kompensationseffekte auf Proteinebene nachvollziehen zu können (Abbildung 24).

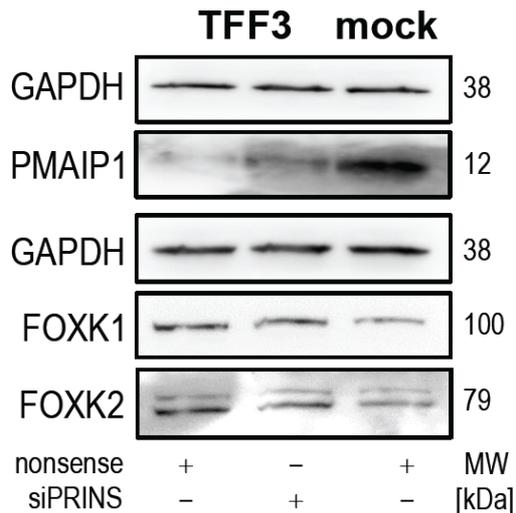


Abbildung 24 Detektion von GAPDH, PMAIP1, FOXK1 und FOXK2 24 h nach Transfektion mit nonsense RNA, und siRNA gegen PRINS in HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hdff3. GAPDH diente als Ladekontrolle. Für PMAIP1 ist ein wesentlich stärkeres Signal in HT-29/B6/mock als in HT-29/B6/hdff3 zu erkennen. PMAIP1 nimmt nach siRNA gegen PRINS in HT-29/B6/hdff3 zu. FOXK1 und FOXK2 werden in HT-29/B6/hdff3 stärker exprimiert als in HT-29/B6/mock, wobei kein Unterschied nach Verwendung von siRNA gegen PRINS beobachtet werden konnte.

PMAIP1 wurde in HT-29/B6/mock wesentlich stärker exprimiert als in HT-29/B6/hdff3. Der *knock-down* von PRINS mittels siRNA bestätigte die Ergebnisse der RT-qPCR und führte zu einer Kompensation von PMAIP1 auf Proteinebene, was sich bezogen auf *nonsense* transfizierte HT-29/B6/hdff3 durch eine Zunahme des Signals im Western Blot zeigte. Da PMAIP1 durch den Faktor FOXK2 inhibiert wird (van der Heide, Wijchers et al. 2015) und auch FOXK1 im engen Zusammenhang zu FOXK2 und Darmkrebskrankungen steht, wurden Western Blots zum Nachweis von FOXK1 und FOXK2 durchgeführt, um diesen Zusammenhang zu untersuchen. Der Proteingehalt an FOXK1 und FOXK2 war in HT-29/B6/hdff3 deutlich höher als in HT-29/B6/mock. Eine Veränderung des Proteingehaltes konnte nach Transfektion mit siRNA gegen PRINS nicht festgestellt werden.

Um zu überprüfen, ob PRINS zu einer direkten Interaktion mit den dysregulierten Proteinen in der Lage ist oder Sekundäreffekte den im Western Blot beobachteten Effekt erklären, wurde nachfolgend eine FISH zur PRINS-Detektion in Kombination mit einer IF zum Nachweis von FOXK1, FOXK2 und PMAIP1 durchgeführt. Sollte tatsächlich eine direkte Interaktion vorliegen, so könnte eine Co-Lokalisierung zu beobachten sein.

In Abbildung 25 ist die Lokalisierung von PRINS mittels FISH dargestellt, um die Spezifität des Signals in der späteren Kombination beider Methoden vergleichen und sicherstellen zu können.

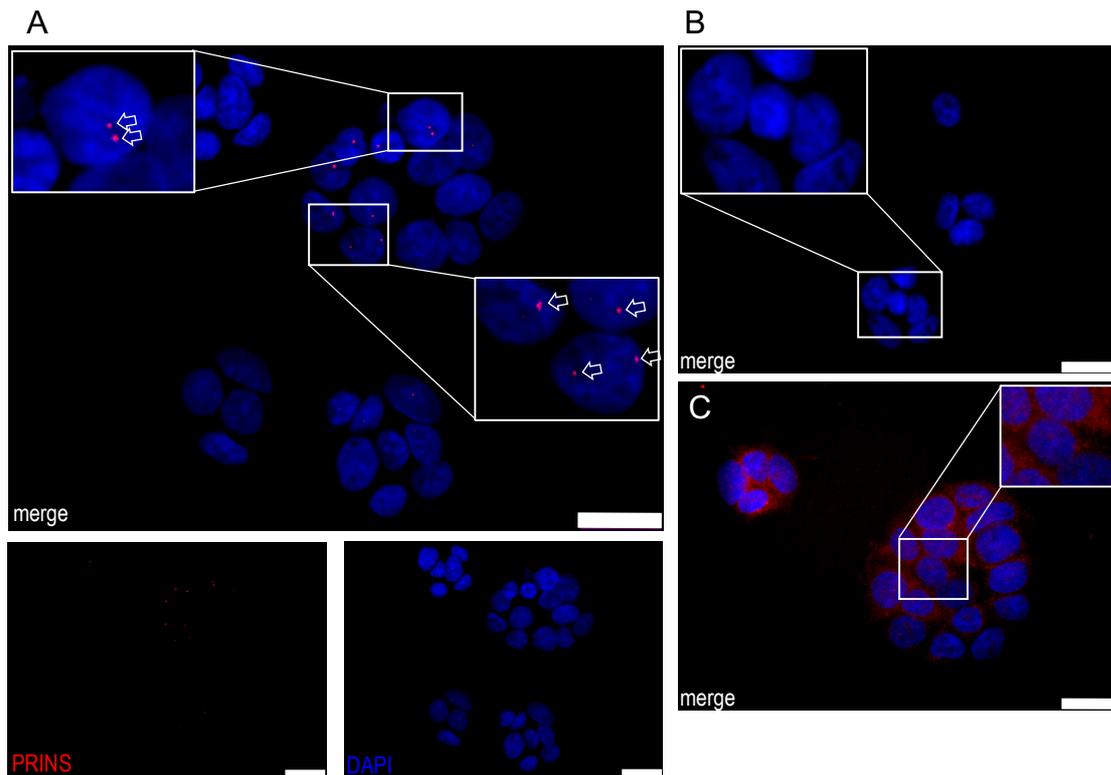


Abbildung 25 Nachweis der PRINS-Lokalisierung (rot) in HT-29/B6/hTff3 (A) mit Hilfe des Stellaris® RNA FISH Systems zur FISH. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Balken entspricht 25 µm. B: Negativkontrolle ohne Verwendung der Hybridisierungssonden. C: Negativkontrolle mit Hybridisierungssonden aber mit zusätzlicher RNase-Behandlung. PRINS ist in 1-2 Bereichen innerhalb des Nukleus detektierbar. Die Negativkontrolle ohne Hybridisierungsproben zeigt kein rotes Fluoreszenzsignal. Die Negativkontrolle mit Sonden aber mit RNase-Behandlung zeigt ein diffuses ubiquitär vorkommendes Signal ohne die 1-2 fokalen Signale, die in A zu sehen sind. Pfeile weisen auf das Fluoreszenzsignal und Lokalisierung von PRINS hin.

In Abbildung 25 A wird deutlich, dass sich PRINS ausschließlich in Form von 1 -2 fokalen Signalen im Zellkern zeigte. Zur Überprüfung der Spezifität wurden zwei Negativkontrollen berücksichtigt. Für die Negativkontrolle ohne Hybridisierungssonde (25 B) konnte kein Signal mehr detektiert werden. Für die Negativkontrolle mit Hybridisierungssonde aber zusätzlicher RNase-Behandlung ist ein deutliches rotes Fluoreszenzsignal messbar. Dieses diffuse Signal befand sich im zytoplasmatischen Bereich und im Zellkern. Jedoch war das in Abbildung 25 A erkennbare, fokale Signal im Zellkern nicht zu erkennen.

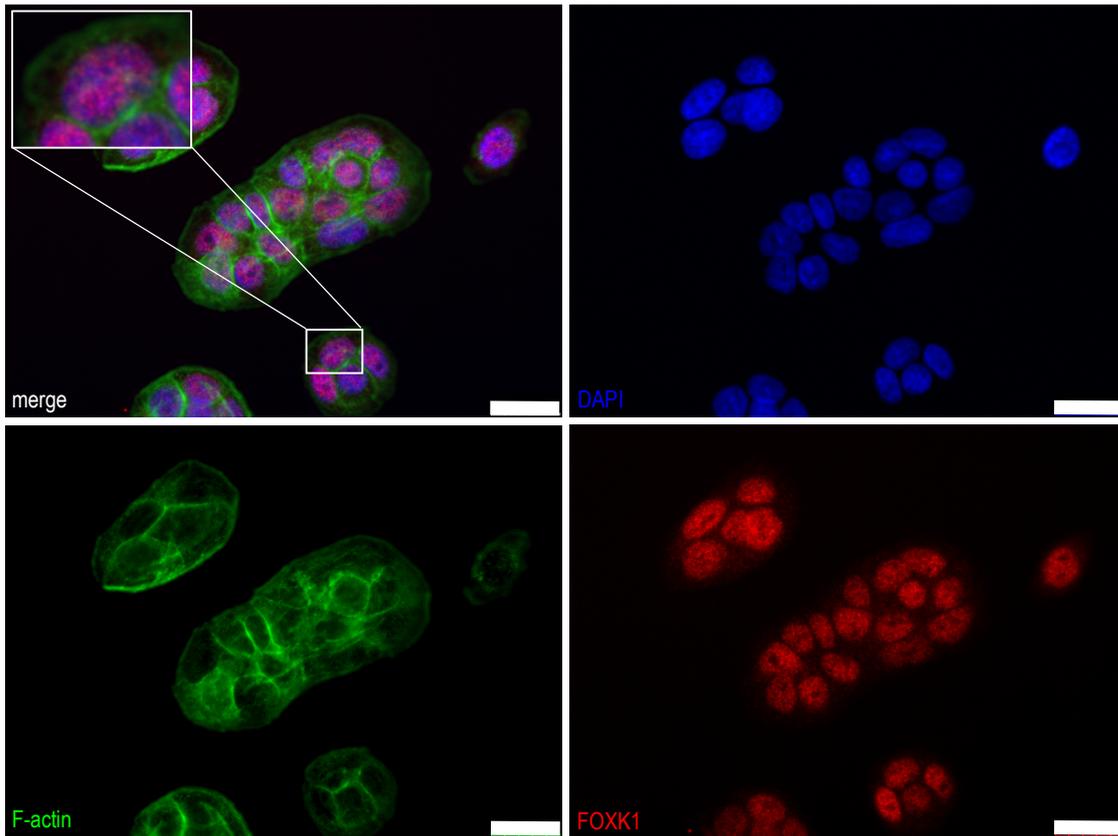


Abbildung 26 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FOXK1 (rot), F-actin (grün) und Zellkernen (blau) in HT-29/B6/hTff3. Der Balken entspricht 25 μm . FOXK1 ist größtenteils im Zellkern messbar. Ein geringerer Anteil ist auch im Zytoplasma detektierbar. Die Färbung von F-actin mit Phalloidin macht das typische inselartige Wachstum der Zellen bei geringer Konfluenz deutlich. Ein verstärktes F-actin-Signal ist besonders in den Bereichen der Zell-Zell-Kontakte zu beobachten.

Abbildung 26 zeigt die IF zum Nachweis von FOXK1 ohne gleichzeitige Detektion von PRINS. FOXK1 fand sich größtenteils im Zellkern wieder. Aber auch im zytoplasmatischen Bereich konnte ein geringerer Anteil detektiert werden. Zur besseren Veranschaulichung und Überprüfung der Lokalisierung wurde eine zusätzliche Färbung von F-actin durchgeführt. Durch die geringe Konfluenz wuchsen die Zellen als charakteristische Inseln mit engen Zell-Zell-Kontakten, die typisch für epitheliale Zellen sind. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der FOXK1-PRINS-Co-Lokalisierung abgebildet.

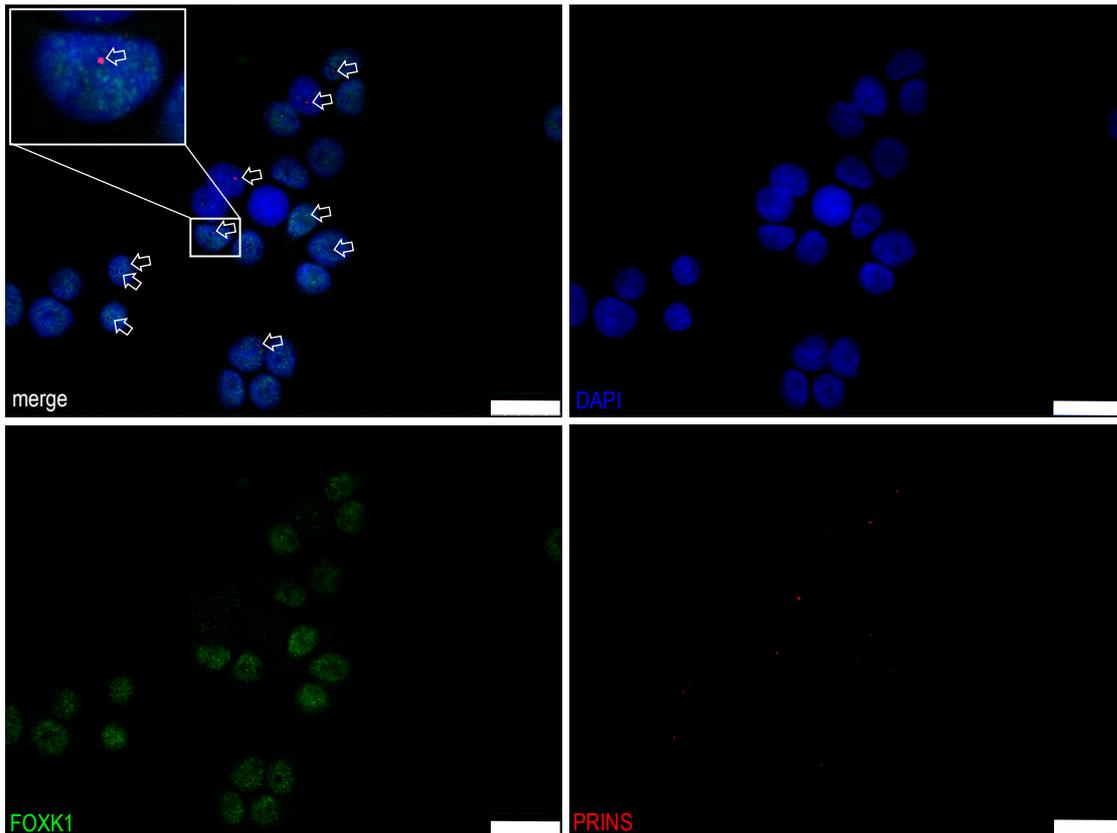


Abbildung 27 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FOXC1 (grün), PRINS (rot) und Zellkernen (blau) in HT-29/B6/hTff3 (A). Der Balken entspricht 25 μm . FOXC1 ist größtenteils im Zellkern messbar. Ein geringerer Anteil ist auch im Zytoplasma detektierbar. PRINS konnte mit Hilfe des Stellaris® RNA FISH Systems zur Hybridisierung im Zellkern lokalisiert werden, weist aber auf keine Co-Lokalisierung mit FOXC1 hin. Pfeile weisen auf das Fluoreszenzsignal und Lokalisierung von PRINS hin.

Auch hier zeigten sich die 1-2 fokalen Signale im Zellkern, die für die Lokalisierung von PRINS stehen. FOXC1 zeigte erneut das vor allem im Zellkern konzentrierte Signal, ohne dabei eine eindeutige Co-Lokalisierung mit PRINS zu besitzen. In Abbildung 28 ist die Lokalisierung von FOXC2 in HT-29/B6/hTff3 zu finden, die, abgesehen vom verwendeten Primärantikörper, nach denselben methodischen Ansätzen durchgeführt wurde wie bei FOXC1.

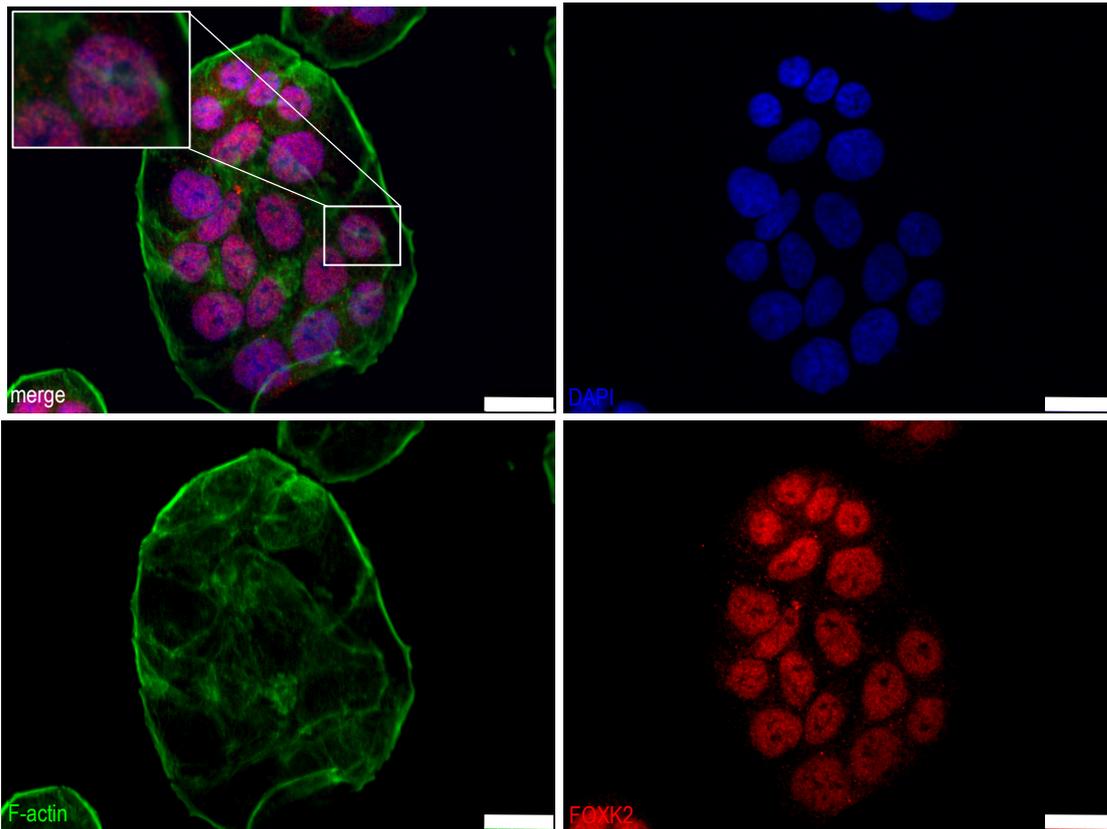


Abbildung 28 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FOXK2 (rot), F-actin (grün) und Zellkernen (blau) in HT-29/B6/htff3. Der Balken entspricht 25 μm . FOXK2 ist größtenteils im Zellkern messbar. Ein geringerer Anteil ist auch im Zytoplasma detektierbar. Die Färbung von F-actin mit Phalloidin macht das typische inselartige Wachstum der Zellen bei geringerer Konfluenz deutlich. Ein verstärktes F-actin-Signal ist besonders in den Bereichen der Zell-Zell-Kontakte oder Außengrenzen zu beobachten.

FOXK2 war größtenteils im Zellkern lokalisiert, wobei ein geringerer Anteil im Zytoplasma gemessen werden konnte. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der FOXK2-PRINS-Co-Lokalisierung abgebildet.

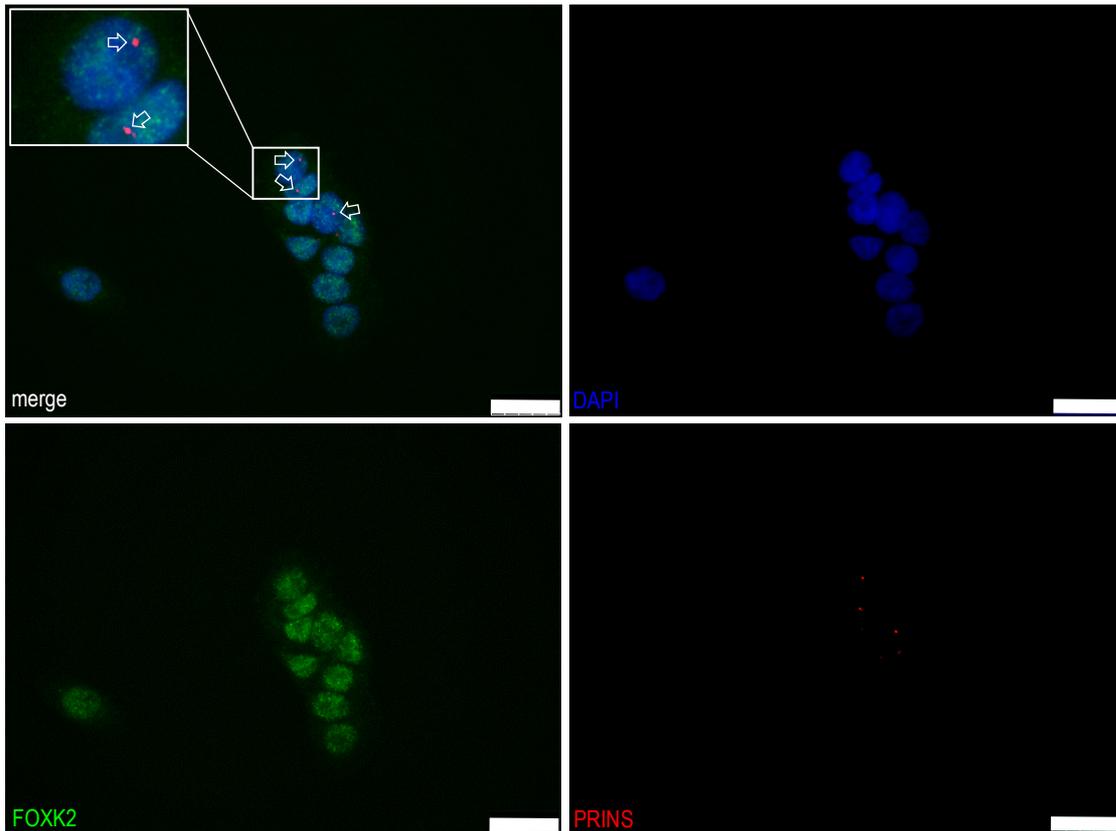


Abbildung 29 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FOXC2 (grün), PRINS (rot) und Zellkernen (blau) in HT-29/B6/hTtf3. Der Balken entspricht 25 μm . FOXC2 ist größtenteils im Zellkern messbar. Ein geringerer Anteil ist auch im Zytoplasma detektierbar. PRINS konnte mit Hilfe des Stellaris® RNA FISH Systems zur Hybridisierung im Zellkern lokalisiert werden, weist aber auf keine Co-Lokalisierung mit FOXC2 hin. Pfeile weisen auf das Fluoreszenzsignal und Lokalisierung von PRINS hin.

Es zeigte sich eine Lokalisierung von PRINS und FOXC2 im Zellkern, ohne eine eindeutige Co-Lokalisierung. Der Abbildung 30 ist die Lokalisierung von PMAIP1 in HT-29/B6/hTtf3 zu entnehmen. PMAIP1 konnte in HT-29/B6/hTtf3 und HT-29/B6/mock als dysreguliert identifiziert werden. Nach *knock-down* von PRINS kam es zur Kompensation des verringerten PMAIP1-Levels in HT-29/B6/hTtf3 in Richtung des Niveaus von HT-29/B6/mock. Eine direkte oder indirekte Regulation von PMAIP1 durch PRINS ist wahrscheinlich und wurde in Form einer Co-Lokalisierung überprüft (Abbildung 31).

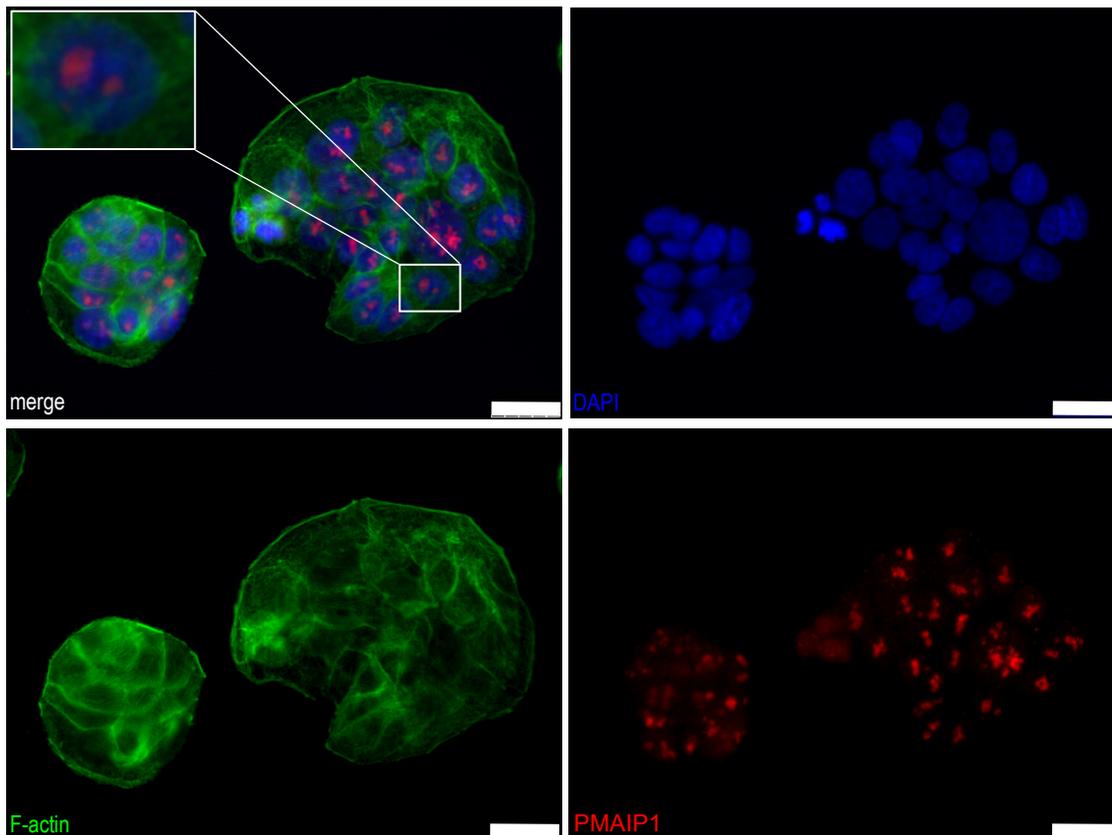


Abbildung 30 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von PMAIP1 (rot), F-actin (grün) und Zellkernen (blau) in HT-29/B6/hff3 (A). Der Balken entspricht 25 μm . PMAIP1 ist größtenteils im Zellkern messbar, wobei innerhalb des Zellkerns Bereiche mit einem erhöhten PMAIP1-Anteil existieren. Ein geringerer Anteil ist auch im Zytoplasma detektierbar.

PMAIP1 war sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma zu finden. Im Nukleus waren hierbei Bereiche zu entdecken, in denen das Protein konzentriert vorzufinden war und ein fokales Fluoreszenzsignal erzeugte. Dieses schien sich bei Beschädigungen bzw. Fragmentierungen der Zellkerne in ein disperses, ubiquitär vorkommendes schwächeres Signal aufzulösen.

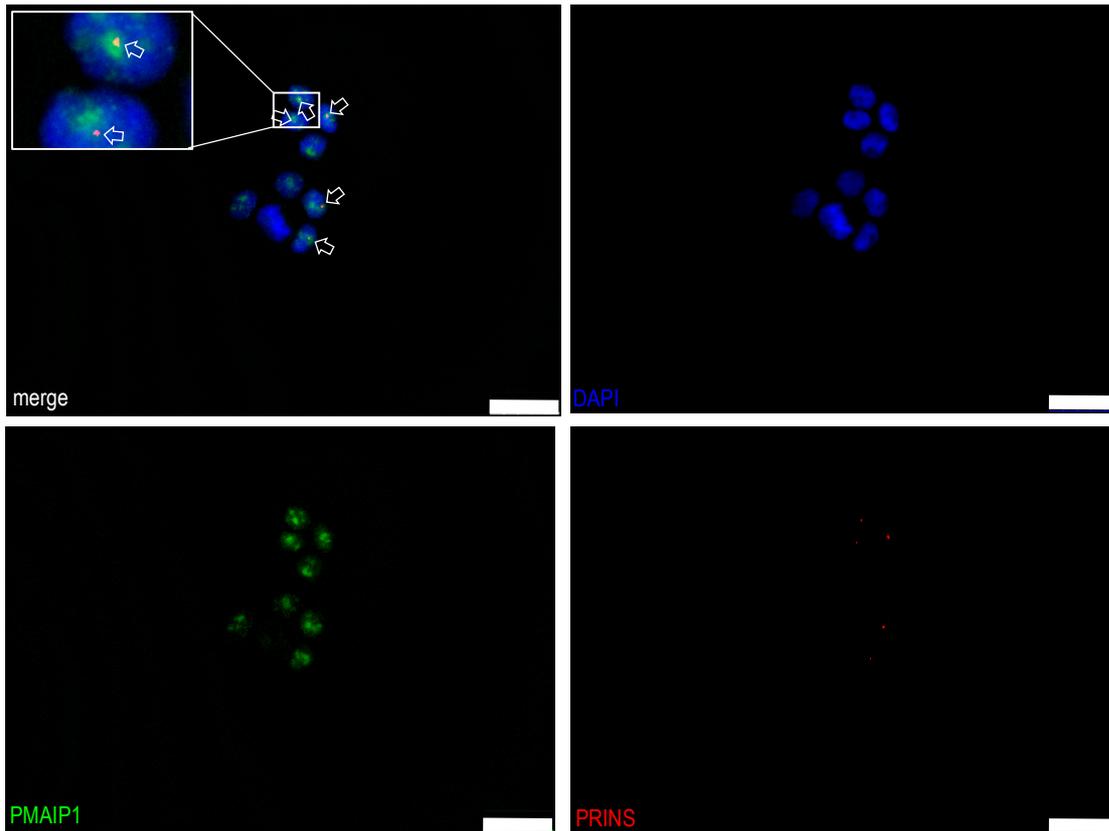


Abbildung 31 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von PMAIP1 (grün), PRINS (rot) und Zellkernen (blau) in HT-29/B6/hTtf3. Der Balken entspricht 25 μm . PMAIP1 ist größtenteils im Zellkern messbar, wobei es innerhalb des Zellkerns Bereiche gibt, in denen ein besonders intensives Fluoreszenzsignal gemessen werden konnte. Ein geringerer Anteil ist auch im Zytoplasma detektierbar. PRINS konnte mit Hilfe des Stellaris® RNA FISH Systems zur Hybridisierung im Zellkern lokalisiert werden. Die Färbungen zeigen eine klare Co-Lokalisierung mit PMAIP1 in den Bereichen, in denen eine besonders hohe Fluoreszenz gemessen werden konnte. Pfeile weisen auf das Fluoreszenzsignal und die Lokalisierung von PRINS hin.

In Abbildung 31 ist deutlich zu erkennen, dass PRINS in den Bereichen des Nukleus detektiert werden konnte, in denen PMAIP1 akkumuliert vorkam. Eine Co-Lokalisierung von PMAIP1 und PRINS im Nukleus konnte somit gezeigt werden. Die räumliche Nähe von PMAIP1 und PRINS untermauert die Hypothese einer möglichen gegenseitigen Regulation. Hinzu kommen die Hinweise aus Abbildung 30, die auf eine Translokation von PMAIP1 vom Zellkern in das Zytoplasma bei einer stattfindenden Apoptose der Zellen hindeuten könnten. Wie in Abbildung 14 zu sehen war, kam es zu einer signifikanten Herabregulierung der PRINS-Expression nach dem Stimulus mit IFN- γ und TNF- α in HT-29/B6/hTtf3. Diese könnte mit einer Translokation von PMAIP1 korrelieren. Des Weiteren führte auch die Verwendung von siRNA gegen PRINS zu einem Anstieg des PMAIP1-Gehaltes in Richtung der HT-29/B6/mock.

4.8 TFF3 verhindert PRINS-abhängig die zytoplasmatische Akkumulierung von PMAIP1

Nachfolgend wurden Western Blot-Analysen durchgeführt, um eine mögliche Translokation von PMAIP1 nach Stimulus mit IFN- γ - und TNF- α zu quantifizieren und zu überprüfen, welchen Einfluss PRINS in diesem Zusammenhang besitzt. Hierzu wurden, nach Herabregulierung von PRINS mittels siRNA und 6 h nach Stimulus mit IFN- γ - und TNF- α , Proteine isoliert und der zytoplasmatische vom nukleären Anteil aus einer Probe separiert. Verglichen wurde der Proteingehalt von *nonsense* transfizierten HT-29/B6/h $tff3$ und HT-29/B6/mock mit und ohne Stimulus. Als Ladekontrolle diente eine Coomassie-Färbung für den nukleären Proteinanteil und eine Ponceau-Färbung für den zytoplasmatischen Anteil.

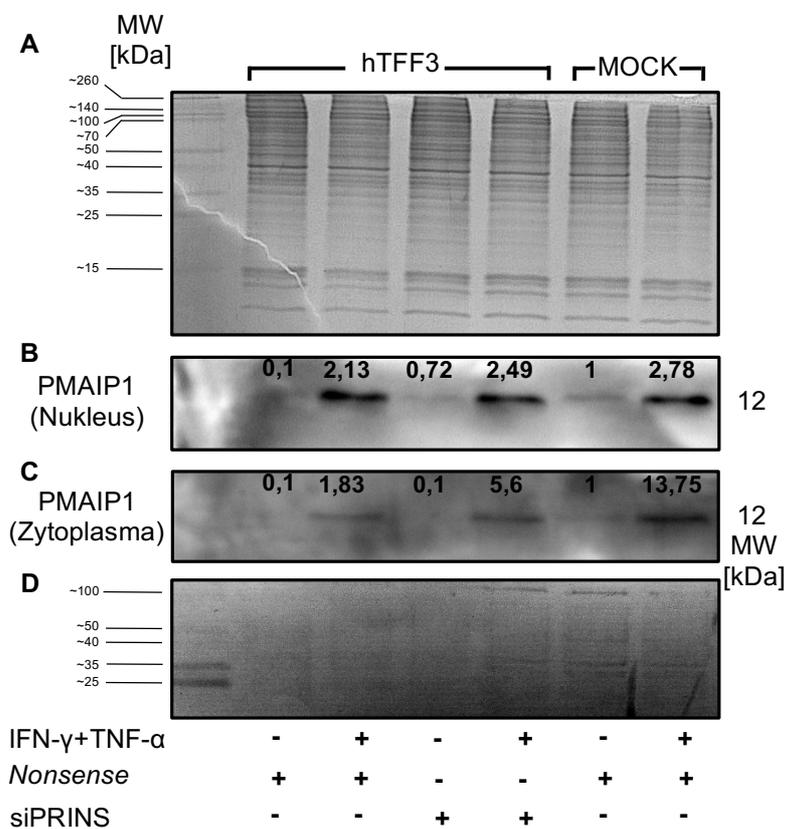


Abbildung 32 Detektion von PMAIP1 24 h nach Transfektion mit nonsense RNA und siRNA gegen PRINS in HT-29/B6/mock und HT-29/B6/h $tff3$ und 6 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α . Eine Coomassie-Färbung für die zytoplasmatische Proteinfraction (A) und eine Ponceau-Färbung für die nukleäre (D) dienten als Ladekontrolle. Für PMAIP1 ist sowohl im nukleären als auch zytoplasmatischen Proteinanteil ein wesentlich stärkeres Signal in unbehandelten und nonsense transfizierten HT-29/B6/mock im Vergleich zu unbehandelten und nonsense transfizierten HT-29/B6/h $tff3$ zu erkennen (B und C). Nach siRNA gegen PRINS nimmt das PMAIP1-Signal im nukleären Anteil unbehandelter HT-29/B6/h $tff3$ im Vergleich zu dem nonsense transfizierter, unbehandelter HT-29/B6/h $tff3$ zu (B). Nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α steigt das PMAIP1-Signal im nukleären als auch zytoplasmatischen Anteil in HT-29/B6/h $tff3$ und HT-29/B6/mock und in allen Transfektionsansätzen an (B und C). Ein wesentlich stärkeres Signal ist in behandelten und nonsense transfizierten HT-29/B6/mock im Vergleich zu allen anderen Ansätzen im zytoplasmatischen Anteil zu detektieren. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Bandenstärke mit der Software ImageJ quantifiziert und auf unbehandelte, nonsense transfizierte HT-29/B6/mock normalisiert. Die Ergebnisse stammen aus einem pool aus drei biologischen Replikaten.

Wie in Abbildung 32 B und C zu erkennen ist, war der PMAIP1-Gehalt in unbehandelten und *nonsense* transfizierten HT-29/B6/mock größer als der unbehandelter und *nonsense* transfizierter HT-29/B6/htff3. Die Ergebnisse aus Abbildung 24 wurden somit bestätigt. Durch die Behandlung mit IFN- γ - und TNF- α kam es sowohl in HT-29/B6/mock als auch in HT-29/B6/htff3 zu einer Zunahme des PMAIP1-Signals in beiden Kompartimenten. In HT-29/B6/mock scheint dabei die Lokalisierung von PMAIP1 im Zytoplasma dominanter zu sein als in HT-29/B6/htff3 (Abbildung 32 C). Die Transfektion mit siRNA gegen PRINS in unbehandelten HT-29/B6/htff3 führte zu einer Zunahme des PMAIP1-Gehaltes im Nukleus und somit zu einer Annäherung auf das Niveau von HT-29/B6/mock. Auch ist eine Zunahme des PMAIP1-Signals in behandelten und siPRINS-transfizierten HT-29/B6/htff3 nach Stimulus im zytoplasmatischen Bereich zu erkennen (Abbildung 32 C).

4.9 PRINS beeinflusst direkt den TFF3-abhängigen PMAIP1-Gehalt

Um die direkte Interaktion von PRINS und PMAIP1 zu überprüfen, wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurden formaldehydfixierte und unfixierte HT-29/B6/htff3 lysiert und PMAIP1 durch eine spezifische Antikörperbindung über magnetische Teilchen separiert. Die Effektivität der Separation wurde zunächst über die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mit Hilfe einer Silberfärbung sichergestellt. Hierzu wurden das anfängliche Lysat, der Überstand, der die ungebundenen Proteine enthalten sollte, und das eigentliche Präzipitat auf ein Tricingel aufgetragen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennt (Abbildung 33 A). Darüber hinaus wurde das Vorhandensein von PMAIP1 im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 33 B).

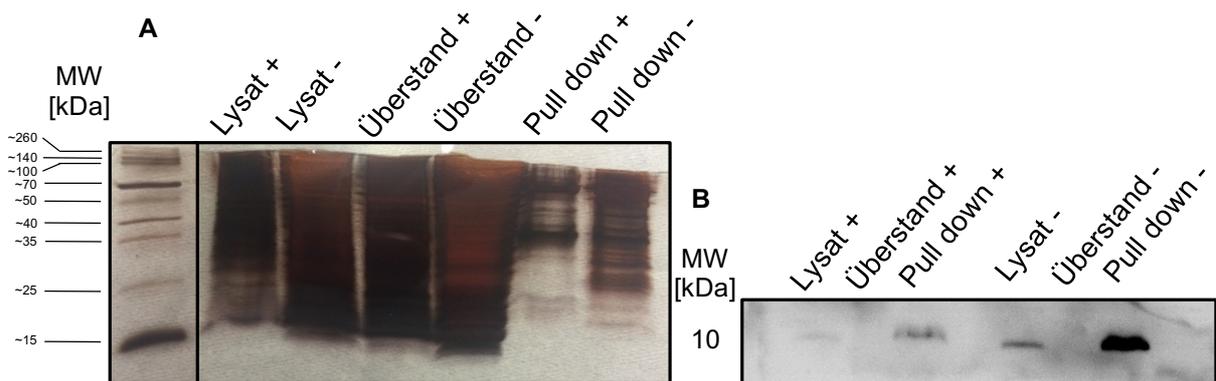


Abbildung 33 Silberfärbung von lysierten, fixierten bzw. lysierten, unfixierten HT-29/B6/htff3, von den Überständen mit ungebundenen Proteinen aus der PMAIP1 Co-IP und von präzipitierten Proteinen (A). Es ist eine deutliche Abnahme des Gesamtproteingehaltes nach Immunpräzipitation zu erkennen. Der spezifische Nachweis von PMAIP1 im Western Blot zeigte die Anreicherung von PMAIP1 nach Co-IP (B). Es konnte ein wesentlich stärkeres Antikörpersignal nach Co-IP von unfixierten Zellen im Vergleich zu fixierten Zellen festgestellt werden. Zudem zeigte sich für PMAIP1 in unfixierten Proben ein schnelleres Laufverhalten als in fixierten Proben. (+) steht für formaldehydfixierte HT-29/B6/htff3 und (-) für unfixierte HT-29/B6/htff3.

Die durchgeführte Silberfärbung zeigte eine deutliche Abnahme des Gesamtproteingehaltes nach erfolgter Co-IP gegenüber dem anfänglichen Zelllysatsatz bzw. den Überständen mit ungebundenen Proteinen. Dabei schien der Proteingehalt unfixierter Proben größer zu sein als der formaldehydfixierter Ansätze. Im Western Blot, zum spezifischen Nachweis von PMAIP1, konnte in beiden Ansätzen eine Anreicherung von PMAIP1 durch die Co-IP festgestellt werden. Generell ist auch hier die Ausbeute in unfixierten Proben wesentlich höher als die fixierter. In den Überständen lag der PMAIP1-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze. Interessanterweise führte die Fixierung zu einem unterschiedlichen Laufverhalten im SDS-PAGE. Während anhand der Markerbanden eine Größe von > 10 kDa für PMAIP1 in fixierten Proben festgestellt werden konnte, wiesen unfixierte Proteine ein schnelleres Laufverhalten auf und somit ein Molekulargewicht < 10 kDa.

Final wurde überprüft, ob mit der Immunpräzipitation von PMAIP1 auch eine Anreicherung von PRINS einhergeht. Hierzu wurden die magnetischen Teilchen nach erfolgter Co-IP proteinasebehandelt, um gebundene RNA vom Komplex zu lösen. Als zusätzliche Kontrolle wurde auch ein RNase-Verdau durchgeführt, um die nicht-proteingebundene RNA zu entfernen. Unserer Theorie nach sollte die angenommene Komplexierung von PMAIP1 und PRINS einen RNase-Angriff auf PRINS verhindern. Die freigesetzte RNA wurde vor der reversen Transkription gefällt und aufgereingt. Eine durchgeführte PCR mit einem PRINS-spezifischen Primer-Paar, sollte die Anreicherung von PRINS bestätigen. Um die Spezifität der Methode zu überprüfen, wurde ebenfalls eine PCR zur Detektion von GAPDH durchgeführt (Abbildung 34).

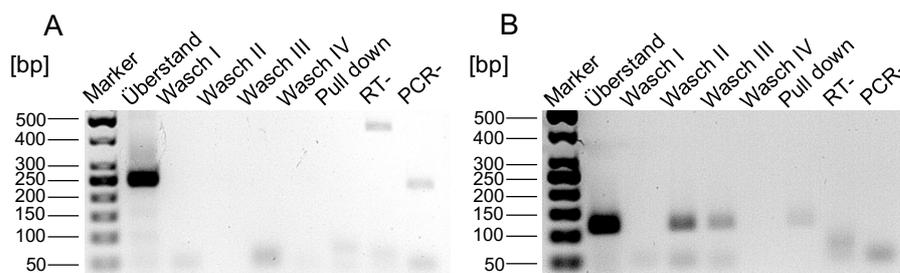


Abbildung 34 Ergebnisse der PCR für GAPDH (A) und PRINS (B) nach Co-IP von PMAIP1 aus unfixierten Zelllysaten. GAPDH konnte lediglich im Überstand nach Kopplung der magnetischen Teilchen an die Lysat-Antikörper-Mischung (Überstand) detektiert werden. Die PCR-Negativkontrolle für GAPDH mit Wasser anstatt RT-Reaktion ist leicht positiv. PRINS konnte im Überstand, nach Waschschrift II und III und im Pull down nachgewiesen werden. Legende: Wasch I (Waschen mit Cell Lysis Buffer), Wasch II (Waschen mit dem Stellaris® Waschpuffer A), Wasch III (Waschen mit dem Stellaris® Waschpuffer A), Wasch IV (Waschen mit dem Stellaris® Waschpuffer B).

PRINS konnte im Überstand nach Kopplung der magnetischen Teilchen an die Lysat-Antikörper-Mischung, nach Waschschriften mit dem Stellaris® Waschpuffer A (Wasch II und III) und erfolgter Co-IP von PMAIP1 detektiert werden. GAPDH wurde als Kontrolle ebenfalls mittels PCR analysiert und konnte allein im Überstand detektiert werden.

5. Diskussion

Epitheliale Zellen besitzen eine enorme regenerative Kapazität, sodass Verletzungen unter physiologischen Bedingungen schnell und ohne Narbenbildung heilen. Die Restitution zur Erhaltung der Homöostase läuft ohne Proliferation, allein durch die Migration intakter Zellen am Ort der Verletzung ab (Lipkin, Sherlock et al. 1963; Lacy 1988). TFF3 scheint als potentes Mitogen eine Schlüsselrolle bei diesem Prozess einzunehmen und ist in der Lage, die Apoptose zum Teil zu inhibieren (Wright, Hoffmann et al. 1997). Die in dieser Arbeit verwendeten humanen intestinalen Adenokarzinomzellen (HT-29/B6) wachsen als hochdifferenzierte und polarisierte Monolayer, die in der Lage sind, Mucin zu sekretieren und somit sehr gut *in vivo*-Situationen abzubilden. Durch die stabile Transfektion konnte zudem eine erhöhte Expression von TFF3 in HT-29/B6/htff3 erreicht werden (Meyer zum Buschenfelde, Tauber et al. 2006). Kommt es zu einer Störung der Restitution und somit der Homöostase kann dies zu chronisch inflammatorischen Erkrankungen (IBD) wie der Crohn-Krankheit (Morbus Crohn) oder der ulcerativen Colitis kommen. Diesen Erkrankungen ist gemein, dass sie mit einer erhöhten Expression von TNF- α einhergehen (MacDonald, Hutchings et al. 1990; Murch, Braegger et al. 1993; Farrell and Peppercorn 2002), einem Zytokin mit anti-proliferativen Eigenschaften, das in der Lage ist, die Tumorprogression zu verhindern (Matthews and Watkins 1978; Green, Dobrjansky et al. 1982). Zudem ist bekannt, dass eine Apoptoseinduktion in Tumorzellen aber nicht in normalen Zellen durch TNF- α möglich ist. Dieser Effekt, der auch als TRAIL-induzierte Apoptose bezeichnet wird, lässt sich durch die Präsensibilisierung mit IFN- γ verstärken (Jalving, de Jong et al. 2006). Durch die Überexpression von TFF3 in unserem Zellmodell war es naheliegend, ein damit einhergehendes anti-apoptotisches Potential der HT-29/B6/htff3-Zellen zu überprüfen. Durch die Rolle von TFF3 im Zuge der Homöostase und chronisch inflammatorischer Erkrankungen schien die Behandlung mit IFN- γ und TNF- α logisch, da hiermit am ehesten realistische *in vivo*-Situationen simuliert werden können. HT-29/B6/htff3 und die Kontrollzellen HT-29/B6/mock wurden hierzu nach Präsensibilisierung mit IFN- γ dauerhaft einer TNF- α -Behandlung unterzogen, was eine verstärkte TRAIL-induzierte Apoptose erwarten ließ. Der beobachtete Abfall des *cell index* mit Hilfe des xCELLigence®-Systems in HT-29/B6/mock ging mit einer deutlichen Zunahme des Signals für die gespaltene und somit aktive Form der Caspase-3 24 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α einher. Sowohl der ex- als auch der intrinsische Apoptosesignalweg enden in der Aktivierung der Effektor-Caspase-3 durch Caspase-8 oder Caspase-9 (Fernandes-Alnemri, Armstrong et al. 1996; Muzio, Salvesen et al. 1997; Cain, Brown et al. 1999). Weitere typische Merkmale eines stattgefundenen Apoptoseereignisses sind die Entstehung fragmentierter Zellkerne und Stressfasern, kleinen kontraktiven Aktin-Bündeln, die auch bei der Migration und Morphogenese von Bedeutung sind

(Hanna, Chan et al. 1999). Auch diese zellulären Reaktionen lassen sich deutlich nachvollziehen. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die TFF3-Überexpression den Zellen einen Schutz gegen eine TRAIL-induzierte Apoptose verleiht. Die protektiven Eigenschaften von HT-29/B6/htff3 traten dabei nicht allein nach einer viertägigen Vorinkubation auf. Vergleichbare Effekte konnten auch ohne Vorinkubation und sogar nach erfolgter Transfektion beobachtet werden. Ein ausdifferenzierter Zellstatus scheint vermutlich aufgrund der existierenden TFF3-Überexpression nicht notwendig zu sein. Dennoch war es für diese Arbeit essentiell für alle Experimente, nicht nur wegen einer höheren Homogenität und Standardisierung, eine viertägige Vorinkubationsphase einzuhalten, da der Schwerpunkt auf der Erforschung des Expressionsverhaltens nicht kodierender RNAs liegen sollte. Die Expression dieser Moleküle wiederum verändert sich deutlich in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Zellen.

TFF3 wird bei einer Vielzahl inflammatorischer Prozesse und Krebs vermehrt exprimiert. Eine Beteiligung bei der Abwehr und Reparatur des Epithels konnte, wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, in mehreren Studien und auch anhand unserer eigenen Forschungsergebnisse dieser Arbeit belegt werden (Kim, Kim et al. 2004; May, Semple et al. 2004). Mechanistisch ist bisher jedoch äußerst wenig über die Funktionsweise von TFF3 bekannt, auch wenn Hinweise existieren, die auf eine enge Verbindung zum PI3K- und Wnt-Signalweg hindeuten (Taupin, Kinoshita et al. 2000; Lin, Xu et al. 2013). Signalwege, die ebenfalls bei Krebserkrankungen besonders häufig dysreguliert zu sein scheinen. Zwar ist der Zusammenhang zwischen PI3K und Krebs schon seit den 1980er Jahren bekannt, jedoch ist erst in den letzten Jahren der Wissenschaft bewusst geworden, dass die Klasse der nicht kodierenden RNAs äußerst potente Regulatoren darstellt, die unter anderem auch die Entstehung maligner gastrointestinaler Tumore beeinflussen (Nakano, Miyazawa et al. 2010; Guo, Wang et al. 2012; Denoyelle, Lambert et al. 2014). Die Bedeutung dieser Klasse wird allein dadurch deutlich, dass gerade einmal 10 % der transkriptionellen zellulären Leistung zu funktionalen Proteinen führt. Der Rest ist zum Beispiel der Transkription von miRNAs oder lncRNAs gewidmet, die lange Zeit als evolutionärer Müll angesehen wurden. Wir stellten in dieser Arbeit die Hypothese auf, dass der beobachtete TFF3-vermittelte antiapoptotische Effekt möglicherweise auf das Zusammenspiel unterschiedlicher Klassen nicht kodierender RNAs zurückzuführen sein könnte. Die Existenz eines Interaktoms auf dieser Ebene kann seit der Entdeckung von miRNA-mRNA- oder miRNA-lncRNA-Interaktionen in unterschiedlichen Spezies nicht mehr angezweifelt werden.

Die in dieser Arbeit getesteten Kandidaten nicht kodierender RNAs stammten aus Literaturrecherchen und *in silico*-Analysen. Daraus ergab sich ein Satz aus 6 miRNAs, für die bereits eine Relevanz in Apoptosesignalwegen beschrieben oder aber eine Beteiligung in Krebs-, Apoptose-, Wnt- oder PI3K-Signalwegen *in silico* vorausgesagt wurde. Vervollständigt

wurde dieser Satz mit einer Reihe unterschiedlicher lncRNAs, deren Auswahl bereits in einer unserer jüngsten Publikationen beschrieben wurde (Pawar, Hanisch et al. 2016). Da der Anteil falsch-positiver Ergebnisse bei *in silico*-Analysen sehr hoch ist, wurden Expressionsanalysen 2, 4 und 7 Tage nach Aussaat der Zellen durchgeführt. Die unterschiedlichen Differenzierungszustände der Zellen könnten zum Beispiel einen Einfluss auf epitheliale und mesenchymale Marker besitzen und somit unter Umständen auch die Regulation nicht kodierender RNAs beeinflussen. Nur die Kandidatengene, die über einen Großteil des gewählten Beobachtungszeitraumes und in Abhängigkeit zur TFF3-Überexpression eine erhöhte oder verringerte Expression gezeigt haben, waren für uns von Interesse. Durch die durchgeführte mehrtägige Expressionsanalyse konnte so der Differenzierungsgrad der Zellen als möglicher Einflussfaktor ausgeschlossen werden. Nur stabil dysregulierte Transkripte sollten, unserer Hypothese nach, auch in der Lage sein den Zellen einen langanhaltenden Schutz gegenüber negativen Stimuli zu gewähren. Kürzere Expressionsveränderungen lassen sich entsprechend auch auf kurzfristige Anpassungen der Zellen zurückführen und waren für unsere Fragestellung somit irrelevant. Da eine potentielle gegenseitige Regulation zwischen miRNAs und lncRNAs zu untersuchen war, wurde zusätzlich auf antikorrelierte Expressionsmuster geachtet. Unter anderem zeigte die miR-491-5p eine stabile Herabregulierung in HT-29/B6/htfft gegenüber HT-29/B6/mock, die mit einer durchgängig signifikant erhöhten Expression von PRINS einherging. Damit erfüllte PRINS als einzige getestete lncRNA das Kriterium der Antikorrelation in Bezug auf die dysregulierten miRNAs und das Kriterium der stabilen Dysregulation. Die Kinetik wies darauf hin, dass die PRINS-Expression nicht allein auf TFF3 zurückzuführen sein kann. Nach 7 Tagen schien die PRINS-Expression abzunehmen, wobei sie weiterhin signifikant über dem Level von HT-29/B6/mock verblieb. Bei gleichbleibender TFF3-Überexpression schienen noch weitere, bislang unbekannte Regulationsmechanismen in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Zellen die Transkription von PRINS zu modifizieren. Damit bestätigte sich die oben erwähnte Hypothese, dass auch sekundäre Effekte, unabhängig von TFF3, einen Einfluss auf die Expression relevanter Gene besitzen können und rechtfertigt somit die gewählte viertägige Vorinkubation für die folgenden Experimente.

Die mögliche gegenseitige Regulation zwischen den dysregulierten miRNAs und PRINS wurde *in silico* mit Hilfe des Analysewerkzeugs RNAhybrid überprüft und es zeigten sich mehrere hypothetische Bindestellen, die eine direkte Bindung ermöglichen könnten. Durch *gain-of-function*-Experimente mit der miR-491-5p konnte eine verringerte PRINS-Expression erreicht werden, was die zuvor beobachtete Antikorrelation bestätigte und als weiteres Indiz einer gegenseitigen Regulation diente. Natürlich kann die veränderte PRINS-Expression auch auf Sekundäreffekte zurückzuführen sein, sodass auf keinen Kausalzusammenhang geschlossen werden kann. Ein Reporterassay erbrachte letztendlich den Beweis, dass eine Regulation

durch die Interaktion der miR-491-5p mit PRINS an der *in silico* vorausgesagten Bindestelle #3 möglich ist und ein Kausalzusammenhang mit großer Wahrscheinlichkeit besteht. Auch nach Transfektion mit miR-326-*mimic* ist ein deutlicher Abwärtstrend in der PRINS-Expression zu erkennen. Die Herabregulierung ist in diesem Fall jedoch nicht signifikant, sodass auf eine Überprüfung der direkten Interaktion mit PRINS verzichtet wurde. Dennoch ist durchaus vorstellbar, dass die miR-326 direkt oder indirekt die PRINS-Expression beeinflussen könnte. In einzelnen Experimenten konnte keine erhöhte PRINS-Expression in HT-29/B6/htff3 im Vergleich zu HT-29/B6/mock festgestellt werden. Gleiches gilt für die Herabregulierung der miR-491-5p-Expression. Die Transfektion der Zellen durch Elektroporation und die nur 24 h-andauernde Inkubation der Zellen könnten für diesen Effekt verantwortlich sein, da zuvor beobachtet wurde, dass erst nach 48 h mit einer deutlichen PRINS-Überexpression, bzw. nach 4 Tagen mit einer deutlichen Herabregulierung der miR-491-5p gerechnet werden kann. Durch das Prinzip der Methode konnte keine viertägige Vorinkubation der Zellen gewährleistet werden. *Loss-of-function*-Experimente mittels siRNA gegen PRINS, die zu einer Reduzierung der PRINS-Expression um 25 % führten, erbrachten keine Veränderung der miR-491-5p-Expression. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche siRNAs verwendet, wobei sich die prozentuale Herabregulierung nicht bedeutend verbessern ließ (Daten nicht gezeigt). Dass sich der *knock-down* von PRINS als schwierig erwies, kann verschiedene Gründe haben. Durch die Überexpression von TFF3 kommt es möglicherweise zu einer ständig erhöhten PRINS-Expression, sodass der *knock-down* ineffektiv zu sein scheint. Die PRINS-Lokalisierung im Nukleus macht es methodisch schwer, diese RNA effektiv zu beeinflussen, da sowohl die Zell- als auch die Nukleusmembran durch die Transfektion überwunden werden müssen. Auch mögliche Interaktionen von PRINS mit RNA-bindenden Proteinen könnten vor einem Angriff durch kleine interferierende RNA schützen. Hinzu kommt, dass PRINS vermutlich zur Bildung stabiler Sekundärstrukturen in der Lage ist. Durch diese Faltungen und die mögliche Bildung von Splicing-Varianten ist es nicht trivial geeignete Positionen für ansetzende siRNAs zu wählen, die einen effektiveren *knock-down* erreichen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass TFF3 in der Lage ist, HT-29/B6-Zellen vor einer TRAIL-induzierten Apoptose zu schützen, da anders als bei HT-29/B6/mock kein erkennbarer negativer Effekt auf TFF3-überexprimierende Zellen beobachtet werden konnte. TFF3 inhibiert dabei die miR-491-5p-Expression, wobei diese wiederum durch eine direkte Bindung die PRINS-Expression verringern kann. *Knock-down*-Experimente konnten keinen Einfluss von PRINS auf die miR-491-5p-Expression bestätigen, eine gegenseitige Beeinflussung liegt also vermutlich nicht vor. Es drängt sich die Vermutung auf, dass die miR-491-5p und PRINS eine Rolle im TFF3-vermittelten antiapoptotischen Verhalten spielen könnten. Durch die Behandlung mit IFN- γ und TNF- α zeigte sich eine tendenziell erhöhte Expression der miR-491-5p in HT-29/B6/mock und HT-29/B6/htff3. Die miR-491-5p wurde bereits als miRNA mit

pro-apoptischen Eigenschaften beschrieben (Denoyelle, Lambert et al. 2014). Dazu würde der von uns beobachtete Anstieg der miR-491-5p, bei einer IFN- γ und TNF- α -induzierten Apoptose, passen. In Übereinstimmung zu der zuvor beobachteten Antikorrelation sank die PRINS-Expression in HT-29/B6/hfff3 signifikant ab, wobei sie in HT-29/B6/mock durch den Stimulus unverändert blieb. Vermutlich liegt seine Expression in HT-29/B6/mock auf konsequent niedrigem Niveau, sodass eine noch weiter absinkende Expression nicht mehr möglich sein könnte. Da die Zunahme der miR-491-5p-Expression in HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hfff3 nach Stimulus vergleichbar war, könnte PRINS für den TFF3-vermittelten antiapoptischen Effekt verantwortlich sein. Die PRINS-Expression nahm zwar nach dem Stimulus in HT-29/B6/hfff3 deutlich ab, blieb aber signifikant über dem Niveau der Expression in HT-29/B6/mock, was den Überlebensvorteil der HT-29/B6/hfff3 begründen könnte. Auch hier zeigte sich, dass PRINS nicht allein durch TFF3 und die miR-491-5p reguliert werden kann. Auch wenn die leicht veränderte miR-491-5p- und TFF3-Expression einen Einfluss auf PRINS haben sollten, kam es weitgehend unabhängig von diesen zu einem deutlichen Abfall der PRINS-Expression durch den Stimulus mit IFN- γ und TNF- α . PRINS wurde bereits als lncRNA mit antiapoptischen Eigenschaften von anderen Wissenschaftlern beschrieben. In Keratinozytenmodellen konnten Szegedi und Kollegen feststellen, dass PRINS seinen protektiven Effekt vermutlich über den Faktor GIP3 ausübt (Cheriyath, Glaser et al. 2007; Szegedi, Sonkoly et al. 2010) und interessanterweise konnte eine erhöhte PRINS-Expression in gesunden Gewebeabschnitten von Psoriasispatienten im Vergleich zu erkrankten Abschnitten beobachtet werden. Weiterhin führte eine verringerte PRINS-Expression zu einer signifikant verringerten Überlebensrate von Keratinozyten gegenüber unterschiedlichen negativen Stimuli wie UV-B-Strahlung und Serummangel (Szegedi, Goblos et al. 2012). Greift man unsere eigenen Ergebnisse auf, dann weisen diese darauf hin, dass der Stimulus durch IFN- γ und TNF- α zu einer deutlichen Herabregulierung der PRINS-Expression führen kann. Geht man davon aus, dass es bei Erkrankungen wie der IBD und Psoriasis zu einer erhöhten Expression von TNF- α (MacDonald, Hutchings et al. 1990; Murch, Braegger et al. 1993) und unterschiedlichen TFFs (Rio, Chenard et al. 1991; Dignass, Lynch-Devaney et al. 1994; Sands and Podolsky 1996) kommt, könnte dies der Grund für die verringerte PRINS-Expression in erkrankten Abschnitten von Psoriasispatienten sein.

Betrachtet man den anfänglich beobachteten Phänotyp TFF3-überexprimierender HT-29/B6-Zellen, so liegt die Hypothese nahe, dass die verringerte Expression der miR-491-5p und die erhöhte Expression von PRINS für den antiapoptischen Effekt mitverantwortlich sein könnten. Wenn man eine Herabregulierung der PRINS-Expression durch siRNA erzwingt bzw. die verringerte miR-491-5p-Expression mittels miR-491-5p-*mimic* Transfektion ausgleicht, sollte sich der antiapoptische Effekt in der Theorie zum Teil aufheben lassen können. Durchgeführte xCELLigence®-Versuche konnten diese Hypothese zum Teil bestätigen. Die

Behandlung mit IFN- γ und TNF- α führte unabhängig von der Transfektion zum Absterben der HT-29/B6/mock-Zellen. Es machte zudem deutlich, dass die zuvor gewählte viertägige Vorinkubation der Zellen für den beobachteten antiapoptotischen Effekt von HT-29/B6/htff3-Zellen nicht essentiell zu sein scheint. Der Anstieg des *cell index* nach Transfektion mit miR-491-5p-*mimic* ohne Behandlung mit IFN- γ und TNF- α bleibt wegen der großen Standardabweichung und der geringen Unterschiede zur Kontrolle diskutabel. So kann unseren Ergebnissen nach selbst ein scheinbar negatives Ereignis, wie die Behandlung mit TNF- α , temporär mit einem Anstieg des *cell index* einhergehen. Im Rahmen des xCELLigence®-Versuches zeigten HT-29/B6/htff3 allein durch die Transfektion mit miR-491-5p-*mimic* ein erhöhtes Absterben nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α . Der flacher verlaufende *cell index* nach PRINS-*knock-down* und ein fluoreszenzbasierter Caspase-3-assay konnten zusätzlich bestätigen, dass auch PRINS Apoptoseveränderungen der Zellen bewirken kann. Des Weiteren scheint die TFF3-Überexpression den leicht proapoptotischen Effekt, der allein auf die Transfektion mit miR-491-5p-*mimic* bzw. siRNA gegen PRINS zurückzuführen ist, zu verhindern. Der Anteil Caspase-3 positiver HT-29/B6/mock speziell nach PRINS-*knock-down* konnte in HT-29/B6/htff3 jedoch nicht erreicht werden. Vermutlich ist unter anderem die geringe Effektivität der verwendeten siRNA, die eine Herabregulierung der PRINS-Expression um nur ca. 25 % bewirkt, und somit nicht das Niveau der HT-29/B6/mock, für den geringeren Effekt verantwortlich. Des Weiteren können selbstverständlich noch zusätzliche Mechanismen, unabhängig von der TFF3-miR-491-5p-PRINS-Achse, den erhöhten antiapoptotischen Effekt bewirken.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde versucht, den Mechanismus der beiden nicht kodierenden RNAs aufzuklären. Wie bereits erwähnt, ist eine enge Beteiligung von TFF3 am PI3K-Signalweg bereits beschrieben worden. Einmal aktiviert, reguliert dieser Prozesse wie die Proliferation, das Überleben und die Apoptose von Zellen (Cantley 2002). Die Rolle der miR-491-5p und PRINS innerhalb des PI3K-Signalweges wurde in dieser Arbeit überprüft. Dabei stellte sich nach Testung mehrerer kleiner inhibitorischer Moleküle, die verschiedene, relevante Signalwege inhibieren, heraus, dass die Expression beider nicht kodierenden RNAs vom PI3K-Signalweg abhängig zu sein scheint. Durch die Inhibierung des PI3K-Signalweges kommt es zur Aufhebung der TFF3-abhängigen Inhibierung der miR-491-5p-Expression. Passend zu der zuvor beobachteten Antikorrelation sinkt die PRINS-Expression hierdurch signifikant ab. Umgekehrt konnten wir im Rahmen dieser Arbeit keinen Unterschied im Grad der AKT-Phosphorylierung mit oder ohne IFN- γ - und TNF- α -Stimulus zwischen HT-29/B6/mock und HT-29/B6/htff3 feststellen. Jedoch scheint die TFF3-Überexpression eine wesentlich deutlichere Phosphorylierung von PDK1 (Ser473) bewirken zu können. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist PDK1 in der Lage, direkt oder aber indirekt über AKT die Aktivierung des PI3K-Signalweges über p70-S6K zu steuern (Pullen, Dennis et al. 1998;

Dowling, Topisirovic et al. 2010). Die erhöhte Phosphorylierung von PDK1 in HT-29/B6/hTff3 deutet in unserem Fall auf eine PI3K-abhängige und AKT-unabhängige Aktivierung von p70-S6K hin, die wir auch am Ser371 und Thr389 feststellen konnten. Entgegen unserer Erwartungen fiel die Phosphorylierung von p70-S6K (Thr389) in HT-29/B6/mock jedoch deutlicher aus und schien nach Stimulus mit IFN- γ - und TNF- α sogar noch zuzunehmen. Diese Konstellation konnte auch von anderen Wissenschaftlern beobachtet werden und steht laut van der Heide unter anderem im Zusammenhang mit einer stattfindenden Apoptoseinduktion (van der Heide, Wijchers et al. 2015). Bezogen auf einen kompensatorischen Effekt, kann die Herabregulierung von FOXK2 hierbei zur Aufhebung der PMAIP1-Inhibierung führen, was eine Phosphorylierung von p70-S6K und Aktivierung der Caspase-3 bedeuten kann (van der Heide, Wijchers et al. 2015). Des Weiteren wurde in unserer Arbeit die Wirkung der miR-491-5p und PRINS auf den PI3K-Signalweg überprüft. Western Blot-Analysen bestätigten erneut, dass AKT in unserem Zellmodell nicht differentiell reguliert wird. Interessanterweise nimmt die PDK1(Ser241)-Phosphorylierung nach Transfektion mit miR-491-5p-*mimic* und siRNA in HT-29/B6/mock deutlich zu, was sowohl in HT-29/B6/hTff3 als auch in HT-29/B6/mock mit der Phosphorylierung von p70-S6K (Thr371) einhergeht. Möglicherweise versuchen HT-29/B6/mock durch die Aktivierung dieses Signalweges einen einsetzenden negativen Stimulus durch antiapoptotische Mechanismen über PDK1 zu kompensieren. Ob diese Phosphorylierung auf die erhöhte Aktivität von PDK1 zurückzuführen ist oder aber einen Mechanismus, der auch die erhöhte Phosphorylierung nach Stimulus mit IFN- γ - und TNF- α erklärt, bleibt offen. Die Phosphorylierung von p70-S6K deutet zusammen mit der erhöhten Caspase-3-Aktivierung erneut auf eine PMAIP1-abhängige Apoptose hin (van der Heide, Wijchers et al. 2015). Es wäre denkbar, dass in unserem Zellmodell die bereits für die miR-491-3p beschriebene mTORC2-PI3K Rückkopplungs-Schleife zutrifft (Zhao, Luo et al. 2016). Auch bei dieser spielen *Forkhead box*-Proteine (FOXO1) eine entscheidende Rolle und auch hier hat die miR-491 einen Einfluss auf die Chemosensitivität von Mundkrebszellen (Zheng, Jia et al. 2015). Huang und Kollegen beschrieben, dass die verringerte Expression der miR-491-5p mit einer geringeren Überlebensrate bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom korreliert. Die Überexpression der miR-491-5p führte in ihren Arbeiten zur Aufhebung des invasiven und metastasierenden Verhaltens von Plattenepithelkarzinom- und Lungenkrebszellen *in vitro* und *in vivo* (Huang, Chan et al. 2014). Gehen wir davon aus, dass TFF3 vermehrt von metastasierenden Krebszellen gebildet wird und ihnen einen erhöhten proliferativen, invasiven und protektiven Effekt verleiht (Wright, Hoffmann et al. 1997), dann würde die verringerte Expression der miR-491-5p in HT-29/B6/hTff3 mit der Beobachtung von Huang und Kollegen übereinstimmen. Auch dass eine forcierte Überexpression der miR-491-5p zur Apoptoseinduktion führen kann, ließ sich replizieren (Denoyelle, Lambert et al. 2014). Denoyelle und Kollegen beschreiben in ihrer Arbeit, dass die miR-491-5p in den

Gebärmutterhalskrebszellen IGROV1-R10 durch die Inhibierung der BCL-X_L-Expression zur Apoptose führt. Über die Beeinflussung von BIM und EGFR, als direktes Ziel der miR-491-5p, kommt es zu einer Inhibierung der AKT-Phosphorylierung. In der Zelllinie SKOV3 konnte dieser Ablauf jedoch nicht beobachtet werden. Jedoch konnte durch die Inhibierung des PI3K-Signalweges die Sensitivität gegenüber der miR-491-5p wiederhergestellt werden. Auch in unserem Fall konnten wir keine Veränderung im Grad der AKT-Phosphorylierung feststellen und die vermutlich wechselseitige Beeinflussung der miR-491-5p und dem PI3K-Signalweg und ihren Einfluss auf die Apoptose bestätigen. Wie zuvor erwähnt, wurde die miR-491-5p bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit Apoptose und Krebs beschrieben, während über PRINS nur sehr wenige Anhaltspunkte in der Literatur zu finden sind. Im Rahmen unserer Arbeit konnten wir feststellen, dass die miR-491-5p TFF3-abhängig zu einer direkten Interaktion mit PRINS in der Lage ist und innerhalb der PI3K-Signalkaskade vor PRINS von Bedeutung zu sein scheint. Da anhand der bisherigen Ergebnisse deutlich wird, dass der pro-apoptotische Effekt der miR-491-5p über PRINS vermittelt werden könnte, sollte in dieser Arbeit die Rolle von PRINS in Bezug auf den beobachteten anti-apoptotischen Effekt näher erforscht werden.

Eine direkte oder indirekte Regulierung von pro- oder antiapoptotisch wirkenden Proteinen durch PRINS wäre denkbar. Die unerwarteten Phosphorylierungsmuster der p70-S6K weisen auf die Beteiligung von PMAIP1 hin (van der Heide, Wijchers et al. 2015). Eine Aktivierung von PMAIP1, zum Beispiel durch die Inhibierung von FOXK-Proteinen, kann zur Aktivierung der p70-S6K und der Caspase-3 führen (van der Heide, Wijchers et al. 2015). Ein durchgeführter RT-qPCR-Array mit unterschiedlichen, relevanten mRNAs, die für pro- und antiapoptotisch wirkende Proteine kodieren, offenbarte eine Vielzahl regulierter Gene. Im Rahmen dieser Arbeit waren aber nur solche relevant, die nach Transfektion mit miR-491-5p bzw. siRNA gegen PRINS einen kompensatorischen Effekt der HT-29/B6/htff3 auf das Niveau von HT-29/B6/mock gezeigt haben. Unserer Theorie nach könnte ein Angleichen dieser Expression auch zum Ausgleich des Apoptoseverhaltens beider Subklone führen. Tatsächlich zeigte PMAIP1 genau dieses kompensatorische Expressionsmuster in der RT-qPCR, das auch mit Hilfe von Western Blot-Analysen auf Proteinebene bestätigt werden konnte. PMAIP1 und FOXK-Proteine könnten demnach an der Regulation des erhöhten anti-apoptotischen Verhaltens von HT-29/B6/htff3 beteiligt sein. Störungen im Wnt-Signalweg konnten in Zusammenhang mit Brust- und Darmkrebs und verschiedenen degenerativen Prozessen gebracht werden (Moon, Kohn et al. 2004; Nusse 2005; Clevers 2006; Clevers and Nusse 2012; Augustin, Gross et al. 2013). Dabei nehmen FOXK1 und FOXK2 als positive Regulatoren dieses Signalweges und als Faktoren, die mit der DVL-Translokation in Verbindung gebracht werden könnten, eine Schlüsselrolle ein (Wang, Li et al. 2015). Diese Proteine können in der Lage sein, die Expression pro-apoptotischer Proteine wie BIM (Obexer,

Geiger et al. 2007), *FAS Ligand* (FASL) (Suhara, Kim et al. 2002) und den TNF- α -verwandten, Apoptose-induzierenden Liganden (*TNF- α related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (Modur, Nagarajan et al. 2002) zu initiieren, was wiederum zu einer verringerten Aktivität von AKT führt (Adler and Nelson 1988; Raghavendra, Pathak et al. 2009). Wie bereits beschrieben, konnten wir eine erhöhte Phosphorylierung von PDK1 in HT-29/B6/hTff3 feststellen, die auf eine PI3K-abhängige und AKT-unabhängige Aktivierung von p70-S6K hindeutet. Der beobachtete erhöhte Gehalt von FOXK1 und FOXK2 in HT-29/B6/hTff3 in Kombination zur unveränderten AKT-Phosphorylierung und dem antiapoptotischen Effekt könnte diese Regulation erklären. Als zusätzliche Unterstützung dieser Hypothese konnten wir einen geringeren Gehalt von PMAIP1 in HT-29/B6/hTff3 feststellen. PMAIP1 wird durch den Faktor FOXK2 inhibiert, wobei FOXK2 ebenfalls als negativer Regulator von p70-S6K bekannt ist (van der Heide, Wijchers et al. 2015). Auch den gegenüber HT-29/B6/mock geringeren Gehalt von p70-S6K in HT-29/B6/hTff3 konnten wir bestätigen.

Den Wandel von einem fokalen PMAIP1-Signal im Zellkern zu einem diffusen Signal in apoptotischen Zellen konnten wir im Rahmen dieser Arbeit beobachten. Interessanterweise korreliert diese Beobachtung mit einer verringerten PRINS-Expression durch den Stimulus mit IFN- γ - und TNF- α . Eine durchgeführte FISH in Kombination mit IF zeigte eine deutliche Co-Lokalisierung von PMAIP1 und PRINS im Zellkern und bekräftigte die Theorie einer möglichen direkten Interaktion. PMAIP1 ist vor allem im Nukleus, dem Zytoplasma und den Mitochondrien lokalisiert. Es ist jedoch beschrieben worden, dass es bei einer stattfindenden p53-abhängigen Apoptose zu einer Translokation von PMAIP1 zu den Mitochondrien kommen kann (Oda, Ohki et al. 2000). Da PRINS und PMAIP1 im Nukleus co-lokalisiert vorliegen, überprüften wir den Einfluss von TFF3 und PRINS auf die Akkumulierung von PMAIP1 im Nukleus und dem Zytoplasma. Es konnte eine wesentlich deutlichere Akkumulierung von PMAIP1 in HT-29/B6/mock im Vergleich zu HT-29/B6/hTff3 im Zytoplasma festgestellt werden. Unseren Ergebnissen nach, scheint TFF3 PRINS-abhängig einen Anstieg des zytoplasmatischen PMAIP1-Gehaltes durch den Stimulus mit IFN- γ - und TNF- α zu verhindern. Auch eine verstärkte Lokalisierung im Nukleus in unbehandelten HT-29/B6/hTff3 konnte nach PRINS-*knock-down* beobachtet werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass PRINS in der Lage sein könnte, direkt mit PMAIP1 zu interagieren und dadurch PMAIP1 daran zu hindern, vom Zellkern zum Zytoplasma und somit zu den Mitochondrien zu gelangen. Damit könnte die finale Apoptoseinduktion durch PMAIP1 verhindert werden. Co-Immunpräzipitationen konnten letztendlich die direkte Bindung von PMAIP1 und PRINS bestätigen.

5.1 Ausblick

In dieser Arbeit konnten einige neue grundlegende Erkenntnisse über die Vermittlung des antiapoptotischen Effektes humaner Adenokarzinomzellen am Beispiel von HT-29/B6-Zellen

gewonnen werden. In weiterführenden Experimenten wäre es naheliegend zu klären, wie die TFF3-abhängige miR-491-5p-Inhibierung vermittelt wird. Unsere Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des PI3K-Signalweges hin. Zudem wurde beschrieben, dass die miR-491-5p einen Einfluss auf diesen Signalweg über eine Inhibierung der AKT-Phosphorylierung (Denoyelle, Lambert et al. 2014) besitzen kann, was wir jedoch im Rahmen unserer Studien und unserer Zellmodelle nicht replizieren konnten. Die von uns durchgeführten Western Blots und RT-qPCRs machten eine differentielle Regulation von PMAIP1 und *Forkhead box*-Proteinen deutlich. Da diese Proteine in der Signalkaskade vor PRINS zu stehen scheinen, wäre auch eine mögliche Regulation der miR-491-5p durch diese möglich. Experimente mit siRNA gegen FOXK1 und FOXK2 wären denkbar, um deren Einfluss auf die miR-491-p- und PRINS-Expression zu klären. Sollte eine Regulation einer oder beider nicht kodierenden RNAs zu sehen sein, könnten Co-IP eine direkte Interaktion anzeigen.

Mechanistisch konnten keine endgültigen Aussagen über die Rolle von PRINS getroffen werden. Darüber hinaus stellte es sich als schwierig heraus, einen effektiven *knock-down* von PRINS zu erzielen. Effektivere *knock-downs* durch eine Kombination von siRNAs, die an unterschiedlichen Sequenzabschnitten binden, müssten erzielt werden. Alternativ wäre auch ein kompletter *knock-out* von PRINS zum Beispiel mit Hilfe des CRISPR/CAS-Systems optimal. Die Erforschung der Funktionen unterschiedlicher PRINS-Splicing-Varianten wäre sehr interessant. Hierzu müsste zunächst ein Großteil der möglichen PRINS-Varianten durch PCR-Analysen ermittelt werden. Um das komplette Konstrukt zu amplifizieren, wären hierzu 3'- und 5'- RACE-Experimente erforderlich, um auch die Sequenzenden von PRINS mit einbeziehen zu können. Alternativ wäre auch die Verwendung der *Next Generation Sequencing* (NGS)-Technologie denkbar. Sind verschiedene Varianten identifiziert und sequenziert, wäre die Herstellung von *in vitro*-transkribierten Konstrukten möglich. Nach der Transfektion wäre zum Beispiel die Überprüfung eines erhöhten antiapoptotischen Phänotyps naheliegend. Auch könnte überprüft werden, welche Splicing-Varianten durch die miR-491-5p beeinflusst werden, welche sonstigen Interaktionspartner in Frage kommen könnten und wie sich die Expression von mRNAs, die für pro- und antiapoptotisch wirkende Proteine kodieren, verändert. Final könnte sogar die Protein-RNA-Interaktion untersucht werden, indem modifizierte Nukleotide für die Herstellung *in vitro*-transkribierter PRINS-Varianten Verwendung finden. 4-Thio-Uridin zum UV-Crosslink, um eine irreversible Bindung von Proteinen und RNA zu erreichen, in Kombination mit Digoxigenin- oder Biotin-markierten Nukleotiden zur nachfolgenden Aufreinigung, wären hierfür vielversprechende Ansätze.

Ein weiterer wichtiger, noch zu untersuchender Punkt betrifft die Allgemeingültigkeit unserer Beobachtungen. Bisher wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Überexpression von TFF3 durch eine stabile Transfektion, also genomische Integration gearbeitet. Physiologischer wäre aber die spezifische Induktion von TFF3 mit Hilfe einer oder mehrerer Liganden. Bisher konnte

noch kein spezifischer TFF3-Induktor ermittelt werden. Auch ein TFF3-Rezeptor ist bisher unbekannt. In weiterführenden Experimenten wäre neben der Suche nach spezifischen Liganden oder Rezeptoren, auch die Exposition verschiedener Zelllinien mit humanen rekombinanten TFF3 vorstellbar. Dass die Applikation von TFF3 einen protektiven Effekt besitzen kann, konnte bereits *in vivo* bestätigt werden (Teng, Xu et al. 2009). Interessant wäre in unserem Zusammenhang, ob diese Applikation zu einer vergleichbaren Regulation auf Ebene nicht kodierender RNAs führt. Sollte es zu einer Herabregulierung der miR-491-5p und erhöhten Expression von PRINS in unterschiedlichen Zelllinien kommen, wäre die Allgemeingültigkeit zum Teil belegt. Zudem könnte bei dieser Gelegenheit die Rolle des Mucins untersucht werden, da ein synergistischer Effekt von TFF3 und Mucin vermutet wird (Dignass, Lynch-Devaney et al. 1994; Wong, Poulsom et al. 1999). Vermutlich zeigen sich auch gravierende Unterschiede zwischen der apikalen und basalen Behandlung der Zellen mit TFF3, die wichtige Rückschlüsse auf *in vivo*-Situationen zulassen würden. Sollte sich ausschließlich bei basaler, also dem Lumen abgewandten Seite, ein Effekt zeigen, würde dies dafür sprechen, dass TFF3 nur nach Verletzungen des Epithels seine Wirkung zeigt. TFF3 wird normalerweise apikal sekretiert und erreicht physiologisch nur nach Verletzungen der Epithelschicht die basale Seite der Zellen (Andoh, Kinoshita et al. 2001). TFF3 wird, wie bereits erwähnt, vermehrt von metastasierenden Krebszellen gebildet und verleiht den Zellen erhöhte proliferative, invasive und protektive Eigenschaften (Wright, Hoffmann et al. 1997). Unseren Erkenntnissen nach vermittelt TFF3 dabei seinen protektiven Effekt über eine multifaktorielle Signalkaskade und nicht kodierende RNAs. Am Ende steht die Dysregulation des anti-apoptotisch wirkenden Proteins PMAIP1 durch die lncRNA PRINS. Wünschenswert wäre die Überprüfung unserer Ergebnisse *in vivo*. Basierend auf einem Mausmodell könnte eine Colitis durch Chemikalien wie TNBS induziert werden, um den angenommenen protektiven Effekt von PRINS zu untersuchen. Hierzu könnte *in vitro*-transkribierte PRINS-RNA und auch unterschiedliche Splicing-Varianten appliziert werden, wodurch Pathologien im Idealfall weniger dramatisch ausfallen sollten. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass ein PRINS-*knock-down* die Effektivität einer TRAIL-induzierten Apoptose *in vivo* verbessert, was besonders bei der Therapie metastasierender Krebsvarianten ein erfolgversprechender Ansatz sein könnte.

Zur Behandlung der Psoriasis aber auch der IBD richten sich die sogenannten Biologika gegen eine überschießende Immunreaktion, indem unter anderem Antikörper gegen TNF- α eingesetzt werden. Hemminki und Kollegen stellten in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass diese Medikation bei Autoimmunerkrankungen einen möglichen Einfluss auf das Krebsrisiko haben könnte (Hemminki, Liu et al. 2012). Nachvollziehbar logisch, wenn man bedenkt, dass TNF- α als ein von Immunzellen sekretiertes Zytokin beschrieben wurde, das einen anti-proliferativen Effekt auf Krebszellen besitzt und die Tumorprogression verhindert (Matthews

and Watkins 1978; Green, Dobrjansky et al. 1982). Wird TNF- α durch Biologika beseitigt, kommt es zwar zu einer Verbesserung der entzündlichen Prozesse, jedoch kann TNF- α dadurch seinen anti-proliferativen Effekt auf Krebszellen nicht mehr ausüben. Zudem können auch Autoimmunreaktionen und Wundheilungsprozesse bei Einsatz dieser Medikamente gestört werden (Heidecke, Hensler et al. 1999; Kakutani, Takeuchi et al. 1999; McCourt, Wang et al. 1999; Williams, Cave et al. 1999; Yazlovitskaya, Pelling et al. 1999). Im Zeitalter der personalisierten Medizin schreitet die Entwicklung neuartiger und innovativer Arzneimittel voran, die sich unter dem Begriff Gentherapeutika zusammenfassen lassen. Indem Medikamente an die speziellen Bedürfnisse jedes einzelnen Patienten angepasst werden, soll das Ausmaß möglicher Nebenwirkungen minimiert werden. Im Jahre 2012 wurde das Medikament Glybera (Alipogen tiparvovec) als erstes Gentherapeutikum zugelassen und wird Patienten mit einem Lipoproteinlipase-Defizit empfohlen. Das Präparat enthält das Lipoproteinlipase-Gen in Form eines adeno-assoziierten Virus-Vektors.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir dazu beitragen, die Rolle der beiden nicht kodierenden RNAs miR-491-5p und PRINS besser zu verstehen. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass der erhöhte anti-apoptotische Effekt von TFF3-überexprimierenden Adenokarzinomzellen zum Teil aufgehoben werden kann, wenn man die verringerte Expression der miR-491-5p und die erhöhte Expression von PRINS kompensiert. Gentherapeutika, die diese Dysregulation ausgleichen, könnten möglicherweise unterstützend eingesetzt werden, um die TRAIL-basierte Chemotherapie noch effektiver zu gestalten.

6. Zusammenfassung

TFF3 wird bei mucosalen Verletzungen, unterschiedlichen ulcerativen Prozessen und Krebs vermehrt exprimiert und scheint vor allem bei der Abwehr, Instandhaltung und Reparatur des intestinalen Epithels eine Relevanz zu besitzen. Die Überexpression von TFF3 in HT-29/B6 führte in dieser Arbeit zu einem erhöhten protektiven Effekt gegenüber einer IFN- γ - und TNF- α -induzierten Apoptose. Um diesen Effekt zu verstehen, haben wir unterschiedliche miRNAs und lncRNAs als potente Regulatoren untersucht, die laut Literaturrecherchen und *in silico*-Analysen eng im Zusammenhang mit TFF3-relevanten Signalwegen wie Wnt, PI3K und der Regulation der Apoptose stehen. Dabei stießen wir auf die antikorreliert exprimierte miR-491-5p und lncRNA PRINS. *Gain*- und *loss of function*-Experimente wiesen auf eine gegenseitige Regulation hin, wobei die direkte Interaktion von uns bewiesen werden konnte. Es drängte sich die Vermutung auf, dass der erhöhte antiapoptotische Effekt von TFF3 auf die Dysregulation und das Zusammenspiel der miR-491-5p und PRINS zurückzuführen sein könnte. Ein Ausgleich dieser veränderten Expression auf das Niveau von Kontrollzellen sollte unserer Hypothese nach auch den Schutz gegenüber der Induktion der Apoptose aufheben. Tatsächlich konnte der Anteil apoptotischer HT-29/B67/htff3 dadurch erhöht werden. Um den Mechanismus hinter der Wirkung beider nicht kodierenden RNAs zu untersuchen, wurden mittels kleiner inhibitorischer Moleküle verschiedene relevante Signalwege stillgelegt, wodurch die Bedeutung des PI3K-Signalweges erkennbar wurde. Die Inhibierung des PI3K-Signalweges führte zur Aufhebung der TFF3-vermittelten Dysregulation beider nicht kodierenden RNAs. Dabei scheinen TFF3 und miR-491-5p unabhängig von AKT in der Lage zu sein, PDK1 zu phosphorylieren und p70-S6K zu aktivieren. Die erhöhte Phosphorylierung der p70-S6K unabhängig von PDK1 in HT-29/B67/mock und die Untersuchung pro- und anti-apoptotisch wirkender Proteine führten uns zu PMAIP1, einem Regulator des pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedes Mcl-1, der bekanntermaßen sogar in der Lage ist, Apoptose in Krebszellen auszulösen. Co-Lokalisierungen von PRINS und PMAIP1 bekräftigten die Hypothese einer potentiell gegenseitigen Regulation. Unseren Ergebnissen nach scheint TFF3 in der Lage zu sein, die Translokation von PMAIP1 vom Zellkern in das Zytoplasma PRINS-abhängig verhindern zu können. Final durchgeführte Co-Immunpräzipitationen deuteten auf eine direkte Bindung von PMAIP1 und PRINS hin. Weitere mechanistische Untersuchungen wären in Zukunft notwendig, um den genauen Einfluss von PRINS auf PMAIP1 entschlüsseln zu können. Besonders interessant wäre zusätzlich die Überprüfung des protektiven PRINS-Effektes *in vivo* als potentielles Therapeutikum bei der IBD, als Marker bei metastasierenden Krebserkrankungen oder zusätzliches Ziel im Rahmen einer TRAIL-basierten Chemotherapie.

7. Summary

TFF3 is upregulated in mucosal injury, different ulcerative processes and cancer. It appears to have a relevance especially in the defense, maintenance and repair of the intestinal epithelium and is also closely related to tumor invasion, resistance to apoptosis and metastasis. The over-expression of TFF3 in HT-29/B6 resulted in an increased protective effect against IFN- γ and TNF- α induced apoptosis and caused dysregulation of various non-coding RNAs. Anti-correlated expression pattern after transfection with miR-491-5p-*mimic* as well as reporter gene assays confirmed the direct interaction of miR-491-5p with the lncRNA PRINS in HT-29/B6/*htff3*. miR-491-5p was shown to inhibit PRINS-expression while PRINS had no discernible effect on miR-491-5p. Moreover, PRINS expression seemed to be controlled independently of TFF3 and miR-491-5p by IFN- γ - and TNF- α . Both non-coding RNAs hold an impact on the previously observed antiapoptotic phenotype. Compensation of the dysregulated noncoding RNAs increased the number of apoptotic cells after TRAIL-induced apoptosis. Mechanistically, Western blot analyzes confirmed the involvement of PI3K signaling pathway in this context. Regulation of miR-491-5p and PRINS by IFN- γ /TNF- α seemed to activate the PI3K signaling pathway independent of AKT through regulation of PDK1 and p70-S6K. In addition, the TFF3-mediated inhibitory effect on miR-491-5p was reversible by inhibition of the PI3K signaling pathway with small molecular inhibitors. PRINS and miR-491-5p had an impact on expression of a variety of mRNA that encode for pro-or anti-apoptotic proteins and the regulation of PMAIP1, FOXK1 and FOXK2 was confirmed at protein level, too. In further analyzes PRINS and PMAIP1 showed nuclear colocalization, indicating a direct interaction. PRINS revealed its influence on PMAIP1's cellular localization in the nucleus especially in combination with TRAIL-induced apoptosis. PRINS seemed to be able to prevent the translocation of PMAIP1 from the nucleus to the cytoplasm. Finally, co-immunoprecipitation suggested PMAIP1's direct binding on PRINS. In future, further mechanistic studies will be necessary in order to determine the impact of PRINS on regulation of PMAIP1. Analyzes under *in vivo* conditions will be indicated to prove the potential of PRINS as a therapeutic target in IBD, as a marker in metastatic cancers or as part of a TRAIL-based chemotherapy.

8. Literaturverzeichnis

- Adler, A. J. and J. F. Nelson (1988). "Aging and chronic estradiol exposure impair estradiol-induced cornification but not proliferation of vaginal epithelium in C57BL/6J mice." Biol Reprod **38**(1): 175-182.
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-756.
- Andoh, A., K. Kinoshita, I. Rosenberg and D. K. Podolsky (2001). "Intestinal trefoil factor induces decay-accelerating factor expression and enhances the protective activities against complement activation in intestinal epithelial cells." J Immunol **167**(7): 3887-3893.
- Aqeilan, R. I., G. A. Calin and C. M. Croce (2010). "miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives." Cell Death Differ **17**(2): 215-220.
- Ashkenazi, A., P. Holland and S. G. Eckhardt (2008). "Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL)." J Clin Oncol **26**(21): 3621-3630.
- Augustin, I., J. Gross, D. Baumann, C. Korn, G. Kerr, T. Grigoryan, C. Mauch, W. Birchmeier and M. Boutros (2013). "Loss of epidermal Evi/Wis results in a phenotype resembling psoriasiform dermatitis." J Exp Med **210**(9): 1761-1777.
- Barry, E. R., T. Morikawa, B. L. Butler, K. Shrestha, R. de la Rosa, K. S. Yan, C. S. Fuchs, S. T. Magness, R. Smits, S. Ogino, C. J. Kuo and F. D. Camargo (2013). "Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP." Nature **493**(7430): 106-110.
- Basson, M. D., I. M. Modlin, S. D. Flynn, B. P. Jena and J. A. Madri (1992). "Independent modulation of enterocyte migration and proliferation by growth factors, matrix proteins, and pharmacologic agents in an in vitro model of mucosal healing." Surgery **112**(2): 299-307; discussion 307-298.
- Bata-Csorgo, Z., K. D. Cooper, K. M. Ting, J. J. Voorhees and C. Hammerberg (1998). "Fibronectin and alpha5 integrin regulate keratinocyte cell cycling. A mechanism for increased fibronectin potentiation of T cell lymphokine-driven keratinocyte hyperproliferation in psoriasis." J Clin Invest **101**(7): 1509-1518.
- Bata-Csorgo, Z., C. Hammerberg, J. J. Voorhees and K. D. Cooper (1995). "Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. Cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes." J Clin Invest **95**(1): 317-327.
- Bazzoni, F. and B. Beutler (1996). "The tumor necrosis factor ligand and receptor families." N Engl J Med **334**(26): 1717-1725.
- Behrens, J., L. Vakaet, R. Friis, E. Winterhager, F. Van Roy, M. M. Mareel and W. Birchmeier (1993). "Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene." J Cell Biol **120**(3): 757-766.
- Beylot-Barry, M., L. Lamant, B. Vergier, A. de Muret, S. Fraitag, B. Delord, P. Dubus, L. Vaillant, M. Delaunay, G. MacGrogan, C. Beylot, A. de Mascarel, G. Delsol and J. P. Merlio (1996). "Detection of t(2;5)(p23;q35) translocation by reverse transcriptase polymerase chain reaction and in situ hybridization in CD30-positive primary cutaneous lymphoma and lymphomatoid papulosis." Am J Pathol **149**(2): 483-492.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Cerretti (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-733.
- Blam, M. E., R. B. Stein and G. R. Lichtenstein (2001). "Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives." Am J Gastroenterol **96**(7): 1977-1997.
- Blay, J. and K. D. Brown (1985). "Epidermal growth factor promotes the chemotactic migration of cultured rat intestinal epithelial cells." J Cell Physiol **124**(1): 107-112.

- Blumberg, R. S., L. J. Saubermann and W. Strober (1999). "Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease." *Curr Opin Immunol* **11**(6): 648-656.
- Buda, A., M. A. Jepson and M. Pignatelli (2012). "Regulatory function of trefoil peptides (TFF) on intestinal cell junctional complexes." *Cell Commun Adhes* **19**(5-6): 63-68.
- Cain, K., D. G. Brown, C. Langlais and G. M. Cohen (1999). "Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex." *J Biol Chem* **274**(32): 22686-22692.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* **296**(5573): 1655-1657.
- Cheriyath, V., K. B. Glaser, J. F. Waring, R. Baz, M. A. Hussein and E. C. Borden (2007). "G1P3, an IFN-induced survival factor, antagonizes TRAIL-induced apoptosis in human myeloma cells." *J Clin Invest* **117**(10): 3107-3117.
- Chinnadurai, G., S. Vijayalingam and S. B. Gibson (2008). "BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions." *Oncogene* **27 Suppl 1**: S114-127.
- Ciacci, C., S. E. Lind and D. K. Podolsky (1993). "Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers." *Gastroenterology* **105**(1): 93-101.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* **127**(3): 469-480.
- Clevers, H. and R. Nusse (2012). "Wnt/beta-catenin signaling and disease." *Cell* **149**(6): 1192-1205.
- Cohen, P. and S. Frame (2001). "The renaissance of GSK3." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(10): 769-776.
- Denoyelle, C., B. Lambert, M. Meryet-Figuere, N. Vigneron, E. Brotin, C. Lecerf, E. Abeilard, F. Giffard, M. H. Louis, P. Gauduchon, P. Juin and L. Poulain (2014). "miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation." *Cell Death Dis* **5**: e1445.
- Di Cristofano, A., B. Pesce, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi (1998). "Pten is essential for embryonic development and tumour suppression." *Nat Genet* **19**(4): 348-355.
- Di Meglio, P., F. Villanova and F. O. Nestle (2014). "Psoriasis." *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**(8).
- Dianda, L., A. M. Hanby, N. A. Wright, A. Sebesteny, A. C. Hayday and M. J. Owen (1997). "T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment." *Am J Pathol* **150**(1): 91-97.
- Dignass, A., K. Lynch-Devaney, H. Kindon, L. Thim and D. K. Podolsky (1994). "Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway." *J Clin Invest* **94**(1): 376-383.
- Dowling, R. J., I. Topisirovic, B. D. Fonseca and N. Sonenberg (2010). "Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors." *Biochim Biophys Acta* **1804**(3): 433-439.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu and S. Nagata (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Engelman, J. A., J. Luo and L. C. Cantley (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." *Nat Rev Genet* **7**(8): 606-619.
- Epple, H. J., K. M. Kreusel, C. Hanski, J. D. Schulzke, E. O. Riecken and M. Fromm (1997). "Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol." *Pflugers Arch* **433**(5): 638-647.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg and W. Filipowicz (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." *Annu Rev Biochem* **79**: 351-379.
- Farrell, R. J. and M. A. Peppercorn (2002). "Ulcerative colitis." *Lancet* **359**(9303): 331-340.
- Fernandes-Alnemri, T., R. C. Armstrong, J. Krebs, S. M. Srinivasula, L. Wang, F. Bullrich, L. C. Fritz, J. A. Trapani, K. J. Tomaselli, G. Litwack and E. S. Alnemri (1996). "In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a

novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7464-7469.

Fogh, J., J. M. Fogh and T. Orfeo (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." J Natl Cancer Inst **59**(1): 221-226.

Gajhede, M., T. N. Petersen, A. Henriksen, J. F. Petersen, Z. Dauter, K. S. Wilson and L. Thim (1993). "Pancreatic spasmolytic polypeptide: first three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of peptides." Structure **1**(4): 253-262.

Gan, X. Q., J. Y. Wang, Y. Xi, Z. L. Wu, Y. P. Li and L. Li (2008). "Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction." J Cell Biol **180**(6): 1087-1100.

Ge, H., J. Gardner, X. Wu, I. Rulifson, J. Wang, Y. Xiong, J. Ye, E. Belouski, P. Cao, J. Tang, K. J. Lee, S. Coberly, X. Wu, J. Gupte, L. Miao, L. Yang, N. Nguyen, B. Shan, W. C. Yeh, M. M. Veniant, Y. Li and H. Baribault (2015). "Trefoil Factor 3 (TFF3) Is Regulated by Food Intake, Improves Glucose Tolerance and Induces Mucinous Metaplasia." PLoS One **10**(6): e0126924.

Goldstein, J. C., N. J. Waterhouse, P. Juin, G. I. Evan and D. R. Green (2000). "The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant." Nat Cell Biol **2**(3): 156-162.

Green, S., A. Dobrjansky and M. A. Chiasson (1982). "Murine tumor necrosis-inducing factor: purification and effects on myelomonocytic leukemia cells." J Natl Cancer Inst **68**(6): 997-1003.

Gum, J. R., J. W. Hicks and Y. S. Kim (1997). "Identification and characterization of the MUC2 (human intestinal mucin) gene 5'-flanking region: promoter activity in cultured cells." Biochem J **325** (Pt 1): 259-267.

Guo, R., Y. Wang, W. Y. Shi, B. Liu, S. Q. Hou and L. Liu (2012). "MicroRNA miR-491-5p targeting both TP53 and Bcl-XL induces cell apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells through mitochondria mediated pathway." Molecules **17**(12): 14733-14747.

Gutschner, T. and S. Diederichs (2012). "The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view." RNA Biol **9**(6): 703-719.

Habas, R. and I. B. Dawid (2005). "Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier?" J Biol **4**(1): 2.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanna, A. N., E. Y. Chan, J. Xu, J. C. Stone and D. N. Brindley (1999). "A novel pathway for tumor necrosis factor-alpha and ceramide signaling involving sequential activation of tyrosine kinase, p21(ras), and phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **274**(18): 12722-12729.

Hannun, Y. A. (1994). "The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide." J Biol Chem **269**(5): 3125-3128.

Harper, P. H., E. C. Lee, M. G. Kettlewell, M. K. Bennett and D. P. Jewell (1985). "Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis." Gut **26**(3): 279-284.

Hay, E. D. (1990). "Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation." Cell Differ Dev **32**(3): 367-375.

Heidecke, C. D., T. Hensler, H. Weighardt, N. Zantl, H. Wagner, J. R. Siewert and B. Holzmann (1999). "Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection." Am J Surg **178**(4): 288-292.

Heller, R. A. and M. Kronke (1994). "Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways." J Cell Biol **126**(1): 5-9.

Hemminki, K., X. Liu, J. Ji, J. Sundquist and K. Sundquist (2012). "Autoimmune disease and subsequent digestive tract cancer by histology." Ann Oncol **23**(4): 927-933.

Heyer, J., K. Yang, M. Lipkin, W. Edelmann and R. Kucherlapati (1999). "Mouse models for colorectal cancer." Oncogene **18**(38): 5325-5333.

Hoffmann, W. and W. Jagla (2002). "Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain." Int Rev Cytol **213**: 147-181.

- Hoffmann, W., W. Jagla and A. Wiede (2001). "Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain." Histol Histopathol **16**(1): 319-334.
- Hotulainen, P. and P. Lappalainen (2006). "Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells." J Cell Biol **173**(3): 383-394.
- Huang da, W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists." Nucleic Acids Res **37**(1): 1-13.
- Huang, H. and X. He (2008). "Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights." Curr Opin Cell Biol **20**(2): 119-125.
- Huang, H., J. Li, L. Hu, L. Ge, H. Ji, Y. Zhao and L. Zhang (2014). "Bantam is essential for Drosophila intestinal stem cell proliferation in response to Hippo signaling." Dev Biol **385**(2): 211-219.
- Huang, W. C., S. H. Chan, T. H. Jang, J. W. Chang, Y. C. Ko, T. C. Yen, S. L. Chiang, W. F. Chiang, T. Y. Shieh, C. T. Liao, J. L. Juang, H. C. Wang, A. J. Cheng, Y. C. Lu and L. H. Wang (2014). "miRNA-491-5p and GIT1 serve as modulators and biomarkers for oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis." Cancer Res **74**(3): 751-764.
- Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. (2012). "Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **100**(Pt B): 1-441.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P. D. Zamore (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.
- Ishida, H., T. Tatsumi, A. Hosui, T. Nawa, T. Kodama, S. Shimizu, H. Hikita, N. Hiramatsu, T. Kanto, N. Hayashi and T. Takehara (2011). "Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway." Biochem Biophys Res Commun **412**(1): 92-97.
- Itoh, K., B. K. Brott, G. U. Bae, M. J. Ratcliffe and S. Y. Sokol (2005). "Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/beta-catenin signaling." J Biol **4**(1): 3.
- Jalving, M., S. de Jong, J. J. Koornstra, W. Boersma-van Ek, N. Zwart, J. Wesseling, E. G. de Vries and J. H. Kleibeuker (2006). "TRAIL induces apoptosis in human colorectal adenoma cell lines and human colorectal adenomas." Clin Cancer Res **12**(14 Pt 1): 4350-4356.
- Jiang, H. J., S. Wang and Y. Ding (2014). "Emerging paradigms of long non-coding RNAs in gastrointestinal cancer." Am J Stem Cells **3**(2): 63-73.
- Jump, R. L. and A. D. Levine (2004). "Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **10**(4): 462-478.
- Kakutani, M., K. Takeuchi, I. Waga, H. Iwamura and K. Wakitani (1999). "JTE-607, a novel inflammatory cytokine synthesis inhibitor without immunosuppression, protects from endotoxin shock in mice." Inflamm Res **48**(8): 461-468.
- Kaler, P., V. Galea, L. Augenlicht and L. Klampfer (2010). "Tumor associated macrophages protect colon cancer cells from TRAIL-induced apoptosis through IL-1beta-dependent stabilization of Snail in tumor cells." PLoS One **5**(7): e11700.
- Kartha, S. and F. G. Toback (1992). "Adenine nucleotides stimulate migration in wounded cultures of kidney epithelial cells." J Clin Invest **90**(1): 288-292.
- Ke, J., Y. L. Yao, J. Zheng, P. Wang, Y. H. Liu, J. Ma, Z. Li, X. B. Liu, Z. Q. Li, Z. H. Wang and Y. X. Xue (2015). "Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits malignant biological behaviors of human glioma cells via modulation of miR-326." Oncotarget **6**(26): 21934-21949.
- Kim, B. W., K. M. Kim, B. I. Lee, L. S. Maeng, H. Choi, S. H. Cho, H. S. Chae, J. K. Kim, K. Y. Choi and I. S. Chung (2004). "Expression of trefoil peptides in the subtypes of intestinal metaplasia." Peptides **25**(5): 779-783.
- Kim, M. Y., C. Linardic, L. Obeid and Y. Hannun (1991). "Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation." J Biol Chem **266**(1): 484-489.

- Kinoshita, K., D. R. Taupin, H. Itoh and D. K. Podolsky (2000). "Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor." Mol Cell Biol **20**(13): 4680-4690.
- Kolesnick, R. and D. W. Golde (1994). "The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling." Cell **77**(3): 325-328.
- Krasagakis, K., C. Garbe, C. C. Zouboulis and C. E. Orfanos (1995). "Growth control of melanoma cells and melanocytes by cytokines." Recent Results Cancer Res **139**: 169-182.
- Kreusel, K. M., M. Fromm, J. D. Schulzke and U. Hegel (1991). "Cl- secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6)." Am J Physiol **261**(4 Pt 1): C574-582.
- Kroesen, B. J., N. Teteloshvili, K. Smigielska-Czepiel, E. Brouwer, A. M. Boots, A. van den Berg and J. Kluiver (2015). "Immuno-miRs: critical regulators of T-cell development, function and ageing." Immunology **144**(1): 1-10.
- Kruger, J. and M. Rehmsmeier (2006). "RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W451-454.
- Lacy, E. R. (1988). "Epithelial restitution in the gastrointestinal tract." J Clin Gastroenterol **10 Suppl 1**: S72-77.
- Lambert, N. J., S. G. Gu and A. M. Zahler (2011). "The conformation of microRNA seed regions in native microRNPs is prearranged for presentation to mRNA targets." Nucleic Acids Res **39**(11): 4827-4835.
- Lane, D. (2004). "Anthony Dipple Carcinogenesis Award. p53 from pathway to therapy." Carcinogenesis **25**(7): 1077-1081.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.
- Lehtinen, M. K., Z. Yuan, P. R. Boag, Y. Yang, J. Villen, E. B. Becker, S. DiBacco, N. de la Iglesia, S. Gygi, T. K. Blackwell and A. Bonni (2006). "A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span." Cell **125**(5): 987-1001.
- Lin, N., L. F. Xu and M. Sun (2013). "The protective effect of trefoil factor 3 on the intestinal tight junction barrier is mediated by toll-like receptor 2 via a PI3K/Akt dependent mechanism." Biochem Biophys Res Commun **440**(1): 143-149.
- Lipkin, M., P. Sherlock and B. Bell (1963). "Cell Proliferation Kinetics in the Gastrointestinal Tract of Man. II. Cell Renewal in Stomach, Ileum, Colon, and Rectum." Gastroenterology **45**: 721-729.
- Liu, D., I. el-Hariry, A. J. Karayiannakis, J. Wilding, R. Chinery, W. Kmiot, P. D. McCrea, W. J. Gullick and M. Pignatelli (1997). "Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor." Lab Invest **77**(6): 557-563.
- Liu, F., X. Hu, M. Zimmerman, J. L. Waller, P. Wu, A. Hayes-Jordan, D. Lev and K. Liu (2011). "TNFalpha cooperates with IFN-gamma to repress Bcl-xL expression to sensitize metastatic colon carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis." PLoS One **6**(1): e16241.
- Liu, X., H. Zou, C. Slaughter and X. Wang (1997). "DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." Cell **89**(2): 175-184.
- Louzada, S., F. Adegas and R. Chaves (2012). "Defining the sister rat mammary tumor cell lines HH-16 cl.2/1 and HH-16.cl.4 as an in vitro cell model for Erbb2." PLoS One **7**(1): e29923.
- Lv, R., W. Qiao, Z. Wu, Y. Wang, S. Dai, Q. Liu and X. Zheng (2014). "Tumor necrosis factor alpha blocking agents as treatment for ulcerative colitis intolerant or refractory to conventional medical therapy: a meta-analysis." PLoS One **9**(1): e86692.
- MacDonald, T. T., P. Hutchings, M. Y. Choy, S. Murch and A. Cooke (1990). "Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine." Clin Exp Immunol **81**(2): 301-305.
- Machesky, L. M. and A. Hall (1997). "Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization." J Cell Biol **138**(4): 913-926.

- Marchbank, T., B. R. Westley, F. E. May, D. P. Calnan and R. J. Playford (1998). "Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects." J Pathol **185**(2): 153-158.
- Mashimo, H., D. C. Wu, D. K. Podolsky and M. C. Fishman (1996). "Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor." Science **274**(5285): 262-265.
- Matthews, N. and J. F. Watkins (1978). "Tumour-necrosis factor from the rabbit. I. Mode of action, specificity and physicochemical properties." Br J Cancer **38**(2): 302-309.
- May, F. E., J. I. Semple, S. J. Prest and B. R. Westley (2004). "Expression and mitogenic activity of TFF2 in human breast cancer cells." Peptides **25**(5): 865-872.
- McBain, J. A., J. L. Weese, L. F. Meisner, W. H. Wolberg and J. K. Willson (1984). "Establishment and characterization of human colorectal cancer cell lines." Cancer Res **44**(12 Pt 1): 5813-5821.
- McCourt, M., J. H. Wang, S. Sookhai and H. P. Redmond (1999). "Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis." Arch Surg **134**(12): 1325-1331; discussion 1331-1322.
- McKenzie, C., T. Marchbank, R. J. Playford, W. Otto, L. Thim and M. E. Parsons (1997). "Pancreatic spasmolytic polypeptide protects the gastric mucosa but does not inhibit acid secretion or motility." Am J Physiol **273**(1 Pt 1): G112-117.
- Medema, J. P., C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer and M. E. Peter (1997). "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." EMBO J **16**(10): 2794-2804.
- Meyer zum Buschenfelde, D., R. Tauber and O. Huber (2006). "TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression." Peptides **27**(12): 3383-3390.
- Mitsiades, N., V. Poulaki, S. Tseleni-Balafouta, D. A. Koutras and I. Stamenkovic (2000). "Thyroid carcinoma cells are resistant to FAS-mediated apoptosis but sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." Cancer Res **60**(15): 4122-4129.
- Modur, V., R. Nagarajan, B. M. Evers and J. Milbrandt (2002). "FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer." J Biol Chem **277**(49): 47928-47937.
- Moon, R. T., A. D. Kohn, G. V. De Ferrari and A. Kaykas (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies." Nat Rev Genet **5**(9): 691-701.
- Mora, A., D. Komander, D. M. van Aalten and D. R. Alessi (2004). "PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 161-170.
- Murch, S. H., C. P. Braegger, J. A. Walker-Smith and T. T. MacDonald (1993). "Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease." Gut **34**(12): 1705-1709.
- Murphy, A. C., B. Weyhenmeyer, J. Noonan, S. M. Kilbride, S. Schimansky, K. P. Loh, D. Kogel, A. G. Letai, J. H. Prehn and B. M. Murphy (2014). "Modulation of Mcl-1 sensitizes glioblastoma to TRAIL-induced apoptosis." Apoptosis **19**(4): 629-642.
- Muzio, M., G. S. Salvesen and V. M. Dixit (1997). "FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens." J Biol Chem **272**(5): 2952-2956.
- Nakano, H., T. Miyazawa, K. Kinoshita, Y. Yamada and T. Yoshida (2010). "Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells." Int J Cancer **127**(5): 1072-1080.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." Cell **81**(1): 53-62.
- Nusse, R. (2005). "Wnt signaling in disease and in development." Cell Res **15**(1): 28-32.
- Nusse, R., C. Fuerer, W. Ching, K. Harnish, C. Logan, A. Zeng, D. ten Berge and Y. Kalani (2008). "Wnt signaling and stem cell control." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **73**: 59-66.

- Obeid, L. M., C. M. Linardic, L. A. Karolak and Y. A. Hannun (1993). "Programmed cell death induced by ceramide." Science **259**(5102): 1769-1771.
- Obexer, P., K. Geiger, P. F. Ambros, B. Meister and M. J. Ausserlechner (2007). "FKHRL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells." Cell Death Differ **14**(3): 534-547.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi and N. Tanaka (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science **288**(5468): 1053-1058.
- Ogawara, Y., S. Kishishita, T. Obata, Y. Isazawa, T. Suzuki, K. Tanaka, N. Masuyama and Y. Gotoh (2002). "Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53." J Biol Chem **277**(24): 21843-21850.
- Park, S. Y., J. W. Seol, Y. J. Lee, J. H. Cho, H. S. Kang, I. S. Kim, S. H. Park, T. H. Kim, J. H. Yim, M. Kim, T. R. Billiar and D. W. Seol (2004). "IFN-gamma enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1." Eur J Biochem **271**(21): 4222-4228.
- Pawar, K., C. Hanisch, S. E. Palma Vera, R. Einspanier and S. Sharbati (2016). "Down regulated lncRNA MEG3 eliminates mycobacteria in macrophages via autophagy." Sci Rep **6**: 19416.
- Pickard, M. R. and G. T. Williams (2015). "Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 lncRNA." Genes (Basel) **6**(3): 484-499.
- Playford, R. J., T. Marchbank, R. Chinery, R. Evison, M. Pignatelli, R. A. Boulton, L. Thim and A. M. Hanby (1995). "Human spasmodic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration." Gastroenterology **108**(1): 108-116.
- Ploner, C., R. Kofler and A. Villunger (2008). "Noxa: at the tip of the balance between life and death." Oncogene **27 Suppl 1**: S84-92.
- Podolsky, D. K., K. Lynch-Devaney, J. L. Stow, P. Oates, B. Murgue, M. De-Beaumont, B. E. Sands and Y. R. Mahida (1993). "Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion." J Biol Chem **268**(16): 12230.
- Poliseno, L., L. Salmena, J. Zhang, B. Carver, W. J. Haveman and P. P. Pandolfi (2010). "A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology." Nature **465**(7301): 1033-1038.
- Porth, C. M. (1998). Pathophysiology-Concepts of altered health status, Lippincott-Raven.
- Prantera, C., H. Lochs, M. Campieri, M. L. Scribano, G. C. Sturniolo, F. Castiglione and M. Cottone (2006). "Antibiotic treatment of Crohn's disease: results of a multicentre, double blind, randomized, placebo-controlled trial with rifaximin." Aliment Pharmacol Ther **23**(8): 1117-1125.
- Prantera, C., M. L. Scribano, E. Berto and F. Zannoni (1997). "Antibiotic use in Crohn's disease: why and how?" BioDrugs **8**(4): 293-306.
- Prensner, J. R. and A. M. Chinnaiyan (2011). "The emergence of lncRNAs in cancer biology." Cancer Discov **1**(5): 391-407.
- Pullen, N., P. B. Dennis, M. Andjelkovic, A. Dufner, S. C. Kozma, B. A. Hemmings and G. Thomas (1998). "Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1." Science **279**(5351): 707-710.
- Qu, Y. L., H. F. Wang, Z. Q. Sun, Y. Tang, X. N. Han, X. B. Yu and K. Liu (2015). "Up-regulated miR-155-5p promotes cell proliferation, invasion and metastasis in colorectal carcinoma." Int J Clin Exp Pathol **8**(6): 6988-6994.
- Raghavendra, P. B., N. Pathak and S. K. Manna (2009). "Novel role of thiazolidine derivatives in inducing cell death through Myc-Max, Akt, FKHR, and FasL pathway." Biochem Pharmacol **78**(5): 495-503.
- Rehmsmeier, M., P. Steffen, M. Hochsmann and R. Giegerich (2004). "Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes." RNA **10**(10): 1507-1517.

- Rio, M. C., M. P. Chenard, C. Wolf, L. Marcellin, C. Tomasetto, R. Lathe, J. P. Bellocq and P. Chambon (1991). "Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract." Gastroenterology **100**(2): 375-379.
- Roy, S. and D. W. Nicholson (2000). "Cross-talk in cell death signaling." J Exp Med **192**(8): F21-25.
- Saikumar, P., Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam (1999). "Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease." Am J Med **107**(5): 489-506.
- Sakahira, H., M. Enari and S. Nagata (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." Nature **391**(6662): 96-99.
- Salmena, L., L. Poliseno, Y. Tay, L. Kats and P. P. Pandolfi (2011). "A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?" Cell **146**(3): 353-358.
- Sands, B. E. and D. K. Podolsky (1996). "The trefoil peptide family." Annu Rev Physiol **58**: 253-273.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.
- Schmitz, H., M. Fromm, C. J. Bentzel, P. Scholz, K. Detjen, J. Mankertz, H. Bode, H. J. Epple, E. O. Riecken and J. D. Schulzke (1999). "Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6." J Cell Sci **112** (Pt 1): 137-146.
- Sethi, G., B. Sung and B. B. Aggarwal (2008). "TNF: a master switch for inflammation to cancer." Front Biosci **13**: 5094-5107.
- Sgambato, A. and A. Cittadini (2010). "Inflammation and cancer: a multifaceted link." Eur Rev Med Pharmacol Sci **14**(4): 263-268.
- Sharbati, J., C. Hanisch, R. Pieper, R. Einspanier and S. Sharbati (2015). "Small molecule and RNAi induced phenotype transition of expanded and primary colonic epithelial cells." Sci Rep **5**: 12681.
- Sharbati, J., A. Lewin, B. Kutz-Lohroff, E. Kamal, R. Einspanier and S. Sharbati (2011). "Integrated microRNA-mRNA-analysis of human monocyte derived macrophages upon Mycobacterium avium subsp. hominissuis infection." PLoS One **6**(5): e20258.
- Sonkoly, E., Z. Bata-Csorgo, A. Pivarcsi, H. Polyanka, A. Kenderessy-Szabo, G. Molnar, K. Szentpali, L. Bari, K. Megyeri, Y. Mandi, A. Dobozy, L. Kemeny and M. Szell (2005). "Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS." J Biol Chem **280**(25): 24159-24167.
- Sprick, M. R., M. A. Weigand, E. Rieser, C. T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P. H. Krammer and H. Walczak (2000). "FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2." Immunity **12**(6): 599-609.
- Sugarman, B. J., B. B. Aggarwal, P. E. Hass, I. S. Figari, M. A. Palladino, Jr. and H. M. Shepard (1985). "Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro." Science **230**(4728): 943-945.
- Suhara, T., H. S. Kim, L. A. Kirshenbaum and K. Walsh (2002). "Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation." Mol Cell Biol **22**(2): 680-691.
- Sun, G. G., Y. F. Lu, Y. J. Cheng, C. R. Yang, Q. Liu, S. W. Jing and X. C. Han (2014). "Expression of BTG1 in hepatocellular carcinoma and its correlation with cell cycles, cell apoptosis, and cell metastasis." Tumour Biol **35**(12): 11771-11779.
- Svoboda, M., J. Slyskova, M. Schneiderova, P. Makovicky, L. Bielik, M. Levy, L. Lipska, B. Hemmelova, Z. Kala, M. Protivankova, O. Vycital, V. Liska, L. Schwarzova, L. Vodickova and P. Vodicka (2014). "HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients." Carcinogenesis **35**(7): 1510-1515.
- Szegedi, K., A. Goblos, S. Bacsá, M. Antal, I. B. Nemeth, Z. Bata-Csorgo, L. Kemeny, A. Dobozy and M. Szell (2012). "Expression and functional studies on the noncoding RNA, PRINS." Int J Mol Sci **14**(1): 205-225.

- Szegedi, K., E. Sonkoly, N. Nagy, I. B. Nemeth, Z. Bata-Csorgo, L. Kemeny, A. Dobozy and M. Szell (2010). "The anti-apoptotic protein G1P3 is overexpressed in psoriasis and regulated by the non-coding RNA, PRINS." Exp Dermatol **19**(3): 269-278.
- Taupin, D. and D. K. Podolsky (2003). "Trefoil factors: initiators of mucosal healing." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 721-732.
- Taupin, D. R., K. Kinoshita and D. K. Podolsky (2000). "Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 799-804.
- Teng, X., L. F. Xu, P. Zhou, H. W. Sun and M. Sun (2009). "Effects of trefoil peptide 3 on expression of TNF-alpha, TLR4, and NF-kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis mice." Inflammation **32**(2): 120-129.
- Tojkander, S., G. Gateva and P. Lappalainen (2012). "Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles." J Cell Sci **125**(Pt 8): 1855-1864.
- Torres, M. A. and W. J. Nelson (2000). "Colocalization and redistribution of dishevelled and actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis." J Cell Biol **149**(7): 1433-1442.
- Trainer, D. L., T. Kline, F. L. McCabe, L. F. Faucette, J. Feild, M. Chaikin, M. Anzano, D. Rieman, S. Hoffstein, D. J. Li and et al. (1988). "Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines." Int J Cancer **41**(2): 287-296.
- Tytgat, K. M., H. A. Buller, F. J. Opdam, Y. S. Kim, A. W. Einerhand and J. Dekker (1994). "Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin." Gastroenterology **107**(5): 1352-1363.
- Uchino, H., H. Kataoka, H. Itoh, R. Hamasuna and M. Koono (2000). "Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth in vitro and in vivo." Gastroenterology **118**(1): 60-69.
- Valis, K., L. Prochazka, E. Boura, J. Chladova, T. Obsil, J. Rohlena, J. Truksa, L. F. Dong, S. J. Ralph and J. Neuzil (2011). "Hippo/Mst1 stimulates transcription of the proapoptotic mediator NOXA in a FoxO1-dependent manner." Cancer Res **71**(3): 946-954.
- van der Heide, L. P., P. J. Wijchers, L. von Oerthel, J. P. Burbach, M. F. Hoekman and M. P. Smidt (2015). "FoxK2 is required for cellular proliferation and survival." J Cell Physiol **230**(5): 1013-1023.
- Van der Sluis, M., B. A. De Koning, A. C. De Bruijn, A. Velcich, J. P. Meijerink, J. B. Van Goudoever, H. A. Buller, J. Dekker, I. Van Seuning, I. B. Renes and A. W. Einerhand (2006). "Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection." Gastroenterology **131**(1): 117-129.
- van Staveren, W. C., D. Y. Solis, A. Hebrant, V. Detours, J. E. Dumont and C. Maenhaut (2009). "Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells?" Biochim Biophys Acta **1795**(2): 92-103.
- Varelas, X., B. W. Miller, R. Sopko, S. Song, A. Gregorieff, F. A. Fellouse, R. Sakuma, T. Pawson, W. Hunziker, H. McNeill, J. L. Wrana and L. Attisano (2010). "The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling." Dev Cell **18**(4): 579-591.
- Vargo-Gogola, T. and J. M. Rosen (2007). "Modelling breast cancer: one size does not fit all." Nat Rev Cancer **7**(9): 659-672.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Wang, W., X. Li, M. Lee, S. Jun, K. E. Aziz, L. Feng, M. K. Tran, N. Li, P. D. McCrea, J. I. Park and J. Chen (2015). "FOXKs promote Wnt/beta-catenin signaling by translocating DVL into the nucleus." Dev Cell **32**(6): 707-718.
- White, E. (2012). "Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer." Nat Rev Cancer **12**(6): 401-410.
- Williams, M. A., C. M. Cave, G. Quaid and J. S. Solomkin (1999). "Chemokine regulation of neutrophil function in surgical inflammation." Arch Surg **134**(12): 1360-1366.
- Wong, W. M., R. Poulsom and N. A. Wright (1999). "Trefoil peptides." Gut **44**(6): 890-895.

Wright, N. A., W. Hoffmann, W. R. Otto, M. C. Rio and L. Thim (1997). "Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer." FEBS Lett **408**(2): 121-123.

Xu, J., J. Y. Zhou, W. Z. Wei and G. S. Wu (2010). "Activation of the Akt survival pathway contributes to TRAIL resistance in cancer cells." PLoS One **5**(4): e10226.

Yazlovitskaya, E. M., J. C. Pelling and D. L. Persons (1999). "Association of apoptosis with the inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase activity in the tumor necrosis factor alpha-resistant ovarian carcinoma cell line UCI 101." Mol Carcinog **25**(1): 14-20.

Zhao, M., R. Luo, Y. Liu, L. Gao, Z. Fu, Q. Fu, X. Luo, Y. Chen, X. Deng, Z. Liang, X. Li, C. Cheng, Z. Liu and W. Fang (2016). "miR-3188 regulates nasopharyngeal carcinoma proliferation and chemosensitivity through a FOXO1-modulated positive feedback loop with mTOR-p-PI3K/AKT-c-JUN." Nat Commun **7**: 11309.

Zheng, G., X. Jia, C. Peng, Y. Deng, J. Yin, Z. Zhang, N. Li, M. Deng, X. Liu, H. Liu, M. Lu, C. Wang, Y. Gu and Z. He (2015). "The miR-491-3p/mTORC2/FOXO1 regulatory loop modulates chemo-sensitivity in human tongue cancer." Oncotarget **6**(9): 6931-6943.

zur Bruegge, J., C. Hanisch, R. Einspanier, T. Alter, G. Golz and S. Sharbati (2014). "Arcobacter butzleri induces a pro-inflammatory response in THP-1 derived macrophages and has limited ability for intracellular survival." Int J Med Microbiol **304**(8): 1209-1217.

X Anhang

X₁ Zusätzliche Ergebnisse

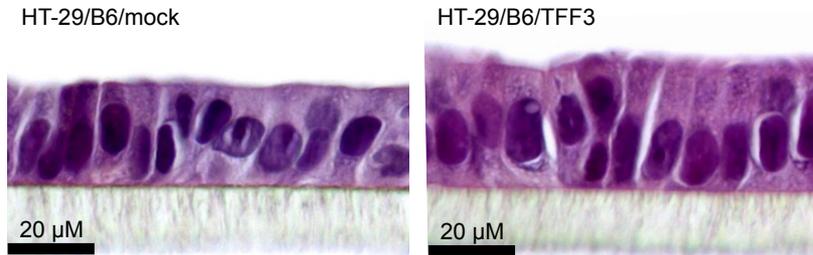


Abbildung 35 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von ausdifferenzierten HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hff3 9 Tage nach Aussaat.

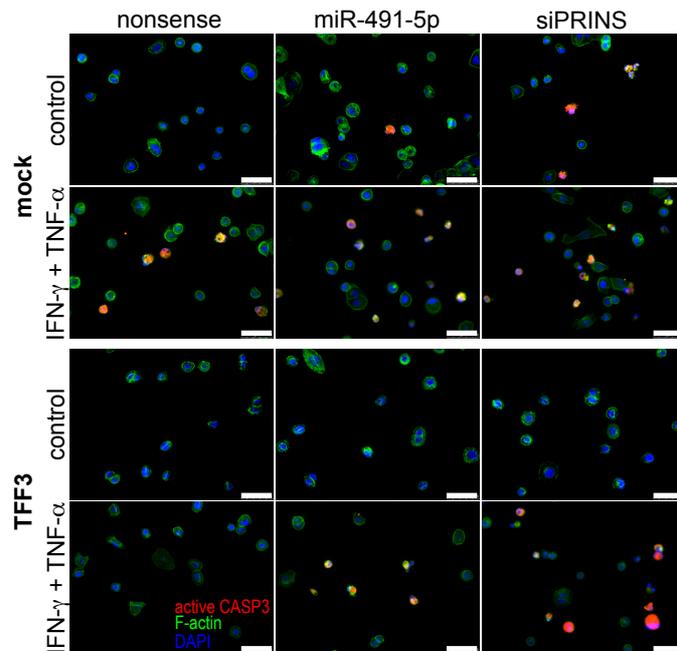


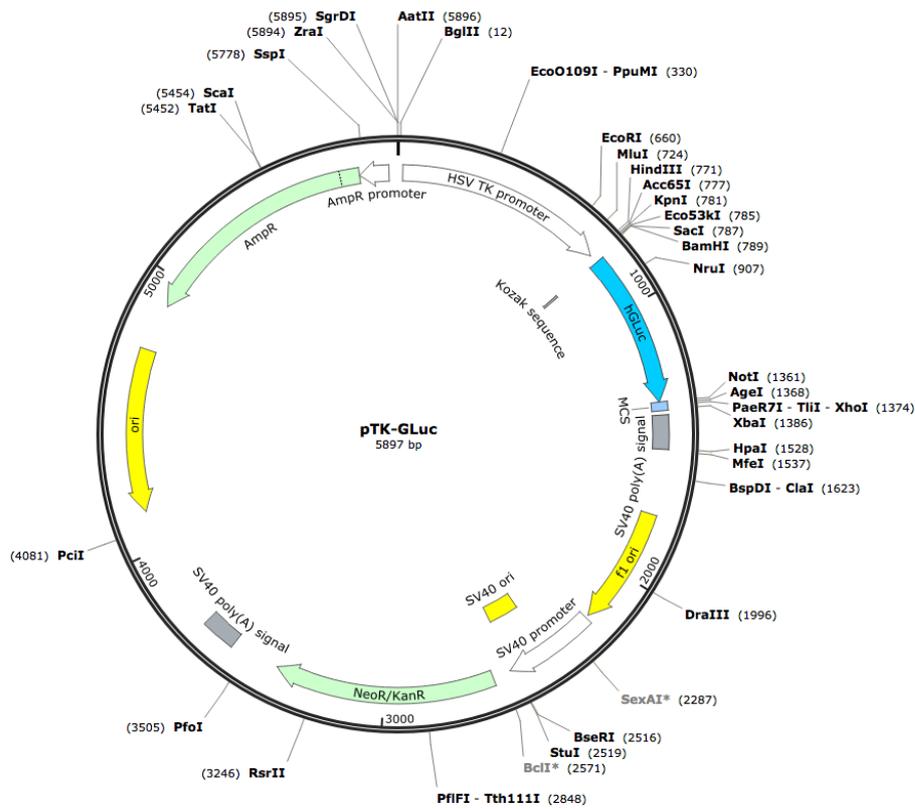
Abbildung 36 Nachweis der Apoptoseinduktion von HT-29/B6/mock und HT-29/B6/hff3 durch Färbung der aktiven Caspase-3, Zellkernen und F-Aktin 6 h nach Transfektion mit miR-491-5p, siRNA gegen PRINS und nonsense RNA und anschließender 24stündiger Behandlung mit IFN- γ und TNF- α . Der Balken entspricht 25 μ m. Die Zellen wurden zusätzlich zu den Aufnahmen in Abbildung 16 subkonfluent ausgesät.

X₂ Abkürzungsverzeichnis

APC	adenomatosis polyposis coli
ASS	Acetylsalicylsäure
BCG	Bacille Calmette-Guérin
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BIM	(bcl-2-like protein 11)
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like
BTG1	B-Cell Translocation Gene 1
CAD	Caspasen-aktivierte DNase
CagA	Zytotoxin-assoziiertes Antigen
Caspase	cysteiny-directed aspartate-specific protease
CK1	casein kinase 1
DISC	death-inducing signaling complex
DSS	Dextran Natriumsulfat
DVL	dishevelled
EGFR	epidermal growth factor receptor
FADD	Fas-associated protein with death domain
FASL	FAS Ligand
FGF1	Fibroblast Growth Factor 1
FOXP1 und FOXP2	forkhead box k1 und k2
G1P3	Glc7 Interacting Protein
GCRE	goblet-cell-specific-enhancer element
GI	gastrointestinal
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HOTAIR	HOX antisense intergenic RNA
IBD	inflammatory bowel disease; chronisch entzündliche Darmerkrankungen
IFI6	Interferon α -inducible protein 6
IFN-g	Interferon-g
IL	Interleukin
LEF	lymphoid enhancer factor
lncRNA	lange nicht kodierende RNA
Mcl-1	induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MEG3	Maternally expressed 3
miRNA	microRNA
mTORC2	rapamycin-insensitive mTOR complex2
MUC2	Mucin-2
NF-kB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NPM	Nucleophosmin
	3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (3-phosphoinositide-dependent kinase-1
PDK1	
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat
PKB synonym AKT	Proteinkinase B
PMAIP1 bzw. NOXA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
PRINS	Psoriasis susceptibility-related RNA Gene Induced by Stress

PTEN	Lipid-Phosphatase phosphatase and tensin homolog
RISC	RNA-induced-Silencing-Complex
siRNA	Small interfering RNA
TAZ	transcriptional co-activator with PDZ-binding motif
TCF	T cell factor
TFF3	trefoil factor 3
TGF- β	transforming growth factor β
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAIL	TNF- α related apoptosis-inducing ligand
UTR	Untranslated region
VacA	Vakuolisierendes Zytotoxin
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Wg für wingless und Int-1
Wt	Wildtyp
YAP	Yes-associated protein

X₃ Plasmidkarten



X₄ Material

Chemikalien	Hersteller
Acid-Phenol:CHCl ₃ 5:1 Lösung	Ambion
Acrylamid 40% (Rotiporese Gel 40)	Carl Roth GmbH
AG490	Tocris Bioscience
Ammoniumpersulfat	Merck KGaA
Ampicillin	Sigma Aldrich GmbH
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich GmbH
Coomassie G250	Merck KGaA
Cryomaxx	PAA Laboratories GmbH
Cut Smart Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Roche GmbH
Diethylpyrocarbona (DEPC)	Sigma Aldrich GmbH
Deoxynukleotid-Mix (dNTP Mix)	Bioline GmbH
Dulbecco's Modifizierte Medien (DMEM)	Biochrom AG
Dithiothreitol (DTT)	Cell Signaling Technology
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Life Technologies
Essigsäure	Carl Roth GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
Fetal bovine Serum (FBS) superior (S 0615)	Biochrom AG
Fast Digest (FD)-Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH
Formaldehyd	Carl Roth GmbH
Gentamycin	Biochrom AG
Geneticin (G418)	Carl Roth GmbH
Glukose	Merck KGaA
Glycerin	Carl Roth GmbH
B-Glycerophosphatdinatriumsalz	Sigma Aldrich GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfon- säure (HEPES)	Sigma Aldrich GmbH
iCRT14	Tocris Bioscience
IGEPAL	Sigma Aldrich GmbH
Interferon (IFN)-γ	Cell Signaling Technology
Isopropanol	Merck KGaA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Leupeptin	Cell Signaling Technology
Lysogeny broth (LB)-Agarplatte	Carl Roth GmbH
Lysogeny broth (LB)-Medium	Carl Roth GmbH
LY-294002	Tocris Bioscience
Magnesiumchlorid (MgCl)	Merck KGaA
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck KGaA
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
miR- <i>mimic</i> (synthetische microRNA)	Life Technologies
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
Natriumfluorid (NaF)	Merck KGaA
Natriumthiosulfat	Carl Roth GmbH
Natriumpyrophosphat	Cell Signaling Technology
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich GmbH
<i>nonsense</i> Kontroll RNA	Thermo Fisher Scientific

Phosphate-buffered saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH
Phalloidin (Atto 488)	Sigma Aldrich GmbH
PMSF	Sigma Aldrich GmbH
Primer	Sigma Aldrich GmbH
Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma Aldrich GmbH
Protein G Magnetic Beads	New England Biolabs GmbH
random Hexamer Primer	Life Technologies
Reaktionspuffer (10x) für Dnase I mit MgCl ₂	Life Technologies
Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA)	Cell Signaling Technology
Roti-Load I (4x)	Carl Roth GmbH
RPMI 1640 (F 1215)	Biochrom AG
Reverse Transkription (RT) Puffer (5x)	Life Technologies
Saccharose	Sigma Aldrich GmbH
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH
SCH7979	Tocris Bioscience
SensiMix™SYBR Hi-ROX	Bioline GmbH
Silbernitrat	Carl Roth GmbH
small interfering RNA (siRNA gegen PRINS)	Eurofins Genomics
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	Carl Roth GmbH
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Merck KGaA
TFF3 (human, rekombinant)	Tocris Bioscience
Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha	Sigma-Aldrich GmbH
Tris Pufferan	Carl Roth GmbH
Tween 20	Sigma Aldrich GmbH
Tween-100	Sigma Aldrich GmbH
Typanblau (0,5 %)	Serva Heidelberg

Verbrauchsmaterialien

Hersteller

6-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH
8-Well Objektträger	Sarstedt
96-Well E-plates	Lonza Cologne AG
96 Well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH
Elektroporationsküvetten	Lonza Cologne AG
E-Plate® 96	ACEA Biosciences
MicroAmp® Fast96-Well Reaction Plates	Life Technologies GmbH
Mikroreaktionsgefäße 0,2 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen 2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Sarstedt
PVDF Membranen Amersham Hybond™-P(0,45 µm)	GE Healthcare Europe GmbH
PVDF Membranen Amersham Hybond™-P(0,20 µm)	GE Healthcare Europe GmbH
Roti®-Store Cryoröhrchen	Carl Roth GmbH
Serologische Pipetten 10 ml; 25 ml	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25 cm ²) mit Belüftung	Sarstedt
Zellkulturflaschen (75 cm ²) mit Belüftung	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt

Kits	Hersteller
2-D Quant Kit	GE Healthcare Europe GmbH
6000 Nano Kit	Agilent
Biolux Assay Kits	New England Biolabs GmbH
ECL Select™ Western Blot Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH
LumiGlo-Kit	Cell Signaling Technology
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
miRVana miRNA Isolierungskit	Life Technologies GmbH
NucleoSpin® Plasmid	Macherey Nagel GmbH
NucleoBond® xtra Midi PlusEF	Macherey Nagel GmbH
QIAquick Gel Extraction Kits	Qiagen
Stellaris® RNA FISH System	Biosearch Technologies
Transfektionskit L	Lonza Cologne AG
Transfektionskit R	Lonza Cologne AG

Enzyme	Hersteller
Accutase (A6964)	Sigma-Aldrich GmbH
DNase I (RNase frei)	Thermo Fisher Scientific
OneTaq Polymerase	New England Biolabs GmbH
Q5 Polymerase	New England Biolabs GmbH
Restriktionsendonukleasen HF-NotI, XbaI, FD-HindIII, FD-XbaI	New England Biolabs GmbH
RevertAid™ reverse Transkriptase	Life Technologies
RNase A	Quiagen
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH

Vektoren	Hersteller
pTK-CLuc	New England Biolabs GmbH
pTK-Gluc Plasmid	New England Biolabs GmbH

Geräte	Hersteller
2100 BioAnalyzer	Agilent
Elektrophoresekammern (DNA)	Carl Roth GmbH
Elektrophoresekammern (Western Blot)	GE Amersham, SE 250-Apparatur
FLUOstar OPTIMA Luminometer	BMG Labtech
Fluoreszenzmikroskops DMI600 B	Leica
Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Nano Drop 1000 spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH
Nucleofector™2b	Lonza Cologne AG
SE 250-Apparatur	Amersham Biosciences, GE
Sterilbank	LaboGene
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Life Technologies GmbH
TE 77 ECL Semi-Dry Transfer Unit	Amersham Biosciences, GE
T _{Gradient} Thermal Cycler	Healthcare Europe GmbH
Veriti® 96-Well Thermal Cycler	Biometra
Zentrifuge	Life Technologies GmbH
The xCELLigence® RTCA SP	Eppendorf
	ACEA Biosciences

Antikörper	Hersteller
Caspase-3	Cell Signaling Technology
FOXK1(#12025)	Cell Signaling Technology
FOXK2(#12008)	Cell Signaling Technology
GAPDH (# D16H11)	Cell Signaling Technology
HRP markierter anti-Mouse IgG	New England Biolabs GmbH
HRP markierter anti-Rabbit IgG	New England Biolabs GmbH
PMAIP1 (#D8L7U)	Cell Signaling Technology
Pan-AKT (# C67E7)	Cell Signaling Technology
Pan-P70-S6K (# 49D7)	Cell Signaling Technology
PCNA	abcam
Pho-AKT (Ser473) (# D9E)	Cell Signaling Technology
Pho-P70-S6K (Ser371) (# 9208)	Cell Signaling Technology
Pho-P70-S6K (Thr389) (# 108D2)	Cell Signaling Technology
Pho-PDK1 (Ser241) (#C49H2)	Cell Signaling Technology

X₅ Auswahl nicht kodierender RNAs (*in silico*)

Tabelle 20 miRmap Analyse: ermöglicht *in silico*-Voraussagen von Zielen für miRNAs (miRmap Score 99)

hsa-miR-16-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-329	hsa-miR-491-5p
RNF24	RP11-766F14.2	MARCH1	SBK1	DPY19L3	AEN
CBX6	RAB22A	ZMYM2	SRGAP3	SOX17	SESN2
CACNA2D1	BMPR2	PAQR3	ZC3H12B	DSTYK	MTMR2
KIAA1432		KPNA5	ZZEF1	SRGAP3	PBX2
PRDM5		NHLRC2	TSPAN14	PIK3C3	RHPN1
WDTC1		ZNF652	AMOTL1	ASH1L	PFKFB2
ATXN7L1			LRRCS5	HLF	RAP1GAP2
C17orf51			SYT9	CA8	RABL2B
ZBTB34			CBL	DTNA	CCL22
ATG4B			C16orf72	PRDM5	PPP1R18
TMCC1			PRICKLE2	CDCA4	PPP1R3B
MYO5B			C17orf51	TMEM2	CREB3L2
PLAG1			SUDS3	CBL	ZMYM4
MAPK9			STK35	SYT2	DOT1L
CHD2			KIAA0141	PTPLB	FIBCD1
RAB31P			NCR3LG1	CTTNBP2NL	GFOD1
SREK1			C1orf95	CD2AP	CBX6
TMEM183A			EIF4EBP2	PLAG1	NPTXR
ATG14			SDK2	FAM46C	GNG13
MAN2A2			RAB11FIP4	KIAA2018	TSC1
TK2			TREML2	INO80D	SRGAP3
ABL2			ANXA11	TMOD2	ATP11A
ANKRD34C			PCNX	ABLIM1	ONECUT3
DES11			TMEM127	LAMTOR3	SNX33
LIN7A			CELSR1	ABL2	HEATR1
UBE2Q1			ADIPOQ	UGT8	ZDHC14
IPO9			TMEM164	BRI3BP	C16orf52
LUZP1			NFATC2	NFAT5	Z99715.1
SBNO1			hsa-mir-4763	RNF152	SLIT1
ZMAT3			KIF6	FAM105B	MIER3
SFT2D3			HS3ST1	USP36	TTC38
RUND3B			LDOC1L	PPP2R2D	POGK
PISD			BRD3	KLHDC5	POLR3A
PRKAB2			ZNF343	JHDM1D	FAM222A
FAT3			NFIC	SLC35B4	40057
MAFK			KIAA1147	BCLAF1	EEPD1
C2orf42			POLR2J2	MED28	KDM4B
TRIP11			ADAM29	ENPP4	LARP1
DLGAP2			SLC7A1	WDR72	KIAA1614
PTCH1			CSNK1G1	FAM126B	IGFBP5
FGF7			RALGPS2	PCNX	AKNA
EIF2C4			GABRA4	FAT3	TSPAN9
USP15			CCDC149	FSTL3	TUSC5
EIF2C1			RRP8	CBX2	hsa-mir-4763
TACC1			SORD	CPEB4	TTC3
TNRC6B			SOGA1	DCAF5	KIR3DX1
DMPK			SEC14L5	CPA4	TNRC6B
BTLA			C22orf29	ZMAT3	GATAD2B
LAMP3			RIMS4	DNAJC5	HRK
NFATC3			PLXNA4	C16orf52	ARID3B
TFAP2A			HIPK2	NLRP11	KCNMB1
C1QL3			PLEKHG4B	TMEM79	ZBTB4
DZIP1			AL033381.1	TFCP2	MLL2
TLK1			SGPL1	EIF3F	CPNE7
AHCYL2			C15orf38	OAS3	SLC28A3
ATF6			NOS1AP	CREB5	MAVS
THAP6			PRKCA	SBNO1	STMN3
KDSR			MGLL	PLCXD1	RNASE13
SOGA1			RFT1	TNRC6B	METTL21A
MCFD2			PRR14L	SMCHD1	CABP7
KCNC2			SHISA7	DLGAP4	MTAP
MNT			PRIMA1	FAM219A	SPIB
SYNRG			ORAI2	MCAM	TFIP11
TBL1XR1			TBC1D13	GRIK3	GNB1L
SIK1			ASXL3	TM9SF3	XCR1
HRK			FBXO41	FAM120C	SORCS2
TMEM221			UBE4A	MYSM1	HHLA2
SLC11A2			DGKG	SPOPL	VPS53
CNOT6L			PAX8	PPARGC1A	CSNK1G1
DNAJB4			SAMD4B	HIPK2	SENP2
BTBD9			POTEG	DNM3	SFTPB
TTPAL			LIMD1	BRWD3	ENY2
FOXK1			DNAJC18	PEAK1	SLC46A1
C10orf54			SSH2	STRN	ELN
APLN			KCNA7	ST6GALNAC3	NFIC
HIPK2			LPP	TMEM132B	SLC7A1
SHOC2			TFCP2L1	C16orf53	ICOSLG
C14orf43			PSAPL1	KIAA2022	BTBD9
BCL11B			MAPK1	EAF1	HIPK2
SLC41A2			ARNT2	FIGN	NOVA2
PAFAH1B1			SH3PXD2A	FOXK1	FOXP4
ACVR2A			WDFY1	STK36	ITGAX
ITGA2			SLC7A11	VANGL1	ARRB1
DGCR14			OXSRI	MAP3K2	RRP7A
RWDD1			PIP5K1C	CDS2	RPS24
THSD4			WSCD1	ZNF571	SLC25A45
MAMSTR			STX6	NOS1AP	ZSCAN12
TUBA4A			TOMM40L	KLF11	HS6ST1
CD40			PDXK	FAM46A	PAX5
RFT1			DNAJB12	GPX6	KALRN
ELL			UBXN10	HIPK1	ADAMTSL1
TMEM189-UBE2V1			H6PD	OCLN	SOX12
TMEM189			LRRCS5	PTCHD1	SPOCK2

hsa-miR-16-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-329	hsa-miR-491-5p
FGFR1			DHX33	KIAA2026	SEMA6A
SLC1A2			IGF2BP1	C1orf216	MOB3B
TRIM66			BAHD1	C21orf91	FAM212B
FGF2			ELK4	PIK3R1	CDS2
AXIN2			FZD5	MMS22L	C14orf43
QSOX1			CNNM1	LCORL	EGR3
RPRD1B			FAM26E	KPNA4	TNS1
IVNS1ABP			PPM1F	AK4	SLC29A4
TRPC1			MOB3C	SLITRK4	PADI2
HAUS3			CMKLR1	NECAB1	TNNI1
PKD4			PRND	ATP9A	DUSP3
PPT2			SHISA9	NFASC	VWA1
ARHGAP35			EHD3	REEP3	SYT7
STK38L			GRIN2A	METTL9	SHISA6
SSR1			TMEM194B	PAIP2B	PRIMA1
MCU			YY1	ABI2	CHRN2
ZBTB46			KCNJ5	EPHA4	TNFAIP1
STXBP3			CERS6	MBOAT2	SIRPB2
COL12A1			ARC	FAM204A	ZC3H7B
SLC13A3			MYO9A	ZNF264	HPCAL4
UNC119B			TNFRSF11A	CSRNP3	RP3-324N14.2
NUP50			POTEM	CNOT6	ADAM23
KIAA0317			CBFA2T2	U47924.25	DNAJB5
ZNF609			USH1G	AP000708.1	CLIP2
PAQR3			LONRF2	BACH2	ABCG4
ZMYM2			ZHX3	LANCL3	STX1B
POLR1A			GFRA1	AFF1	CBLN3
INSR			IQSEC3	STX1B	HSPG2
LSM11			PPP1R12B	RTF1	SAMD4B
UBE2V1			C22orf46	GLRA3	EIF5AL1
PHF19			TMEM178B	ZFX	VANGL2
SLC9A8				TFAM	TSKU
UNC80				RNF38	KIAA1161
ARL10				CPSF6	KCNQ4
LIMD1				CCDC71L	DIRAS1
MTHFR				UBE2H	CMIP
DRD1				SLC6A19	FBXO41
CCNLJ				EPG5	ARNT2
DCUN1D1				SLC7A11	HOXC12
CCNT1				RAP2B	MAPK1
RBM12				VAPB	SLC38A7
PID1				ZC3H12C	C11orf45
FASN				POU2F1	KCNAB2
CYB5B				SSBP2	ZNF609
PTCD3				MON2	SYNGAP1
VAPB				SMAD2	SH3PXD2A
SRRM4				TCF21	RAMP2
TGIF2				AGPS	RIMS3
PDCD1				SMAD4	ZCCHC24
C5orf64				ZNF304	TBR1
NUCKS1				STRBP	LYPLA2
C18orf1				FAM26E	KCNJ8
ANO3				EDNRA	EPB41L1
CD80				GNAI1	ANKRD52
TBC1D16				ABCC6	PATL1
RASGEF1B				TCF4	TEAD3
POU2F1				HSPA4	HIC2
ASB1				ELK4	GSX1
PTPN4				BLCAP	PEA15
GFAP				CPLX2	FLT4
PRTG				CDK6	ZNF516
AL158821.1				GADL1	NMT1
TMEM43				GLCC1	ASTN1
RPS6KA3				NHLRC2	CTD-2616J11.4
WNT7A				PALM2-AKAP2	TCEB3
SLC9A6				WIPF2	GIT1
ARFGAP2				RSF1	CDC42BPA
E2F7				MACC1	AR
C14orf37				LNPEP	PDXK
LATS1				TP53INP1	TMEM104
CLCN5				NKTR	SLC6A17
ARIH1				PDE5A	NF2
FOSL2				LARP4	HNRNPUL1
NCS1				RABGAP1	L1CAM
PVRL1				TMEM178B	OPTC
RAB30				IYD	RABL2A
EDA				ATXN1	ENTPD2
ABHD2				IMPAD1	ARHGEF11
FAM123B				PDE3A	N4BP3
ENTPD1				AMMECR1	PPP1R10
ADAMTS12				TNFRSF21	EHD2
HTR2A				PCGF3	TRIOBP
IYD				IGF1R	C10orf105
SNRNP48				PRRG1	ALPK3
PTPN3				MGAT4A	AGPAT1
RAB11FIP2				SLC44A1	AKT2
WEE1				AKAP11	PVRL1
WNK3				NUFIP2	CPLX2
NRP2					ZNF703
IGF1R					KIF21B
TECPR2					IGF2BP1
PPAPDC2					ONECUT2
PPM1L					HMX1
GRM1					SLC6A4
DCLK1					UBTF
HS3ST5					MRPL22
ZFYVE20					C1orf21
CLOCK					SEMA4G
TBRG1					RGS5
PPP1R12B					GPR153
BCL2L2					ALPI

hsa-miR-16-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-329	hsa-miR-491-5p
PAPPA					GLP2R
KIAA0247					PLA2G2D
PLSCR4					DRP2
IP6K1					TXNL1
CYBASC3					ZDHHC3
TRANK1					MBD2
					PRDM16
					IQSEC3
					SLIT3
					MEF2D
					DUSP8
					ARF3
					GRAMD1B
					IGSF9B
					USP13
					ELAVL3
					SLAMF8
					NACC1
					SLC25A23

Tabelle 21 DAVID-Analyse: ermöglicht in silico-Voraussagen von Prozessen, in denen regulierte Gene beteiligt sind. (Für miR-16, miR-20, miR-155, miR-326, miR-329, miR-491)

Term	Count	%	PValue	Genes	Fold Enrichment
hsa05200:Pathways in cancer	22	3,4755134 28	0,004232701	PRKCA, FGFR1, AR, FGF7, STK36, CBL, ARNT2, SMAD4, ITGA2, CDK6, SMAD2, FZD5, MAPK1, IGF1R, PAX8, MAPK9, PTCH1, AXIN2, FGF2, WNT7A, PIK3R1, AKT2	1,926932617
hsa04310:Wnt signaling pathway	16	2,5276461 3	1,98E-04	PRKCA, TBL1XR1, VANGL1, VANGL2, SMAD4, SMAD2, FZD5, SENP2, PRICKLE2, NFAT5, MAPK9, SOX17, AXIN2, NFATC2, WNT7A, NFATC3	3,044112695
hsa04010:MAPK signaling pathway	16	2,5276461 3	0,042239183	PRKCA, FGFR1, CACNA2D1, FGF7, MAPK1, RPS6KA3, DUSP3, ELK4, ARRB1, MAP3K2, MAPK9, NFATC2, DUSP8, PLA2G2D, FGF2, AKT2	1,721576843
hsa04144:Endocytosis	14	2,2116903 63	0,010805424	GIT1, DNMT3, ARFGAP2, CBL, PIP5K1C, ZFYVE20, RAB11FIP4, IGF1R, RAB11FIP2, ARRB1, RAB22A, IQSEC3, EHD2, EHD3	2,185887988
hsa04360:Axon guidance	13	2,0537124 8	0,001553843	ABLIM1, GNAI1, L1CAM, SLIT1, SLIT3, SEMA6A, EPHA4, MAPK1, SEMA4G, NFAT5, SRGAP3, NFATC2, NFATC3	2,895151754
hsa04910:Insulin signaling pathway	12	1,8957345 97	0,006717384	MAPK1, PPP1R3B, TSC1, PRKAB2, CBL, FASN, MAPK9, PDE3A, INSR, PPARGC1A, PIK3R1, AKT2	2,553672316
hsa05210:Colorectal cancer	9	1,4218009 48	0,008126379	IGF1R, MAPK1, SMAD4, MAPK9, SMAD2, AXIN2, FZD5, PIK3R1, AKT2	3,078087167
hsa04660:T cell receptor signaling pathway	9	1,4218009 48	0,032697031	MAPK1, CBL, NFAT5, MAPK9, NFATC2, NFATC3, PDCD1, PIK3R1, AKT2	2,394067797
hsa05218:Melanoma	8	1,2638230 65	0,010861274	IGF1R, FGFR1, MAPK1, FGF7, CDK6, FGF2, PIK3R1, AKT2	3,237049415
hsa04370:VEGF signaling pathway	8	1,2638230 65	0,014448871	PRKCA, MAPK1, NFAT5, NFATC2, PLA2G2D, NFATC3, PIK3R1, AKT2	3,06440678
hsa04914:Progesterone-mediated oocyte maturation	8	1,2638230 65	0,028546524	IGF1R, MAPK1, RPS6KA3, GNAI1, MAPK9, PDE3A, PIK3R1, AKT2	2,672447773
hsa04540:Gap junction	8	1,2638230 65	0,033605109	PRKCA, MAPK1, DRD1, GNAI1, MAP3K2, TUBA4A, GRM1, HTR2A	2,582365264
hsa05215:Prostate cancer	8	1,2638230 65	0,033605109	IGF1R, FGFR1, MAPK1, AR, CREB3L2, CREB5, PIK3R1, AKT2	2,582365264
hsa04270:Vascular smooth muscle contraction	8	1,2638230 65	0,092217663	PRKCA, EDNRA, MAPK1, RAMP2, PPP1R12B, PLA2G2D, KCNMB1, ARHGEF11	2,052058111
hsa05212:Pancreatic cancer	7	1,1058451 82	0,037438969	MAPK1, SMAD4, MAPK9, CDK6, SMAD2, PIK3R1, AKT2	2,793079096
hsa04520:Adherens junction	7	1,1058451 82	0,049410736	IGF1R, FGFR1, MAPK1, PVRL1, SMAD4, SMAD2, INSR	2,611710324
hsa04012:ErbB signaling pathway	7	1,1058451 82	0,079737075	PRKCA, MAPK1, CBL, MAPK9, ABL2, PIK3R1, AKT2	2,311513735
hsa05214:Glioma	6	0,9478672 99	0,065784631	PRKCA, IGF1R, MAPK1, CDK6, PIK3R1, AKT2	2,736077482
hsa00564:Glycerophospholipid metabolism	6	0,9478672 99	0,085236782	CDS2, DGKG, LYPLA2, PISD, PLA2G2D, AGPAT1	2,534895314
hsa04730:Long-term depression	6	0,9478672 99	0,089454964	PRKCA, IGF1R, MAPK1, GNAI1, PLA2G2D, GRM1	2,498157701
hsa04930:Type II diabetes mellitus	5	0,7898894 15	0,078195247	MAPK1, MAPK9, INSR, ADIPOQ, PIK3R1	3,056256762

Tabelle 22 DAVID-Analyse: ermöglicht in silico-Voraussagen von Prozessen, in denen regulierte Gene beteiligt sind. (Für miR-326, miR-329, miR-491)

Term	Count	%	PValue	Genes	Fold Enrichment
hsa05200:Pathways in cancer	14	3,0303030 3	0,058079835	PRKCA, AR, STK36, CBL, ARNT2, SMAD4, SMAD2, CDK6, FZD5, IGF1R, MAPK1, PAX8, PIK3R1, AKT2	1,722560976
hsa04360:Axon guidance	12	2,5974025 97	2,90E-04	ABLIM1, EPHA4, MAPK1, SEMA6A, SEMA4G, GNAI1, SRGAP3, NFAT5, L1CAM, NFATC2, SLIT1, SLIT3	3,754152824
hsa04310:Wnt signaling pathway	11	2,3809523 81	0,003761237	PRKCA, SENP2, VANGL1, VANGL2, PRICKLE2, NFAT5, SMAD4, SMAD2, SOX17, NFATC2, FZD5	2,939924314
hsa04144:Endocytosis	10	2,1645021 65	0,036395256	RAB11FIP4, GIT1, DNMT3, IGF1R, ARRB1, CBL, PIP5K1C, IQSEC3, EHD2, EHD3	2,193322981
hsa04270:Vascular smooth muscle contraction	8	1,7316017 32	0,019700972	PRKCA, EDNRA, MAPK1, RAMP2, PPP1R12B, PLA2G2D, KCNMB1, ARHGEF11	2,882653061
hsa04530:Tight junction	8	1,7316017 32	0,04603243	PRKCA, EPB41L1, OCLN, GNAI1, ASH1L, AMOTL1, PPP2R2D, AKT2	2,409381663
hsa04910:Insulin signaling pathway	8	1,7316017 32	0,047595708	MAPK1, PPP1R3B, TSC1, CBL, PDE3A, PPARGC1A, PIK3R1, AKT2	2,391534392
hsa04370:VEGF signaling pathway	7	1,5151515 15	0,009873027	PRKCA, MAPK1, NFAT5, NFATC2, PLA2G2D, PIK3R1, AKT2	3,766666667
hsa05210:Colorectal cancer	7	1,5151515 15	0,016679112	IGF1R, MAPK1, SMAD4, SMAD2, FZD5, PIK3R1, AKT2	3,363095238
hsa05215:Prostate cancer	7	1,5151515 15	0,021604876	IGF1R, MAPK1, AR, CREB3L2, CREB5, PIK3R1, AKT2	3,174157303
hsa05214:Glioma	6	1,2987012 99	0,018685323	PRKCA, IGF1R, MAPK1, CDK6, PIK3R1, AKT2	3,843537415
hsa05212:Pancreatic cancer	6	1,2987012 99	0,031274388	MAPK1, SMAD4, CDK6, SMAD2, PIK3R1, AKT2	3,363095238
hsa04070:Phosphatidylinositol signaling system	6	1,2987012 99	0,03465065	PRKCA, CDS2, DGKG, PIK3C3, PIP5K1C, PIK3R1	3,272200772
hsa05220:Chronic myeloid leukemia	6	1,2987012 99	0,03642048	MAPK1, CBL, SMAD4, CDK6, PIK3R1, AKT2	3,228571429
hsa04914:Progesterone-mediated oocyte maturation	6	1,2987012 99	0,05956259	IGF1R, MAPK1, GNAI1, PDE3A, PIK3R1, AKT2	2,815614618
hsa04012:ErbB signaling pathway	6	1,2987012 99	0,062003625	PRKCA, MAPK1, CBL, ABL2, PIK3R1, AKT2	2,783251232
hsa04666:Fc gamma R-mediated phagocytosis	6	1,2987012 99	0,083541552	PRKCA, DNMT3, MAPK1, PIP5K1C, PIK3R1, AKT2	2,54887218
hsa05223:Non-small cell lung cancer	5	1,0822510 82	0,042819904	PRKCA, MAPK1, CDK6, PIK3R1, AKT2	3,736772487

Term	Count	%	PValue	Genes	Fold Enrichment
hsa00564:Glycerophospholipid metabolism	5	1,082251082	0,085227741	CDS2, DGKG, LYPLA2, PLA2G2D, AGPAT1	2,967436975
hsa04730:Long-term depression	5	1,082251082	0,088834843	PRKCA, IGF1R, MAPK1, GNAI1, PLA2G2D	2,924430642
hsa05218:Melanoma	5	1,082251082	0,096267041	IGF1R, MAPK1, CDK6, PIK3R1, AKT2	2,842052314

X₆ Publikationsliste

- In Vorbereitung **Publication:**
TFF3-dependent resistance of colorectal adenocarcinoma cells to IFN- γ /TNF- α -induced apoptosis is mediated by miR-491-5p regulation of lncRNA PRINS.
- 02/2016 **Abstract:**
22. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie.
mirRNA-lncRNA axis protects intestinal epithelial cancer cells from TNF- α induced apoptosis.
- 01/2016 **Publication:**
Down regulated lncRNA MEG3 eliminates mycobacteria in macrophages via autophagy. Scientific Reports
- 10/2015 **Abstract and Poster:**
Non-coding Genome (EMBL, Heidelberg). *TFF3 dependent resistance of intestinal epithelial cancer cells to apoptosis is mediated by a miRNA-lncRNA axis.*
- 07/2015 **Publication:**
Small molecule and RNAi induced phenotype transition of expanded and primary colonic epithelial cells. Scientific Reports
- 05/2015 **Abstract:**
13th Digestive Physiology of Pigs. *Alternative in vitro testing approaches for commercialized GM food/feed mimicing the intestinal epithelial barrier.*
- 09/2014 **Publication:**
90-day oral toxicity studies on two genetically modified maize MON810 varieties in Wistar Han RCC rats. Archives of toxicology
- 08/2014 **Publication:**
Arcobacter butzleri induces a pro-inflammatory response in THP-1 derived macrophages and has limited ability for intracellular survival. International journal of medical microbiology
- 08/2014 **Abstract und Poster:**
Epithelia: The Building Block of Multicellularity (EMBL, Heidelberg). *Activation of Toll-like Receptors 2, 4 and 5 induces epithelial to mesenchymal transition in intestinal epithelial cells.*
- 03/2014 **Abstract und Poster:**
21. Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft. *Alternative in vitro testing approaches for commercialized GM food/feed.*

X₇ Danksagung

Ich möchte mich zunächst sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier bedanken, der mir die Möglichkeit geboten hat diese Arbeit im Institut für Veterinär Biochemie anfertigen zu können.

Prof. Dr. Tina Romeis möchte ich für Ihre Unterstützung bei der Bewertung und Begutachtung dieser Arbeit danken.

PD Dr. Soroush Sharbati möchte ich meinen tiefsten Dank und größte Wertschätzung aussprechen. Er stand mir in den drei Jahren stets zur Seite, hat mich ermutigt, dann weiterzumachen, wenn es am schwierigsten war und hat mich durch viele Höhen und Tiefen begleitet. Herr PD Dr. Soroush Sharbati hat mich gelehrt, offen für neue Gedanken und Ideen zu sein, Dinge zu riskieren, seine Begeisterung zu bewahren und auch seinen eigenen Ergebnissen stets kritisch gegenüber zu stehen. Ich bedanke mich für stundenlange Gespräche, in denen neue Gedanken und Ideen entstanden sind und seine angenommene Rolle als wissenschaftliches Vorbild, Mentor und Freund.

Barbara Kutz-Lohroff danke ich von Herzen für Ihre ehrlichen Worte und Meinungen, größtes Engagement und Hilfe bei Experimenten, wertvolle Erfahrung mit unterschiedlichsten Methoden und die tolle Atmosphäre in den Büros des Biochemie-Ersatzbaus.

Dr. Jutta Sharbati danke ich für Ihre hervorragende Betreuung besonders zu Beginn meiner Promotion. Ihre große Erfahrung im Umgang mit Zellmodellen und fluoreszenzmikroskopischen bildgebenden Verfahren erwiesen sich im Laufe der Arbeit als wichtiges Wissen.

Dr. Jenny zu Brügge danke ich für die vielen konstruktiven Gespräche, Hinweise und Ideen und natürlich das eine oder andere Persönliche.

Ich danke auch Laura Lehmann für ihre technische Unterstützung und freundschaftlichen Gespräche.

Ebenfalls allergrößten Dank gebührt meiner Familie. Ohne die ständige, bedingungslose Unterstützung meiner Eltern, meiner Brüder und meiner Schwester hätte ich nicht den Mut und die Kraft besessen, insgesamt 9 Jahre Studium und Promotion zu meistern. Ich danke Ihnen für ihre Geduld und Ermutigungen. Meiner Schwester Annabelle danke ich darüber hinaus für die Zeit, die sie in das Korrekturlesen dieser Arbeit investiert hat.

Am Ende bedanke ich mich bei der Frau an meiner Seite, die mit mir gemeinsam diese Zeit gemeistert und mich immer unterstützt und aufgefangen hat. Ich bedanke mich dafür, dass

sie meinen Blick immer wieder auf andere, wichtigere Dinge gelenkt hat, mich aus gedanklichen Sackgassen befreien konnte und ihre Liebe.

Ich bedanke mich am Ende bei meiner ungeborenen Tochter, weil sie bereits jetzt meine Welt aus den Angeln gehoben hat und mich gelehrt hat, worauf es im Leben ankommt.

X₈ Selbstständigkeitserklärung

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten wurden am Institut für Veterinär Biochemie der Freien Universität Berlin, im Zeitraum Oktober 2013 bis Oktober 2016 durchgeführt. Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine andere als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 08.09.2016 _____ Carlos Hanisch