

Aus der Sektion für Molekulare Onkologie
Institut für experimentelle Tumorforschung im Krebszentrum Nord – CCC
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

NUKLEÄRE FUNKTION VON TRAIL- REZEPTOREN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

VERENA HASELMANN

aus Hildesheim

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Trauzold

2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Adam; Prof. Dr. H.-U. Simon, Bern

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2015

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 30.05.2015

gez.:

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	TRAIL und TRAIL-Rezeptoren	1
1.2	TRAIL-induzierte Signalwege	2
1.3	TRAIL-basierte Tumorthérapien	4
1.4	Identifizierung möglicher neuer Interaktionspartner von TRAIL-R2	5
1.5	Biogenese von microRNAs.....	7
1.6	Let-7	9
1.7	Ziel und Fragestellung der Arbeit	10
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Materialien.....	12
2.1.1	Puffer und Lösungen	12
2.1.2	Kits	14
2.1.3	siRNAs	14
2.1.4	Primer.....	15
2.1.5	TaqMan MicroRNA Assays	15
2.1.6	Antikörper für die Immunpräzipitation.....	15
2.1.7	Antikörper für Western Blot Analyse	16
2.1.8	Antikörper für Immunfluoreszenz	18
2.1.9	Chemikalien	19
2.1.10	Geräte und weitere Materialien	21
2.2	Methoden	23
2.2.1	Zelllinien	23
2.2.2	Zellkultur.....	23
2.2.3	Herstellung von Ganzzelllysaten mittels RIPA-Puffer.....	23
2.2.4	Herstellung von Gesamtzelllysaten mittels IP-Lysepuffer.....	24

2.2.5	Herstellung von Kern- und Zytosolextrakten	24
2.2.6	Herstellung von Kernlysaten für die Immunpräzipitation	25
2.2.7	Herstellung von nativen Kernlysaten.....	25
2.2.8	Proteinbestimmung.....	26
2.2.9	Behandlung von Lysaten mit RNase und RNase-Inhibitor	26
2.2.10	Immunpräzipitation	26
2.2.11	siRNA-Transfektion.....	28
2.2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
2.2.13	Western Blot	29
2.2.14	Blue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.2.15	Immunfluoreszenzfärbung.....	30
2.2.16	Aufreinigung der Gesamt-RNA.....	31
2.2.17	Real-time RT- PCR	32
2.2.18	Quantifizierung reifer miRNAs mittels real-time PCR	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Verifizierung der Interaktion von TRAIL-R2 mit p68, NF45 und hnRNPA1	33
3.2	Zelluläre Verteilung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2.....	34
3.3	Analyse der nukleären TRAIL-Rezeptorkomplexe.....	37
3.4	Analyse der RNA-Abhängigkeit der identifizierten Proteininteraktionen	41
3.5	Analyse der Interaktion von TRAIL-Rezeptoren mit dem Mikroprozessor-Komplex.....	46
3.6	Etablierung eines Transfektionsmodells zur Analyse der nukleären Funktion von TRAIL-Todesrezeptoren	50
3.7	TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von let-7.....	54
3.8	TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von let-7 Zielprotein Lin28B	

3.9	TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von let-7 Zielprotein HMGA2	
	58	
3.10	TRAIL-Todesrezeptoren fördern die Proliferation von Tumorzellen	61
4	Diskussion	65
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis	77
7	Danksagung.....	94
8	Lebenslauf	95

Darstellungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: TRAIL INDUZIERTE SIGNALWEGE	3
ABBILDUNG 2: BIOGENESE VON MIRNAS	9
TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN PUFFER UND LÖSUNGEN.....	12
TABELLE 2: VERWENDETE KITS MIT HERSTELLERNACHWEIS.....	14
TABELLE 3: VERWENDETE SIRNAS MIT HERSTELLERNACHWEIS	14
TABELLE 4: VERWENDETE PRIMER MIT HERSTELLERNACHWEIS.....	15
TABELLE 5: VERWENDETE MICRORNA ASSAYS MIT HERSTELLERNACHWEIS.....	15
TABELLE 6: VERWENDETE ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNPRÄZIPITATION MIT HERSTELLERNACHWEIS.....	15
TABELLE 7: VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT ANALYSEN.....	16
TABELLE 8: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT ANALYSEN.....	17
TABELLE 9: VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ.....	18
TABELLE 10: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ.....	18
TABELLE 11: FLUORESCENZFARBSTOFFE UND IHRE SPEKTRALEN EIGENSCHAFTEN	18
TABELLE 12: VERWENDETE CHEMIKALIEN MIT HERSTELLERNACHWEIS	19
TABELLE 13: VERWENDETE GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN MIT HERSTELLERNACHWEIS.....	21
ABBILDUNG 3: TRAIL-R2 INTERAGIERT MIT P68, HNRNPA1, NF45, NF90/110 UND MIT TRAIL- R1	34
ABBILDUNG 4: ANALYSE DER ZELLULÄREN VERTEILUNG VON TRAIL-R1 UND TRAIL-R2 MITTELS IMMUNFLUORESCENZ.....	35
ABBILDUNG 5: ANALYSE DER ZELLULÄREN VERTEILUNG VON TRAIL-R1 UND TRAIL-R2 MITTELS ZELLFRAKTIONIERUNG.....	36
ABBILDUNG 6: NACHWEIS DER SPEZIFITÄT DER GEGEN TRAIL-R2 VERWENDETEN ANTIÖRPER	37
ABBILDUNG 7: ANALYSE DER NUKLEÄREN TRAIL-REZEPTORKOMPLEXEN MITTELS IMMUNPRÄZIPITATION	38
ABBILDUNG 8: ANALYSE DER INTERAKTION VON TRAIL-REZEPTOREN MIT P68, NF45, NF90/110 UND HNRNPA1.....	39
ABBILDUNG 9: ANALYSE VON NATIVEN TRAIL-REZEPTORKERNKOMPLEXEN.....	40
ABBILDUNG 10: ANALYSE DER RNA-ABHÄNGIGKEIT DER IDENTIFIZIERTEN PROTEININTERAKTIONEN IN PANC1-ZELLEN	43
ABBILDUNG 11: ANALYSE DER RNA-ABHÄNGIGKEIT DER IDENTIFIZIERTEN PROTEININTERAKTIONEN IN PANC89-ZELLEN	44

ABBILDUNG 12: ANALYSE DER RNA-ABHÄNGIGKEIT DER IDENTIFIZIERTEN PROTEININTERAKTIONEN IN BXPC3-ZELLEN	45
ABBILDUNG 13: TRAIL-R2 INTERAGIERT MIT DROSHA UND DGCR8	47
ABBILDUNG 14: TRAIL-R2 KOLOKALISIERT MIT DROSHA UND DGCR8	48
ABBILDUNG 15: ANALYSE DER RNA-ABHÄNGIGKEIT DER INTERAKTION VON TRAIL-R2 MIT DROSHA UND DGCR8	50
ABBILDUNG 16: TRANSFEKTION VON PANC1-ZELLEN MIT SIRNA GEGEN TRAIL-R1 UND TRAIL-R2	52
ABBILDUNG 17: ANALYSE DER EXPRESSION VON TRAIL-R1 UND TRAIL-R2 IM ZELLKERN NACH TRANSFEKTION MIT SIRNA	53
ABBILDUNG 18: TRAIL-REZEPTOREN REGULIEREN DIE EXPRESSION VON LET-7	55
ABBILDUNG 19: TRAIL-TODESREZEPTOREN REGULIEREN DIE EXPRESSION VON LET-7 ZIELPROTEIN LIN28B	57
ABBILDUNG 20: TRAIL-TODESREZEPTOREN REGULIEREN DIE EXPRESSION VON HMGA259	
ABBILDUNG 21: TRAIL-TODESREZEPTOREN REGULIEREN DIE EXPRESSION VON HMGA2 ÜBER LET-7 IN PANC1-ZELLEN	60
ABBILDUNG 22: TRAIL-TODESREZEPTOREN REGULIEREN DIE EXPRESSION VON HMGA2 ÜBER LET-7 IN BXPC3-ZELLEN	61
ABBILDUNG 23: TRAIL-R1 UND TRAIL-R2 REGULIEREN DIE PROLIFERATION VON PANC1- ZELLEN	62
ABBILDUNG 24: TRAIL-REZEPTOREN REGULIEREN DIE PROLIFERATION VON HCT116- ZELLEN	63

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
3'UTR	3'untranslated region
Ago2	Argonaut 2
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma extra large
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
Caspase	Cysteiny-l-aspartate specific protease
CD40	Cluster of differentiation 40
CD4-Zellen	Cluster of differentiation 4-Zellen, T-Helferzellen
CD8-Zellen	Cluster of differentiation 8-Zellen, zytotoxische T-Zellen
CD95	Cluster of differentiation 95, Fas-Rezeptor
CD95L	CD95-Ligand, Fas-Rezeptor Ligand
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A
CDK6	Cell division kinase 6
cDNA	Complementary DNA
CF	Zytoplasmatische Fraktion
c-myc	cellular myelocymatosis oncogene
c-Rel	cellular reticuloendotheliosis oncogene
Ctrl	Kontrolle
CytC	Cytochrom C
DcR1	Decoy Rezeptor 1
DcR2	Decoy Rezeptor 2
DD	Death Domäne (Todesdomäne)
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8

DIABLO	Direct IAP binding protein of low pI
DISC	Death-Inducing Signalling Complex
DNA	Desoxyribonucleic acid
DR4	Death receptor 4
DR5	Death receptor 5
Drosha	Double-stranded RNA-specific endoribonuclease
dsRNA	Double-stranded RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERK	Extracellular regulated MAP kinase
FADD	Fas-associated protein with death domain
Fc	crystallisable fragment
FCS	Fetales Kälberserum
FLICE	FADD-like interleukin-1 beta converting enzyme
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H	hours (Stunden)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HGS-ETR1	Human Genome Science Extracellular TRAIL-Receptor 1; Mapatumumab
HGS-ETR2	Human Genome Science Extracellular TRAIL-Receptor 2; Lexatumumab
HMGA2	High mobility group A2
hnRNPA1	Heterogenous nuclear Ribonucleoprotein A1
HRP	Horseradish peroxidase
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
ILF2	Interleukin 2 Faktor

IMP-1	IGF-2 mRNA-binding protein 1
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDA	kilo-Dalton
let-7	lethal-7
Lexa	Lexatumumab
Lin28B	Lin-28 homolog B
LNA	Locked nucleic acid
LSM	Laser Scanning Mikroskopie
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI TOF	Matrix assisted laserdesorption/ionisation time of flight
Mapa	Mapatumumab
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	minutes (Minuten)
miRBase	miRNA Datenbank
miRNA	mikro RNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
n.s.	nicht spezifisch
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NF	Nukleäre Fraktion
NF110	Nuclear factor 110
NF45	Nuclear factor 45
NF90	Nuclear factor 90
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NK-Zellen	Natural Killer Zellen
nM	Nanomolar
NP-40	Nonidet P-40

NSCLC	Non-small cell lung cancer
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerinligand
ORF	Open reading frame
PACT	Protein activator of the interferon induced protein kinase
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
P-Body	Processing-Body
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
pre-miRNA	precursor micro-RNA
pri-miRNA	primary micro-RNA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative PCR
Ran	Ras-related nuclear protein
Ran-GTP	Ran-Guanosintrisphosphat
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
Ras	Rat sarcoma protein
Rcf	Relative centrifugal force
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RISC	miRNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNU6B	RNA, U6 small nuclear 6, pseudogene
RPM	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
rTRAIL	rekombinantes TRAIL
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Seconds (Sekunden)
siRNA	single interfering RNA
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases

Smad2/3	Mothers against decapentaplegic homolog 2/3
Src	Cellular sarcoma oncogene
tBid	trunkiertes Bid
TBS-T	Tris buffered saline tween
TGF	Tumor growth factor
TIC	Tumor-initiierende Zellen
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TRBP	HIV transactivating response RNA binding protein
TRICK2	TRAIL receptor inducer of cell killing 2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T β R1	TGF- β -Rezeptor 1
UTR	Untranslated region
V	Volt
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 TRAIL und TRAIL-Rezeptoren

Der Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand TRAIL gehört zur TNF-Superfamilie von Zytokinen und wurde 1995 und 1996 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996). Er wird primär von Zellen des Immunsystems als Typ-II Transmembranprotein exprimiert (Falschlehner et al., 2007) und kann durch Proteolyse in seine lösliche Form überführt werden (Mariani & Krammer, 1998). Die am besten untersuchte Funktion von TRAIL ist die Induktion der Apoptose (Falschlehner et al., 2007). Diese wird interessanterweise präferentiell in Tumorzellen induziert, wohingegen die meisten gesunden Zellen resistent sind (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Dabei scheint TRAIL eine wichtige Rolle in der durch das Immunsystem, insbesondere durch NK-Zellen, vermittelten Abwehr von viral infizierten Zellen und Tumorzellen zu spielen (Schnepple et al., 2011; Strater et al., 2002; Smyth et al., 2003, Takeda et al., 2002). TRAIL scheint außerdem an der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen (Song et al., 2000) sowie der Regulation der Homöostase von T-Lymphozyten (Janssen et al., 2005) beteiligt zu sein, wobei seine genaue physiologische Funktion bislang nicht geklärt ist.

Insgesamt wurden fünf unterschiedliche TRAIL-Rezeptoren identifiziert, die alle zur Familie der TNF-Rezeptoren gehören. Die beiden Zellmembran-gebundenen Rezeptoren TRAIL-R1/DR4 (Pan et al., 1997a) und TRAIL-R2/DR5/TRICK2 (Pan et al., 1997b; Screaton et al., 1997; Walczak et al., 1997) sind Typ-I Transmembranproteine und besitzen zytoplasmatisch eine Todesdomäne (DD), durch die sie die Apoptose induzieren können. Dementsprechend werden sie als Todesrezeptoren bezeichnet. Für TRAIL-R2 existieren zwei Splicevarianten, denen bislang keine unterschiedlichen Funktionen zugewiesen werden konnten (Falschlehner et al., 2007). Daneben kann TRAIL an zwei weitere membranständige Rezeptoren, TRAIL-R3 und TRAIL-R4, binden, die auch als DcR1 und DcR2 bezeichnet werden (Mérino et al., 2006). TRAIL-R3 ist über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker in der Plasmamembran befestigt und besitzt keine zytoplasmatische Domäne (Degli-Esposti et al., 1997b; Pan et al., 1997b). TRAIL-R4 weist eine höhere Homologie zu den beiden TRAIL-Todesrezeptoren auf, besitzt zytoplasmatisch jedoch nur eine trunkeierte Todesdomäne (Degli-Esposti et al., 1997a).

Entsprechend sind TRAIL-R3 und TRAIL-R4 nicht in der Lage, Apoptose auszulösen und fungieren als sogenannte Decoyrezeptoren. Als solche können sie die TRAIL-induzierte Apoptose hemmen, indem sie kompetitiv zu TRAIL-R1 und TRAIL-R2 an TRAIL binden (Degli-Esposti et al., 1997b) oder nicht-funktionale Komplexe ausbilden (Mérino et al., 2006). Für TRAIL-R4 wurde außerdem beschrieben, dass er nach Bindung von TRAIL zu einer Aktivierung von NF- κ B führen und somit indirekt die TRAIL-vermittelte Apoptose hemmen kann (Degli-Esposti et al., 1997a). Als fünfter TRAIL-Rezeptor wurde der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) identifiziert (Emery et al., 1998). OPG wird als Homodimer sezerniert und bindet nicht nur an TRAIL, sondern auch mit deutlich höherer Affinität an RANKL/OPGL und ist in die Regulation der Osteoklastogenese involviert (Emery et al., 1998; Fuller et al., 1998; Lacey et al., 1998). Es wird angenommen, dass OPG durch Bindung von TRAIL ebenfalls als Decoyrezeptor fungieren kann (Emery et al., 1998). Da die Affinität von OPG für TRAIL bei physiologischen Temperaturen allerdings sehr gering ist, bleibt die Bedeutung dieser Interaktion unklar (Truneh et al., 2000).

1.2 TRAIL-induzierte Signalwege

Die am besten verstandene Funktion von TRAIL ist die Induktion der Apoptose über seine beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Falschlehner et al., 2007). Dabei kommt es nach Bindung des trimerisierten Liganden TRAIL zu einer Trimerisierung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2, die Homo- oder Heterokomplexe ausbilden (Hymowitz et al., 1999). Über die geclusterten DD der Todesrezeptoren wird das Adaptorprotein FADD rekrutiert und bindet über seine Todeseffektordomäne die Procaspasen-8 und/oder -10 (Bodmer et al., 2000; Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000). Der so entstandene Komplex wird als Death-Inducing Signalling Complex DISC bezeichnet (Kischkel et al., 1995) und führt zu einer Initialisierung der intrazellulären Signaltransduktion durch Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Die aktivierten Caspasen-8/-10 führen ihrerseits sowohl direkt zur Aktivierung der Effektorcaspase-3, die über die Caspasen-Kaskade die Apoptose induziert, als auch zur Spaltung von Bid zu trunkiertem tBid (Li et al., 1998). Reicht dabei die Menge an gebildeter Initiatorcaspase-8 aus, um direkt die Apoptose-induzierenden Effektorcaspasen zu aktivieren, spricht man von Typ-I-Zellen. In diesen ist der Rezeptor-vermittelte extrinsische Weg zur Induktion der Apoptose ausreichend. In den als Typ-II bezeichneten Zellen ist die Menge an aktivierter Caspase-8 hingegen nicht

ausreichend, um direkt die Effektorcaspasen zu aktivieren, so dass sie auf die Spaltung von Bid angewiesen sind (Scaffidi et al., 1998). Diese stellt eine Verbindung zum intrinsischen Weg der Apoptose dar und wird als mitochondrialer Verstärkungsmechanismus bezeichnet (Falschlehner et al., 2007). Hierbei transloziert tBid nach Spaltung durch Caspase-8 in die Mitochondrienmembran und führt durch Interaktion mit Bax und Bak zur Freisetzung von Cytochrom c und weiterer proapoptotischer Proteine wie Smac/DIABLO (Luo et al., 1998). Cytochrom c bildet zusammen mit dem Adaptorprotein Apaf1 das sogenannte Apoptosom aus, in dem dann Procaspase-9 autokatalytisch aktiviert wird. Aktivierte Caspase-9 führt ihrerseits zur Aktivierung der Effektorcaspasen und damit zur Apoptose (Adams & Cory, 2002).

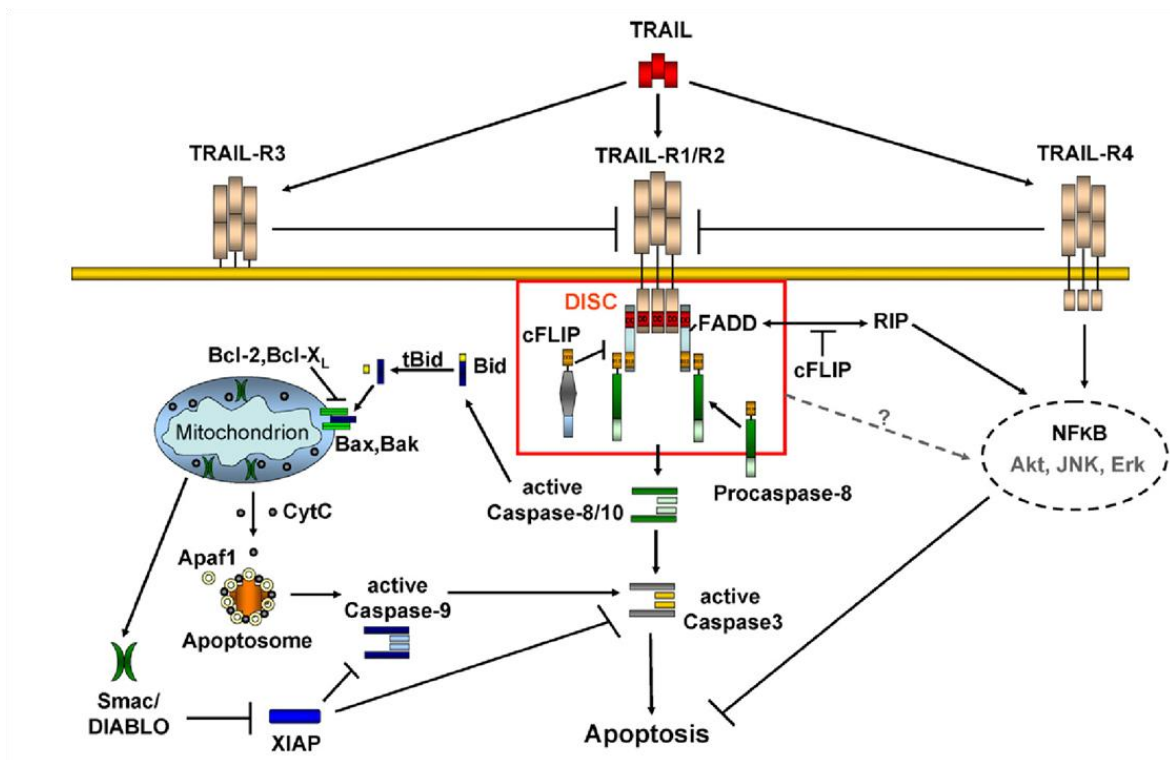


Abbildung 1: TRAIL induzierte Signalwege

Dargestellt sind die durch TRAIL induzierten apoptotischen und nicht-apoptotischen Signalwege. Die genauere Erläuterung dazu findet sich im Textteil 1.2. (Quelle: Falschlehner et al., 2007).

Neben der Induktion der Apoptose können über die beiden TRAIL-Todesrezeptoren auch nicht-apoptotische Signalwege aktiviert werden (Azijli et al., 2013). Insbesondere für

TRAIL-resistente Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass TRAIL unter anderem zu einer Aktivierung von NF- κ B, PKB/Akt, p38, JNK, ERK1/2, PKC (Proteinkinase C) Isoformen sowie von Src führt. Diese Aktivierung kann unter anderem in einer gesteigerten Expression von antiapoptotischen, proinflammatorischen und invasionsfördernden Proteinen resultieren mit der Folge einer Hemmung der Apoptose, Steigerung der Proliferation, Migration und Invasion (Trauzold et al., 2001; Zauli et al., 2005; Xu et al., 2010; Son et al., 2010; Mucha et al., 2009; Belyanskaya et al., 2008; Vilimanovich et al., 2008; Azijli et al., 2012; Trauzold et al., 2006). In vivo kann es insbesondere in Apoptose-resistenten Tumorzellen zu einer vermehrten Invasivität und Metastasierung kommen (Hoogwater et al., 2010; Ishimura et al., 2006; Trauzold et al., 2006).

Nach Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren durch TRAIL werden weder nur apoptotische noch ausschließlich anti-apoptotische Signalwege aktiviert, so dass das Gleichgewicht zwischen den beiden Signalwegen im Enddefekt darüber entscheidet, ob es zur Induktion der Apoptose oder zur Aktivierung von inflammatorischen und invasionsfördernden Proteinen kommt (Kalthoff & Trauzold, 2009).

1.3 TRAIL-basierte Tumorthérapien

Die Beobachtung, dass TRAIL präferentiell in Tumorzellen Apoptose induziert, wohingegen die meisten normalen, nicht-transformierten Zellen resistent sind (Walczak et al., 1999), hat zur Entwicklung TRAIL-basierter Tumorthérapieansätze geführt. Dabei konnte in In-vivo-Studien gezeigt werden, dass rekombinantes TRAIL und agonistische, Rezeptor-spezifische Antikörper gegen TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 im Gegensatz zu anderen Todesliganden wie CD95L oder TNF α zu keiner systemischen Toxizität führen, insbesondere keiner gesteigerten Hepatotoxizität mit Leberversagen (Humphreys & Halpern, 2008; Ichikawa et al., 2001; Walczak et al., 1999). Diese Beobachtung zusammen mit der Eigenschaft von TRAIL, Apoptose auch in p53-mutierten Zellen zu induzieren bzw. auch in Chemotherapie-resistenten Tumoren effektiv Apoptose auszulösen (Ashkenazi & Herbst, 2008; Humphreys & Halpern, 2008; Mahalingam et al., 2009; Ravi et al., 2004), lässt TRAIL-basierte Therapien als eine hoffnungsvolle Option zur Behandlung von Krebspatienten erscheinen. Daher werden rekombinantes TRAIL sowie agonistische anti-TRAIL-R1 und anti-TRAIL-R2 spezifische Antikörper, insbesondere in Kombination mit unterschiedlichen Chemotherapeutika, bereits zur Behandlung

verschiedener Tumorentitäten in Phase I-II klinischen Studien getestet (Micheau et al., 2013; Wiezorek et al., 2010).

In den letzten Jahren wurde allerdings auch deutlich, dass TRAIL neben der Induktion der Apoptose auch zahlreiche andere zelluläre Effekte stimulieren kann. Insbesondere in TRAIL-resistenten Tumorzelllinien bzw. Tumoren kann eine systemische Gabe von TRAIL unter anderem durch Aktivierung von NF- κ B, AKT, MAPKs und PKC zu einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen und invasionsfördernden Proteinen führen und damit die Metastasierung, Inflammation und Invasion *in vivo* fördern (Hoogwater et al., 2010; Ishimura et al., 2006; Siegmund et al., 2007; Trauzold et al., 2006).

Die Beobachtung, dass die beiden TRAIL-Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in Tumoren im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe vermehrt exprimiert werden (Ganten et al., 2009; Leithner et al., 2009; Macher-Goeppinger et al., 2009; Mahalingam et al., 2008; Oikonomou et al., 2009; Sanlioglu et al., 2007; Spierings et al., 2003), bietet nicht nur ein attraktives Ziel für den klinischen Einsatz von TRAIL, sondern lässt auch vermuten, dass eine gesteigerte Expression dieser Proteine einen Vorteil für Tumorzellen darstellt. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von TRAIL-R2 bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen, NSCLC und Brustkrebs mit einer schlechteren Prognose korreliert ist (Ganten et al., 2009; Macher-Goeppinger et al., 2009; Spierings et al., 2003).

Somit ist ein fundierteres Verständnis der zellulären Funktionen von TRAIL und seinen beiden Todesrezeptoren für die Entwicklung rationaler, sicherer TRAIL-basierter Tumorthérapien notwendig.

1.4 Identifizierung möglicher neuer Interaktionspartner von TRAIL-R2

Das TRAIL/TRAIL-Rezeptorsystem ist das einzige Todesrezeptorsystem mit zwei Todesrezeptoren, wobei nicht genau geklärt ist, ob die beiden Rezeptoren unterschiedliche zelluläre Funktionen ausüben oder funktionell redundant sind (Falschlehner et al., 2007). Diese Fragestellung wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass TRAIL-R2 in unterschiedlichen Tumorzelllinien für die Induktion der Apoptose hauptverantwortlich ist (Ichikawa et al., 2001; Kelley et al., 2005). Andere Arbeitsgruppen haben hingegen TRAIL-R1 als entscheidenden Rezeptor für die TRAIL-induzierte Apoptose identifiziert (Lemke et

al., 2010; MacFarlane et al., 2005). So haben *Lemke et al.* nachgewiesen, dass in Pankreasadenokarzinom-Zelllinien die Apoptose über TRAIL-R1 vermittelt wird (Lemke et al., 2010). Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Bedeutung der beiden Rezeptoren in den untersuchten Zelllinien kann in der Interaktion mit verschiedenen Proteinen bestehen. Daher wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. Anna Trauzold TRAIL-R1- und TRAIL-R2-Komplexe in unstimulierten Panc89-Zellen mittels MALDI TOF Massenspektrometrie analysiert. Hierbei konnten überraschenderweise mehrere am Splicing und der posttranskriptionellen Genregulation beteiligte Kernproteine, unter anderem p68, NF45 und hnRNPA1, als mögliche neue Interaktionspartner von TRAIL-R2 identifiziert werden.

Die nukleäre RNA-Helikase p68 gehört zur Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen. Sie kann ATP-abhängig RNA/RNA- und RNA/Protein-Interaktionen dissoziieren und ist in verschiedene Prozesse des RNA-Metabolismus involviert (Yang et al., 2005). Sie spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie zum Beispiel der Zellproliferation und der frühen Organentwicklung (Stevenson et al., 1998). Eine vermehrte Expression konnte in unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen werden und wird mit der Tumorprogression sowie der Transformation von Zellen in Zusammenhang gebracht (Causevic et al., 2001; Wei & Hu, 2001).

NF45 wird vom ILF2-Gen kodiert und wurde ursprünglich zusammen mit seinem Interaktionspartner NF90 als Sequenz-spezifischer DNA-bindender Komplex identifiziert, der die Expression von Interleukin-2 (IL-2) reguliert (Corthésy et al., 1994). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass beide Proteine im Zellkern als RNA- und DNA-bindende Proteine fungieren und an der Regulation der Genexpression unterschiedlicher Proteine beteiligt sind sowie vermutlich an der Zellproliferation (Guan et al., 2008). Die genaue Funktion von NF45 ist allerdings noch nicht geklärt.

HnRNPA1 gehört zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine und besitzt verschiedene Isoformen, die sowohl durch alternatives Spleißen als auch durch posttranslationale Modifikation entstehen (Carpenter et al., 2006; Riva et al., 1986). Als nukleo-zytoplasmatisches Shuttle-Protein ist es in verschiedene Prozesse des mRNA-Metabolismus involviert (Michlewski & Cáceres, 2010) und eine gesteigerte Expression konnte in unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen werden (Pino et al., 2003; Ushigome et al., 2005).

Die gemeinsame Funktion der möglichen neuen TRAIL-R2-Interaktionspartner p68, NF45 und hnRNPA1 besteht darin, dass sie alle am großen Mikroprozessor-Komplex (Gregory et al., 2004) sowie der Regulation der Biogenese der miRNA let-7 (Michlewski & Cáceres, 2010; Salzmann et al., 2007; Sakamoto et al., 2009) beteiligt sind.

1.5 Biogenese von microRNAs

MiRNAs sind evolutionär konservierte, kleine, nicht-kodierende RNAs, die in den 90er Jahren entdeckt wurden (Lee et al., 1993). Sie regulieren die Genexpression posttranskriptionell, indem sie an die 3'UTR der mRNA ihrer Zielproteine binden und in Abhängigkeit von ihrer Komplementarität entweder zu deren Degradation oder zur Hemmung der Translation führen (Filipowicz et al., 2008). Inzwischen wurden fast 2000 humane miRNAs identifiziert, die in der miRNA Datenbank miRBase aufgelistet sind (Koturbash et al., 2010). Da jede miRNA die Expression mehrerer Zielproteine beeinflussen kann, wird davon ausgegangen, dass bis zu 30 % aller Protein-kodierenden humanen Gene durch miRNAs reguliert werden (Lewis et al., 2005). Somit stellen miRNAs die größte Klasse an negativen Genregulatoren dar, die an unterschiedlichen biologischen Prozessen wie der Differenzierung, Entwicklung, Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind (Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Park & Peter, 2008;). Entsprechend ist eine Dysregulation ihrer Expression mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert, unter anderem mit Krebs. Dabei werden miRNAs, die in die Karzinogenese involviert sind, als Oncomirs bezeichnet und können sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene fungieren (Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

MiRNAs sind innerhalb der Introns Protein-kodierender RNAs oder innerhalb der Introns oder Exons nicht-Protein-kodierender RNAs lokalisiert (Park & Peter, 2008). Ungefähr 36 % aller bekannten miRNAs sind in Clustern angeordnet, die zusammen als transkriptionelle Einheit oder Polycistron transkribiert werden (Koturbash et al., 2010). Die meisten für miRNAs kodierenden Gene werden dabei durch die Polymerase II in sogenannte primäre miRNAs transkribiert, in der die eigentlichen Vorläufer haarnadelförmige Schleifen (hairpins) ausbilden (Cullen, 2004). Noch im Zellkern erfolgt die Prozessierung der primären miRNAs durch den als Mikroprozessor-Komplex bezeichneten Multiproteinkomplex, dessen Kernkomponenten die RNase III Drosha und ihr Kofaktor DGCR8 sind, welcher doppelsträngige RNA bindet (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004). Als weitere Komponenten des großen Mikroprozessor-Komplexes wurden p68, NF45, NF90

und hnRNPA1 identifiziert (Gregory et al., 2004). Der Komplex spaltet die Haarnadelschleife an ihrer Basis, wodurch die 60-70 Nukleotide langen pre-miRNAs entstehen (Lee et al., 2003), die dann über den Ran-GTP-abhängigen Transporter Exportin-5 ins Zytoplasma exportiert werden (Yi et al., 2003). Dort erfolgt eine zweite Prozessierung durch die RNase III Dicer zu reifen miRNA-Duplices, die ungefähr 20 bis 22 Nukleotide lang sind (Bernstein et al., 2001; Hutvágner et al., 2001). Durch Interaktion mit dem Protein PACT werden die Proteine Argonaut 2 (Ago2) und TRBP rekrutiert und damit der als miRNA-induced silencing complex (RISC) bezeichnete Ribonukleoproteinkomplex ausgebildet (Hammond et al., 2001; Gregory et al., 2005). Im RISC wird einer der beiden miRNA-Stränge degradiert und der andere sogenannte Leitstrang hybridisiert mit der 3'UTR komplementärer mRNA. Bei nahezu perfekter Komplementarität wird die hybridisierte mRNA durch Ago2 degradiert, bei partieller Komplementarität wird hingegen die Translation gehemmt (Lai, 2002).

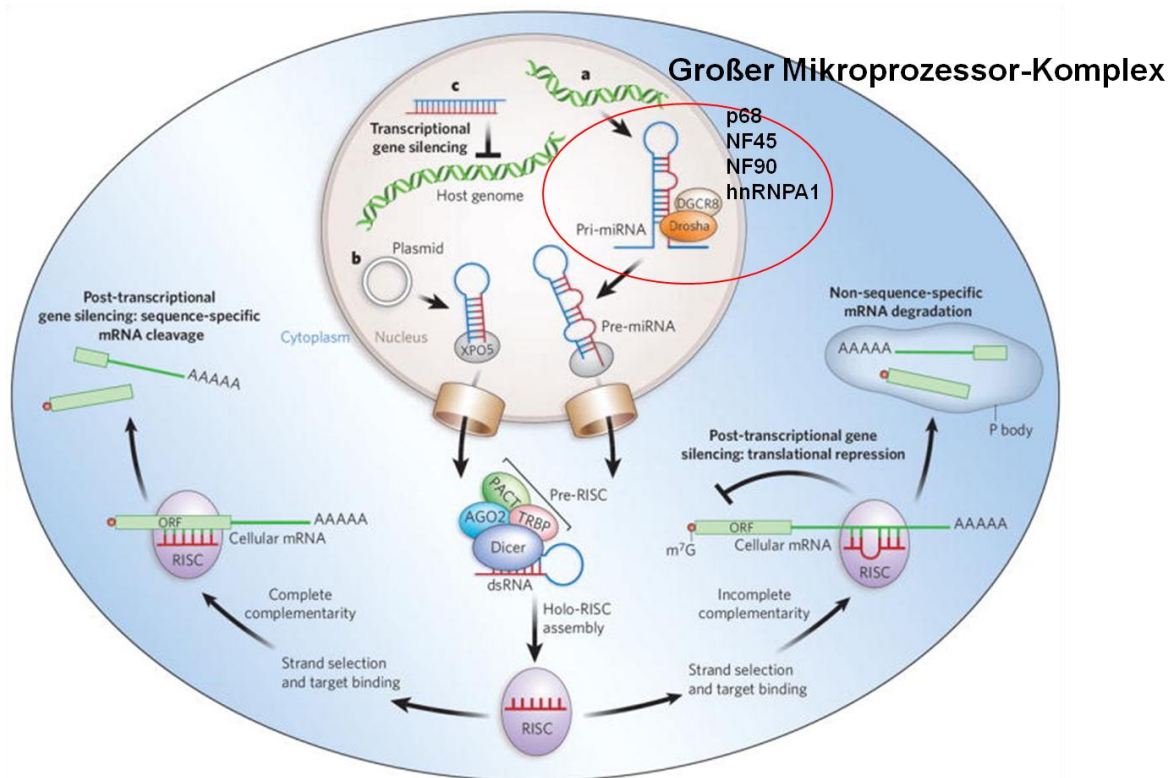


Abbildung 2: Biogenese von miRNAs

Dargestellt sind die Biogenese und die Wirkmechanismen von miRNAs. Die für die miRNAs kodierenden Gene werden primär durch die Polymerase II in pri-miRNAs transkribiert und im Zellkern durch den Mikroprozessor-Komplex zu pre-miRNAs prozessiert, die dann über Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert werden. Hier erfolgt die Prozessierung durch Dicer zu reifen miRNAs-Duplices, deren Leitstrang in den RISC inkorporiert wird. Dieser hybridisiert mit der 3'UTR seiner Ziel-mRNA und führt bei partieller Komplementarität zur Hemmung der Translation, bei perfekter Komplementarität hingegen zur Degradation der mRNA. Genauere Erläuterungen vgl. Textabschnitt 1.5 (Quelle: Castanotto & Rossi, Nature, 2009; modifiziert).

1.6 Let-7

Lethal-7, kurz let-7 genannt, ist eine der am besten untersuchten miRNA-Familien, die als zweite miRNA im Wurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde (Reinhart et al., 2000). Das humane Genom umfasst dabei 13 let-7 Familienmitglieder, die alle evolutionär hoch konserviert sind (Pasquinelli et al., 2000). Zu den Ziel-mRNAs von let-7 gehören mRNAs, die für Regulatoren mitogener Signalwege wie z.B. Ras, HMGA2, IMP-1 und c-myc kodieren (Barh et al., 2010). Die Expression von let-7 wird während der Embryogenese hochreguliert und in differenzierten, adulten Geweben wird dann ein konstant hohes Expressionsniveau aufrechterhalten (Boyerinas et al., 2010). In unterschiedlichen

Tumorentitäten konnte eine verminderte Expression von let-7 nachgewiesen werden, wobei durch eine Wiederherstellung des normalen Expressionslevels ein Fortschreiten der Tumorigenese aufgehalten werden konnte. Dementsprechend agiert let-7 als Tumorsuppressor sowie als Regulator der terminalen Differenzierung und Apoptose (Barh et al., 2010).

Die als mögliche neue TRAIL-R2-Interaktionspartner identifizierten Proteine p68, NF45 und hnRNPA1 fungieren als Regulatoren der Biogenese von let-7. Dabei konnte gezeigt werden, dass p68 die Reifung von let-7 fördert (Salzmann et al., 2007), wohingegen NF45 sowie hnRNPA1 die Prozessierung von pri-let-7 zu pre-let-7 hemmen und damit negative Regulatoren der Biogenese von let-7 darstellen (Michlewski & Caceres, 2012; Sakamoto et al., 2009).

1.7 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Alle bislang bekannten Funktionen der beiden TRAIL-Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 beruhen auf ihrer Fähigkeit, nach Bindung ihres natürlichen Liganden TRAIL oder agonistischer, Rezeptor-spezifischer Antikörper apoptotische oder nicht-apoptotische Signalwege zu aktivieren (Falschlehner et al., 2007). Voraussetzung hierfür ist die Expression der beiden Rezeptoren auf der Plasmamembran. Daneben wurden beide TRAIL-Todesrezeptoren bereits intrazellulär nachgewiesen (Ganten et al., 2009; Macher-Goeppinger et al., 2009; Oikonomou et al., 2009; Sangioglou et al., 2007; Spierings et al., 2003), wobei die Relevanz dieser Beobachtung bislang noch nicht untersucht worden ist. Für ein besseres Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen des TRAIL-Rezeptorsystems sowie für die Entwicklung einer rationalen TRAIL-basierten Therapie ist es allerdings unumgänglich zu verstehen, welche biologischen Funktionen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 intrazellulär ausüben.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es daher zunächst, die intrazelluläre Verteilung der beiden TRAIL-Todesrezeptoren in unterschiedlichen Tumorzelllinien mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (LSM) zu betrachten. Außerdem soll die von der Arbeitsgruppe in unbehandelten Panc89-Zellen identifizierte Interaktion von TRAIL-R2 mit p68, NF45 und hnRNPA1 in einer weiteren Zelllinie mittels Immunpräzipitationsversuchen und Immunfluoreszenz-basierten Kollokalisationsstudien verifiziert werden. Sollte dies gelingen, soll in einem weiteren Schritt überprüft werden, ob

diese Interaktion im Zellkern stattfindet, da es sich bei p68, NF45 und hnRNPA1 um nukleäre Proteine handelt. Aufgrund der Tatsache, dass die möglichen neuen Interaktionspartner von TRAIL-R2 Bestandteile des großen Mikroprozessor-Komplexes sind, soll dann untersucht werden, ob die beiden TRAIL-Todesrezeptoren ebenfalls mit den Kernproteinen dieses Komplexes, Drosha und DGCR8, assoziiert sind.

Um die Bedeutung einer konstitutiven intrazellulären Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 untersuchen zu können, soll die Expression beider Rezeptoren mittels siRNA herunterreguliert werden. Dafür muss zunächst ein entsprechendes Transfektionsmodell etabliert werden. Mit diesem soll des Weiteren die Frage geklärt werden, ob die beiden TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern genau wie p68, NF45 und hnRNPA1 an der Regulation der Biogenese von let-7 beteiligt sind.

Auf diese Weise soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag für ein besseres Verständnis der zellulären Funktionen der beiden TRAIL-Todesrezeptoren leisten, indem die Bedeutung ihrer intrazellulären Lokalisation untersucht wird sowie mögliche neue Funktionen dieser Rezeptoren identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden sind alle verwendeten Puffer, Lösungen, Antikörper, Kits, Geräte sowie alle übrigen Materialien aufgeführt.

2.1.1 Puffer und Lösungen

Die für die Zelllyse verwendeten Puffer wurden jeweils mit einem Protease- und Phosphataseinhibitor versetzt, um einen Verdau der Proteine zu verhindern.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung	Mengenangabe
Anodenpuffer 1fach	NativePAGE Running Buffer (20X)	5 % v/v
Blotting-Puffer 1fach	Methanol	20 % v/v
	Glycin	190 mM
	TRIS Base	100 mM
EMSA-I-Puffer	DTT	1 mM
	EDTA	0,2 mM
	HEPES pH 7	10 mM
	KCl	10 mM
IP-Lysepuffer(für Ganzzelllysate)	Glycerol	1 % v/v
	NaCl	120 mM
	TRIS Base pH 7,4	30 mM
	Triton X-100	1 % v/v
Kern-Lyse-Puffer (für Kernextrakte)	Glycerol	1 % v/v
	NaCl	120 mM
	TRIS Base pH 7,4	30 mM
	NP-40	0,5 % v/v
Kathodenpuffer 1fach	NativePAGE Running Buffer (20X)	5 % v/v
	NativePAGE Cathode Buffer Additive (20X)	5 %v/v

Laufpuffer 1fach	Glycin	192 mM
	SDS	1 % v/v
	TRIS Base pH 7,4	25 mM
Lämmli-Probenpuffer 4fach	Bromphenolblau	0,02 % w/v
	DTT	200 mM
	Glycerol	40 %
	TRIS HCl pH 6,8	250 mM
	SDS	8 % w/v
Nativer-Lyse-Puffer	Digitonin	1 %v/v
	NativePAGE Sample Puffer	1 %v/v
Polysomenpuffer NP40 0,5 %	HEPES pH 7	10 mM
	KCl	150 mM
	MgCl ₂	5 mM
	NP40	0,5 % v/v
RIPA-Puffer	TRIS Base pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	1 % v/v
	Na-Desoxycholat	1 % w/v
	SDS	0,2 % w/v
TBS 1fach	NaCl	140 mM
	TRIS Base pH 7,4	20 mM
TBS-T 1fach	NaCl	140 mM
	TRIS Base pH 7,4	20 mM
	Tween 20	0,1 % v/v

2.1.2 Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits mit Herstellernachweis

Bezeichnung	Hersteller
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH, München
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH, München
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
mirVana miRNA Isolation Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Bonn
DharmaFECT 1 siRNA Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Bonn
SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Bonn
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix	Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot

2.1.3 siRNAs

Tabelle 3: Verwendete siRNAs mit Herstellernachweis

siRNA	Artikelnummer	Hersteller
ON-TARGETplus Non-targeting Pool (Kontroll-siRNA)	D-001810-10-20	Thermo Fisher Scientific, Bonn
TNFRSF10A (TRAIL-R1) ON-TARGETplus SMART pool	L-008090-00-0020	Thermo Fisher Scientific, Bonn
TNFRSF10B (TRAIL-R2) ON-TARGETplus SMART pool	L-004448-00-0020	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Let7 knockdown Custom LNA Oligonucleotide (5'-A+ACTATG+CA+ACC+TACT+A+C+C+TCA)	500100	Exiqon, Dänemark
miRCURY LNA microRNA Inhibitor Control	199004-00	Exiqon, Dänemark

2.1.4 Primer

Tabelle 4: Verwendete Primer mit Herstellernachweis

Primer	Sequenz	Hersteller
HMGA2	Vorwärts: 5'-AAAGCAGC-TCAAAAGAAAGCA-3'; Rückwärts: 5'-TGTGTGGCCATTCCTAGGT-3'	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg
GAPDH	Vorwärts: 5'-GGCGTCTTCACCACCATGGAG-3'; Rückwärts: 5'-AAGTTGTCAT-GGATGACCTTGGGC-3'	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg

2.1.5 TaqMan MicroRNA Assays

Tabelle 5: Verwendete microRNA Assays mit Herstellernachweis

Primerpool	Assay-ID	Hersteller
Hsa-let-7a	RT000377; TM000377	Applied Biosystems, Darmstadt
Hsa-let-7b	RT002619; TM002619	Applied Biosystems, Darmstadt
Hsa-let-7c	RT000379; TM000379	Applied Biosystems, Darmstadt
Hsa-let-7d	RT002283; TM002283	Applied Biosystems, Darmstadt
Hsa-let-7g	RT002282; TM002282	Applied Biosystems, Darmstadt
GAPDH	HS_99999905_m1	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.6 Antikörper für die Immunpräzipitation

Tabelle 6: Verwendete Antikörper für die Immunpräzipitation mit Herstellernachweis

Primärantikörper	Wirt	Hersteller
HGS-ETR1 (Mapatumumab)	Mensch	Human Genome Sciences Inc., UK
HGS-ETR2 (Lexatumumab)	Mensch	Human Genome Sciences Inc., UK

2.1.7 Antikörper für Western Blot Analyse

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen

Primärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Katalog Nummer
Anti- α -Tubulin	Kaninchen	1:50.000	Epitomics, Hamburg	1878-1
Anti- β -Actin	Maus	1:50.000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	A5441
Anti-DGCR8	Kaninchen	1:1000	Protein Tech Group, USA	10996-1-AP
Anti-Drosha	Kaninchen	1:500	Abcam Inc., UK	ab12286
Anti-HMGA2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, vertrieben durch New England Biolabs, Frankfurt a.M.	5269
Anti-HMGA2	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-130024
Anti-hnRNPA1	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, vertrieben durch New England Biolabs, Frankfurt a.M.	4296
Anti-hnRNPA1	Maus	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-32301
Anti-NF45	Kaninchen	1:1500	Abcam Inc., UK	ab28772
Anti-NF90	Kaninchen	1:1000	Atlas Antibodies, Schweden	HPA001897
Anti-Lamin A/C	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling, vertrieben durch New England Biolabs, Frankfurt a.M.	2032
Anti-Lamin A	Kaninchen	1:2000	Abcam Inc., UK	ab26300
Anti-LIN28B	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, vertrieben durch New England Biolabs, Frankfurt a.M.	4196
Anti-p68	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	81350
Anti-TRAIL-R1	Kaninchen	1:1000	Millipore GmbH, Schwalbach	16955
Anti-TRAIL-R2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, vertrieben durch New England Biolabs, Frankfurt	3696

			a.M.	
Anti-TRAIL-R2	Kaninchen	1:4000	ProSci Inc., Lörrach	2010
Anti-TRAIL-R2	Kaninchen	1:1000	Atlas Antibodies, Schweden	HPA 023625

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen

Sekundärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Katalog Nummer
Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	Ziege	1:3000	Cell Signaling, vertrieben durch New England Biolabs, Frankfurt a.M.	7076
Anti-Mensch IgG, HRP-gekoppelt	Ziege	1:10.000	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Hamburg	109-036-064
Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Ziege	1:3000	Cell Signaling, vertrieben durch New England Biolabs, Frankfurt a.M.	7074
Anti-Ziege IgG, HRP-gekoppelt	Affe	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-2304

2.1.8 Antikörper für Immunfluoreszenz

Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Katalog Nummer
Anti-DGCR8	Kaninchen	1:125	Protein Tech Group, USA	10996-1-AP
Anti-Drosha	Kaninchen	1:150	Abcam Inc., UK	Ab12286
Anti-hnRNPA1	Maus	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Sc-32301
Anti-NF45	Kaninchen	1:600	Abcam Inc., UK	Ab 28772
Anti-NF90	Kaninchen	1:500	Atlas Antibodies, Schweden	HPA001897
Anti-p68	Kaninchen	1:600	Abcam, UK	21696
Anti-TRAIL-R1	Mensch	1:500	Human Genome Sciences, UK	HGS-ETR1
Anti-TRAIL-R2	Mensch	1:1000	Human Genome Sciences, UK	HGS-ETR2

Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Katalog Numer
Alexa-Fluor 488 anti-mouse IgG	Ziege	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe	A-11008
Alexa-Fluor 488 anti-rabbit IgG	Ziege	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe	A-11003
Alexa-Fluor 546 anti-human IgG	Ziege	1:200	Invitrogen, Karlsruhe	A-11013

Tabelle 11: Fluoreszenzfarbstoffe und ihre spektralen Eigenschaften

Fluoreszenz-Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Farbe
Alexa-Fluor 488	495 nm	519 nm	Grün
Alexa-Fluor 546	556 nm	573 nm	Rot
Hoechst 33342	350 nm	461 nm	Blau

2.1.9 Chemikalien

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien mit Herstellernachweis

Chemikalien	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bromphenolblau	LKB Bromma, Schweden
BSA (Rinderserumalbumin)	Biomol GmbH, Hamburg
Casyton Lösung	Schärfe System, Reutlingen
Acid Phenol (ChCl ₃)	Applied Biosystems, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G 250	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Complete Mini Protease-Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Curix 60 Developer G153 A und B	Agfa, Gera
Curix 60 Rapid Fixer G354	Agfa, Gera
ddH ₂ O	Millipore Reinstwasseranlage
Digitonin	Invitrogen, Karlsruhe
DPBS 1fach	Invitrogen, Karlsruhe
DPBS 10fach	Invitrogen, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fetales Kälberserum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Glutamat 100fach	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hoechst	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
IS Mounting Medium	Dianova, Hamburg
Isopropanol	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, Saarbrücken
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

NativeMark Unstained Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
NativePAGE Cathode Buffer Additive 20X	Invitrogen, Karlsruhe
NativePAGE Running Buffer 20X	Invitrogen, Karlsruhe
NativePAGE 5 % G-250 Sample Additive	Invitrogen, Karlsruhe
NativePAGE Sample Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker, Niederlande
Natrium-Deoxycholat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Natrium-Dodecylsulfat (SDS) Rotistock 20 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natrium-Dodecylsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nonidet P-40 (Igepal CA 630)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Opti MEM Kulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein G Sepharose Beads 4 Fast Flow	GE Healthcare Europe GmbH, München
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega, Mannheim
RPMI 1640 Kulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure 25 %	Merck KGaA, Darmstadt
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TRIS Base, Ultrol Grade	Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin 10fach	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.10 Geräte und weitere Materialien

Tabelle 13: Verwendete Geräte und sonstige Materialien mit Herstellernachweis

Geräte & weitere Materialien	Typbezeichnung	Hersteller
Blottingkammer	Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Combitips Plus	5 ml	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	Durchmesser 18 mm	Th. Geyer, Renningen
Dounce Homogenisator Pestle B	Tissue Grind Tube und Pestle 2 ml; 7 ml	Gerresheimer Kimble
ECL- Chemilumineszenz-Film	Hyperfilm	GE Healthcare Europe GmbH, München
Eppendorffraktionsgefäße	0,5 ml; 1 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Falkon-Röhrchen	15 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Fast Real-Time PCR System	7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Filmentwickler	Curix60	Agfa, Gera
Kapillarspitzen	200 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	LSM510	Carl Zeiss Jena, Jena
Kühlzentrifuge	5415 R	Eppendorf, Hamburg
Microloader		Eppendorf, Hamburg
Mikroplatten-Lesegerät (Photometer)	Sunrise	Tecan Trading AG, Schweiz
Mikroskop	Axiovert 135	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Millipore Reinstwasseranlage	Milli-Q	Millipore GmbH, Schwalbach
Nanadrop	ND-1000	Thermo Fisher Scientific, USA
NativPAGE Novex 4-16 % Bis-TRIS Gel	1 mm x 10 well	Invitrogen, Karlsruhe
Objekträger	Super-Frost Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific,

		Bonn
Petrischalen	Größe 150 mm x 20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Immobilion-P	Millipore GmbH, Schwalbach
Real time PCR System	StepOne	Applied Biosystems, Darmstadt
SDS-PAGE Gelkammer	Novex Mini Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Serologische Pipetten	5 ml; 10 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sonifiziergerät	PG.1029	MSE, UK
Spannungsgeber	Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Thermoblock	Thermomixer Kompakt	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Personal Cycler	Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge	Mini Spin Plus	Eppendorf, Hamburg
TRIS-Glycin-Gel 4-20 %	1 mm x 10 well	Invitrogen, Karlsruhe
Ultrazentrifuge TL100	Rotor TLA-100	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Ultrazentrifuge Optima XL-80	Rotor SW28Ti; Rotor SW60Ti	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., USA
Whatman Chromatographie Papier	Dicke 3 mm	Whatman GmbH, Dassel
Zellschaber	25 cm; 39 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	T25, T75, T175	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	6-/12-/96-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellzahlmessgerät	Casy 1 TT	Schärfe System, Reutlingen
Zellkulturzentrifuge	Rotina 48 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen	Größen: 7 mm x 20 mm; 11 mm x 60 mm; 16 mm x 102 mm	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde in erster Linie mit der humanen Pankreasadenokarzinom-Zelllinie Panc1 gearbeitet. Des Weiteren wurden auch die humanen Tumorzelllinien Panc89, BxPC3 (Pankreasadenokarzinom) sowie HCT116 (Kolonkarzinom) untersucht.

2.2.2 Zellkultur

Alle Zellen wurden in T25, T75 oder T175 Zellkulturflaschen mit RPMI 1640 Kulturmedium, das mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1mM Natriumpyruvat sowie 1mM Glutamat versetzt wurde, im Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte zwei- bis dreimal wöchentlich bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80-90 %, um ein einschichtiges, adhärentes Wachstum zu gewährleisten. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 37°C-warmen PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin versetzt. Infolge der Behandlung mit Trypsin, einer Serinprotease, kam es zur Spaltung der Adhäsionsproteine, so dass sich die Zellen nach einer Inkubation von ca. 10 min im Brutschrank durch leichtes Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche lösen ließen. Nach Resuspendierung der Zellen wurden diese mit äquivalenten Mengen Kulturmedium versetzt, um die Aktivität des Trypsins durch das enthaltene FCS zu stoppen und so einen Verdau der Zellen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen 4 min bei Raumtemperatur (RT) mit 1420 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension konnte nun im jeweils gewünschten Teilungsverhältnis auf neue Flaschen verteilt werden.

Bei einigen Versuchen wurde anstelle von Trypsin Accutase verwendet, um die Zellen schonender abzulösen.

Für die Zellzählung wurden 25 µl der Zellsuspension in 5 ml Casyton Lösung aufgenommen, die Zellzahl mittels Casy-Zählgerät bestimmt und die Zellen entsprechend des jeweiligen Versuches auf 6-Loch-Platten ausgesät.

2.2.3 Herstellung von Ganzzelllysaten mittels RIPA-Puffer

Für die Zelllyse mittels RIPA-Puffer wurde zunächst der Überstand der auf 6-Loch-Platten kultivierten Zellen abgenommen, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und die Platten dann auf Eis gestellt. Entsprechend der Konfluenz der Zellen wurde zu diesen

zwischen 100 µl (Zelldichte 50 %) und 200 µl (Zelldichte 90-100 %) RIPA-Puffer hinzupipettiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei -80°C für mindestens eine h eingefroren, um eine effektive Lyse zu garantieren. Nach Auftauen der Zellen auf Eis wurden diese mit Hilfe des Zellschabers abgelöst, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, 10 sec lang sonifiziert, um enthaltene DNA zu fragmentieren und anschließend bei 4°C für 15 min mit 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand (fertiges Lysat) wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und die Proteinkonzentration mittels Pierce-Assay bestimmt. Die fertigen Lysate wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4 Herstellung von Gesamtzelllysaten mittels IP-Lysepuffer

Die Zellen wurden auf einer Petrischale (Durchmesser 10 cm) ausgesät und nach 24 h lysiert, wobei die Konfluenz der Zellen ca. 70-90 % betrug. Hierfür wurde zunächst das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend 4 ml IP-Lysepuffer pro Petrischale hinzugefügt. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber abgekratzt, in ein Falcon-Röhrchen überführt und 20 min auf Eis inkubiert, wobei der erfolgreiche Zellaufschluss mikroskopisch kontrolliert wurde. Das Zelllysate wurde anschließend auf 2 ml-Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt und bei 4°C 30 min lang mit 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die Proteinkonzentration mittels DC-Proteinassay bestimmt. Die Lysate wurden in der Regel direkt für die Immunpräzipitation verwendet und ansonsten bei -80°C gelagert.

2.2.5 Herstellung von Kern- und Zytoleextrakten

Die Zellen wurden in einer T175 Zellkulturflasche ausgesät und nach 24 h bei Erreichen einer Konfluenz von 70-90 % fraktioniert. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Für die Lyse der Zellmembran wurden die Zellen mit 4 ml EMSA-I-Puffer, einem hypotonischen Puffer, versetzt, mit einem Zellschaber abgelöst und in 2 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 6 min bei 4°C und 13.000 rpm wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Durch erneute Zentrifugation bei 4°C für 30 min mit 13.200 rpm (Rotor: 5415 R) bzw. bei Ultrazentrifugation mit 27.500 rpm (Rotor: SW28Ti; entsprechend 100.000 rcf) konnte die lösliche Zytolefraktion gewonnen werden, die dann mit 3 M KCl auf eine Endkonzentration von 150 mM KCl eingestellt wurde, um eine der Kernfraktion entsprechende Salzkonzentration zu erhalten.

Die übriggebliebenen Zellpellets wurden zunächst dreimal mit EMSA-I-Puffer gewaschen, zwischendurch jeweils für 6 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand jedes Mal verworfen, um sicher zu stellen, dass die gesamte zytosolische Fraktion entfernt wurde. Für die Lyse der Kerne wurde das Pellet in 500 µl Polysomenpuffer (ohne NP-40), der mit RNasin (100U/ml) versetzt wurde, resuspendiert, dreimal 5 sec auf Eis sonifiziert und anschließend zehnmal mit einem Douncer homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 4°C für 30 min mit 13.200 rpm (Rotor: 5415 R) bzw. bei Ultrazentrifugation mit 33.500 rpm (Rotor: SW60Ti) wurde die Kernfraktion bzw. die nur lösliche Kernfraktion in ein neues Röhrchen überführt. Anschließend wurde die NP-40-Konzentration durch Zugabe von Polysomenpuffer mit hohem NP-40-Gehalt (10 %) auf eine Konzentration von 0,5 % eingestellt.

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels DC-Assay und die Proben wurden danach bei -80°C aufbewahrt.

2.2.6 Herstellung von Kernlysaten für die Immunpräzipitation

Für Herstellung von Kernextrakten für die Immunpräzipitation wurden je nach verwendeter Zelllinie zwischen 26 und 50 Petrischalen (Durchmesser 10 cm) mit Zellen, die 24 h zuvor ausgesät wurden und eine Konfluenz von 70-90 % erreicht hatten, lysiert. Die Lyse der Zellmembran erfolgte wie oben beschrieben, wobei pro Petrischale 4 ml EMSA-I-Puffer verwendet wurde. Für die Lyse der Kernmembran wurde anstatt des Polysomenpuffers Kern-Lyse-Puffer (1 ml pro 8 ml verwendetem EMSA I-Puffer) benutzt, da sich hiermit zum einen unspezifische Bindungen minimieren ließen und zum anderen durch das Glycerol enthaltene Komplexe stabilisiert wurden. Die Proteinbestimmung erfolgte ebenfalls mit dem DC-Proteinassay und die Kernextrakte wurden anschließend unverzüglich für die Immunpräzipitation weiterverarbeitet.

2.2.7 Herstellung von nativen Kernlysaten

Die Zellen wurden in einer T175 Zellkulturflasche ausgesät und 24 h später bei einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Kernlysate extrahiert. Dafür wurden die Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und alle weiteren Arbeitsschritte dann auf Eis durchgeführt. Zur Lyse der Zellmembran wurden die Zellen mit 4 ml EMSA-I-Puffer pro Zellkulturflasche versetzt, 5 min inkubiert, dann mit dem Zellschaber abgekratzt und in 2 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 13.200 rpm wurde der Überstand verworfen und die Zellen anschließend erneut zweimal mit je 1 ml

EMSA-I-Puffer nach dem gleichen Schema gewaschen, wobei die Eppendorf-Röhrchen vereinigt wurden. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation für 8 min bei 4°C mit 13.200 rpm, nach der der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 350 µl Native-Lyse-Puffer resuspendiert wurde. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation, bei der die Proben zwischendurch immer wieder invertiert wurden, wurden sie für 30 min bei 4°C und 13.200 rpm zentrifugiert, der Überstand (das native Kernlysate) in ein neues Röhrchen überführt und anschließend die Proteinkonzentration mittels Pierce-Protein-Assay bestimmt. Die nativen Kernextrakte wurden dann unmittelbar mittels Blue Native PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.8 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurden zwei unterschiedliche Kits verwendet, wobei bei beiden für jede Probe eine 4fach-Bestimmung durchgeführt wurde. Für die Proteinbestimmung in RIPA-Lysaten wurde der BCA-Assay (Pierce) benutzt, für die Proteinbestimmung in IP-Gesamtzelllysaten sowie Kern- und Zytosolextrakten wurde hingegen der DC-Assay verwendet. Die Durchführung beider Assays erfolgte gemäß Herstellerinstruktionen, wobei die Absorption der Farbreaktion im Photometer mit entsprechendem Programm gemessen und ausgewertet wurde.

2.2.9 Behandlung von Lysaten mit RNase und RNase-Inhibitor

Eine Immunpräzipitation aus Lysaten, die mit RNase behandelt wurden, im Vergleich zu einer aus unbehandelten Lysaten, dient der Unterscheidung, ob kopräzipitierte Proteine über RNA gebunden sind oder es sich um direkte Protein-Protein-Interaktionen handelt.

Für die Behandlung des Lysates mit RNase wurde diesem pro mg Protein 57,1 µg RNase A (stock 30 µg/µl) hinzugefügt. Eine äquivalente Menge Lysat wurde entsprechend mit 100 U RNasin/ml (stock 40 U/µl) versetzt, um den RNA-Abbau zu verhindern. Beide Ansätze wurden eine h bei 37°C inkubiert, dann 15 min bei 4°C mit 13.200 rpm zentrifugiert, um ausgefallene Komplexe zu entfernen und der Überstand anschließend direkt für die Immunpräzipitation verwendet.

2.2.10 Immunpräzipitation

Diese Methode wurde verwendet, um die Komplexe von TRAIL-Rezeptoren mit anderen Proteinen zu untersuchen. Dafür wurden Protein-G-Sepharose Beads, kleine mit Protein-G ummantelte Sepharosekügelchen, verwendet, die den Fc-Teil unterschiedlicher

Antikörperklassen binden. Durch Inkubation von Beads mit Antikörpern gegen TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 und dem jeweiligen Lysat, wurden im Lysat enthaltene TRAIL-Rezeptoren samt daran gebundener Proteine über die entsprechenden Antikörper an die Beads gebunden und somit präzipitiert. Das übrige Lysat sowie unspezifisch gebundene Proteine wurden durch mehrmalige Waschschriffe entfernt. Um die Proteine von den Beads zu lösen, wurden die Beads nach dem letzten Waschschriff in Lämmli-Puffer aufgenommen und erhitzt. Die denaturierten Proteine wurden anschließend von den Sepharose-Beads abgenommen und mittels Western Blot analysiert.

Vor der Präzipitation erfolgte zuerst ein sogenanntes „pre-clearing“ des Lysates mit dem Ziel, Proteine, die unspezifisch an die Beads binden, zu entfernen. Dazu wurden jeweils 40 µl in 20 % Ethanol gelöste Protein-G Sepharose Beads in ein 2 ml-Eppendorf-Röhrchen pipettiert und zweimal mit dem jeweiligen Puffer (siehe oben) auf 1,5 ml aufgefüllt und mit Microloader-Spitzen trocken gesaugt. Auf die so vorbereiteten Beads wurde dann das Ganzzell- bzw. Kernlysate gegeben und 1 h bei 4°C invertiert, dann die Beads 1 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Lysat abgenommen.

Für die Präzipitation aus Gesamtzelllysaten wurde jeweils 900 µg Lysat mit 10 µg Mapatumumab (Mapa) bzw. Lexatumumab (Lexa) angesetzt und mit IP-Lysepuffer auf 1,5 ml aufgefüllt. Für die Präzipitation aus Kernlysaten wurden hingegen 1,5 mg Kernlysate und 20 µg Mapa bzw. Lexa verwendet und entsprechend mit Kern-Lyse-Puffer auf 1,5 ml aufgefüllt. In beiden Fällen wurden zusätzlich Antikörperkontrollen mit analogen Mengen der verwendeten Antikörper und IP-Lysepuffer anstelle des Lysates angesetzt, um bei der späteren Analyse im Western Blot die durch die Antikörper hervorgerufenen Banden ausmachen zu können. Eine weitere Kontrolle, die sogenannte Beads-Kontrolle, bestehend aus Beads und Lysat, diente dem Nachweis, inwieweit die untersuchten Proteine auch direkt, also unspezifisch, an die Beads gebunden werden. Alle angesetzten Proben wurden in Eppendorf-Röhrchen über Nacht bei 4°C invertiert.

Am nächsten Tag wurden je 40 µl Protein-G Sepharose Beads in 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen pipettiert, zweimal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und das über Nacht inkubierte Lysat-Antikörper-Gemisch auf die trocken gesaugten Beads gegeben und anschließend 2 h bei 4°C invertiert. Danach wurden die Proben 1 min mit 4000 rpm zentrifugiert (Minizentrifuge) und der Überstand verworfen. Nach sechsmaligem Waschen mit je 1 ml des jeweiligen Puffers wurden die Beads in 60 µl Puffer und 40 µl 4fach Lämmli resuspendiert und für 10 min bei 80°C im Heizblock geschüttelt. Nach erneuter

Zentrifugation konnten die Überstände mit Microloader-Spitzen von den Beads abgenommen und in neue Eppendorf-Röhrchen überführt werden. Die Lagerung bis zur Auswertung mittels Western Blot erfolgte bei -20°C .

2.2.11 siRNA-Transfektion

In Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie und der Dauer der Transfektion wurden zwischen $1,5 \times 10^5$ und $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch auf eine 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 24 bis 96 h transient mit spezifischer siRNA gegen TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 und zur Kontrolle mit nicht zielgerichteter Kontroll-siRNA mit einer Endkonzentration von jeweils 100 nM transfiziert. Verwendet wurde dafür jeweils eine SMART pool siRNA, die aus vier spezifischen siRNAs gegen TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 besteht und somit eine bestmögliche Inhibition der Proteinsynthese des jeweiligen Rezeptors ermöglicht. Die Transfektion wurde mit DharmaFECT 1 Transfektionsreagenz entsprechend der Herstellerinstruktionen durchgeführt.

Sollte die Expression der TRAIL-Rezeptoren für mehr als 96 h inhibiert werden, wurden die Zellen zunächst nach oben beschriebenem Vorgehen transient transfiziert, nach 48 h mittels Accutase abgelöst und erneut auf eine 6-Loch-Platte ausgesät. Nach weiteren 24 h erfolgte dann eine zweite Transfektion nach dem gleichen Schema.

Um mögliche Effekte einer Inhibition von let-7 zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich zu oben beschriebener Transfektion gleichzeitig entweder mit LNA-anti-let-7, einem pan-let-7 LNA-Oligonucleotid, oder einer LNA microRNA Inhibitor Kontrolle mit einer Endkonzentration von jeweils 100 nM transfiziert. Auch hierfür erfolgte die Transfektion mit DharmaFECT 1 nach Angaben des Herstellers.

2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels der SDS-Polyacrylamid(PAGE)-Gelelektrophorese wurden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufgetrennt, wobei sich die Größe der jeweils nachgewiesenen Proteine durch das Mitführen eines Proteinmarkers bestimmen ließ.

Hierfür wurden zunächst nach Proteinbestimmung der jeweiligen Lysate die Proben so angesetzt, dass alle Proben innerhalb eines Gels die gleiche Proteinmenge enthielten sowie identische Volumina. Eventuelle Abweichungen wurden durch die entsprechenden Puffer ausgeglichen. Zur Denaturierung der enthaltenen Proteine wurden die Proben 1:4 mit 4fach Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf 4-20 % TRIS-Glycin-Gele aufgetragen. Die Auftrennung

der Proteine erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Gelkammer durch Anlegen einer konstanten Spannung von 125 V für zwei bis drei h je nach gewünschtem Grad der Auftrennung.

2.2.13 Western Blot

Beim Proteinblotting, das als Western-Blotting bezeichnet wird, wurden die im Gel aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen und so für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert.

Für den Proteintransfer fand das sogenannte Nass-Blot Verfahren Anwendung. Hierfür wurde zunächst in eine Blotkassette ein Schwämmchen, darauf ein Whatman Papier und dann das Gel gelegt. Auf das Gel wurde die in 100 % Methanol für 10 sec aktivierte und kurz in destilliertem Wasser gewaschene PVDF-Membran platziert und wiederum mit einem Whatman Papier und einem Schwämmchen bedeckt. Der so bestückte Blottingkammer-Einsatz wurde in eine in Eis stehende Blotkammer eingesetzt und diese vollständig mit Blotting-Puffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte bei 400 mA und konstanter Spannung für 90 min.

Daran anschließend wurde die Membran zunächst kurz in TBS-T gewaschen und dann 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch/TBS-T bzw. 5 % BSA/TBS-T in Abhängigkeit der Herstellerempfehlung für den später verwendeten Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht in einem 50 ml-Röhrchen bei 4°C, wofür der Antikörper entsprechend der Herstellerangaben in 3,5 ml 0,5 % Magermilch/TBS-T bzw. 5 % BSA-TBS-T angesetzt wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran dann zweimal kurz und dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend 1 h bei RT mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten HRP-konjugierten-Sekundärantikörper, der entsprechend der Herstellerinstruktionen in 0,5 % Magermilch/TBS-T verdünnt wurde, inkubiert. Schließlich erfolgten erneut drei 10minütige Waschschrte in TBS-T.

Zum Nachweis der Protein-Antikörperkomplexe wurden als Substrat für die Peroxidase ECL Detektions-Reagenzien unterschiedlicher Herstellerfirmen verwendet. Nach vorgeschriebener Inkubation von Substrat und Membran bei RT, wurde die entstandene Chemilumineszenz in der Dunkelkammer durch Auflegen von lichtempfindlichen Röntgenfilmen und Entwicklung dieser nachgewiesen. Durch Variation der

Expositionsdauer des Röntgenfilms konnte eine optimale Intensität der sichtbaren Banden erzielt werden.

2.2.14 Blue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Blue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN PAGE) wird anstelle von SDS der anionische, nicht-denaturierende Farbstoff Coomassie G-250 verwendet, welcher an die Proteine bindet, sie damit negativ lädt und so eine Auftrennung der unterschiedlichen Proteinkomplexe im Polyacrylamid-Gradientengel ermöglicht. Auf diese Weise können daher native Proteinkomplexe analysiert werden.

Hierfür wurden zunächst die nativen Kernlysate sowie der im Native-Lyse-Puffer angesetzte native Proteinstandard 1:50 mit NativePAGE 5 % G-250 Proben-Additiv versetzt. Je 5 µl Standard bzw. 30 µl Kernlysat pro Tasche wurden auf ein NativePAGE Novex 4-16 % Bis-TRIS Gel aufgetragen, wobei mehrere Taschen mit identischen Mengen des Kernlysates befüllt wurden. Die innere Gelkammer wurde so mit 1fach Kathodenpuffer gefüllt, dass alle Taschen bedeckt waren und in die äußere Gelkammer wurden dann 500 ml 1fach Anodenpuffer hineingegeben. Die Auftrennung der Proteinkomplexe erfolgte bei einer konstanten Spannung von 125 V für 2 h.

Nach der Elektrophorese wurde die Spur mit dem Marker abgeschnitten, über Nacht in Coomassie-G250 gefärbt und am nächsten Tag solange in ddH₂O gewaschen, bis die einzelnen Banden gut zu erkennen waren. Anschließend wurde sie durch Einscannen in ein digitales Format überführt, welches an die Membrangröße angepasst wurde, damit das Molekulargewicht der jeweiligen Proteinkomplexe abgelesen werden konnte.

Das übrige Gel wurde 30 min lang in Laufpuffer äquilibriert und anschließend die im Gel enthaltenen Proteine wie oben beschrieben auf eine PVDF-Membran transferiert. Die einzelnen Spuren des Gels wurden dabei auf der PVDF-Membran markiert, so dass sie nach dem Proteintransfer separat abgeschnitten werden konnten. Somit konnten die nativen Proteinkomplexe hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus unterschiedlichen Proteinen parallel mittels Western Blot analysiert werden, wobei jeweils eine Spur der Analyse eines Proteins diente.

2.2.15 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Lokalisation von Proteinen in der Zelle bzw. eine mögliche Kolo-kalisation unterschiedlicher Proteine bestimmen zu können, wurde das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt. Hierbei werden fixierte Zellen zunächst mit einem gegen

das Zielprotein gerichteten Primärantikörper inkubiert, an den dann in einem zweiten Schritt der mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper bindet, welcher später durch Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge zum Leuchten gebracht werden kann.

Je nach verwendeter Zelllinie wurden zwischen $1,2 \times 10^5$ und $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte auf ein Deckgläschen ausgesät. Nach 40 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen viermal mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Zur Fixierung wurden die Zellen für 10 min in 1 ml eiskaltem 2,5 % PFA/TBS geschwenkt, zweimal mit kaltem PBS gewaschen, dann für 10 min in 1 ml -20°C -kaltem Methanol inkubiert und zweimal für je 5 min mit kaltem PBS gewaschen. Die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte anschließend für 15 min in 1 ml 0,5 % BSA/TBS bei RT.

Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde dieser in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration in 0,5 % BSA/TBS angesetzt, davon je 70 μl auf einen in einer feuchten Kammer glatt ausgelegten Parafilm pipettiert und anschließend die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten darauf platziert. Bei einer Doppelfärbung wurden dabei Primärantikörper unterschiedlicher Spezies verwendet, um die Proteine später separat voneinander darstellen zu können. Nach einer Inkubation von 2 h im Dunkeln bei RT wurden die Deckgläschen einmal für 15 min und dreimal für je 5 min in TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Fluorochrome-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte nach demselben Schema für 1 h bei RT, wobei zusätzlich Höchst-Farbstoff zur Kernfärbung dazugegeben wurde. Bei der Doppelfärbung mussten entsprechend Sekundärantikörper mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern verwendet werden. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen einmal für 15 min und dreimal für jeweils 5 min in TBS und 1 min in destilliertem Wasser gewaschen. Auf einen Objektträger wurden je 15 μl Mounting-Medium aufgetragen und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten bläschenfrei darauf gelegt und nach dem Antrocknen mit Nagellack umrandet, um die Zellen vor einem Austrocknen zu schützen.

Die Analyse der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie.

2.2.16 Aufreinigung der Gesamt-RNA

Die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des mirVana miRNA Isolations-Kits entsprechend der Herstellerangaben. Die enthaltene RNA-Konzentration wurde

anschließend mittels NanoDrop, einem Spektrophotometer, bestimmt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.17 Real-time RT- PCR

Um zu untersuchen, ob die Inhibition der Expression von TRAIL-Rezeptoren einen Einfluss auf die Expression von HMGA2 auf mRNA-Ebene hat, wurde nach Aufreinigung der Gesamt-RNA eine real-time RT-PCR durchgeführt und die Menge an HMGA2-Transkripten von mit siRNA gegen TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 transfizierten Zellen mit solchen verglichen, die nur mit nicht zielgerichteter siRNA transfiziert wurden. Die Expression von HMGA2 wurde dafür auf GAPDH normalisiert.

Zunächst wurden jeweils 2 µg RNA mittels SuperScript VILO cDNA Synthese Kit gemäß der Herstellerangaben im Thermocycler (10 min bei 25°C, 60 min bei 42°C und 5 min bei 85°C) in cDNA revers transkribiert und anschließend entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiter für die qPCR verwendet. Die Templates für die qPCR wurden mit dem Maxima SYBR Green/Rox qPCR MasterMix entsprechend der Herstellerinstruktionen und der jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer für HMGA2 bzw. GAPDH angesetzt. Die qPCR erfolgte anschließend mit dem StepOne real time PCR System nach folgendem Protokoll: 10 min bei 95°C und dann 40 Zyklen je 20 sec bei 95°C und 1 min bei 60°C. Für die Berechnung des Expressionsunterschiedes von HMGA2 in behandelten versus unbehandelten Proben wurde die Delta-Delta CT-Methode (Livak & Schmittgen, 2001) verwendet.

2.2.18 Quantifizierung reifer miRNAs mittels real-time PCR

Die quantitative Bestimmung von let-7 Familienmitgliedern wurde in Kooperation mit Dr. Robert Hässler, Institut für klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel, durchgeführt.

Dafür wurde die aufgereinigte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und mittels TaqMan-PCR unter Verwendung von Assays für hsa-let-7a, has-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7d, hsa-let-7g analysiert und auf GAPDH normalisiert. Die Berechnung der Expressionsunterschiede erfolgte ebenfalls mit der Delta-Delta CT-Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Die Signifikanz der unterschiedlichen Expression einzelner let-7 Familienmitglieder zwischen Kontroll-siRNA und spezifischer siRNA wurde mit dem univariaten ANOVA Test bei einem angenommenen Signifikanzniveau von $p \leq 0.05$ bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Verifizierung der Interaktion von TRAIL-R2 mit p68, NF45 und hnRNPA1

Wie einleitend beschrieben, konnten in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. Anna Trauzold durch MALDI TOF Massenspektrometrie der elektrophoretisch aufgetrennten Immunpräzipitate von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 aus unstimulierten Panc89-Zellen p68, hnRNPA1 und NF45 als mögliche neue Interaktionspartner von TRAIL-R2 identifiziert werden.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es zunächst, diese Interaktion in einer weiteren Zelllinie zu verifizieren. Dazu wurden aus dem Gesamtzelllysat von unstimulierten Panc1-Zellen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 über die spezifischen Antikörper Mapatumumab (Mapa) und Lexatumumab (Lexa) präzipitiert (Humphreys & Halpern, 2008; Lemke et al., 2010) und die Zusammensetzung der Proteinkomplexe mittels Western Blot-Analyse untersucht. Wie die Abbildung 3 zeigt, war die Präzipitation erfolgreich, da sich die beiden bekannten Splice-Varianten von TRAIL-R2 (40 kDa und 48 kDa) nach Präzipitation mit Lexatumumab sowie TRAIL-R1 nach Präzipitation mit Mapatumumab nachweisen ließen. Darüber hinaus konnten eindeutig p68, hnRNPA1 und NF45 in Komplexen mit TRAIL-R2 gefunden werden. Im Gegensatz dazu ließ sich für keines der untersuchten Proteine eine Assoziation mit TRAIL-R1 zeigen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die beiden Rezeptoren offensichtlich miteinander Komplexe ausbilden, da in Immunpräzipitaten von TRAIL-R1 zusätzlich die 48 kDa-Form von TRAIL-R2 enthalten ist.

Da NF45 in der Zelle in heterodimeren Komplexen mit NF90 sowie mit seiner Splice-Variante NF110 vorkommt (Guan et al., 2008; Corthésy & Kao, 1994; Duchange et al., 2000), wurde auch untersucht, ob diese Proteine ebenfalls mit TRAIL-R2 assoziieren. Wie die Abbildung 3 zeigt, ist NF90 deutlich und NF110 schwach in Immunkomplexen von TRAIL-R2 und nicht von TRAIL-R1 nachweisbar.

Ähnliche Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe auch für verschiedene andere Tumorzelllinien erzielt (Haselmann et al., 2014).

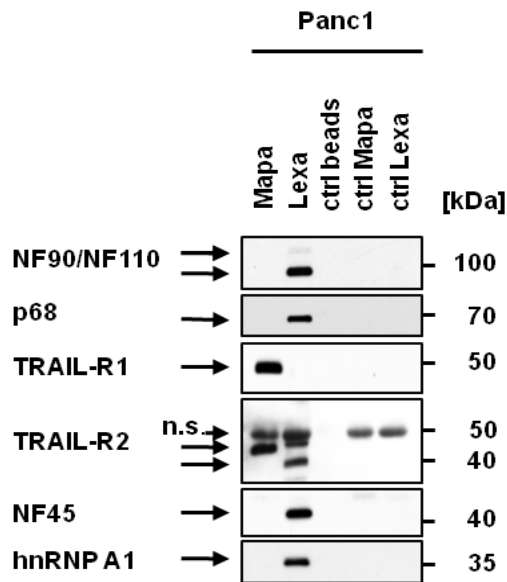


Abbildung 3: TRAIL-R2 interagiert mit p68, hnRNPA1, NF45, NF90/110 und mit TRAIL-R1

TRAIL-R1 und TRAIL-R2 wurden über die Antikörper Mapatumumab (Mapa) und Lexatumumab (Lexa) aus dem aus Panc1-Zellen erstellten Gesamtzelllysate präzipitiert (siehe Material und Methoden). Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Präsenz von TRAIL-R1, TRAIL-R2, p68, hnRNPA1, NF45 und NF90/110 hin untersucht. Als Kontrollen wurden Antikörper alleine (ctrl Mapa, ctrl Lexa) sowie Lysat ohne Antikörper (ctrl beads) mit Protein-G Sepharose Beads inkubiert und parallel analysiert, um die durch den Präzipitationsantikörper hervorgerufenen Banden sowie mögliche unspezifische Bindungen an die Beads nachweisen zu können.

3.2 Zelluläre Verteilung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2

Da es sich bei p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 um Kernproteine handelt, wurde die intrazelluläre Verteilung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in unbehandelten Panc1-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanning Mikroskopie (LSM) untersucht.

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte dabei ein ähnliches Verteilungsmuster wie es bereits vorher in unbehandelten Panc89-Zellen von der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte. Während beide TRAIL-Rezeptoren sowohl auf der Plasmamembran als auch im Zytoplasma von unbehandelten Panc1-Zellen nachweisbar waren (Abbildung 4), zeigte sich zusätzlich eine deutliche Expression von TRAIL-R2 im Zellkern. Im Gegensatz dazu ließ sich TRAIL-R1 im Zellkern nur sehr schwach detektieren.

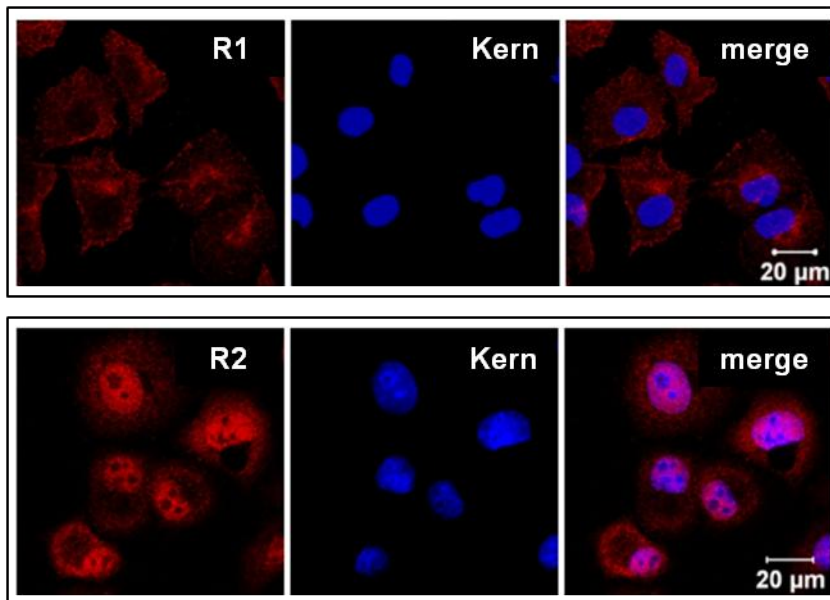


Abbildung 4: Analyse der zellulären Verteilung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 mittels Immunfluoreszenz

Panc1-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und 24 h später mittels indirekter Immunfluoreszenz und LSM hinsichtlich der Expression von TRAIL-Rezeptoren analysiert. TRAIL-R1 (R1) wurde mittels Mapatumumab (Mapa) und TRAIL-R2 (R2) mittels Lexatumumab (Lexa) als primären Antikörper sowie mit Alexa-Fluor 546 als sekundären Antikörper in rot angefärbt. Die Zellkerne sind durch Zugabe von Hoechst-Farbstoff in blau sichtbar. Das Überlagerungsbild (Merge) zeigt die Überlagerung der Einzelfärbungen, wobei die nukleäre Lokalisation durch die pinke Anfärbung deutlich wird.

Um die Expression von TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern mittels einer weiteren Methode zu verifizieren und zusätzlich zu überprüfen, ob sich ein ähnliches Verteilungsmuster auch in anderen Tumorzelllinien findet, wurden Western-Blot-Analysen von Zytoplasma- und Kernextrakten aus Panc1-Zellen sowie aus Panc89-, BxPC3- und HCT116-Zellen untersucht. Abbildung 5A zeigt, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in der Kernfraktion aller vier untersuchten Tumorzelllinien nachgewiesen werden konnten. Dabei fiel auf, dass die kleine Splice-Variante von TRAIL-R2 (40 kDa) nahezu ausschließlich im Zellkern vorkommt, wohingegen die größere Form (48 kDa) im Zytoplasma dominierte. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz wurde hier auch die nukleäre Expression von TRAIL-R1 deutlich, welcher sich hingegen nur sehr schwach im Zytoplasma nachweisen ließ.

Da bei der durchgeführten Fraktionierung möglicherweise Membranreste oder Zellorganellen in den Extrakten enthalten gewesen sein könnten, an die die nachgewiesenen TRAIL-Todesrezeptoren gebunden wurden, wurden die

Fraktionierungsversuche mit einer zusätzlich durchgeführten Ultrazentrifugation wiederholt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Fraktionierungsversuchen ohne Ultrazentrifugation bestätigte sich das gleiche Verteilungsmuster von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 ebenfalls in den nur löslichen zytosolischen und nukleären Extrakten (Abbildung 5B).

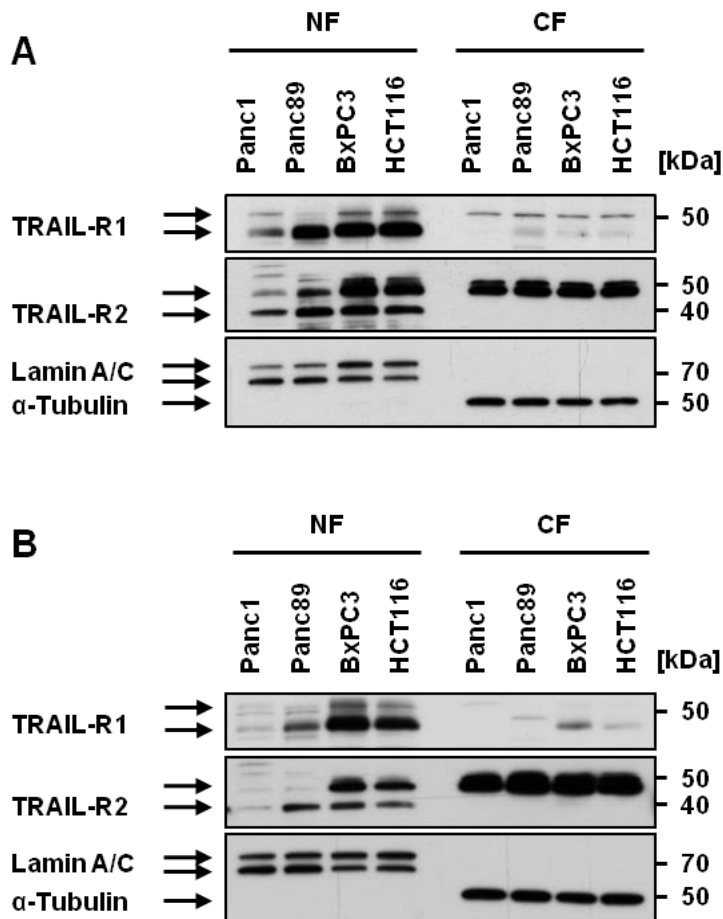


Abbildung 5: Analyse der zellulären Verteilung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 mittels Zellfraktionierung

Die zytoplasmatische Fraktion (CF) und die nukleäre Fraktion (NF) von Panc1-, Panc89-, BxPC3- und HCT116-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Als Kontrolle für die Reinheit der Fraktionierung wurde die Expression von Lamin A/C als nukleären Marker und α -Tubulin als zytoplasmatischen Marker parallel analysiert. **A:** Fraktionierung der Zellen ohne Ultrazentrifugation. **B:** Fraktionierung der Zellen mit zusätzlich durchgeführter Ultrazentrifugation der Kern- und Zytoplasmaextrakte.

Da für die weiteren Versuche eine Verwendung von anti-TRAIL-R1 und anti-TRAIL-R2 Antikörpern unerlässlich war, sollte zunächst die Spezifität von drei kommerziell erhältlichen Antikörpern überprüft werden. Wie Abbildung 6 zeigt, lassen sich in unbehandelten Panc1-Zellen mittels aller drei verwendeten Antikörper die beiden bekannten Splice-Varianten von TRAIL-R2 detektieren, die sich beide durch Transfektion der Zellen mit siRNA gegen TRAIL-R2 herunterregulieren ließen. Die Darstellung der unterschiedlichen Belichtungszeiten diente dabei der Verdeutlichung, dass auch die Expression der 48 kDa-Form von TRAIL-R2 mittels siRNA deutlich reduziert wurde. Zusätzlich wurde ersichtlich, dass der Antikörper von ProScience eine Präferenz für die 48 kDa-Form aufweist. Interessanterweise wurde bei kurzer Expositionsdauer deutlich, dass es sich bei der 48 kDa-Bande von TRAIL-R2 um eine Doppelbande mit minimalen Größenunterschieden handelt. Hierbei könnte es sich zum Beispiel um unterschiedliche phosphorylierte Formen handeln, eine Beobachtung, die bislang noch nicht beschrieben wurde.

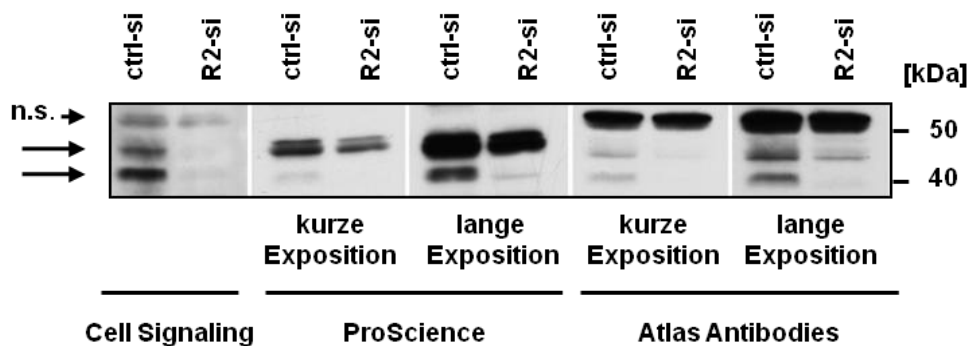


Abbildung 6: Nachweis der Spezifität der gegen TRAIL-R2 verwendeten Antikörper

Inhibition der Expression von TRAIL-R2 mittels siRNA: Panc1-Zellen wurden mit siRNA gegen TRAIL-R2 (R2-si) oder Kontroll-siRNA (ctrl-si) für 48 h transient transfiziert und die Gesamtzelllysate anschließend mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich der Expression von TRAIL-R2 untersucht.

3.3 Analyse der nukleären TRAIL-Rezeptorkomplexe

In den vorausgegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass TRAIL-R2 mit den nukleären Proteinen p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 interagiert und sich im Zellkern

unterschiedlicher Tumorzelllinien nachweisen lässt. Folglich galt es durch weitere Versuche zu bestätigen, dass diese Interaktionen tatsächlich im Zellkern stattfinden. Zu diesem Zweck wurden für die Immunpräzipitation von TRAIL-Rezeptorkomplexen Kernextrakte anstelle von Gesamtzelllysaten verwendet. Zusätzlich wurde die mögliche Kolo-kalisation der Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz und LSM untersucht.

Bei der Immunpräzipitation (Abbildung 7) fand sich eine deutliche Interaktion von TRAIL-R2 mit p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 im Zellkern. Zusätzlich bestätigte sich, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Komplexe miteinander ausbilden, da sowohl geringe Mengen von TRAIL-R1 in den nukleären TRAIL-R2-Präzipitaten als auch die 48 kDa-Form von TRAIL-R2 in Kernpräzipitaten von TRAIL-R1 nachgewiesen wurden. Erstaunlicherweise waren in den nukleären Immunkomplexen von TRAIL-R1 auch NF45, NF90/110 und hnRNPA1, jedoch nicht p68 nachweisbar. Dabei war allerdings die Menge der Proteine, die mit TRAIL-R1 kopräzipitierten, deutlich geringer als diejenige, die in Präzipitaten von TRAIL-R2 detektiert wurde.

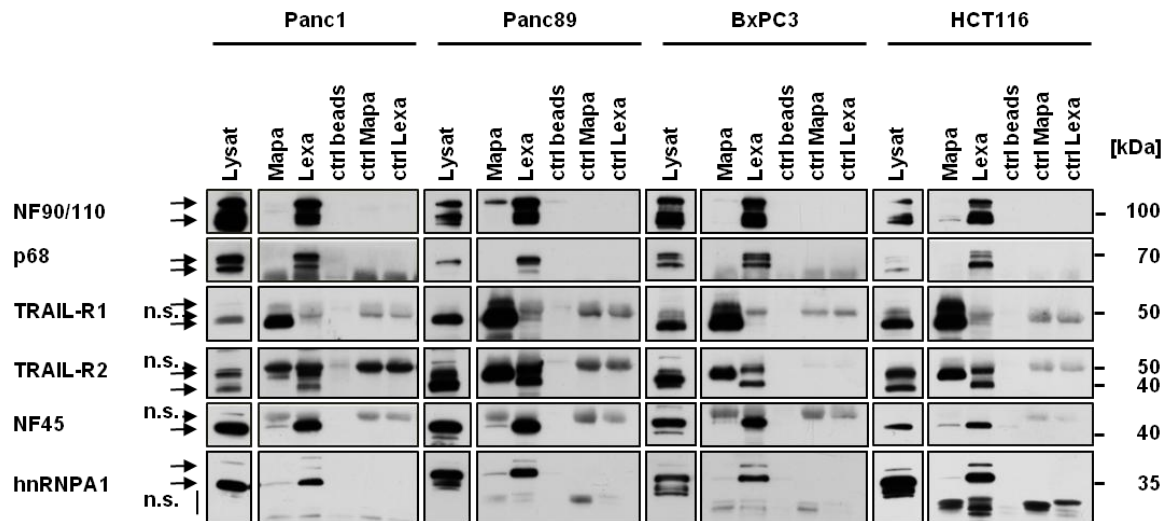


Abbildung 7: Analyse der nukleären TRAIL-Rezeptorkomplexen mittels Immunpräzipitation

TRAIL-R1 und TRAIL-R2 wurden über die Antikörper Mapatumumab (Mapa) und Lexatumumab (Lexa) aus Kernextrakten von Panc1-, Panc89-, BxPC3- und HCT116-Zellen präzipitiert. Als Kontrollen wurden Antikörper alleine (ctrl Mapa, ctrl Lexa) sowie nukleäres Lysat ohne Antikörper (ctrl beads) mit Protein-G Sepharose Beads inkubiert und parallel untersucht. Die Analyse der präzipitierten Proteinkomplexe erfolgte mittels Western-Blot unter Verwendung der entsprechenden Antikörper gegen TRAIL-R1, TRAIL-R2, p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1. Zusätzlich wurden im gleichen Gel jeweils 20 µg des Kernlysates aufgetragen und parallel im Western-Blot analysiert.

Durch die mikroskopische Analyse der intrazellulären Verteilung von TRAIL-Rezeptoren und den damit assoziierten Proteinen in unbehandelten Panc1-Zellen konnten die in der Immunpräzipitation gewonnenen Erkenntnisse für TRAIL-R2 verifiziert werden. Wie in Abbildung 8 dargestellt, wiesen p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 erwartungsgemäß eine primär nukleäre Lokalisation auf. Daneben kam eine starke Kolokalisation von TRAIL-R2 mit p68 und hnRNPA1 sowie eine partielle mit NF45 und NF90/110 zur Darstellung. Für TRAIL-R1 ließ sich hingegen nur eine marginale Kolokalisation mit den untersuchten Proteinen nachweisen.

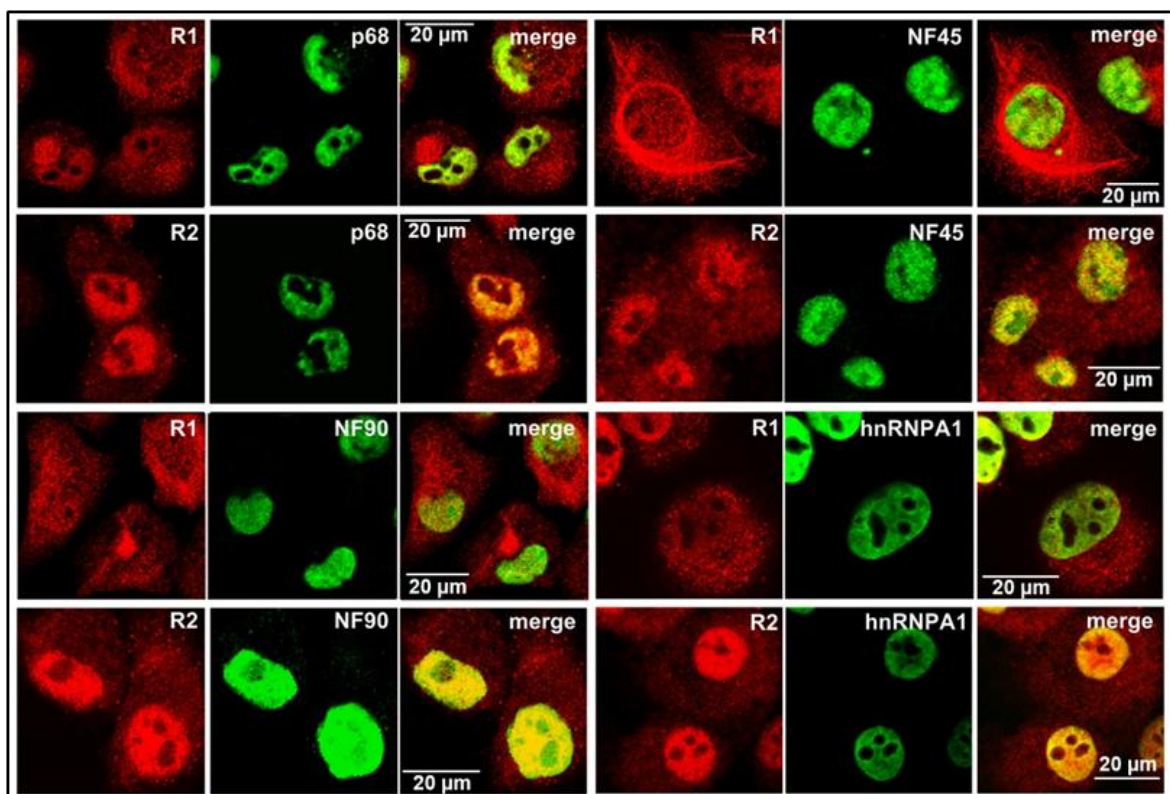


Abbildung 8: Analyse der Interaktion von TRAIL-Rezeptoren mit p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1

Panc1-Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz und LSM hinsichtlich einer Kolokalisation von TRAIL-R1 (R1) und TRAIL-R2 (R2) mit p68, NF45, NF90/110 (NF90) und hnRNPA1 untersucht. Das Merge-Bild zeigt die Überlagerung der Einzelfärbungen, die bei einer Kolokalisation der Proteine gelb erscheinen.

Um die Interaktion der beiden TRAIL-Todesrezeptoren mit p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 zu untermauern, sollte die Interaktion der TRAIL-Todesrezeptoren mit den

beschriebenen Proteinen mittels einer weiteren unabhängigen Methode untersucht werden. Dazu wurden native Proteinkomplexe von Kernextrakten unbehandelter Panc89-Zellen mittels Blue native PAGE und Western-Blot-Technik analysiert.

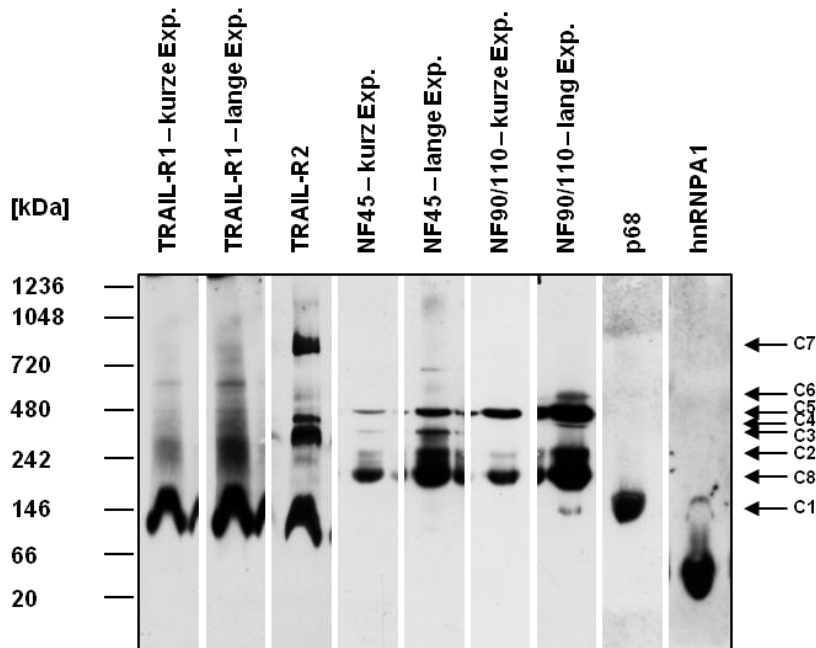


Abbildung 9: Analyse von nativen TRAIL-Rezeptorkernkomplexen

Native Kernextrakte aus Panc89-Zellen wurden separat mittels Blue native PAGE und Western-Blot hinsichtlich der Expression von TRAIL-R1, TRAIL-R2, p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 untersucht.

Wie Abbildung 9 zeigt, wurde TRAIL-R2 in mehreren Komplexen (C1-C7) nachgewiesen. Diese Komplexe weisen ein Molekulargewicht von ungefähr 146 kDa (C1), 242 kDa (C2), zwischen 242 und 480 kDa (C3), etwas weniger als 480 kDa (C4), 480 kDa (C5), etwas mehr als 480 kDa (C6) und mehr als 720 kDa auf. TRAIL-R1 wanderte in der Elektrophorese in Komplexen, deren Größe der TRAIL-R2-enthaltenen Komplexe C1, C5 und C7 entsprach. HnRNPA1 und p68 komigrierten mit dem TRAIL-R2-Komplex C1, NF45 und NF90/110 mit den TRAIL-R2-Komplexen C1, C2 und C5. NF45 wurde außerdem in Komplexen mit einer ähnlichen Größe wie der TRAIL-R2-Komplex C3 und NF90/110 in Komplexen mit einer den TRAIL-R2-Komplexen C4 und C6 entsprechenden Größe nachgewiesen. Auf der Höhe des mit C8 beschrifteten Komplexes kamen nur NF45 und NF90/110 zur Darstellung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass möglicherweise nicht

nur TRAIL-R2 sondern auch TRAIL-R1 in nativen Proteinkomplexen mit p68, NF45, NF90/110 sowie hnRNPA1 enthalten war.

3.4 Analyse der RNA-Abhängigkeit der identifizierten Proteininteraktionen

Bei den mit den TRAIL-Todesrezeptoren assoziierten Proteinen p68, NF45, NF90/110 sowie hnRNPA1 handelt es sich um RNA-bindende Proteine (Corthésy & Kao, 1994; Reichmann et al., 2003; Hirling et al., 1989; Burd & Dreyfuss, 1994). Daher war es Ziel der nachfolgenden Experimente zu überprüfen, ob es sich bei der Interaktion zwischen den TRAIL-Todesrezeptoren und den beschriebenen Proteinen um direkte Protein-Protein-Interaktionen handelt oder die TRAIL-Rezeptoren über RNA mit diesen Proteinen verbunden sind.

Zu diesem Zweck wurden Immunpräzipitationsversuche von TRAIL-Rezeptorkomplexen aus mit RNasin, einem RNase-Inhibitor, versetzten Kernlysaten unterschiedlicher Tumorzelllinien mit solchen verglichen, bei denen vor Präzipitation der Rezeptorkomplexe die Kernextrakte anstelle dessen mit RNase A behandelt wurden.

Die Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitationen (Abbildung 10-12) zeigte für alle drei untersuchten Zelllinien (Panc1, Panc89, BxPC3) vergleichbare Ergebnisse, wobei die Menge der präzipitierten Proteine in Panc1-Zellen am geringsten war (Abbildung 10). Für die Präzipitation der TRAIL-Rezeptorkomplexe aus mit RNasin behandelten Kernextrakten ergab sich das gleiche Bild wie es bereits in Abbildung 7 für unbehandelte Kernextrakte zur Darstellung kam.

Durch den Vergleich mit der Immunpräzipitation aus mit RNase A behandelten Kernextrakten wurde festgestellt, dass die beiden TRAIL-Todesrezeptoren Heterokomplexe durch direkte Proteininteraktion miteinander ausbilden, da sich auch nach Verdau der RNA sowohl TRAIL-R1 in Immunpräzipitaten von TRAIL-R2 als auch die größere Splice-Variante von TRAIL-R2 in TRAIL-R1-Präzipitaten nachweisen ließ. Ein Nachweis von NF90/110 war nach Behandlung mit RNase A weder in TRAIL-R2- noch in TRAIL-R1-Komplexen möglich, wobei es in Panc1-Zellen auch ohne Zugabe von RNase A nicht in Immunkomplexen von TRAIL-R1 nachgewiesen werden konnte. Die nur mit TRAIL-R2 assoziierte Helikase p68 zeigte ebenfalls eine deutliche RNA-Abhängigkeit, da sie nach Verdau mit RNase A fast nicht mehr präzipitiert werden konnte.

NF45 sowie hnRNPA1 wurden beide in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Untersuchungen in Immunkomplexen von TRAIL-R2 und in sehr geringen Mengen auch in Immunkomplexen von TRAIL-R1 detektiert. Bei der Interaktion der TRAIL-Todesrezeptoren mit diesen beiden Proteinen handelte es sich um eine direkte Protein-Protein-Interaktion, da nach RNA-Verdau NF45 noch deutlich und hnRNPA1, insbesondere die 39 kDa-Isoform, verstärkt in den Immunkomplexen beider TRAIL-Rezeptoren nachgewiesen wurden.

Zur Kontrolle, dass es durch den Verdau der RNA nicht zu einer Veränderung der Gesamtmenge der untersuchten Proteine in den Kernextrakten kam, wurden parallel zu der Analyse der Immunpräzipitate auch die mit RNasin versetzten Kernlysate im Vergleich zu den mit RNase A behandelten im Western-Blot betrachtet (Abbildung 10-12). Deutlich wurde hier, dass in beiden Lysaten bei allen drei untersuchten Zelllinien identische Mengen von TRAIL-R1, TRAIL-R2, p68, NF45, NF90/110 sowie hnRNPA1 enthalten waren. Damit waren die oben beschriebenen Unterschiede zwischen den beiden Immunpräzipitationsansätzen eindeutig auf einen Verdau der enthaltenen RNA zurückzuführen.

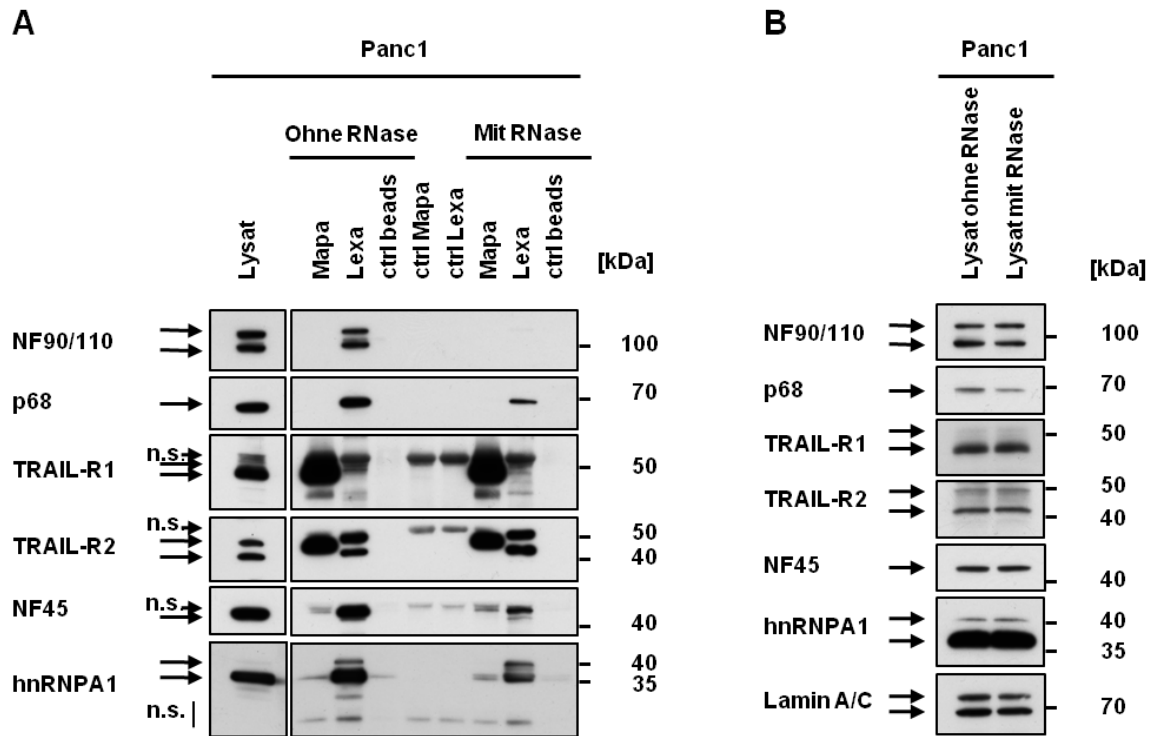


Abbildung 10: Analyse der RNA-Abhängigkeit der identifizierten Proteininteraktionen in Panc1-Zellen

A: Kernextrakte aus Panc1-Zellen wurden entweder mit RNasin versetzt oder 1 h bei 37°C mit RNase A inkubiert. Aus diesen Lysaten wurden anschließend TRAIL-R1 und TRAIL-R2 über die Antikörper Mapatumumab (Mapa) oder Lexatumumab (Lexa) präzipitiert und die präzipitierten Immunkomplexe anschließend hinsichtlich der Präsenz der angegebenen Proteine mittels Western-Blot-Technik analysiert. Als Kontrollen wurden Antikörper alleine (ctrl Mapa, ctrl Lexa) sowie mit RNasin versetztes Kernextrakt ohne Antikörper (ctrl beads) mit den Beads inkubiert und parallel untersucht. Zusätzlich wurden im gleichen Gel jeweils 20 µg des unbehandelten Kernextraktes aufgetragen.

B: Von dem mit RNasin versetzten Kernlysat und dem mit RNase A behandelten Kernextrakten wurden jeweils 20 µg parallel auf die Präsenz von TRAIL-R1, TRAIL-R2, p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 hin analysiert. Als Ladungskontrolle wurde parallel die Expression von Lamin A/C als Kernmarker bestimmt.

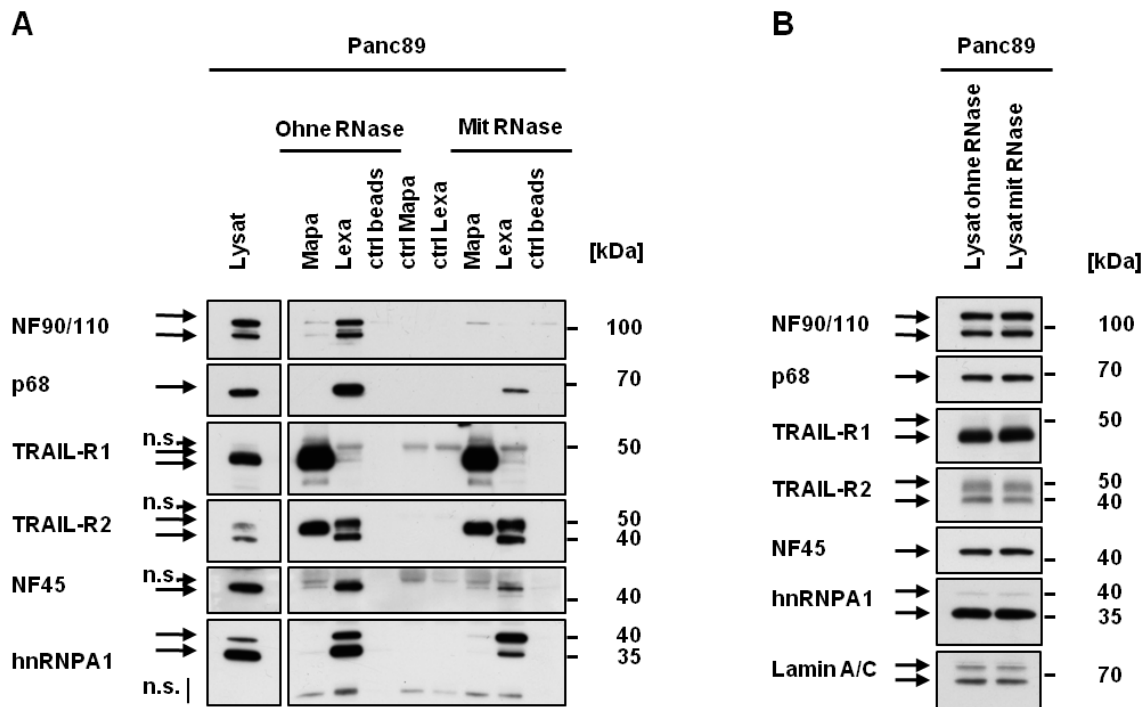


Abbildung 11: Analyse der RNA-Abhängigkeit der identifizierten Proteininteraktionen in Panc89-Zellen

A: Kernextrakte aus Panc89-Zellen wurden entweder mit RNasin versetzt oder 1 h bei 37°C mit RNase A inkubiert. Aus diesen Lysaten wurden anschließend TRAIL-R1 und TRAIL-R2 über die Antikörper Mapatumumab (Mapa) oder Lexatumumab (Lexa) präzipitiert und die präzipitierten Immunkomplexe anschließend hinsichtlich der Präsenz der angegebenen Proteine mittels Western-Blot-Technik analysiert. Als Kontrollen wurden Antikörper alleine (ctrl Mapa, ctrl Lexa) sowie mit RNasin versetztes Kernextrakt ohne Antikörper (ctrl beads) mit den Beads inkubiert und parallel untersucht. Zusätzlich wurden im gleichen Gel jeweils 20 µg des unbehandelten Kernextraktes aufgetragen.

B: Von dem mit RNasin versetzten Kernlysat und dem mit RNase A behandelten Kernextrakten wurden jeweils 20 µg parallel auf die Präsenz von TRAIL-R1, TRAIL-R2, p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 hin analysiert. Als Ladungskontrolle wurde parallel die Expression von Lamin A/C als Kernmarker bestimmt.

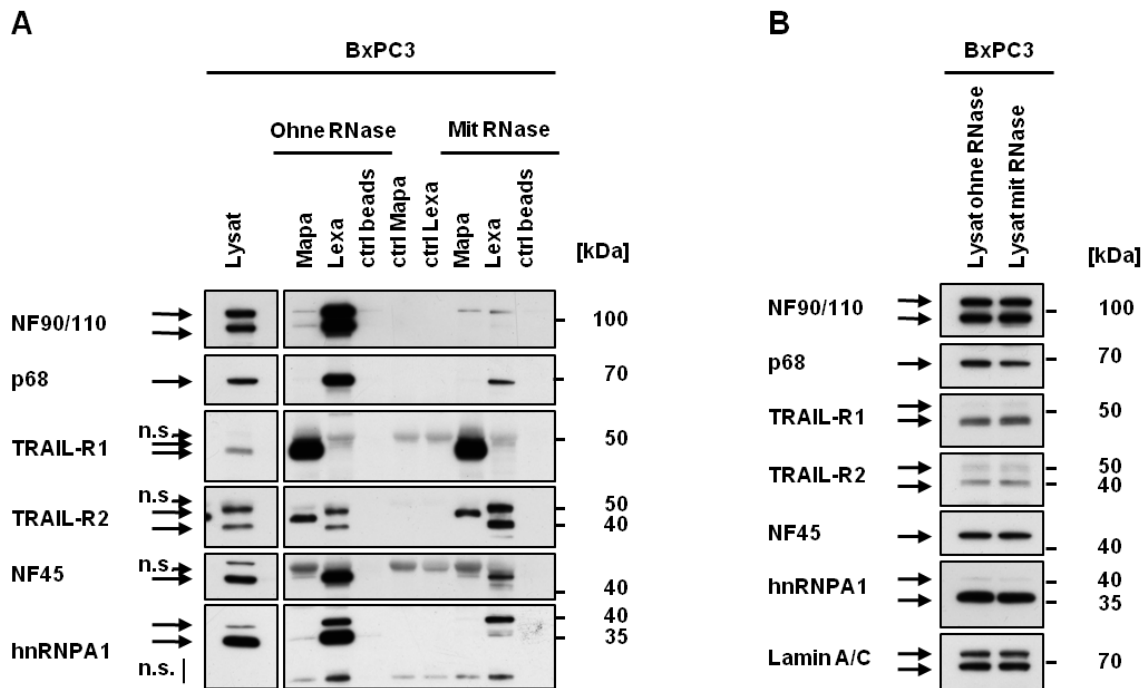


Abbildung 12: Analyse der RNA-Abhängigkeit der identifizierten Proteininteraktionen in BxPC3-Zellen

A: Kernextrakte aus BxPC3-Zellen wurden entweder mit RNasin versetzt oder 1 h bei 37°C mit RNase A inkubiert. Aus diesen Lysaten wurden anschließend TRAIL-R1 und TRAIL-R2 über die Antikörper Mapatumumab (Mapa) oder Lexatumumab (Lexa) präzipitiert und die präzipitierten Immunkomplexe anschließend hinsichtlich der Präsenz der angegebenen Proteine mittels Western-Blot-Technik analysiert. Als Kontrollen wurden Antikörper alleine (ctrl Mapa, ctrl Lexa) sowie mit RNasin versetztes Kernextrakt ohne Antikörper (ctrl beads) mit den Beads inkubiert und parallel untersucht. Zusätzlich wurden im gleichen Gel jeweils 20 µg des unbehandelten Kernextraktes aufgetragen.

B: Von dem mit RNasin versetzten Kernlysat und dem mit RNase A behandelten Kernextrakten wurden jeweils 20 µg parallel auf die Präsenz von TRAIL-R1, TRAIL-R2, p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 hin analysiert. Als Ladungskontrolle wurde parallel die Expression von Lamin A/C als Kernmarker bestimmt.

3.5 Analyse der Interaktion von TRAIL-Rezeptoren mit dem Mikroprozessor-Komplex

Für p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 wurde, wie einleitend beschrieben, gezeigt, dass sie Teil des großen Mikroprozessor-Komplexes sind, der für die Prozessierung von pri-miRNAs zu pre-miRNAs verantwortlich ist. Die beiden Hauptkomponenten dieses Komplexes sind dabei die RNase III Drosha sowie das dsRNA-Bindeprotein DGCR8, welches als akzessorisches Protein doppelsträngige RNA erkennt (Gregory et al., 2004). Aufgrund dessen, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die TRAIL-Todesrezeptoren, insbesondere TRAIL-R2, mit den nukleären Proteinen p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 assoziiert sind und zudem ein Teil dieser Interaktionen RNA-abhängig ist, lag die Vermutung nahe, dass ebenfalls eine Verbindung zwischen den TRAIL-Todesrezeptoren und dem Mikroprozessor-Komplex besteht.

Aus diesem Grund wurden mittels Immunpräzipitationen aus nukleären Lysaten unterschiedlicher Tumorzelllinien TRAIL-Rezeptorkomplexe hinsichtlich einer möglichen Präsenz von DGCR8 und Drosha untersucht. In der Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitationen (Abbildung 13) konnten sowohl Drosha als auch DGCR8 in Komplexen mit TRAIL-R2 gefunden werden. In einigen der untersuchten Zelllinien konnte zudem eine sehr schwache Assoziation von Drosha und DGCR8 mit TRAIL-R1 nachgewiesen werden.

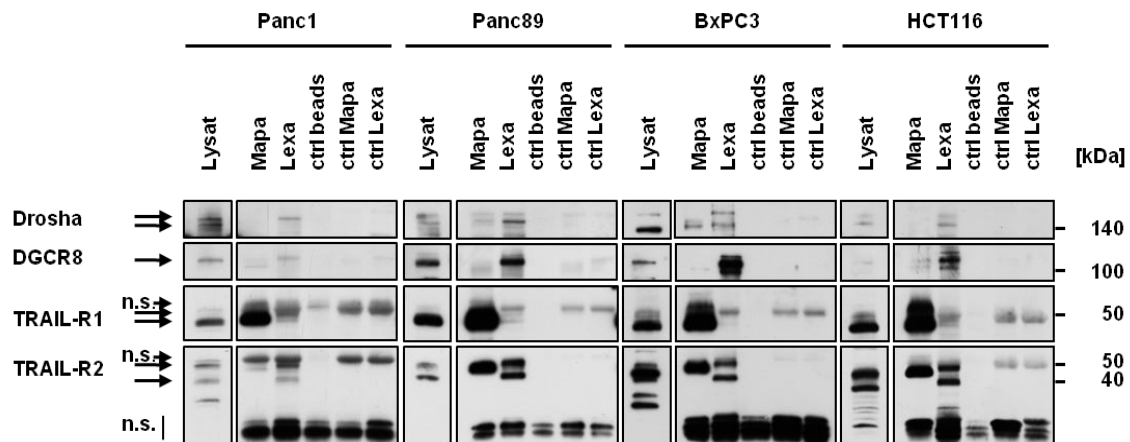
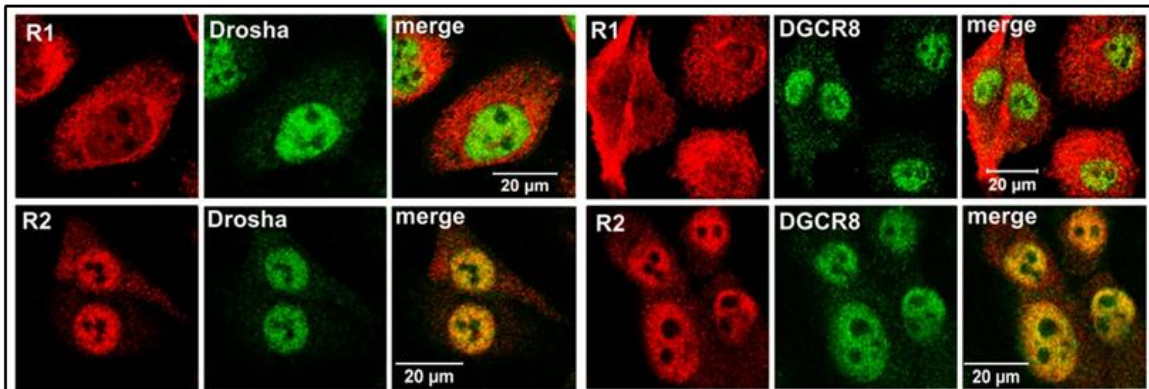
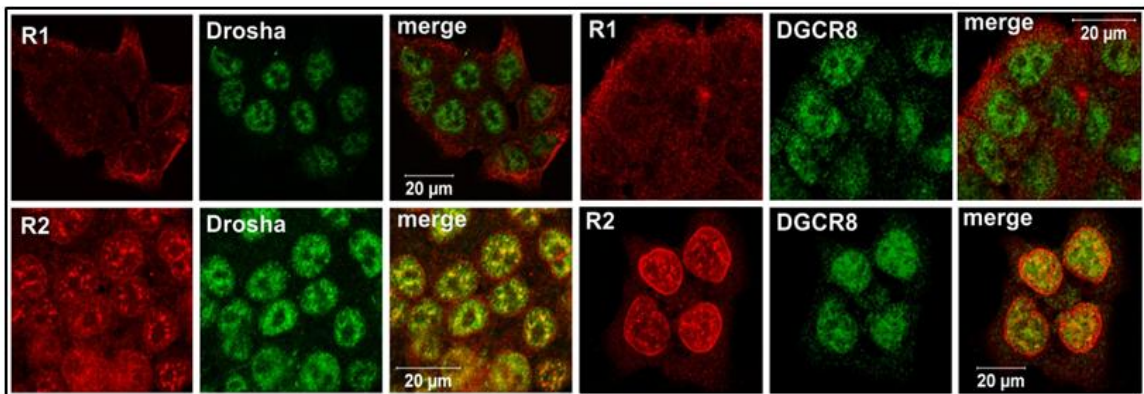
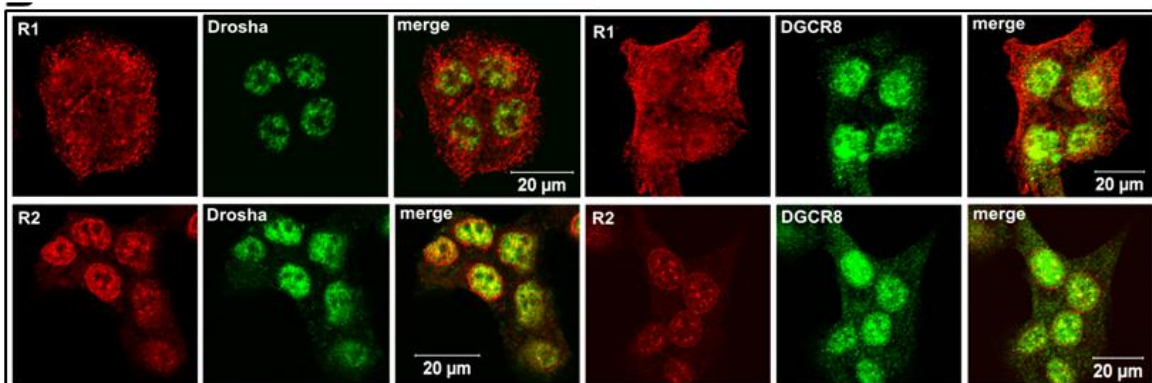


Abbildung 13: TRAIL-R2 interagiert mit Drosha und DGCR8

TRAIL-R1 und TRAIL-R2 wurden aus Kernextrakten von Panc1-, Panc89-, BxPC3- und HCT116-Zellen über die Antikörper Mapatumumab (Mapa) und Lexatumumab (Lexa) präzipitiert. Die Immunkomplexe von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Präsenz von Drosha, DGCR8, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 hin untersucht. Als Kontrollen wurden Antikörper alleine (ctrl Mapa, ctrl Lexa) sowie Kernlysate ohne Antikörper (ctrl beads) mit Protein-G-Sepharose Beads inkubiert und parallel analysiert. Zusätzlich wurden im gleichen Gel jeweils 20 µg des Kernlysates aufgetragen und parallel im Western-Blot analysiert.

Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale LSM konnten die Ergebnisse der Immunpräzipitationsversuche bestätigen. Abbildung 14 zeigt die erwartungsgemäß primär nukleäre Lokalisation von Drosha und DGCR8 in allen drei untersuchten Zelllinien. Im Zellkern konnte auch eine eindeutige Kolo-kalisation von TRAIL-R2 mit Drosha und DGCR8 beobachtet werden. Mit dieser Methode war hingegen die Interaktion von TRAIL-R1 mit den beiden Proteinen nicht nachweisbar.

Panc1**BxPC3****HCT116****Abbildung 14: TRAIL-R2 kolokalisiert mit Drosha und DGCR8**

Panc1-, BxPC3- und HCT116-Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz und LSM hinsichtlich einer Kolokalisation von TRAIL-R1 (R1) und TRAIL-R2 (R2) mit Drosha und DGCR8 untersucht. Das Merge-Bild zeigt die Überlagerung der Einzelfärbungen, die bei einer Kolokalisation in Gelb zur Darstellung kommen.

Ähnlich wie im Falle der Interaktion von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 mit p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 wurde nachfolgend untersucht, ob die Interaktion zwischen den beiden TRAIL-Rezeptoren und Drosha bzw. DGCR8 über direkte Protein-Protein-Interaktion stattfindet oder über RNA vermittelt wird.

Die Analyse der Zusammensetzung der TRAIL-Rezeptorkomplexe in mit RNasin behandelten Kernextrakten im Vergleich zu Kernlysaten, die vor Präzipitation der Rezeptoren mit RNase A inkubiert wurden, ist in Abbildung 15A für Panc1-Zellen dargestellt. Eine Assoziation von Drosha bzw. DGCR8 mit TRAIL-R2 war nach Behandlung mit RNase A vollkommen aufgehoben, wobei diese Behandlung zu keiner Veränderung der Menge von untersuchten Proteinen im Lysat geführt hat (Abbildung 15B). In keinem der beiden Immunpräzipitationsansätze konnte TRAIL-R1 in Komplexen mit Drosha oder DGCR8 gefunden werden.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Interaktion von TRAIL-R2 mit Drosha und DGCR8 RNA vermittelt ist.

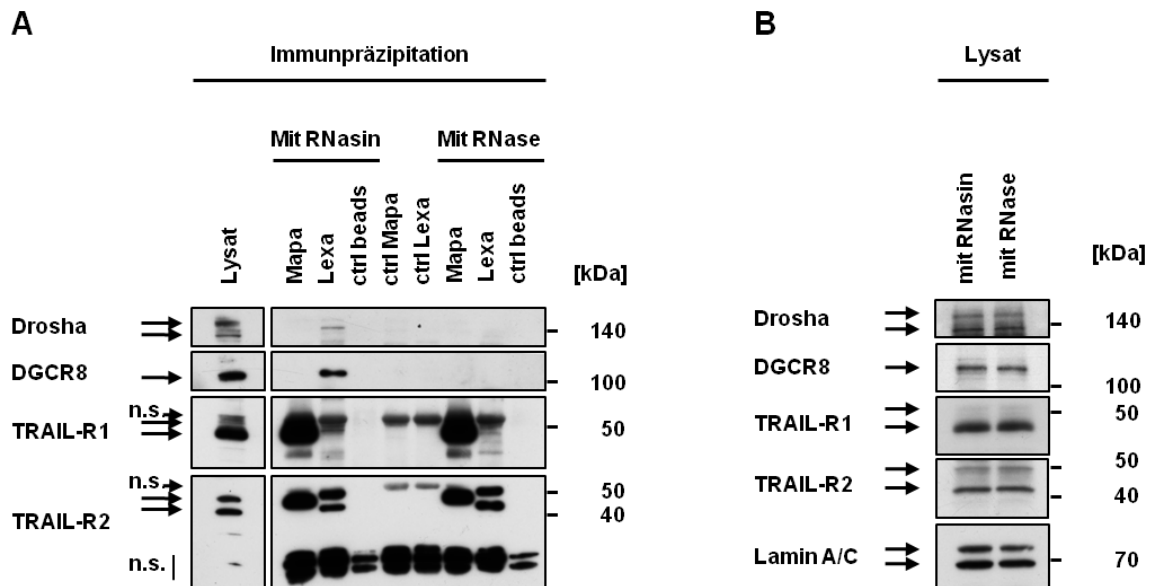


Abbildung 15: Analyse der RNA-Abhängigkeit der Interaktion von TRAIL-R2 mit Drosha und DGCR8

A: TRAIL-R1 und TRAIL-R2 wurden über die Antikörper Mapatumumab (Mapa) und Lexatumumab (Lexa) aus mit RNasin oder RNase A behandelten Kernextrakten von Panc1-Zellen präzipitiert. Als Kontrollen wurden Antikörper alleine (ctrl Mapa, ctrl Lexa) sowie je Kernextrakt mit und ohne RNase-Behandlung ohne Antikörper (ctrl beads) mit Protein-G Sepharose Beads inkubiert und parallel analysiert. Die präzipitierten Rezeptorkomplexe wurden mittels Western-Blot-Technik auf die Präsenz von TRAIL-R1, TRAIL-R2, Drosha und DGCR8 hin untersucht. Zusätzlich wurden im gleichen Gel jeweils 20 µg des unbehandelten Kernextraktes aufgetragen und im identischen Western-Blot analysiert.

B: Von dem mit RNasin versetzten Kernlysat und dem mit RNase A inkubierten Kernextrakten aus Panc1-Zellen wurden jeweils 20 µg im Western-Blot hinsichtlich der enthaltenen Menge von TRAIL-R1, TRAIL-R2, Drosha und DGCR8 untersucht. Als Ladungskontrolle wurde parallel die Expression von Lamin A/C analysiert.

3.6 Etablierung eines Transfektionsmodells zur Analyse der nukleären Funktion von TRAIL-Todesrezeptoren

MiRNAs sind als einzelsträngige RNA-Moleküle an der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression zahlreicher zellulärer Prozesse wie Inflammation, Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Park & Peter, 2008, Ambros et al., 2004). Der Mikroprozessor-Komplex stellt einen wichtigen Regulator in der Biogenese von miRNAs dar. Für die als neue Interaktionspartner von TRAIL-Todesrezeptoren identifizierten Proteine p68, NF45, NF90 und hnRNPA1 konnte gezeigt werden, dass sie an der Reifung der let-7-Familie von miRNAs, wichtigen Regulatoren der embryonalen Entwicklung und

Tumorigenese, beteiligt sind. Für die Helikase p68 wurde belegt, dass sie als positiver Regulator bei der Reifung von let-7 fungiert (Salzmann et al., 2007; Fukuda et al., 2007), wohingegen hnRNPA1 die entgegengesetzte Funktion ausübt. Es bindet pri-let-7 und inhibiert damit dessen Prozessierung durch den Mikroprozessor-Komplex (Michlewski & Caceres, 2010). Für NF45 und NF90 wurde nachgewiesen, dass sie in einer ähnlichen Art und Weise wie hnRNPA1 die Reifung von let-7 inhibieren (Sakamoto et al., 2009).

Um einen möglichen Einfluss von TRAIL-Todesrezeptoren auf die Biogenese von let-7 untersuchen zu können, musste zunächst ein passendes Transfektionsmodell als experimentelles Werkzeug etabliert werden.

Hierfür wurden Panc1-Zellen mit TRAIL-R1 und TRAIL-R2 siRNA transient transfiziert und für 48 bis 96 h kultiviert. Die Western-Blot-Analyse der Ganzzelllysate der transfizierten Zellen (Abbildung 16) zeigt, dass die Transfektion erfolgreich war, da die Expression von TRAIL-R1 bzw. die von TRAIL-R2 durch die entsprechende siRNA inhibiert werden konnte. Im Gegensatz dazu führte weder eine Transfektion mit TRAIL-R1 siRNA zu einer verminderten Expression von TRAIL-R2, noch eine Transfektion mit TRAIL-R2 siRNA zu einem reduzierten Nachweis von TRAIL-R1. Auf diese Weise konnte die Spezifität der verwendeten siRNAs bewiesen werden. Zudem wurde in den Transfektionsversuchen ersichtlich, dass es bereits nach 48 h zu einer deutlichen Reduktion der Expression der beiden TRAIL-Todesrezeptoren kam.

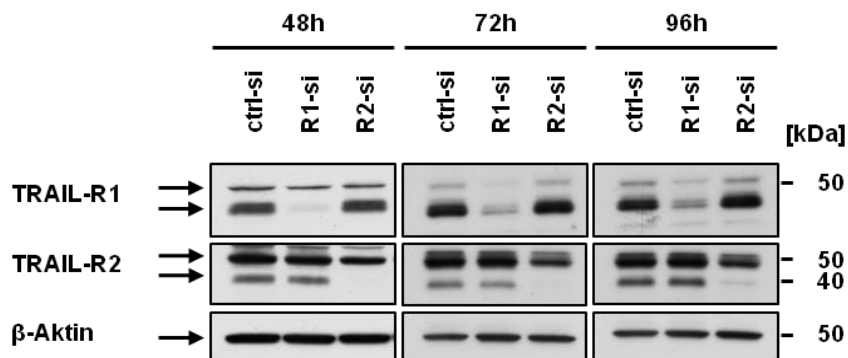


Abbildung 16: Transfektion von Panc1-Zellen mit siRNA gegen TRAIL-R1 und TRAIL-R2

Panc1-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl-si), TRAIL-R1 siRNA (R1-si) oder TRAIL-R2 siRNA transient transfiziert. 48, 72 oder 96 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot-Technik hinsichtlich der Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde parallel die Expression von β -Aktin untersucht.

Um allerdings die funktionelle Relevanz einer konstitutiven Expression der beiden TRAIL-Rezeptoren im Zellkern untersuchen zu können, musste die optimale Transfektionsdauer für eine Herunterregulation der Rezeptoren in diesem zellulären Kompartiment ermittelt werden. Dazu wurden erneut Panc1-Zellen mit TRAIL-R1 und TRAIL-R2 siRNA transient für 48 h, 72 h und 96 h transfiziert und anschließend die Zellen fraktioniert. Die Ergebnisse der Fraktionierung in Abbildung 17A demonstrieren, dass es bereits nach 48 h zu einer deutlich verminderten Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Zellkern kam, wohingegen eine Reduktion der Expression im Zytoplasma erst nach 72 h bei deutlich verkürzter Expositionsdauer des Röntgenfilms (Abbildung 17B) zu erkennen war.

Für die nachfolgenden Experimente zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der nukleären Expression von TRAIL-Todesrezeptoren wurde in Übereinstimmung mit den vorausgegangenen Versuchen die optimale Transfektionsdauer auf 48 h festgelegt.

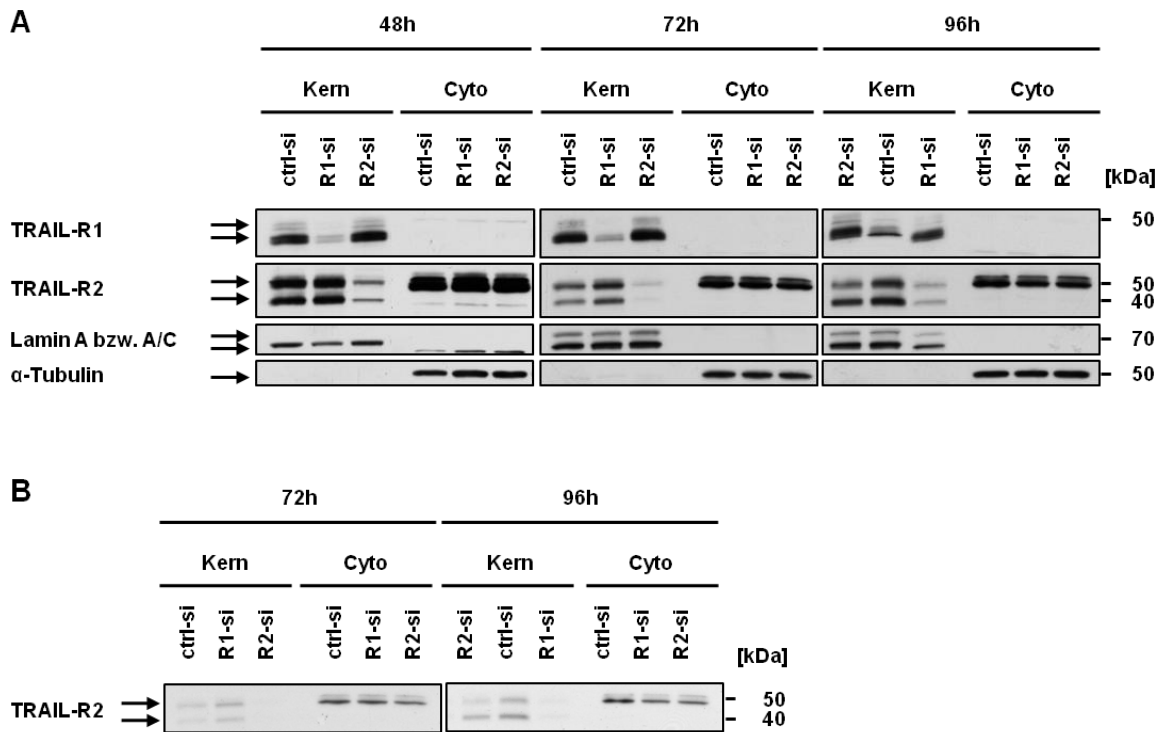


Abbildung 17: Analyse der Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Zellkern nach Transfektion mit siRNA

A: Panc1-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl-si), TRAIL-R1 siRNA (R1-si) oder TRAIL-R2 siRNA (R2-si) transfiziert. Nach 48, 72 oder 96 h wurden die Zellen fraktioniert und anschließend mittels Western-Blot-Analyse die Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Zellkern und Zytoplasma untersucht. Als Kontrolle für die Reinheit der Fraktionierung sowie als Ladungskontrolle wurden Lamin A/C als Kennprotein für die Kernfraktion und α -Tubulin als Kennprotein für die zytoplasmatische Fraktion parallel bestimmt.

B: Die Darstellung zeigt die Transfektionsversuche aus A mit kürzerer Expositionsdauer des Röntgenfilms, um Expressionsunterschiede der TRAIL-Rezeptoren im Zytoplasma erkenntlich zu machen.

3.7 TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von let-7

Ziel der nachfolgenden Experimente war es, zu untersuchen, ob TRAIL-Todesrezeptoren an der Regulation der Reifung von let-7 beteiligt sind. Dazu wurde in Panc1-Zellen die Expression von TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 durch Transfektion mit siRNA inhibiert und die Menge von reifen let-7-Spezies in den transfizierten Zelllysaten nach Aufreinigung der Gesamt-RNA mittels TaqMan-RT-PCR quantifiziert.

Wie Abbildung 18A zeigt, war die Transfektion erfolgreich, da sich sowohl TRAIL-R1 bei Transfektion mit TRAIL-R1 siRNA als auch TRAIL-R2 bei Transfektion mit TRAIL-R2 siRNA nur noch sehr schwach in der Western-Blot-Analyse nachweisen ließen. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Expression der größeren Form von TRAIL-R1 durch siRNA nur im geringen Maße inhibiert werden konnte.

Die Quantifizierung der reifen let-7 miRNAs in den transfizierten Zellen (Abbildung 18B) ergab, dass es nach Herunterregulation von TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 in der Tat zu einer gesteigerten Expression der reifen miRNAs let-7a, let-7b, let-7d und let-7g kam. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Proteininteraktionsstudien übte eine Inhibition von TRAIL-R1 dabei einen quantitativ geringeren Einfluss auf die Menge von let-7 aus als es bei einer reduzierten Expression von TRAIL-R2 zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung von RNU6B anstelle von GAPDH als Normalisierungskontrolle erzielt (Haselmann et al., 2014).

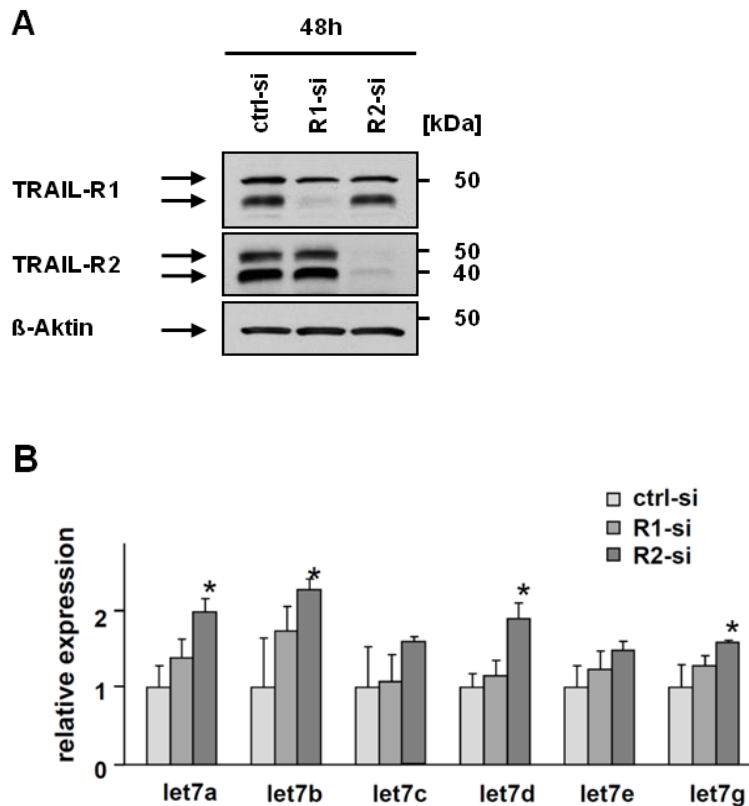


Abbildung 18: TRAIL-Rezeptoren regulieren die Expression von let-7

A: Panc1-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl-si), TRAIL-R1 siRNA (R1-si) oder TRAIL-R2 siRNA (R2-si) für 48 h transient transfiziert und anschließend lysiert. Die Ganzzelllysate wurden mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich der Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 untersucht. Als Ladungskontrolle wurde die Expression von β -Aktin bestimmt.

B: Aus parallel durchgeführten Transfektionen ($n=3$) wurde RNA aufgereinigt und die Expressionsstärke der einzelnen let-7 Familienmitglieder mittels real time RT-PCR unter Verwendung kommerzieller Assays analysiert. Die Expression von let-7 wurde in allen Proben auf die Menge von GAPDH normalisiert. Die Effekte der siRNA gegen TRAIL-R1 (R1-si) und TRAIL-R2 (R2-si) wurden auf die Expressionsstärke in Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden (ctrl-si), normalisiert. Jeder Balken repräsentiert den Durchschnittswert aus 3 biologischen und 2 technischen Replikaten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die mit einem Stern (*) markierten let-7-Spezies zeigen einen signifikanten Expressionsunterschied zwischen Transfektion mit Kontroll-siRNA und spezifischer siRNA. Die Signifikanz wurde mit dem univariaten ANOVA-Test bestimmt ($p \leq 0,05$).

3.8 TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von let-7 Zielprotein Lin28B

Um die funktionelle Relevanz einer TRAIL-R1- bzw. TRAIL-R2-vermittelten Regulation von let-7 zu untersuchen, wurde der Einfluss einer Inhibition der beiden TRAIL-Todesrezeptoren auf die Expression von Lin28B untersucht. Das RNA-bindende Protein Lin28B ist ein Marker für Pluripotenz und unterliegt der inhibitorischen Kontrolle durch let-7. Es stellt somit eines der Zielproteine dieser miRNA-Familie dar (Rybak et al., 2008).

Abbildung 19A (Western Blot) sowie dessen densitometrische Auswertung (Abbildung 19B links) zeigt, dass eine transiente Hemmung der Expression von TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 zu einer verminderten Menge von Lin28B um 60 % bzw. 66 % führte.

Der Vergleich zwischen einer isolierten Inhibition der Expression der TRAIL-Todesrezeptoren mit einer gleichzeitig zusätzlichen Inhibition von let-7 durch eine Kotransfektion mit einem spezifischen Inhibitor von let-7 (let-7 LNA) bzw. einem Kontroll-Oligonukleotid (anti-miR Kontroll-LNA) erlaubte die Analyse, inwieweit der mögliche Einfluss von TRAIL-Todesrezeptoren auf Lin28B über let-7 vermittelt wird. Der eingesetzte pan-let-7-spezifische LNA Inhibitor ist in der Lage, die Expression aller Mitglieder der let-7 miRNA-Familie zu reduzieren (Boyerinas et al., 2009).

Wie im Western-Blot (Abbildung 19A) und dessen densitometrische Auswertung (Abbildung 19B rechts) deutlich wird, kam es nach Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA zusammen mit dem anti-let-7 LNA Inhibitor zu einem moderaten Anstieg der Expression von Lin28B und zwar um das 2,3fache. Dies ermöglichte den Rückschluss, dass Panc1-Zellen zumindest in geringem Maße konstitutiv let-7 exprimieren. Eine gleichzeitige Transfektion der Zellen mit LNA-anti-let-7 und TRAIL-R1 siRNA bzw. TRAIL-R2 siRNA führte hingegen zu einer Zunahme der Expression von Lin28B um das 3,9fache bzw. das 8,1fache. Die Zunahme der Expression von Lin28B war demnach deutlich stärker als durch den Effekt des let-7 Inhibitors in Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, hervorgerufen wurde.

Die Versuche konnten in keiner der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien verifiziert werden, da Lin28B außer von Panc1-Zellen von keiner weiteren dieser Zelllinien exprimiert wird.

Zusammengefasst demonstrieren die Ergebnisse, dass eine Herunterregulation der TRAIL-Todesrezeptoren zu einer verminderten Expression von Lin28B führte und zwar

infolge einer Zunahme von reifem let-7. Es konnte somit gezeigt werden, dass der Einfluss auf Lin28B über let-7 vermittelt wird und die TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern somit eine funktionelle Rolle bei der Biogenese von let-7 spielen.

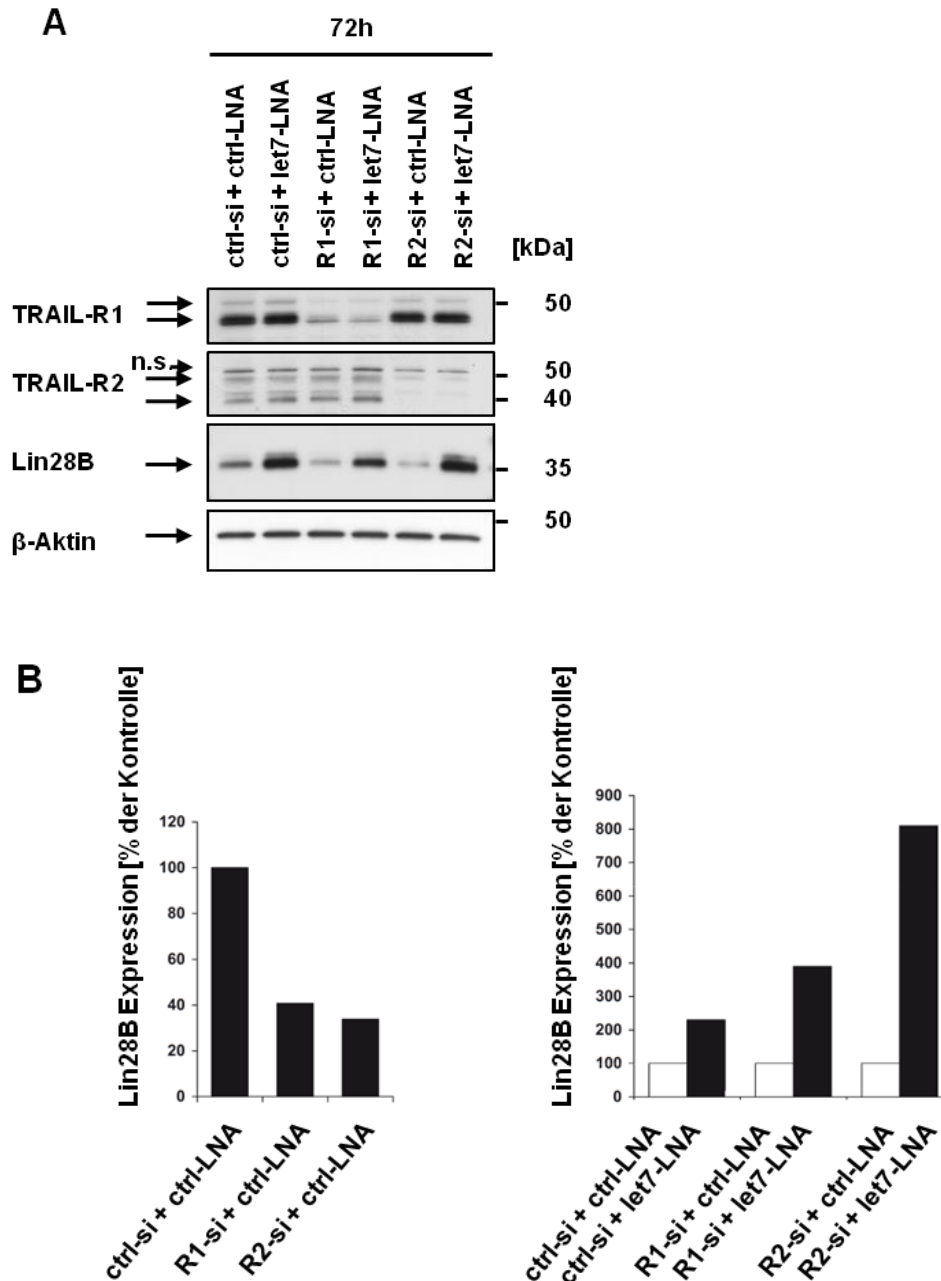


Abbildung 19: TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von let-7 Zielprotein Lin28B

A: Panc1-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl-si), TRAIL-R1 siRNA (R1-si) oder TRAIL-R2 siRNA (R2-si) zusammen mit anti-miR Kontroll-LNA Oligonukleotiden (ctrl-LNA) oder anti-let-7 LNA (let7-LNA) für 72 h doppeltransfiziert. Die Ganzzelllysate der transfizierten Zellen wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im Western-Blot hinsichtlich der Präsenz von TRAIL-R1, TRAIL-R2 und Lin28B analysiert. Parallel wurde als Ladungskontrolle die Expression von β -Aktin untersucht.

B: Die Expression von Lin28B wurde densitometrisch mit der Image-J Software (Rasband, 1997-2011) untersucht und auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Linke Abbildung: Die Expression von Lin28B in den mit Kontroll-siRNA (ctrl-si) und anti-miR Kontroll-LNA Oligonukleotiden (ctrl-LNA) transfizierten Zellen wurde dabei auf 100 % gesetzt und die Expression bei Verwendung von R1-si oder R2-si in Bezug darauf angegeben. Rechte Abbildung: Die Expression von Lin28B in den mit Kontroll-siRNA (ctrl-si), TRAIL-R1 siRNA (R1-si) oder TRAIL-R2 siRNA (R2-si) und Kontroll-LNA (ctrl-LNA) transfizierten Zellen wurde jeweils auf 100 % gesetzt und die Expression von Lin28B bei Transfektion von anti-let-7 LNA (let7-LNA) in Relation dazu angegeben.

3.9 TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von let-7 Zielprotein HMGA2

Das am besten charakterisierte Zielprotein von let-7 ist das high mobility group A2 Protein, HMGA2 (Mayr et al., 2007; Shell et al., 2007; Lee & Dutta, 2007), welches als architektonischer Transkriptionsfaktor die Transkription zahlreicher Gene beeinflusst. Die Korrelation der Expression von HMGA2 ist in gleicher Weise wie die von Lin28B invers zu der von let-7. Es wird in undifferenzierten Zellen während der Embryogenese exprimiert und seine Expression während der Differenzierung der Zellen herunterreguliert, so dass es sich in adulten, differenzierten Geweben nicht nachweisen lässt. Seine Reexpression in unterschiedlichen Tumoren wird dabei für eine Tumorumprogression verantwortlich gemacht (Cleyen & Van de Ven, 2008).

Da in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern an der Biogenese von let-7 beteiligt sind, sollte nachfolgend untersucht werden, ob sie ebenfalls die Expression von HMGA2 beeinflussen können.

Zu diesem Zweck wurden Panc1-Zellen transient mit Kontroll-siRNA, TRAIL-R1 siRNA oder TRAIL-R2 siRNA für 48 h transfiziert. Die Analyse der Expression von HMGA2 im Western-Blot (Abbildung 20A) zeigt, dass sowohl eine Behandlung mit TRAIL-R1 siRNA als auch mit TRAIL-R2 siRNA in einer verminderten Expression von HMGA2 resultierten. Die Inhibition von TRAIL-R2 zeigte erneut einen stärkeren Effekt als die von TRAIL-R1. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse ließen sich auch auf mRNA-Ebene bestätigen. Wie in Abbildung 20B dargestellt, führte eine Inhibition von TRAIL-R2 zu einer stärkeren Reduktion der mRNA von HMGA2 als eine verminderte Expression von TRAIL-R1.

Eine Hemmung der Expression von TRAIL-Todesrezeptoren führte demnach zu einem verminderten Nachweis von HMGA2 sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene. Dies ließ den Rückschluss zu, dass let-7 nicht die Translation von HMGA2 hemmte, sondern aufgrund seiner nahezu perfekten Komplementarität zur mRNA von HMGA2 zu dessen Degradation führte.

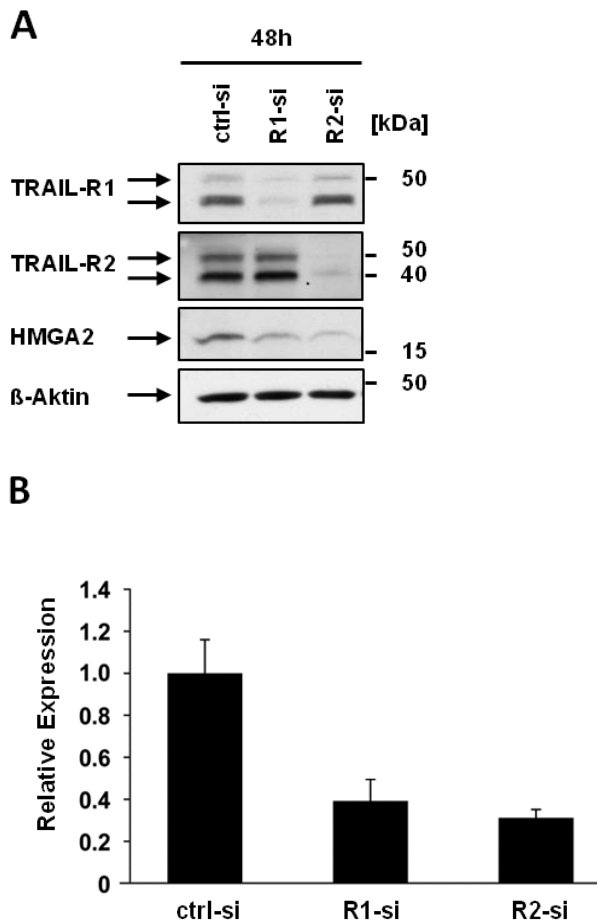


Abbildung 20: TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von HMGA2

A: Panc1-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl-si), TRAIL-R1 siRNA (R1-si) oder TRAIL-R2 siRNA (R2-si) transient transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Ganzzelllysate wurden mittels Western-Blot-Technik hinsichtlich der Expression von TRAIL-R1, TRAIL-R2 und HMGA2 untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von β -Aktin als Ladungskontrolle bestimmt.

B: Aus den Ganzzelllysaten von parallel transfizierten Panc1-Zellen wurde die Gesamt-RNA aufgereinigt und die Expression von HMGA2 und GAPDH parallel mittels real-time RT-PCR untersucht. Die Expression von HMGA2 wurde auf GAPDH normalisiert. Im Diagramm dargestellt ist der Mittelwert aus drei Wiederholungen mit der jeweiligen Standardabweichung. Die Expression von HMGA2 in mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt und die Expression in mit TRAIL-R1 siRNA oder TRAIL-R2 siRNA behandelten Zellen in Relation dazu dargestellt.

Die Beteiligung von let-7 an der TRAIL-R1- bzw. TRAIL-R2-vermittelten Regulation der Expression von HMGA2 wurde analog zu den Versuchen für Lin28B (siehe Abschnitt 3.8) unter Verwendung spezifischer let-7 Inhibitoren untersucht. Zu diesem Zweck wurden Panc1-Zellen mit Kontroll-siRNA, TRAIL-R1 siRNA oder TRAIL-R2 siRNA zusammen mit anti-miR Kontroll-LNA Oligonukleotiden oder dem pan-let-7 LNA Inhibitor für 48, 72 und 96 h doppelt transfiziert. Eine Inhibition von TRAIL-R1 führte zu einer geringeren Reduktion der Expression von HMGA2 auf Proteinebene als es für TRAIL-R2 im Western-Blot nachgewiesen werden konnte (Abbildung 21). Die gleichzeitige Transfektion mit dem let-7-Inhibitor führte in gleicher Weise wie für Lin28B beschrieben zu einer Aufhebung der durch Herunterregulation der TRAIL-Todesrezeptoren hervorgerufenen Effekte. Dementsprechend war let-7 in die Regulation der Expression von HMGA2 durch TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 ebenfalls involviert. Zudem konnte durch die Variation der Transfektionsdauer nachgewiesen werden, dass der Einfluss einer Inhibition der Expression der TRAIL-Todesrezeptoren auf die Expression von HMGA2 nach 96 h am stärksten ausgeprägt war.

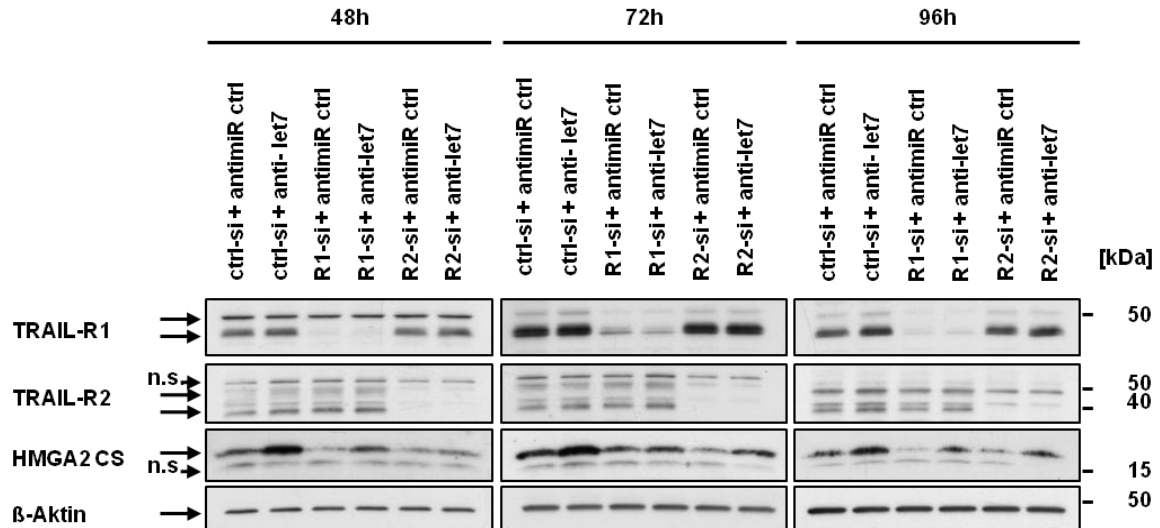


Abbildung 21: TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von HMGA2 über let-7 in Panc1-Zellen

Panc1-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl-si), TRAIL-R1 siRNA (R1-si) oder TRAIL-R2 siRNA (R2-si) zusammen mit anti-miR Kontroll-LNA Oligonukleotiden (anti-miR ctrl) oder anti-let-7 LNA für 48, 72 und 96 h doppelt transfiziert und anschließend lysiert. Die elektrophoretisch aufgetrennten Ganzzelllysate wurden mittels Western-Blot-Technik hinsichtlich der Expression von TRAIL-R1, TRAIL-R2 und HMGA2 sowie von β -Aktin als Ladungskontrolle untersucht.

Die in Panc1-Zellen nachgewiesene let-7-abhängige Regulation der Expression von HMGA2 durch TRAIL-Todesrezeptoren wurde auch für eine weitere Pankreasadenokarzinomazelllinie BxPC3 gezeigt (Abbildung 22).

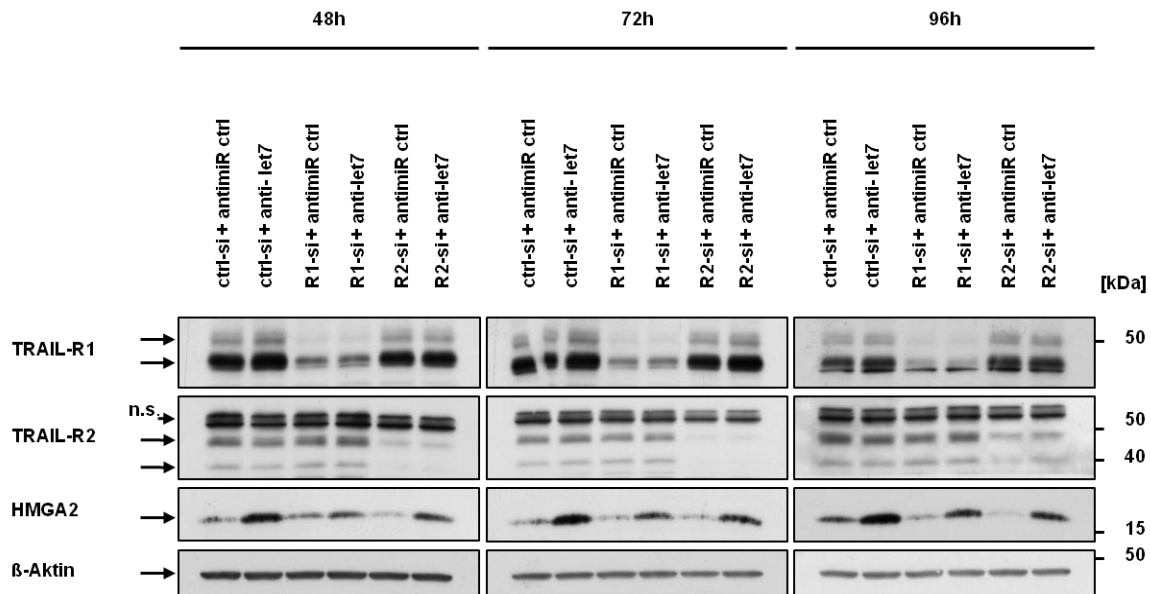


Abbildung 22: TRAIL-Todesrezeptoren regulieren die Expression von HMGA2 über let-7 in BxPC3-Zellen

BxPC3-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl-si), TRAIL-R1 siRNA (R1-si) oder TRAIL-R2 siRNA (R2-si) zusammen mit anti-miR Kontroll-LNA Oligonukleotiden (antimiR ctrl) oder anti-let-7 LNA für 48, 72 und 96 h doppelt transfiziert und anschließend lysiert. Die elektrophoretisch aufgetrennten Ganzzelllysate wurden mittels Western-Blot-Technik hinsichtlich der Expression von TRAIL-R1, TRAIL-R2 und HMGA2 sowie von β -Aktin als Ladungskontrolle untersucht.

3.10 TRAIL-Todesrezeptoren fördern die Proliferation von Tumorzellen

HMGA2 ist an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt wie zum Beispiel an der Zelldifferenzierung und der Proliferation (Sgarra et al., 2009). Auch konnte für HMGA2 gezeigt werden, dass es die Proliferation verschiedener Tumorzellen stimuliert (Watanabe et al., 2009; Cleyne & Van de Ven, 2008).

In den vorausgegangen Experimenten wurde nachgewiesen, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 die Expression von HMGA2 regulieren. Um zu untersuchen, ob der Einfluss von TRAIL-Todesrezeptoren auf HMGA2 funktionell relevant war, sollte eine mögliche Beteiligung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 an der Regulation der Zellproliferation überprüft werden.

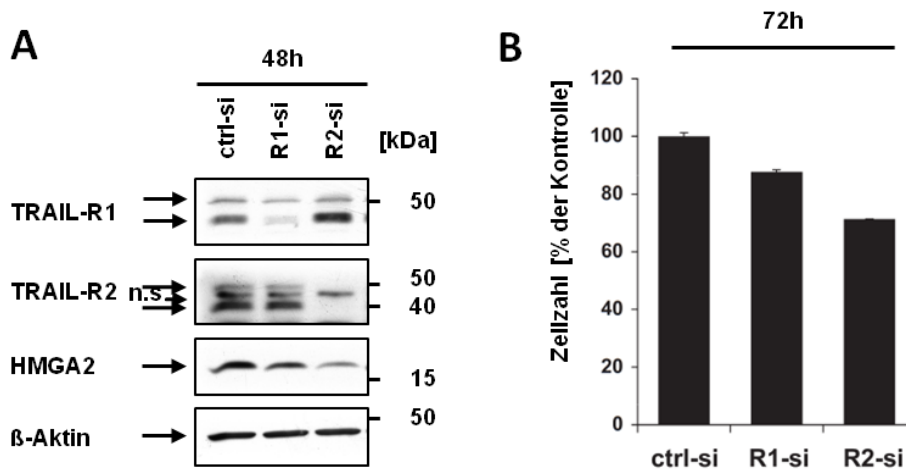


Abbildung 23: TRAIL-R1 und TRAIL-R2 regulieren die Proliferation von Panc1-Zellen

Panc1-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl-si), TRAIL-R1 siRNA (R1-si) oder TRAIL-R2 siRNA (R2-si) transient transfiziert und lysiert.

A: Die Ganzzelllysate wurden 48 h nach Transfektion hergestellt und im Western-Blot hinsichtlich der Expression von TRAIL-R1, TRAIL-R2 und HMGA2 untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von β-Aktin als Ladungskontrolle bestimmt.

B: Die Proliferation der Zellen wurde mittels Zellzählung 72 h nach Transfektion bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus Triplikaten mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Zellzahl in mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt und die Zellzahl in mit TRAIL-R1 siRNA oder TRAIL-R2 siRNA transfizierten Zellen in Relation dazu angegeben.

Hierzu wurden Panc1-Zellen transient mit Kontroll-siRNA oder spezifischer siRNA gegen TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 transfiziert und das Ausmaß der Zellproliferation durch Zellzählung bestimmt. Wie in Abbildung 23A dargestellt, führte eine Inhibition von TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 zu einem reduzierten Nachweis von HMGA2 in der Western-Blot-Analyse. Entsprechend war auch die Zellzahl bei der Zellzählung vermindert (Abbildung 23B). Da nach Transfektion der Zellen mit TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 siRNA keine Zunahme des Zelltods zu beobachten war (Daten nicht gezeigt), konnte die dargestellte Abnahme der Zellzahl in der Tat auf eine Inhibition der Zellproliferation zurückgeführt werden.

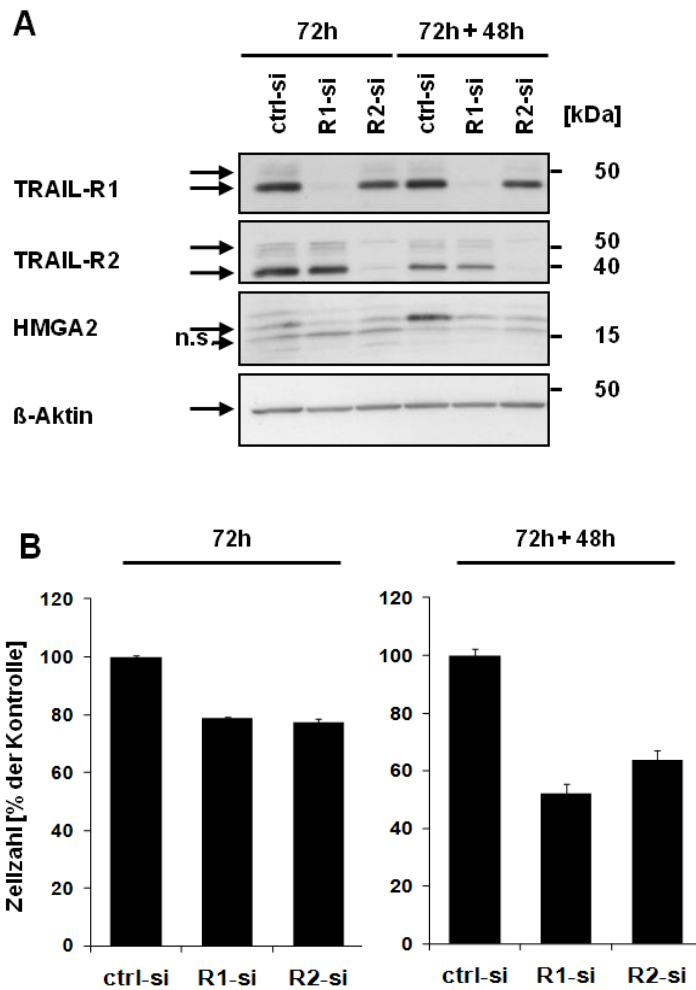


Abbildung 24: TRAIL-Rezeptoren regulieren die Proliferation von HCT116-Zellen

HCT116-Zellen wurden im doppelten Ansatz mit spezifischer siRNA für TRAIL-R1 (R1-si), für TRAIL-R2 (R2-si) oder Kontroll-siRNA transient für 72 h transfiziert. Anschließend wurde je ein Ansatz nach Zellzählung lysiert. Die Zellen des anderen Ansatzes wurden neu ausgesät und nach 24 h erneut mit der entsprechenden siRNA für 48 h transient transfiziert und anschließend nach Zellzählung lysiert.

A: Die Ganzzelllysate wurden nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in der PAGE-Gelelektrophorese mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich der Expression von TRAIL-R1, TRAIL-R2, HMGA2 sowie β -Aktin als Ladungskontrolle untersucht.

B: Die nach Transfektion ermittelte Zellzahl wurde separat für eine Transfektionsdauer von 72 h und von 72 + 48 h ermittelt und als Mittelwert aus je Triplikaten im Balkendiagramm zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt. Die Zellzahl der nur mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurde als 100 % abgebildet und die Zellzahl in den mit TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 transfizierten Zellen in Relation dazu angegeben.

Der Einfluss von TRAIL-Todesrezeptoren auf die Proliferation sollte nachfolgend in einer weiteren Zelllinie bestätigt werden.

Die in Abbildung 24A dargestellte Western-Blot-Analyse zeigt, dass eine Inhibition von TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 mit der entsprechenden siRNA zu einer verminderten Expression von HMGA2 in HCT116-Zellen führte. Entsprechend kam es auch hier zu einer Abnahme der Zellproliferation, was an der verminderten Zellzahl (Abbildung 24B) zu erkennen war. Der Effekt einer Herunterregulation der TRAIL-Rezeptoren auf die Expression von HMGA2 sowie auf die Proliferation war bei einer Transfektionsdauer von insgesamt 144 h stärker ausgeprägt als bei 72stündiger Transfektion.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass nukleäre TRAIL-Todesrezeptoren als positive Regulatoren der Zellproliferation fungieren.

4 Diskussion

Die am besten verstandene Funktion von TRAIL ist die Induktion der Apoptose über seine beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Falschlehner et al., 2007). Die Beobachtung, dass TRAIL Apoptose präferentiell in Tumorzellen auslöst ohne zytotoxische Effekte auf die meisten gesunden Zellen und Gewebe auszuüben, hat zur Entwicklung TRAIL-basierter Tumorthérapien geführt (Walczak et al., 1999; Ashkenazi et al., 1999; Di Pietro & Zauli, 2004). Eine weitere Eigenschaft, weswegen TRAIL-Rezeptoren ein attraktives Ziel für die Krebstherapie darstellen, ist ihre Fähigkeit Apoptose in p53 mutierten Zellen zu induzieren. Im Gegensatz dazu ist die optimale Wirkung von Chemotherapeutika und Radiatio auf die Funktion des Tumorsuppressors p53 angewiesen. In über der Hälfte aller menschlichen Tumoren konnten inaktivierende Mutationen von p53 nachgewiesen werden, die zur Therapieresistenz führen. Somit stellen TRAIL-basierte Therapieansätze eine Möglichkeit dar, auch p53-defiziente Tumoren effektiv behandeln zu können und ebenfalls synergistisch mit Chemotherapeutika oder Radiatio zu wirken (Wiezorek et al., 2010; Wang & El-Deiry, 2003; Ashkenazi et al., 1999). Aufgrund dieser beschriebenen Vorteile werden rekombinantes TRAIL (rTRAIL) und agonistische anti-TRAIL-R1 und anti-TRAIL-R2 spezifische Antikörper, insbesondere in Form von Kombinationstherapien, bereits in klinischen Phase I-II Studien getestet (Micheau et al., 2013; Wiezorek et al., 2010).

Inzwischen konnte aber auch gezeigt werden, dass eine große Anzahl von Tumoren bzw. Tumorzelllinien TRAIL-resistent sind (Falschlehner et al., 2009) oder im Verlaufe einer TRAIL-basierten Therapie durch Selektion resistenter Zellen eine Resistenz entwickeln (Zhang et al., 2005). Insbesondere in diesen Zellen kann es infolge einer systemischen Administration von rTRAIL oder agonistischen, Rezeptor-spezifischen Antikörper auch zur Aktivierung nicht-apoptotischer Signalwege kommen mit der Folge von Inflammation, Zellproliferation, Migration, Invasion, Metastasierung und Apoptoseresistenz (Azijli et al., 2013; Röder et al., 2010; Trauzold et al., 2006; Ishimura et al., 2006; Hoogwater et al., 2010; Falschlehner et al., 2007). Daher müssen für eine sichere und effiziente Tumorthérapie rekombinantes TRAIL oder agonistische Antikörper mit anderen Therapeutika kombiniert werden, die die Tumorzellen sensibilisieren und gleichzeitig die nicht-apoptotischen Signalwege inhibieren. Die Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber anti-TRAIL-R1 oder anti-TRAIL-R2 spezifischen Antikörpern birgt aber auch die Gefahr, dass die zytotoxischen Wirkungen auf gesunde Zellen verstärkt werden, da beide

Rezeptoren nahezu ubiquitär exprimiert werden (Secchiero et al., 2012). Die physiologischen Funktionen des TRAIL/TRAIL-Rezeptorsystems scheinen deutlich komplexer zu sein als bisher angenommen, so dass für die Entwicklung einer rationalen Therapie ein fundierteres Verständnis dieses Systems und seiner Funktionen notwendig ist.

Die Signaltransduktion apoptotischer und nicht-apoptotischer Signalwege durch die beiden TRAIL-Todesrezeptoren erfolgt nach ihrer Aktivierung durch ihren Liganden TRAIL oder durch spezifische agonistische Antikörper. Dementsprechend sind alle bislang bekannten Funktionen der beiden Rezeptoren abhängig von ihrer Expression auf der Plasmamembran.

Daneben konnte in unterschiedlichen Studien, insbesondere durch immunhistochemische Analysen verschiedener Tumoren, gezeigt werden, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch im Zytoplasma (Ganten et al., 2009; Macher-Goeppinger et al., 2009; Oikonomou et al., 2009; Sanlioglu et al., 2007; Spierings et al., 2003) und Zellkern (Bai et al., 2009; Leithner et al., 2009; Peternel et al., 2011; Kojima et al., 2011) exprimiert werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die zelluläre Verteilung der beiden TRAIL-Todesrezeptoren mittels Immunfluoreszenz und Fraktionierungsversuchen in unterschiedlichen Tumorzelllinien untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Rezeptoren im Zytoplasma und TRAIL-R2 vor allem im Zellkern aller untersuchten Zelllinien exprimiert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den oben beschriebenen immunhistochemischen Analysen zur zellulären Verteilung der TRAIL-Todesrezeptoren. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in zahlreichen Tumoren im Vergleich zum jeweiligem Normalgewebe vermehrt exprimiert werden (Mahalingam et al., 2008). Eine Korrelation zwischen einer gesteigerten Expression von TRAIL-R2 und einer schlechten klinischen Prognose konnte zudem für unterschiedliche Tumorentitäten nachgewiesen werden (Ganten et al., 2009; Macher-Goeppinger et al., 2009; Spierings et al., 2003). Somit scheint eine Überexpression von TRAIL-R1/TRAIL-R2 einen Vorteil für Tumorzellen darzustellen (Ganten et al., 2009; Macher-Goeppinger et al., 2009; Oikonomou et al., 2009; Sanlioglu et al., 2007; Spierings et al., 2003). Dazu passt der kürzlich von der AG Trauzold geführte Beweis, dass eine vermehrte Expression von TRAIL-R2 im Zellkern mit einem schlechteren klinischen

Outcome bei Patienten mit Pankreasadenokarzinom assoziiert ist (Haselmann et al., 2014). Im Gegensatz dazu beschreiben *Leithner et al.* allerdings, dass ein vermehrter zytoplasmatischer und nukleärer Nachweis von TRAIL-R2 einen positiven Prognosemarker bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC darstellt (Leithner et al., 2008). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz besteht darin, dass alle Patienten in dieser Studie bereits mit Chemotherapeutika oder Radiatio vorbehandelt wurden, was bei intakter Funktion von p53 zu dessen Induktion führt (Kemp et al., 2001). P53 steigert seinerseits die Expression von TRAIL-R2 (Wu et al., 1997), so dass der vermehrte Nachweis von TRAIL-R2 in diesem Fall als Resultat einer fehlenden Mutation von p53 gedeutet und somit für die bessere Überlebensrate der Patienten ursächlich sein könnte. Erstaunlicherweise ließ sich TRAIL-R2 vermehrt in Pankreastumorzellen nachweisen, die charakteristische Stammzelleigenschaften aufwiesen (Rajeshkumar et al., 2010). Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass während der Entwicklung des zentralen Nervensystems TRAIL-R2 vermehrt in Proliferationszonen exprimiert wird und hier insbesondere im Zellkern (Niu et al., 2012), was eine Proliferations-assoziierte Funktion von nukleärem TRAIL-R2 vermuten lässt. Allerdings wurde die funktionelle Relevanz der nukleären Expression der TRAIL-Todesrezeptoren bislang nicht untersucht.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung der Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Zellkern unterschiedlicher Tumorzelllinien untersucht. Durch die Analyse von TRAIL-Rezeptor-Komplexen aus Gesamtzelllysaten nicht-stimulierter Tumorzellen konnte zunächst die Interaktion von TRAIL-R2 mit den nukleären Proteinen p68, hnRNPA1 und NF45 verifiziert sowie NF90/110 als neuer Bindungspartner von TRAIL-R2 identifiziert werden. Mittels Untersuchung der Rezeptorkomplexe in Kernextrakten und Immunfluoreszenzfärbungen ließ sich bestätigen, dass die beschriebenen Proteininteraktionen tatsächlich im Zellkern stattfinden. Hierbei gelang zudem der Nachweis, dass die genannten Proteine mit Ausnahme von p68 auch mit TRAIL-R1 interagieren. Da alle der identifizierten Proteine am großen Mikroprozessor-Komplex beteiligt sind (Gregory et al., 2004), wurden die Rezeptorkomplexe hinsichtlich einer möglichen Expression der RNase III Drosha sowie seines Bindungspartners DGCR8 untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Assoziation mit TRAIL-R2, wohingegen die Interaktion mit TRAIL-R1 genau wie bei den übrigen Proteinen wesentlich schwächer nachgewiesen werden konnte.

Eine mögliche Erklärung für den geringeren Nachweis der präzipitierten Proteine in TRAIL-R1-Komplexen könnte darin bestehen, dass die entsprechenden Bindungsstellen nur schwer zugänglich waren. Für NF45 sowie NF90/110 wurde beschrieben, dass sie im Zellkern größere Komplexe mit p68 sowie hnRNPA1 und anderen Proteinen ausbilden, die multiple NF90/110 Isoformen enthalten (Guan et al., 2008). Bei Beteiligung von TRAIL-R1 an dieser Komplexbildung könnten somit seine Antikörperbindungsstellen blockiert gewesen sein, so dass in erster Linie nur frei zugänglicher TRAIL-R1 präzipitiert wurde. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass bedingt durch die Ausbildung von TRAIL-R1/TRAIL-R2-Heterokomplexen die Proteine nur aufgrund ihrer Interaktion mit TRAIL-R2 auch über TRAIL-R1 präzipitiert werden konnten. Dagegen spricht allerdings, dass sich p68 nicht in Komplexen mit TRAIL-R1 nachweisen ließ sowie die Tatsache, dass eine Hemmung von TRAIL-R1 ähnliche Effekte wie die von TRAIL-R2 hervorgerufen hat.

Bei der Analyse der RNA-Abhängigkeit der neu identifizierten Interaktionen der beiden TRAIL-Todesrezeptoren ergab sich, dass die Assoziation zwischen hnRNPA1 und NF45 mit TRAIL-R2 und TRAIL-R1 RNA-unabhängig ist, was für eine direkte Protein-Protein-Interaktion spricht. Interessant ist in dieser Hinsicht die kürzlich veröffentlichte Arbeit von *Chandra et al.*, in der für den TGF- β -Rezeptor T β R1 gezeigt werden konnte, dass er nach Translokation in den Zellkern direkt mit hnRNPA1 interagiert und auf diese Weise zu einer alternativen Prozessierung der EGFR mRNA führt, welche ein T β R1-bindendes Motiv enthält (Chandra et al., 2012). In ähnlicher Weise könnten auch TRAIL-R1 und TRAIL-R2 durch direkte Interaktion mit hnRNPA1 im Zellkern an der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression beteiligt sein, was in zukünftigen Projekten untersucht werden sollte.

Da die gemeinsame Funktion aller in dieser Arbeit untersuchten TRAIL-R1- bzw. TRAIL-R2-Interaktionspartner in der Regulation der Biogenese von let-7 besteht (Michlewski & Caceres, 2010; Salzmann et al., 2007; Sakamoto et al., 2009), lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der verbindenden RNA um miRNAs handeln könnte und die TRAIL Rezeptoren auch an diesem Prozess beteiligt sind. Daher wurde als nächstes nach Etablierung eines passenden Transfektionsmodells der Einfluss der nukleären Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf die Reifung von let-7 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition sowohl von TRAIL-R1 als auch von TRAIL-R2 zu einer gesteigerten Expression von reifem let-7 und daraus resultierend zu einer Herunterregulation seines Zielproteins Lin28B führte.

Der genaue Mechanismus der Regulation der Biogenese von let-7 durch die beiden TRAIL-Todesrezeptoren muss allerdings in weiteren Studien untersucht werden. Für TRAIL-R2 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass er sowohl mit den Kernkomponenten des Mikroprozessor-Komplexes Drosha und DGCR8 als auch mit den regulatorischen Proteinen interagiert. Diese können alle über die Bindung an pri-let-7 die Reifung von let-7 spezifisch steigern (p68) bzw. inhibieren (hnRNPA1, NF45) (Michlewski & Caceres, 2010; Salzmann et al., 2007; Sakamoto et al., 2009). Verschiedene pri-let-7-Spezies wurden übereinstimmend in Komplexen mit TRAIL-R2 gefunden. Darüber hinaus konnte von der AG Trauzold gezeigt werden, dass die Hemmung von TRAIL-R2 spezifisch die Aktivität von Drosha steigert (Haselmann et al., 2014). Daher liegt hier die Vermutung nahe, dass TRAIL-R2 die Reifung von let-7 durch eine Beeinflussung der Regulatoren des Mikroprozessorkomplexes hemmt.

Let-7 gehört zu einer der am besten untersuchten miRNA-Familien und ist evolutionär hochkonserviert (Pasquinelli et al., 2000). Zu seinen Zielproteinen gehören Regulatoren unterschiedlicher mitogener Signalwege wie zum Beispiel HMGA2, Ras, IMP-1, c-myc, CDK6 und CDC25A (Barh et al., 2010). Let-7 ist in humanen embryonalen Stammzellen nicht nachweisbar und seine Expression wird mit beginnender Differenzierung der Zellen induziert. In adulten, differenzierten Geweben wird dann ein konstant hohes Expressionsniveau von let-7 aufrechterhalten und seine Zielproteine sind dementsprechend kaum detektierbar (Boyerinas et al., 2010). Die Expression von let-7 gilt daher als Kennzeichen für Differenzierung (Barh et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass let-7 Familienmitglieder in unterschiedlichen Tumoren herunterreguliert sind und eine Reexpression von let-7 die Tumorzellproliferation in vitro und die Tumorigenese in vivo hemmen (Chang et al., 2009). Daher fungiert let-7 als Tumorsuppressor (Johnson et al., 2005) und TRAIL-Todesrezeptoren könnten somit aufgrund der Inhibition von let-7 im Zellkern als potentielle Onkogene angesehen werden.

Die funktionelle Relevanz einer TRAIL-R1- bzw. TRAIL-R2-vermittelten Regulation von let-7 konnte dadurch bestätigt werden, dass eine Inhibition der beiden TRAIL-Todesrezeptoren zu einer verminderten Expression des let-7 Zielproteins Lin28B führte und zwar infolge einer Zunahme von reifem let-7.

Lin28B unterliegt nicht nur der inhibitorischen Kontrolle durch let-7 (Boyerinas et al., 2008; Rybak et al., 2008), sondern reguliert seinerseits dessen Expression auf drei

unterschiedlichen Wegen. Durch direkte Bindung an die terminale Schleife von let-7 Vorläufern verhindert es sowohl die Prozessierung von pri-let-7 zu pre-let-7 durch den Mikroprozessor-Komplex (Newman et al., 2008; Viswanathan et al., 2008) als auch die Dicer-vermittelte Prozessierung von pre-let-7 zu reifem let-7 im Zytoplasma (Rybak et al., 2008). Daneben führt Lin28B zur posttranskriptionellen Uridylierung von pre-let-7 und damit zu dessen Degradation (Heo et al., 2008). Lin28B und let-7 bilden damit einen doppelt-negativen Feedbackmechanismus aus, da Lin28B einen Suppressor von let-7 darstellt, der seinerseits von let-7 herunterreguliert wird (Rybak et al., 2008). Für einige Proteine wie NF- κ B und c-myc wurde beschrieben, dass sie zum Teil direkt die Expression von let-7 hemmen und zum anderen als Transkriptionsfaktoren im Zellkern durch Stimulation der Genexpression von Lin28B zur Hemmung der Biogenese von let-7 führen (Viswanathan & Daley, 2010). Daher sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, ob TRAIL-Rezeptoren im Zellkern neben der direkten Hemmung der Reifung von let-7 ebenfalls indirekt oder direkt die Transkription von Lin28B beeinflussen können und dadurch die Inhibition von let-7 verstärken. In jedem Fall wird durch die in dieser Arbeit nachgewiesene Beeinflussung der Expression von Lin28B durch die beiden TRAIL-Todesrezeptoren deren Wirkung auf die Expression von let-7 und dessen Zielproteinen gesteigert.

Lin28B ist ein evolutionär konserviertes RNA-bindendes Protein, das in embryonalen Stammzellen sowie in sich entwickelnden Geweben exprimiert wird. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen wird seine Expression deutlich reduziert (Zhong et al., 2010). In 15 % aller Tumoren konnte eine vermehrte Expression von Lin28B nachgewiesen werden, wobei seine Überexpression die Transformation von Zellen *in vitro* und das Tumorwachstum und die Metastasierung *in vivo* fördert (Boyerinas et al., 2010). Die in dieser Arbeit beschriebene Beobachtung, dass TRAIL-Rezeptoren im Zellkern zu einer vermehrten Expression von Lin28B führen, lässt damit eine Proliferations-assoziierte Funktion von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 vermuten.

Ein weiteres etabliertes Zielprotein von let-7, welches für die Proliferation von Tumorzellen sowie für ihre Dedifferenzierung verantwortlich gemacht wird, ist HMGA2 (Watanabe et al., 2009; Yu et al., 2007). In Transfektionsversuchen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 zu einer verminderten Expression von HMGA2 auf Proteinebene und mRNA-Ebene führte. Folglich kam es

aufgrund der durch Inhibition der TRAIL-Rezeptoren bedingten gesteigerten let-7-Expression zu einer Degradation der HMGA2 mRNA. Dies liegt vermutlich an der nahezu perfekten Komplementarität mit der 3'UTR von HMGA2 und passt zu den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Park et al., 2007).

Um die funktionelle Relevanz der Regulation der Expression von HMGA2 durch TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zu bestätigen, wurde der Einfluss einer Hemmung der beiden TRAIL-Todesrezeptoren auf die Zellproliferation analysiert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl eine Herunterregulation von TRAIL-R1 als auch von TRAIL-R2 die Proliferation von Tumorzellen hemmte. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit einen möglichen Mechanismus, wie TRAIL-Rezeptoren im Zellkern die Proliferation von Tumorzellen fördern, nämlich über Hemmung der Biogenese von let-7 und der damit verbundenen Reexpression des Onkogens HMGA2.

HMGA2 ist ein frühes embryonales Gen, das vor allem in Stammzellen vermehrt exprimiert wird und in den meisten differenzierten Geweben nicht detektierbar ist (Park et al., 2008). Für verschiedene Tumorentitäten konnte eine deutlich gesteigerte Expression von HMGA2 infolge einer reduzierten Expression von let-7 nachgewiesen werden (Boyerinas et al., 2010). Genau wie auch Lin28B ist HMGA2 ein Stammzellofaktor und ein Marker für Pluripotenz, dessen Expressionsmuster invers mit dem von let-7 korreliert ist und der Kontrolle durch let-7 unterliegt (Peter, 2009). Gemäß der Stammzellhypothese entstehen Tumore aus Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften, den sogenannten Tumor-initiiierenden Zellen (TIC), die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und pluripotent sind (Boyerinas et al., 2010; Park et al., 2008; Yu et al., 2007). Genau wie in normalen Stammzellen konnte in TICs nur ein geringes Expressionslevel von let-7 nachgewiesen werden (Barh et al., 2010). Es wird somit angenommen, dass es während der Karzinogenese eventuell aufgrund einer gesteigerten Expression von Lin28B zu einer Herunterregulation von let-7 kommt. Infolge dessen werden die onkofetalen Zielproteine von let-7 reexprimiert und führen zur Dedifferenzierung der Tumorzellen und zur Tumorprogression (Barh et al., 2010; Peter, 2009; Viswanathan et al., 2009; Yu et al., 2007).

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die beiden TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern an der Regulation der Expression von let-7, Lin28B und HMGA2 beteiligt sind, lässt sich vermuten, dass eine nukleäre Expression von TRAIL-Rezeptoren ein weiteres Charakteristikum von TICs darstellen könnte. Hierzu passt auch

die Beobachtung von *Rajeshkumar et al.*, dass TRAIL-R2 vermehrt in Pankreastumorzellen exprimiert wird, die typische Stammzeleigenschaften aufweisen (*Rajeshkumar et al.*, 2010).

Neben der Stimulation der Proliferation von Tumorzellen könnte die nukleäre Lokalisation der beiden TRAIL-Todesrezeptoren einen weiteren Vorteil für Tumorzellen darstellen. Durch Translokation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in den Zellkern ist es den Tumorzellen vermutlich möglich, sich der TRAIL-induzierten Apoptose zu entziehen. In Übereinstimmung hiermit haben *Kojima et al.* vor kurzem gezeigt, dass eine Inhibition des Kernimports von TRAIL-R2 in HeLa- und HepG2-Zellen gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose sensitiviert (*Kojima et al.*, 2011). Dies passt außerdem zu der Beobachtung, dass humane Zytotrophoblasten TRAIL-R2 primär im Zellkern exprimieren und sich gegenüber einer TRAIL-vermittelten Apoptose resistent zeigen (*Bai et al.*, 2009). Eine Stimulation mit TNF α führte in dieser Studie zur Translokation von TRAIL-R2 auf die Plasmamembran, vermutlich bedingt durch eine gesteigerte Expression von endogenem TRAIL und sensibilisierte die Zellen somit für TRAIL. In ähnlicher Weise beschreiben *Petermel et al.*, dass die nukleäre Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in CD4- und CD8-positiven T-Zellen für eine Apoptoseresistenz der Zellen gegenüber TRAIL verantwortlich sein könnte (*Petermel et al.*, 2010). Die Translokation der beiden TRAIL-Todesrezeptoren könnte einen möglichen Resistenzmechanismus von Tumorzellen gegenüber TRAIL-basierten Tumortherapien darstellen.

Interessant sind in diesem Zusammenhang zwei weitere Publikationen. *Shimizu et al.* konnten Bcl-xL als weiteres Zielprotein von let-7 identifizieren und argumentieren, dass let-7 durch Hemmung der Expression von Bcl-xL auch in die Regulation der Apoptose involviert ist (*Shimizu et al.*, 2010). Somit wäre es möglich, dass TRAIL-Rezeptoren im Zellkern durch die Inhibition der Biogenese von let-7 zu einer gesteigerten Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL führen und damit die Transduktion der Apoptose nach Aktivierung Zellmembran-gebundener TRAIL-Todesrezeptoren hemmen sowie deren proinflammatorischen Signalwege verstärken. Hierzu passen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von *Iliopoulos et al.*, die demonstrieren, dass let-7 sowohl direkt als auch indirekt über Ras zu einer Inhibition der Expression von IL-6 führt. IL-6 seinerseits aktiviert NF- κ B und führt damit zu Inflammation und zellulärer Transformation (*Iliopoulos et al.*, 2009). Zusammengefasst liefern diese Beobachtungen eine weitere Erklärung für einen

Resistenzmechanismus von Tumorzellen gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose. Die beiden TRAIL-Todesrezeptoren könnten im Zellkern durch Hemmung der Biogenese von let-7 auch zu einer gesteigerten Expression anti-apoptotischer sowie proinflammatorischer Proteine führen und damit die Signaltransduktion von zellmembrangebundenem TRAIL-R1 und TRAIL-R2 regulieren. Dies könnte die beschriebene (Trauzold et al., 2006; Ishimura et al., 2006; Hoogwater et al., 2010) protumorale Wirkung von TRAIL in TRAIL-resistenten Zellen verstärken.

TRAIL-Todesrezeptoren bieten ein weiteres, neues Beispiel für Zellmembran-gebundene Rezeptoren, die in den Zellkern transloziert werden können und dort zum Teil Liganden-unabhängig Funktionen ausüben, die sich von denen unterscheiden, die nach Stimulation durch ihren Liganden auf der Plasmamembran vermittelt werden. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen nukleären Funktionen von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 konnte ebenfalls eine Unabhängigkeit von ihrem natürlichen Liganden TRAIL nachgewiesen werden (Haselmann et al., 2014). Das bekannteste Beispiel für diesen Mechanismus stellt die Familie der EGF-Rezeptoren dar. Für einige Familienmitglieder wurde beschrieben, dass sie nach Translokation in den Zellkern die Genexpression ihrer Zielproteine entweder direkt regulieren, indem sie an deren Promotorsequenzen binden oder indirekt durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (Wang et al., 2010). In ähnlicher Weise kann CD40, ein weiteres Mitglied der TNF-Rezeptor Familie, in den Zellkern normaler oder maligner B-Zellen translozieren und dort durch Interaktion mit c-Rel die Proliferation der Zellen stimulieren (Zhou et al., 2007).

Aufgrund der biologischen Bedeutung der hier identifizierten nukleären Funktion der TRAIL-Todesrezeptoren für die Funktion des TRAIL/TRAIL-Rezeptorsystems und den klinischen Einsatz TRAIL-basierter Tumorthérapien sind weitere Studien hinsichtlich des genauen intrazellulären Transportmechanismus unerlässlich. Für TRAIL-R2 konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass der Kernimport über Importin β 1 vermittelt wird (Kojima et al., 2011). Im Gegensatz dazu sind der Mechanismus des Kernimports von TRAIL-R1 sowie die regulatorischen Mechanismen für die Translokation der beiden TRAIL-Todesrezeptoren in den Zellkern unbekannt. In diesem Zusammenhang scheint die Studie von *Chandra et al.* relevant zu sein. Hier wurde gezeigt, dass der TGF- β -Rezeptor T β R1 nach Stimulation durch TGF- β transient mit Smad2/3 interagiert und durch Komplexbildung mit Importin β 1 und Nukleolin in den Zellkern transloziert wird. Hier kommt

es in Abhängigkeit vom zellulären Kontext bei erhöhter Aktivität der Ran GTPase zu einer Dissoziation von T β R1, welcher dann durch direkte Interaktion mit hnRNPA1 die posttranskriptionelle Genexpression von EGFR reguliert (Chandra et al., 2012). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für den Kernimport für TRAIL-Rezeptoren eine Rolle spielen und unterstreicht die Bedeutung des zellulären Kontextes für die intrazelluläre Distribution von Rezeptoren.

Die Identifizierung von Stimulatoren und Inhibitoren des Kernimports und der Aktivität der TRAIL-Todesrezeptoren sowie von Regulatoren ihrer intrazellulären Verteilung ist dringend erforderlich, um das Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der TRAIL-Todesrezeptoren weiter zu verbessern und damit neue zielgerichtete Therapieoptionen zu entwickeln.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, dass beide TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern unterschiedlicher Tumorzelllinien exprimiert werden und dort mit den Proteinen des großen Mikroprozessor-Komplexes Drosha, DGCR8, p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 interagieren, die alle an der Regulation der Biogenese der miRNA let-7 beteiligt sind. Eine Herunterregulation sowohl von TRAIL-R1 als auch von TRAIL-R2 im Zellkern führte zu einem vermehrten Nachweis von reifem let-7 und dadurch bedingt zu einer verminderten Expression der let-7 Zielproteine Lin28B und HMGA2 sowie zu einer Inhibition der Zellproliferation. Auf diese Weise konnte ein bislang unbekannter Mechanismus identifiziert werden, durch den TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern infolge einer Inhibition der Reifung von let-7 zu einer gesteigerten Malignität von Tumorzellen führen.

5 Zusammenfassung

Die auf der Zelloberfläche exprimierte Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 sind in der Lage, nach Aktivierung durch TRAIL oder spezifische agonistische Antikörper die Apoptose in einigen, aber nicht allen Tumorzellen zu induzieren. Insbesondere in Apoptose-resistenten Tumorzellen werden nicht-apoptotische Signalwege induziert, die unter anderem über eine Aktivierung von NF- κ B, Akt oder MAPKs zu Inflammation, Zellproliferation, Invasion und Metastasierung führen können. Diese Funktionen der beiden TRAIL-Todesrezeptoren sind dabei abhängig von ihrer Expression auf der Plasmamembran. Daneben konnten sowohl TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2 im Zytoplasma und Zellkern nachgewiesen werden. Die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung ist allerdings bislang nicht bekannt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die spezifischen Funktionen von intrazellulären TRAIL-Todesrezeptoren in unterschiedlichen Tumorzelllinien untersucht.

Die intrazelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren wurde in unterschiedlichen Tumorzelllinien mittels Immunfluoreszenz und Zellfraktionierungsversuchen untersucht. Die Zusammensetzung der intranukleären TRAIL-Rezeptorkomplexe wurde durch Immunpräzipitation der beiden Rezeptoren aus Kernextrakten sowie mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler LSM analysiert und die Proteininteraktionen durch Behandlung der Kernextrakte mit RNase A auf ihre RNA-Abhängigkeit überprüft. Der Einfluss einer Inhibition von TRAIL-Rezeptoren auf unterschiedliche Zielproteine wurde mittels Transfektionsmodellen analysiert und das Expressionsniveau mittels Western-Blot sowie real-time RT-PCR bestimmt. Die Beurteilung der Proliferation von Zellen erfolgte durch Zellzählung.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass insbesondere TRAIL-R2, aber in geringerem Maße auch TRAIL-R1 im Zellkern verschiedener Tumorzelllinien exprimiert wird. Die Analyse der nukleären TRAIL-Rezeptorkomplexe ergab, dass die beiden TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern mit den Proteinen des großen Mikroprozessor-Komplexes Drosha, DGCR8, p68, NF45, NF90/110 und hnRNPA1 interagieren, die alle an der Regulation der Biogenese von let-7 beteiligt sind. Bei der Analyse der RNA-Abhängigkeit der Proteininteraktionen wurde deutlich, dass lediglich die Interaktion zwischen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 mit NF45 und hnRNPA1 eine direkte Protein-Protein-Interaktion darstellt, wohingegen die übrigen Proteininteraktionen RNA-abhängig sind. Eine Herunterregulation

sowohl von TRAIL-R1 als auch von TRAIL-R2 im Zellkern führte zu einer vermehrten Expression von reifem let-7 und infolge dessen zu einer Reduktion der Expression seiner Zielproteine Lin28B und HMGA2 sowie zu einer Inhibition der Zellproliferation. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die beiden TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern zu einer gesteigerten Malignität von Tumorzellen führen, indem sie die Biogenese von let-7 hemmen und damit zu einer Reexpression der embryonalen Proteine Lin28B und HMGA2 sowie zur Tumorzellproliferation führen.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit ein neuer regulatorischer Mechanismus in der Biologie von TRAIL-Todesrezeptoren identifiziert werden. Bislang wurde davon ausgegangen, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 nur nach Stimulation durch ihren natürlichen Liganden TRAIL auf der Zelloberfläche apoptotische oder nicht-apoptotische Signalwege induzieren. Hier konnte gezeigt werden, dass sie zusätzlich im Zellkern unterschiedlicher Tumorzelllinien exprimiert werden und dort durch Inhibition der Biogenese von let-7 die Proliferation von Tumorzellen fördern und damit zu einer gesteigerten Malignität beitragen. Diese Beobachtung eröffnet neue Perspektiven für die bislang nicht untersuchte Funktion intrazellulärer Todesrezeptoren und sollte für das Regime TRAIL-basierter Tumorthérapien in Zukunft Berücksichtigung finden.

6 Literaturverzeichnis

Adams, J.M.; Cory, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Corr. Opin. Cell Biol.* *14*, 715-720.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* *431*, 350-355.

Ashkenazi, A., Herbst, R.S. (2008). To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J. Clin. Invest.* *118*, 1979-1990.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z., Schwall, R.H. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* *104*, 155-162.

Azijli, K., Yuvaraj, S., Peppelenbosch, M.P., Würdinger, T., Dekker, H., Joore, J., van Dijk, E., Quax, W.J., Peters, G.J., de Jong, S., Kruijt, F.A. (2012). Kinome profiling of non-canonical TRAIL signaling reveals RIP1-Src-STAT3 dependent invasion in resistant non-small lung cancer cells. *J Cell Sci* *125*, 4651-61.

Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G.J., de Jong, S., Kruijt, F.A. (2013). Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ* *20*, 858-68.

Bai, X., Williams, J.L., Greenwood, S.L., Baker, P.N., Aplin, J.D., Crocker, I.P. (2009). A placental protective role for trophoblast-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Placenta* *30*, 855-860.

Barh, D., Malhotra, R., Ravi, B., Sindhurani, P. (2010). MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr. Oncol.* *17*, 70-80.

Belyanskaya, L.L, Ziogas, A., Hopkins-Donaldson, S., Kurtz S., Simon, H.U., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U. (2008). TRAIL-induced survival and proliferation of SCLC cells is mediated by ERK and dependent on TRAIL-R2/DR5 expression in the absence of caspase-8. *Lung Cancer* 60, 355-365.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., Tschopp, J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.* 2, 241-243.

Boyerinas, B., Park, S.M., Shomron, N., Hedegaard, M.M., Vinther, J., Andersen, J.S., Feig, C., Xu, J., Burge, C.B., Peter, M.E. (2008). Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res.* 68, 2587-2591.

Boyerinas, B., Park, S.M., Hau, A., Murmann, A.E., Peter, M.E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* 17, F19-F36.

Burd, C.G., Dreyfuss, G. (1994). RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 13, 1197-1204.

Carpenter, B., MacKay, C., Alnabulsi, A., MacKay, M., Telfer, C., Melvin, W.T., Murray, G.I. (2006). The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1765, 85-100.

Castanotto, D., Rossi, J.J. (2009). The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 457, 426-433.

Causevic, M., Hislop, R.G., Kernohan, N.M., Carey, F.A., Kay, R.A., Steele, R.J., Fuller-Pace, F.V. (2001). Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal cancer. *Oncogene* 22, 7734-7743.

Chandra, M., Zang, S., Li, H., Zimmerman, L.J., Champer, J., Tsuyada, A., Chow, A., Zhou, W., Yu, Y., Gao, H., Ren, X., Lin, R.J., Wang, S.E. (2012). Nuclear translocation of type I TGF- β receptor confers a novel function in RNA processing. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2183-95.

Chang, T., Zeitels, L.R., Hwang, H., Chivukula, R.R., Wentzel, E.A., Bews, M., Jung, J., Gao, P., Dang, C.V., Beer, M.A., Thomas-Tikhonenko, A., Mendell, J.T. (2009). Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3384-3389.

Corthésy, B., Kao, P.N. (1994). Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter. *J. Biol. Chem* 269, 20682-20690.

Cullen, B.R. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell* 16, 861-865.

Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., Goodwin, R.G. (1997b). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.

Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G., Smith, C.A. (1997a). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* 186, 1165-1170.

Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.

Di Pietro, R., Zauli, G. (2004). Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J. Cell Physiol.* 201, 331-340.

Duchange, N., Pidoux, J., Camus, E., Sauvaget, D. (2000). Alternative splicing in the human interleukin enhancer binding factor 3 (ILF3) gene. *Gene* 261, 345-353.

Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R. et al. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 273, 14363-14367.

Esquela-Kerscher, A., Slack, F. (2006). Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 259-269.

Falschlehner, C., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Walczak, H. (2007). TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int. J. Bioch. Cell. Biol.* 39, 1462-1475.

Falschlehner, C., Ganten, T.M., Koschny, R., Schaefer, U., Walczak, H. (2009). TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 647, 195-206.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102-114.

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Youshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y, Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B.W., Kato, S. (2007). DEAD-box RNA helicase subunit of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat. Cell Biol.* 9, 604-611.

Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y., Chambers, T.J. (1998). TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J. Exp. Med.* 188, 997-1001.

Ganten, T.M., Sykora, J., Koschny, R., Batke, E., Aulmann, S., Mansmann, U., Stremmel, W., Sinn, H.P., Walczak, H. (2009). Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J. Mol. Med.* 87, 995-1007.

Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640.

Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.

Guan, D., Altan-Bonnet, N., Parrott, A.M., Arrigo, C.J., Li, Q., Khaleduzzaman, M., Li, H., Lee, C.G., Pe´ery, T., Mathews, M.B. (2008). Nuclear Factor 45 (NF45) is a regulatory subunit of complexes with NF90/110 involved in mitotic control. *Mol. Cell Biol.* 28, 4629-4641.

Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146-1150.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016-3027.

Haselmann, V., Kurz, A., Bertsch, U., Hübner, S., Olempska-Müller, M., Fritsch, J., Häsler, R., Pick, I. A., Fritsche, H., Annewanter, F., Engler, C., Fleig, B., Bernt, A., Röder, C., Schmidt, H., Gelhaus, C., Hauser, C., Egberts, J.H., Heneweer, C., Rohde, A.M., Böger, C., Knippschild, U., Röcken, C., Adam, D., Walczak, H., Schütze, S., Janssen, O., Wulczyn, F.G., Wajant, H., Kalthoff, H., Trauzold, A. (2014). Nuclear Death Receptor TRAILR2 Inhibits Maturation of Let-7 and Promotes Proliferation of Pancreatic and Other Tumor cells. *Gastroenterology* 146, 278-90.

Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., Kim, V.N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol. Cell* 32, 276-284.

Hirling, H., Scheffner, M., Restle, T., Stahl, H. (1989). RNA helicase activity associated with the human p68 protein. *Nature* 339, 562-564.

Hoogwater, F.J., Nijkamp, M.W., Smakman, N., Steller, E.J., Emmink, B.L., Westendorp, B.F., Raats, D.A., Sprick, M.R., Schaefer, U., Van Houdt, W.J. et al. (2010). Oncogenic K-Ras turns death receptors into metastasis-promoting receptors in human and mouse colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 138, 2357-2367.

Humphreys, R.C., Halpern, W. (2008). Trail receptors: targets for cancer therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 615, 127-158.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.

Hymowitz, S.G., Christinger, H.w.; Fuh; G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R.F., Ashkenazi, A., de Vos, A.M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell* 4, 563-571.

Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L, Wang, Z., Liu, D., Ohtsuka, T., Zhang, H., Mountz, J.D., Koopman, W.J., Kimberley, R.P., Zhou, T. (2001). Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat. Med.* 7, 954-960.

Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 139, 693-706.

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLICE. *Nature* 388, 190-195.

Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S.F., Gores, J.G. (2006). Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 290, 129-36.

Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green D.R., Schoenberger, S.P. (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434, 88-93.

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647.

Kalthoff, H., Trauzold, A. (2009). Following the death TRAIL to hunt down tumor cells: translating programmed cell death signaling mechanisms into clinical practice. *Results Probl. Cell Differ.* 49, vii-xiii.

Kelley, R.F., Harris, L.A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J., Fox, J.A. (2001). Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficiency, pharmacokinetics, and safety. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 31-38.

Kemp, C.J., Sun, S., Gurley, K.E. (2001). P53 induction and apoptosis in response to radio- and chemotherapy in vivo is tumor-type-dependent. *Cancer Res.* 61, 327-332.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (FAS/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579-5588.

Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611-620.

Kojima, Y., Nakayama, M., Nishina, T., Nakano, H., Koyanagi, M., Takeda, K., Okumura, K., Yagita, H. (2011). Importin β 1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 286, 43383-93.

Koturbash, I., Zemp, F.J., Pogribny, I., Kovalchuk, O. (2010). Small molecules with big effects: The role of the microRNAome in cancer in carcinogenesis. *Mutat. Res.* 722, 94-105.

Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., et al. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176.

Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* 30, 363-364.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O, Kim, S., Kim V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

Lee, Y.S., Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the *HMGA2* oncogene. *Genes Dev.* 21, 1025-1030.

Leithner, K., Stacher, E., Wurm, R., Ploner, F., Quehenberger, F., Wohlkoenig, C., Bálint, Z., Polachova, J., Olschewski, A., Samonigg, H., et al. (2009). Nuclear and cytoplasmic death receptor 5 as prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy. *Lung Cancer* 65, 98-104.

Lemke J, Noack A, Adam D, Tchikov V, Bertsch U, Röder C, Schütze S, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. (2010). TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *J. Mol. Med.* 88, 729-740.

Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway to apoptosis. *Cell* *94*, 491-501.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* *25*, 402-40.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.

MacFarlane, M. (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol. Lett.* *139*, 89-97.

Macher-Goeppinger, S., Aulmann, S., Tagscherer, K.E., Wagener, N., Haferkamp, A., Penzel, R., Brauckhoff, A., Hohenfellner, M., Sykora, J., Walczak, H. et al. (2009). Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors in renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.* *15*, 650-659.

Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., de Jong, S., Samali, A. (2008). TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?. *Cancer Treat. Rev.* *35*, 280-288.

Mariani, S.M., Krammer, P.H. (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.* *28*, 973-982.

Mayr, C., Hemann, M.T., Bartel, D.P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* *315*, 1576-1579.

Mérino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7046-7055.

Micheau, O., Shirley, S., Dufour, F. (2013). Death receptors as targets in cancer. *Br J Pharmacol* *169*, 1723-44.

- Michlewski, G., Cáceres, J.F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1011-1018.
- Mucha, S.R., Rizzani, A., Gerbes, A.L., Camaj, P., Thasler, W.E., Bruns, C.J., Eichhorst, S.T., Gallmeier, E., Kolligs, F.T., Göke, B, De Toni, E.N. (2009). JNK inhibition sensitises hepatocellular carcinoma cells but not normal hepatocytes to the TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Gut* 58, 688-698.
- Newman, M.A., Thomson, J.M., Hammond, S.M. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* 14, 1539-1549.
- Niu, Y., Li, Y., Zang, J., Huang, H., Deng, J., Cui, Z., Yu, D., Deng, J. (2011). Death receptor 5 and neuroproliferation. *Cell Mol. Neurobiol.* 32, 255-265.
- Oikonomou, E., Kosmidou, V., Katseli, A., Kothonidis, K., Mourtzoukou, D., Kontogeorgos, G., Andera, L., Zografos, G., Pintzas, A. (2009). TRAIL receptor upregulation and the implication of KRAS/BRAF mutations in human colon cancer tumors. *Int. J. Cancer.* 125, 2127-2135.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V.M. (1997a). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R., Dixit, V.M. (1997b). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.
- Park, S.M., Peter, M.E. (2008). MicroRNAs and death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 303-311.
- Park, S.M., Schickel, R., Peter, M.E. (2005). Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 17,610-616.

Park, S.M., Shell, S., Radjabi, A.R., Schickel, R., Feig, C., Boyerinas, B., Dinulescu, D.M., Lengyel, E., Peter, M.E. (2007). Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle*. 6, 2585-2590.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruykun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.

Peter, M.E. (2009). Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell Cycle*. 8, 843-852.

Peternel, S., Prpić-Massari, L., Manestar-Blažić, T., Brajac, I., Kaštelan, M. (2011). Increased expression of TRAIL and its death receptors DR4 and DR5 in plaque psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 389-397.

Pino, I., Pio, R., Toledo, G., Zabalegui, N., Vicent, S., Rey, N., Lozano, M.D., Torre, W., Garcia-Foncillas, J., Montuenga, L.M. (2003). Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer* 41, 131-143.

Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Doonahue, C.J., Moore, A., Ashkenazi, A. (1996). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.

Rajeshkumar, N.V., Rasheed, Z.A., García-García, E., López-Ríos, F., Fujiwara, K., Matsui, W.H., Hidalgo, M. (2010). A combination of DR5 agonistic monoclonal antibody with gemcitabine targets pancreatic cancer stem cells and results in long-term disease control in human pancreatic cancer model. *Mol. Cancer Ther.* 9, 2582-2592.

Ravi, R., Jain, A.J., Schulick, R.D., Pham, V., Prouser, T.S., Allen, H., Mayer, E.G., Yu, H., Pardoll, D.M., Ashkenazi, A., Bedi, A. (2004). Elimination of hepatic metastases of colon

cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL. *Cancer Res.* 64, 9105-9114.

Reichmann, T.W., Parrott, A.M., Fierro-Monti, I., Caron, D.J., Kao, P.N., Lee, C.G., Li, H., Mathews, M.B. (2003). Selective regulation of gene expression by nuclear factor 110, a member of the NF90 family of double-stranded RNA-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 332, 85-98.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.

Riva, S., Morandi, C., Tsoufas, P., Pandolfo, M., Biamonti, G., Merrill, B., Williams, K.R., Multhaup, G., Beyreuther, K, Werr, H. (1986). Mammalian single-stranded DNA binding protein UP I is derived from the hnRNP core protein A1. *EMBO J.* 5, 2267-2273.

Röder, C., Trauzold, A., Kalthoff, H. (2010). Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur. J. Cell. Biol.* 90, 450-455.

Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., Wulczyn, F.G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls prä-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol.* 10, 987-993.

Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., Hatano, E., Fukushima, A., Taniguchi, T., Agata, Y. (2009). The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3754-3769.

Salzman, D.W., Shubert-Coleman, J., Furneaux, H. (2007). P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *J. Biol. Chem.* 282, 32773-32779.

Sanlioglu, A.D., Korcum, A.F., Pestereli, E., Erdogan, G., Karaveli, S., Savas, B., Griffith, T.S., Sanlioglu, S. (2007). TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the

tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *69*, 716-723.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Kreamer, P.H., Peter, M.E. (1998). Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* *17*, 1675-1687.

Schnepfle, D.J., Shepard, B., Bren, G.D., Cummins, N.W., Natesampillai, S., Trushin, S., Algeciras-Schimmich, A., Meng, X.W., Sainski, A.M., A Rizza, S., Kaufmann, S.H., Badley, A.D. (2011). Isolation of a TRAIL Antagonist from the serum of HIV infected patients. *J. Biol. Chem.* *286*, 35742-35754.

Screaton, G.R., Mongkolsapaya, J., Xu, X.N., Cowper, A.E., McMichael, A.J., Bell, J.I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr. Biol.* *7*, 693-696.

Secchiero, P., Melloni, E., Heikinheimo, M., Mannisto, S., Di Pietro, R., Lacone, A., Zauli, G. (2012). TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood* *103*, 517-522.

Sgarra, R., Rustighi, A., Tessari, M.A., Di Bernardo, J., Altamura, S., Fusco, A., Manfioletti, G., Glanocotti, V. (2004). Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett.* *574*, 1.8.

Shell, S., Park, S.M., Radjabi, A.R., Schickel, R., Kistner, E.O., Jewell, D.A., Feig, C., Lengyel, E., Peter, M.E. (2007). Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 11400-11405.

Shimizu, S., Takehara, T., Hikita, H., Kodama, T., Miyagi, T., Hosui, A., Tatsumi, T., Ishida, H., Noda, T., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., Hayashi, N. (2010). The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *52*, 698-704.

- Siegmund, D., Klose, S., Zhou, D., Baumann, B., Roder, C., Kalthoff, H., Wajant, H., Trauzold, A. (2007). Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells. *Cell. Signal.* 19, 1172-1184.
- Smyth, M.J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J.J., van den Brink, M.R., Eriksson, J.E. (2003). Nature's TRAIL – on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18, 1-6.
- Son, J.K., Varadarajan, S., Bratton, S.B. (2010). TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1. *Cell Death Differ* 17, 1288-1301.
- Song, K., Chen, Y., Goke, R., Wilmen, A., Seidel, C., Goke, A., Hilliard, B., Chen, Y. (2000). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J. Exp. Med.* 191, 1095-1104.
- Spierings, D.C., de Vries, E.G., Timens, W., Groen, H.J., Boezen, H.M., de Jong, S. (2003). Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clin. Cancer Res.* 9, 3397-3405.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., Walczak, H. (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, 599-609.
- Stevenson, R.J., Hamilton, S.J., MacCallum, D.E., Hall, P.A., Fuller-Pace, F.V. (1998). Expression of the `dead box`RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlated with organ differentiation/maturation in the fetus. *J. Pathol.* 184, 351-359.
- Strater, J., Walczak, H., Pukrop, T., von Muller, L., Hasel, C., Kornmann, M., Mertens, T., Moller, P. (2002). TRAIL and its receptors in the colonic epithelium: a putative role in the defense of viral infections. *Gastroenterology* 122, 659-666.
- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.* 195, 161-169.

Trauzold, A., Wermann, H., Arlt, A., Schutze, S., Schafer, H., Oestern, S., Roder, C., Ungefroren, H., Lampe, E., Heinrich, M., et al. (2001). CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 20, 4258-4269.

Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Roder, C., Kalthoff, H., Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 25, 7434-7439.

Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M.P., Deen, K.C., McLaughlin, M.M., Srinivasula, S.M., Livi, G.P., Marshall, L.A., Alnemri, E.S., Williams, W.V., Doyle, M.L. (2000). Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 23319-23325.

Vilimanovich, U., Bumbasirevic, V. (2008). TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2. *Cell Mol Life Sci* 65, 814-26.

Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320, 97-100.

Ushigome, M., Ubagai, T., Fukuda, H., Tsuchiya, N., Sugimura, T., Takatsuka, J., Nakagama, H. (2005). Up-regulation of hnRNPA1 gene in sporadic colorectal cancers. *Int. J. Oncol.* 26, 635-640.

Viswanathan, S.R., Daley, G.Q. (2010). Lin28: a microRNA regulator with a macro role. *Cell* 140, 445-449.

Viswanathan, S.R., Powers, J.T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T.L., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L.A., Lockhart, V.L., et al. (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat. Genet.* 41, 843-848.

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, et al. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16, 5386-5397.

Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* 5,157-163.

Wang, S.; El-Deiry, W.S. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22, 8628-8633.

Wang, Y.N., Yamaguchi, H., Hsu, J.M., Hung, M.C. (2010). Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* 29, 3997-4006.

Watanabe, S., Ueda, Y., Akaboshi, S., Hino, Y., Sekita, Y., Nakao, M. (2009). HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *Am. J. Pathol.* 174, 854-868.

Wei, Y., Hu, M.H. (2001). The story of p68 RNA helicase on cell transformation. *Yi Chuan Xue Bao.* 28, 991-996.

Wiezorek, J., Holland, P., Graves, J. (2010). Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 1701-1708.

Willey, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.

Wu, G.S., Burn, T.F., McDonald, E.R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G., El-Deiry, W.S. (1997). KILLER/DR5 is a damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* 17, 141-143.

Xu, J., Zhou, J.Y., Wei, W.Z., Wu, G.S. (2010). Activation of the Akt survival pathway contributes to TRAIL resistance in cancer cells. *PLoS One* 5, 10226.

Yang, L., Lin, C., Liu, Z.R. (2005). Signaling to the DEAD-box – Regulation of DEAD-box RNA helicase by protein phosphorylation. *Cellular Signal*. 17, 1495-1504.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 17, 3011-3016.

Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J., Song, E. (2007). Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 131, 1109-1123.

Zauli, G., Sancilio, S., Cataldi, A., Sabatini, N., Bosco, D., Di, P.R. (2005). PI-3K/Akt and NF-kappaB/Ikappa B alpha pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment. *J Cell Physiol* 202, 900-911.

Zhang, L., Fang, B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther*. 12, 228-237.

Zhong, X., Li, N., Liang, S., Huang, Q., Coukos, G., Zhang, L. (2010). Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *J. Biol. Chem*. 285, 41961-41971.

Zhou, H.J., Pham, L.V., Tamayo, A.T., Lin-Lee, Y.C., Fu, L., Yoshimura, L.C., Ford, R.J. (2007). Nuclear CD40 interacts with c-Rel and enhances proliferation in aggressive B-cell lymphoma. *Blood* 110, 2121-2127.

7 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. Anna Trauzold für die kontinuierliche fachliche und persönliche Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Für die konstruktive Kritik sowie für die ständig neuen Herausforderungen möchte ich mich herzlich bedanken, insbesondere aber für die Begeisterungsfähigkeit und Leidenschaft für die Wissenschaft, die faszinierend und ansteckend war und noch immer ist.

Herrn Prof. Dr. Holger Kalthoff möchte ich sehr herzlich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit am Institut für Experimentelle Tumorforschung durchgeführt haben zu dürfen sowie für die fortwährende Förderung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit und die zahlreichen konstruktiven Gespräche.

An Gökhan Alp richtet sich mein freundschaftlicher Dank für die motivierende und aufbauende tägliche Zusammenarbeit im Labor, für die Kollegialität und Unterstützung während der praktischen Arbeiten.

Herrn Dr. Uwe Bertsch danke ich herzlich für die Einführung in die Methode der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und für die angenehme Zusammenarbeit. Für die technische und allgemeine Unterstützung und die fortwährende Hilfsbereitschaft bei der Erstellung dieser Arbeit danke ich Dr. Christian Röder. Bei Herrn Dr. Robert Hässler möchte ich mich für Hilfe bei der Quantifizierung von miRNAs mittels real-time PCR sowie die konstruktive Zusammenarbeit bedanken.

Mein sehr persönlicher Dank gilt meiner Mutter, die mich in jeglichem Vorhaben unterstützt und gefördert hat, mich immer wieder motiviert hat und mir seit ich denken kann zur Seite steht. Dafür danke ich Ihr von ganzem Herzen!

Mein Dank gilt ebenfalls meinem Vater, der meine gesamte Ausbildung ermöglicht und gefördert hat und mir immer mit gutem Rat zur Seite stand sowie meinem Mann Jan-Hendrik für die emotionale Unterstützung, seine Geduld, die manchmal mehr als nur ein bisschen strapaziert wurde und die zahlreichen Tage und Abende im Labor.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Verena Haselmann
 Wohnort: Müllheimer Talstr. 66
 69469 Weinheim
 Geburtsdatum: 30. Juli 1982
 Nationalität: Deutsch
 Familienstand: Verheiratet

Bildung:

seit 08/2011 Assistenzärztin in Weiterbildung zur Labormedizinerin
 Leiter: Prof. M. Neumaier, Institut für Klinische Chemie -
 IKC, Universitätsmedizin Mannheim

04/2010-08/2011 Promotionsstudentin
 Leiter: Prof. H. Kalthoff, Sektion für Molekulare Onkologie,
 Krebszentrum Nord, Universitätsklinikum Schleswig-
 Holstein, Campus Kiel
 Arbeitsthema: Nukleäre Funktion von TRAIL-Rezeptoren

12/2009 Staatsexamen und Approbation

03/2009-07/2009 PJ-Tertial in der Anästhesie, St. Bernward Krankenhaus,
 Hildesheim

12/2008-03/2009 PJ-Tertial in der Inneren Medizin, Launceston General
 Hospital, University of Tasmania, Australien

10/2008-12/2008 PJ-Tertial in der Allgemein Chirurgie, Chinese University of
 Hong Kong, Hong Kong

08/2008-10/2008 PJ-Tertial in der Allgemein Chirurgie, University of
 Hong Kong, Hong Kong

04/2003-12/2009 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-
 Universität Göttingen

10/2002-03/2003 Studium der Physik an der Georg-August-Universität
 Göttingen

07/1993-07/2002 Besuch des Gymnasium Andreanum, Hildesheim mit
 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Publikationen:

Haselmann V, Kurz, A., Bertsch, U., Hübner, S., Olempska-Müller, M., Fritsch, J., Häslar, R., Pick, I. A., Fritsche, H., Annewanter, F., Engler, C., Fleig, B., Bernt, A., Röder, C., Schmidt, H., Gelhaus, C., Hauser, C., Egberts, J.H., Heneweer, C., Rohde, A.M., Böger, C., Knippschild, U., Röcken, C., Adam, D., Walczak, H., Schütze, S., Janssen, O., Wulczyn, F.G., Wajant, H., Kalthoff, H., Trauzold, A. (2014). Nuclear Death Receptor TRAILR2 Inhibits Maturation of Let-7 and Promotes Proliferation of Pancreatic and Other Tumor cells. *Gastroenterology* 146, 278-90.