

Michael Hahn  
Dr. med.

## **Untersuchungen zur Tetrazyklin-regulierbaren Expression von miRNA-Sequenzen in Tumorzellen**

Promotionsfach: DKFZ  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Martin R. Berger

Das Mamma-Karzinom ist weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau und die häufigste Ursache Tumor-assoziiertes Mortalität bei Frauen. Im fortgeschrittenen Stadium finden sich oft Knochenmetastasen, welche ein hohes Maß an Morbidität und damit auch eine erhöhte Mortalität mit sich bringen.

In metastasierenden Brustkrebszellen kommt es zu einer Überexpression von Genen des Knochengewebes. Diese Faktoren erlauben den Tumorzellen eine effiziente Interaktion mit der Mikroumgebung des Knochens („osteomimicry“), die zur Aktivierung von Osteoklasten und damit letztlich zur Entstehung osteolytischer Läsionen führt. Besondere Bedeutung kommt dabei den SIBLING-Proteinen Osteopontin und Bone-Sialoprotein zu. Die Expression dieser beider Faktoren wird von dem Transkriptionsfaktor Runx2 mitgesteuert. Dieser stellt einen wesentlichen Regulator dar, welcher in Brustkrebszellen Osteoblasten-ähnliche Genprogramme aktiviert. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Hemmung von Runx2 zu einer signifikanten Reduktion von Osteolysen im Tiermodell führt.

In dieser Arbeit wurde auf Grundlage der invasiven Mamma-Karzinom-Zelllinie MDA-MB231 ein zelluläres Modellsystem in Form von Zellklonen generiert, in denen transgene Einheiten Tetrazyklin-abhängig reguliert werden können. Die Anwendbarkeit des Systems für Fragestellungen *in vitro* und *in vivo* wurde anhand eines miRNA-vermittelten Knockdown von Runx2 demonstriert.

Zur Herstellung der Tet-regulierbaren Zellklone wurde zunächst der Tetrazyklin-abhängige Transaktivator tTA, an das Fluoreszenzprotein GFP gekoppelt, retroviral in das zelluläre Genom integriert. Nach der Charakterisierung von Klonen mit guten Regulationseigenschaften wurde in einem zweiten retroviralen Transduktionsschritt eine Tetrazyklin-regulierbare Genkassette integriert. Diese enthält einen bidirektionalen Tetrazyklin-abhängigen Promotor, von dem aus ein rotes Fluoreszenzprotein und ein Luziferase-Gen exprimiert wird. Damit ist sowohl eine durchflusszytometrische Analyse der Zellklone als auch *in vivo*-Luziferase-Imaging möglich. Anhand der Regulationseigenschaften wurden vier doppelstabile Klone für weitere Arbeiten ausgewählt. Die genomischen Loci der integrierten Elemente wurden mittels LAM-PCR identifiziert. Die regulierbare Genkassette wird von Flp-Rekombinase-Erkennungssequenzen flankiert, sodass anhand eines „recombinase mediated cassette exchange“ (RMCE) jede beliebige Expressionskassette in den vorher charakterisierten Locus integriert werden kann. Für den Kassettenaustausch wurden drei verschiedene Versionen der Flp-Rekombinase in ihrer Effizienz verglichen.

Drei verschiedene miRNA-Sequenzen gegen Runx2 wurden nach dem Muster der miRNA3 erstellt, in Zielvektoren kloniert und mittels Kassettenaustausch in die Zellklone integriert. Die Effizienz bezüglich des Knockdown von Runx2 wurde anhand von Western Blot Analysen verglichen.

Anschließend durchgeführte MTT-Assays deuteten auf eine erhöhte Proliferationsrate der MDA-MB231-Zellen nach einem Runx2-Knockdown.

In einem ersten *in vivo*-Vorversuch wurde der Osteotropismus der selektierten Zellklone anhand von *in vivo*-Luziferasemessungen in einem Nacktratten-Modell überprüft; hierzu

wurden Tumorzellen in eine A.femoralis der Versuchstiere injiziert. Ein zweiter *in vivo*-Vorversuch diente dem Nachweise der Funktionalität der Tet-regulierten Zellklone *in vivo* sowie der Etablierung einer geeigneten Doxyzyklin-Konzentration. Dieser Versuch erbrachte außerdem Hinweise darauf, dass die Tumorzellen mit einer intensivierten Kohlenhydrat-Diät in eine Kohlenhydrat-Abhängigkeit gebracht werden können, die eine starke Proliferationshemmung nach Absetzen der Diät bewirkt.

Der *in vivo*-Hauptversuch diente der Untersuchung der Effekte eines Runx2-Knockdown auf das Ausmaß von Osteolysen im Rattenmodell. Anhand von computertomographischen Daten, welche drei und vier Wochen nach Inokulation der Zellen erhoben wurden, erfolgte die Quantifizierung der Osteolysen. In der statistischen Auswertung konnte eine signifikante Reduktion der Osteolysen unter Induktion der miRNA gegen Runx2 gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von Tet-regulierbaren MDA-MB231-Klonen ein Werkzeug zum Studium von Genfunktionen im Kontext der Knochenmetastasierung von Brustkrebs erstellt. Dieses wurde am Beispiel des Transkriptionsfaktors Runx2 in unterschiedlichen Fragestellungen *in vitro* und *in vivo* angewandt.