

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. P. Meybohm**

**Analyse exosomaler microRNAs  
im Serum von Patientinnen mit Brustkrebsmetastasen**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

Leonie Sophie Reifschläger

**aus Gummersbach**

**Würzburg, August 2022**



**Referent bzw. Referentin:** Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Malgorzata Burek

**Korreferent bzw. Korreferentin:** Prof. Dr. med. Achim Wöckel

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 9. Mai 2023**

Die Promovendin ist Zahnärztin.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2	Klassifizierung des Mammakarzinoms nach histologischen und biologischen Merkmalen	2
1.1.3	Diagnostik und Staging	4
1.1.4	Metastasierung des Mammakarzinoms	5
1.1.5	Therapie des Mammakarzinoms	7
1.2	Die Bedeutung der microRNA für die Metastasierung ins zentrale Nervensystem	9
1.2.1	Die Barriere der Blut-Hirn-Schranke	9
1.2.2	Exosome und exosomale miRNA	11
1.2.3	MiRNA in der Tumorentstehung	14
1.3	Zielsetzung	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Ethikvotum	18
2.2	Geräte	18
2.3	Software	19
2.4	Verbrauchsmaterial	19
2.5	Chemikalien	20
2.5.1	Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit – Invitrogen	21
2.5.2	Prepare cDNA templates kit (TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis kit)	22
2.5.3	BrdU Cell Proliferation Assay – Merck Millipore	23
2.6	Zellkulturen und Medien	23
2.7	Serumproben	23
2.7.1	Einteilung nach Metastasierung	24
2.7.2	Einteilung nach Rezeptoren	24
2.7.3	Statistik der klinischen Daten	25
2.8	Methoden	26
2.8.1	Literaturrecherche	26
2.8.2	Ermittlung von miRNA-Expressionsprofilen aus Patientinnenserum	26
2.8.3	Datenbankrecherche nach potenziellen Targets und Signalwegen	30
2.8.4	Analyse der miRNA-210 in der Zellkultur	31
2.8.5	Statistische Auswertungsmethode	36

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Isolierung der RNA aus Serumexosomen	37
3.2	MiRNA-Expressionsprofile beim Mammakarzinom	37
3.2.1	MiRNA-Expressionsprofile nach Metastasierung	37
3.2.2	MiRNA-Expressionsprofile nach Tumorrezeptoren	40
3.3	Datenbankrecherche: Identifikation von möglichen Zielgenen und Signalwegen	44
3.4	Zellkulturversuche	50
3.4.1	MiRNA-210	50
3.4.2	BrdU-Proliferationsassay	51
3.4.3	MTT-Assay	51
3.4.4	Adhäsionsassay	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
4.1	MiRNA-Expressionsmuster beim Mammakarzinom	55
4.1.1	Probensammlung	55
4.1.2	MiRNA-Expressionsunterschiede bei Metastasierung	56
4.1.3	Targets der Blut-Hirn-Schranke	64
4.1.4	Bewertung der miRNA als Biomarker für Hirnmetastasen beim Mammakarzinom	65
4.1.5	MiRNA-Expressionsunterschiede bei Rezeptorstatus	66
4.1.6	Datenbankrecherche	67
4.2	Verhalten der Endothelzellen unter Einfluss von miRNA-210	69
4.2.1	Bedeutung der miRNA-210 für die Krebsentstehung	69
4.2.2	Auswirkung der miRNA-210-Überexpression auf die Endothelzelle	71
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
	<b>APPENDIX</b>	
<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	
<b>IV</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>V</b>	<b>Lebenslauf</b>	
<b>VI</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	



## **1 Einleitung**

### **1.1 Das Mammakarzinom**

#### **1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren**

Brustkrebs ist eine der wesentlichen gesundheitlichen Herausforderungen unserer Gesellschaft. Mit jährlich beinahe zwei Millionen Neuerkrankungen weltweit ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung in der weiblichen Bevölkerung (Heer et al. 2020).

Seit 2009 wird erstmals ein Rückgang der Inzidenz in Deutschland beobachtet. Trotzdem wurde im Jahr 2017 noch bei 67.295 Patientinnen im Alter von über 20 Jahren eine Form von Brustkrebs diagnostiziert (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut 2021a). Damit ist durchschnittlich jede achte Frau in ihrem Leben von einer Form des Mammakarzinoms betroffen.

Fast die Hälfte der Neuerkrankungen tritt bei Patientinnen im Alter von 50 – 69 Jahren auf (Hubner et al. 2020). Aus diesem Grund wird seit 2005 in Deutschland ein an die europäischen Leitlinien angepasstes Mammographie-Screening zur Früherkennung angewendet. Damit sollen Vorstufen, auch Vorläuferläsionen genannt, oder auch frühe Formen des Mammakarzinoms rechtzeitig erkannt werden, da diese mit einer besseren Prognose therapiert werden können (Katalinic et al. 2020; Kooperationsgemeinschaft Mammographie GbR 2021). Im Evaluationsbericht des nationalen Mammographiescreenings von 2017 wird beschrieben, dass mithilfe dieser Maßnahme ungefähr 80 % der invasiven Karzinome noch vor einem Lymphknotenbefall diagnostiziert werden konnten und weniger als ein Viertel der Karzinome eine ungünstige Prognose hatte (Deutsches Mammographie-Screening-Programm 2019).

Das Mammakarzinom ist mit weltweit jährlich 600.000 Todesfällen auch die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen (Sung et al. 2021; Heer et al. 2020). In Deutschland ließ sich seit den neunziger Jahren eine Verminderung der Mortalität um mehr als ein Viertel beobachten, bis sich die Zahl der Todesfälle im Jahr 2014 bei ungefähr 18.000 Todesfällen in Deutschland pro Jahr einpendelte (Hubner et al. 2020; Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut 2021b).

Die Abnahme der Sterblichkeit lässt sich durch eine bessere Vorsorge, eine effektivere Chemo-, Antihormon- und Immuntherapie sowie durch deren multimodale Anwendung erklären (Hubner et al. 2020). Damit ist die 5-Jahres-Überlebensrate von 79 % im Jahr

## 1 Einleitung

2002 auf 87 % im Jahr 2016 gestiegen (*Krebs in Deutschland 2006*, S. 52-55; *Krebs in Deutschland für 2015/2016 2019*, S. 78-81).

Als Risikofaktoren für die Erkrankung an Brustkrebs gelten eine frühe Menarche, eine späte Menopause und Erstgeburten im Alter von über 30 Jahren. Ein ungesunder Lebensstil mit Fettleibigkeit aufgrund von fettreicher Nahrung und exzessiver Alkoholkonsum sowie eine Strahlenexposition der Patientinnen im jungen Alter erhöhen ebenfalls das Risiko zu erkranken. Zudem erkranken in der westlichen Welt ungefähr 10 % der Patientinnen aufgrund von genetischer Prädisposition. Dabei besteht ein höheres Risiko, wenn enge Familienmitglieder, Verwandte ersten Grades oder mehr als zwei Angehörige betroffen sind (Thakur et al. 2017; Bravi, Decarli, and Russo 2018; John et al. 2007; McPherson, Steel, and Dixon 2000).

Geographisch ließ sich lange Zeit ein Unterschied in der Inzidenz zwischen fortschrittlichen und weniger entwickelten Ländern erkennen. Begründet wurde dies durch ein verbessertes Screening und vermehrte Anwendung von Hormontherapien mit Östrogenpräparaten während der Wechseljahre in den fortschrittlichen Staaten. Aktuelle Trends zeigen aber, dass sich die Inzidenzzahlen der Länder angleichen. Grund hierfür ist zum einen ein erhöhtes Bewusstsein der Bevölkerung für die Risikofaktoren in den OECD-Staaten und zum anderen Screening in weniger entwickelten Staaten (Torre et al. 2016).

### **1.1.2 Klassifizierung des Mammakarzinoms nach histologischen und biologischen Merkmalen**

Brustkrebs ist eine heterogene Tumorerkrankung, bei der eine Differenzierung der Läsionen bedeutend für die Einschätzung des Krankheitsverlaufs, die Prognose und eine an die Patientin angepasste Therapie ist (Yeo and Guan 2017). Vorläuferläsionen, wie beispielsweise das Carcinoma in situ, müssen hierbei histologisch von invasiven Karzinomen abgegrenzt werden.

Vorläuferläsionen des invasiven Mammakarzinoms sind Neoplasien aus abnormen Epithelzellen, die beim duktalem Carcinoma in situ (DCIS) vollständig im Brustgang oder bei den lobulären Neoplasien (lobuläres CIS, Atypische lobuläre Hyperplasie) im Brustdrüsenlappen liegen. Mikroskopisch sehen sie dem invasiven Karzinom ähnlich, durchbrechen jedoch nicht die Basalmembran. Die Neoplasien unterscheiden sich in der Wahrscheinlichkeit ein invasives Karzinom zu entwickeln. Während das DCIS als nicht

## 1 Einleitung

obligate Präkanzerose gilt, ist das Risiko, ein invasives Karzinom zu entwickeln, bei einem diagnostizierten LCIS höher (Ward et al. 2015).

Der Oberbegriff Mammakarzinom fasst alle malignen Tumore der Brustdrüse zusammen. Dazu gehören die invasiven duktales Karzinome, welche vom Milchgangsepithel ausgehen, die invasiven lobulären Karzinome, die sich aus den Milchdrüsenläppchen entwickeln sowie weitere Sonderformen.

Seit 2013 wird das duktales Karzinom nach der WHO-Klassifikation „invasive carcinoma of no special type (NST)“ genannt und ist mit 40 – 75 % der Diagnosestellungen die häufigste Erkrankungsform (Vuong et al. 2014). Diese Subgruppe umfasst alle Brustkrebsformen, die nach Ausschlussverfahren keiner „speziellen“ Gruppe zugeordnet werden können. Zu den „speziellen“ Gruppen zählen unter anderem das invasive lobuläre Karzinom, das tubuläre, kribiforme und muzinöse Karzinom sowie das Karzinom mit medullären Eigenschaften und mit apokriner oder siegelringzelliger Differenzierung (Sinn and Kreipe 2013; Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Im Zusammenhang mit der zwölften St. Gallen International Breast Cancer Conference 2011 wurde eine Klassifikation mithilfe biologischer Marker des Ersttumors eingeführt. Anhand klinisch-histologischer Faktoren wie Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptoren (PR) und dem Nachweis der human epidermal growth factor receptor 2-Positivität (HER2) sowie des Proliferationsfaktors Ki67 lassen sich vier Subtypen definieren:

*Tabelle 1: Einteilung der Subtypen anhand klinisch-histologischer Faktoren*

Luminal A		ER und/ oder PR +, HER2 -, Ki-67 niedrig
Luminal B	– HER2-neg	ER und/ oder PR +, HER2 -, Ki-67 hoch
	– HER2-pos	ER und/ oder PR +, HER2 überexprimiert, jedes Ki-67
HER2-positiv		ER und PR -, HER2 überexprimiert
Triple negative		ER und PR -, HER2 -

Die Einteilung in Subgruppen soll besser zwischen den einzelnen Typen differenzieren, um genauere Prognosen zu liefern und eine individuellere Gestaltung der Therapie zu ermöglichen (Goldhirsch et al. 2011).

### 1.1.3 Diagnostik und Staging

Grundsätzlich werden Tumore der Brust in hochentwickelten Ländern wie Deutschland oder der USA entweder bei Vorsorgeuntersuchungen oder aufgrund von Symptomen festgestellt (McDonald et al. 2016).

Frauen zwischen 50 – 69 Jahren haben die Möglichkeit, sich im Rahmen des Mammographie-Programmes (s.o.) im Zweijahresrhythmus untersuchen zu lassen. Das Mammographie-Screening ist mit einer Sensitivität von 100 % für Dichtegrad 1 des American College of Radiology (ACR), d.h. bei fettreichem Brustgewebe und 72,9 % für Kategorie ACR3 (heterogene Dichte) die effektivste Methode der Früherkennung (Weigel et al. 2017).

Außerhalb des Screenings werden die Tumore oft erst bei Auftreten von Symptomen erkannt. Schmerzen, axilläre Lymphadenopathie, spontane, blutige Mammillensekretion oder Hauterscheinungen wie Erytheme oder Ödeme können Anzeichen für eine Erkrankung an Brustkrebs sein (Apantaku 2000).

Bei Verdacht auf einen Tumor sollte der Befund beim Gynäkologen durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden. Nach einer ausführlichen Anamnese, bei der Risikofaktoren, Familienanamnese, Medikamenteneinnahme und Vorerkrankungen abgefragt werden, wird zunächst eine klinische Untersuchung beider Brustdrüsen durchgeführt. Diese beinhaltet die Inspektion sowie die Palpation von Brust und Lymphknoten.

Liegt bei der klinischen Brustuntersuchung ein auffälliger Befund vor, sollten bildgebende Verfahren zur weiteren Diagnostik herangezogen werden. Bei Patientinnen über 40 Jahren sollte in jedem Fall eine mammographische Untersuchung erfolgen. Ergänzend dazu wird in der S3-Leitlinie von 2020 bei schlechter Beurteilbarkeit der Mammographie oder dichtem Brustgewebe eine Ultraschall-Untersuchung empfohlen. Nachteil der Sonographie sind vermehrte falsch-positive Befunde, die unnötige Kontrollen und aufwendige Biopsien zur Folge haben. Bei Frauen unter 40 Jahren kann hingegen eine klinische Untersuchung, Sonographie und perkutane Biopsie zur sicheren Diagnostik ausreichen und eine Mammographie nur bei fehlender Eindeutigkeit notwendig sein (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Eine weitere wichtige Methode der Bildgebung ist die Magnetresonanztomographie (MRT), welche jedoch nicht als Standarddiagnostik verwendet wird, sondern nur bei bestimmten Indikationen Anwendung findet. Kann durch andere bildgebende Verfahren keine eindeutige Diagnose gestellt werden, sollte zusätzlich ein kontrastmittelverstärktes

## 1 Einleitung

MRT durchgeführt werden. Mit einer Sensitivität von fast 100 % können besonders nicht-verkalkte Auffälligkeiten wie lobuläre Neoplasien festgestellt werden (Bennani-Baiti, Bennani-Baiti, and Baltzer 2016).

Zur histologischen Sicherung der Befunde sollte anschließend an die Bildgebung eine Stanz- oder Vakuumbiopsie durchgeführt werden. Die Stanzbiopsie wird standardmäßig unter Ultraschallkontrolle durchgeführt. Bei auffälligen Mikrokalkablagerungen findet eine Vakuumbiopsie unter Röntgenkontrolle statt (Liu and Huang 2018).

Die entnommenen Gewebeproben lassen sich mit dem Grading-System nach Elston und Ellis (Modifikation des Bloom und Richardson-Gradings) in verschiedene Malignitätsgrade einteilen. Anhand der Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate kann die Differenzierung des Tumors von gut bis schlecht differenziert festgestellt und in die Grade G1 – G3 eingeteilt werden (Christgen, Langer, and Kreipe 2016).

Wird letztendlich ein maligner Tumor diagnostiziert, schließt sich bei klinischem Verdacht auf Metastasierung oder ab einem UICC Stadium II mit erhöhtem Risiko für Metastasen an die Diagnostik ein Staging der Erkrankung anhand der TNM-Klassifikation an. Im Rahmen der Basis-Staging-Untersuchung werden mittels CT von Thorax und Abdomen und Skelettszintigraphie Lunge, Leber und Skelett auf Metastasen sowie Lymphknoten auf Befall untersucht (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Die TNM-Klassifikation gibt die Ausbreitung des Tumors im Körper an. Zusammen mit der UICC-Einteilung kann sie als Grundlage für die Einschätzung der Prognose sowie als Basis für eine an die Patientinnen angepasste Therapie herangezogen werden (Li et al. 2015). Zur Bestimmung wird die Größe oder der Einfluss des Primärtumors auf Nachbarstrukturen (T), die Größe, Anzahl und/ oder Region der befallenen Lymphknoten (N) und die Fernmetastasierung (M) geprüft (Cserni et al. 2018). Präoperativ wird durch klinische Daten das klinische Stadium (cTNM) und postoperativ anhand der histologischen Auswertung der Gewebeproben das pathologische Stadium (pTNM) erhoben (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

### 1.1.4 Metastasierung des Mammakarzinoms

Trotz stetig besser werdender Früherkennungs- und Therapiemaßnahmen, um frühe Stadien mit guter Prognose rechtzeitig zu diagnostizieren, entwickeln 30 – 40 % der Brustkrebspatientinnen Metastasen. Bei der Metastasierung lösen sich Krebszellen vom Primärtumor, durchwandern das umgebende Gewebe und breiten sich über die Lymph-

## 1 Einleitung

oder Blutbahn systemisch im Körper aus, um sich an entfernten Körperregionen anzusiedeln und zu vermehren. Oft sind lebenswichtige Organe betroffen, deren Funktion dadurch erheblich eingeschränkt wird. Aufgrund von Therapieresistenzen, besonders von Hirnmetastasen (HM), verschlechtert sich die Prognose mit der Diagnose von Metastasen enorm und letztendlich sind sie die Ursache für 90 % aller Todesfälle im Zusammenhang mit Brustkrebs (Jin and Mu 2015; Gupta and Massague 2006).

Tumorzellen (TZ) können zum einen über den Lymphabfluss in regionäre Lymphknoten (LK) in der axillären, infra- und supraclaviculären Region und entlang der A. mammaria interna streuen (Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Die Erkenntnis über einen Befall der Lymphknoten dient als wichtiger Prognosefaktor. Bei einem positiven Befund mit mehr als drei befallenen Lymphknoten sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate im Vergleich zu Patientinnen mit metastasenfremen LK um ungefähr 30 % (Carter, Allen, and Henson 1989).

Bei Streuung über die Blutbahn sind Pleura (7 % der Fälle), das zentrale Nervensystem (ZNS, 17 % der Fälle), Lunge (23 % der Fälle), Leber (27 % der Fälle) und Knochen (48 % der Fälle) besonders anfällig für Fernmetastasen. Die Präferenz ist abhängig vom Subtyp des Brustkrebses. Für einen Knochenbefall sind vor allem die Typen Luminal A und Luminal B der St. Gallen Klassifikation und für Lebermetastasen der Subtyp HER2 verantwortlich (Soni et al. 2015). Besonders gravierend sind Metastasen im ZNS. Drei Viertel der Hirnmetastasen stehen im Zusammenhang mit einer Erkrankung an einem HER2-positiven oder Triple-negativen Tumor (Kennecke et al. 2010). Zerebrale Metastasen sind Bestandteil dieser Arbeit und werden im Kapitel 1.2 genauer behandelt.

Eine weitere wichtige medizinische Herausforderung ist die metastatische Latenz. Nicht selten kommt es bei Patientinnen Jahre nach der Erstdiagnose und radikaler Therapie zu einem Rückfall aufgrund von systemisch metastasierter Erkrankung. Grund dafür sind Mikrometastasen bzw. disseminierte oder zirkulierende Tumorzellen (CTC/DTC), die beim allgemeinen prätherapeutischen Staging nicht erkannt wurden (Jin and Mu 2015; Redig and McAllister 2013). Die Zellen verbleiben auf unbestimmte Zeit im Ruhezustand und es wird angenommen, dass schließlich 3 % der CTCs/ DTCs überleben, um Mikrometastasen zu bilden, von denen sich dann 1 % zum Tumor entwickelt (Luzzi et al. 1998; Giancotti 2013).

### **1.1.5 Therapie des Mammakarzinoms**

Die Therapie des Mammakarzinoms ist abhängig vom Lymphknotenstatus und vom Vorkommen von Fernmetastasen.

Wird der Brustkrebs frühzeitig und noch vor Befall von Lymphknoten, Knochen und inneren Organen diagnostiziert, gilt die operative Entfernung des Tumors als primäre Strategie. Studien belegen, dass brusterhaltende Operationen (BET) mit anschließender Bestrahlung eine ähnliche Überlebensrate wie die alleinige Mastektomie aufweisen und aufgrund eines besseren kosmetischen Ergebnisses und damit geringerer psychischer Belastung für die Patientinnen präferiert werden sollten (Fisher et al. 2002; Sakorafas 2001). Um bei der BET das lokale Rezidivrisiko zu senken, wird eine R0-Resektion mit tumorfreien Rändern im Gesunden gefordert. Ein vergrößerter Abstand vom Schnitttrand zum Tumor kann dabei die Prognose nicht verbessern (Moran et al. 2014). Die anschließende Strahlentherapie ist notwendig, um bei multizentrischen Tumoren verbliebenes Restgewebe und mikroskopische Foki zu behandeln und reduziert ein erneutes Auftreten des Krebses um 25 % (Fisher et al. 2002; Newman and Kuerer 2005).

Lediglich in Ausnahmefällen, wie beim inflammatorischen Mammakarzinom oder bei Befunden, bei denen kein tumorfreier Resektionsrand erreicht werden kann oder eine postoperative Strahlentherapie kontraindiziert bzw. von der Patientin nicht gewünscht ist, ist die Mastektomie Mittel der Wahl (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Bei Patientinnen mit unauffälligen Lymphknoten sollte ergänzend eine Biopsie des Sentinel-Lymphknotens (SLNB) durchgeführt werden. Die SLNB ist eine effektive Methode, um den Lymphknotenstatus zu erfassen und liefert Informationen über das Risiko einer lokalen und systemischen Ausbreitung sowie für die Organisation der weiteren Therapie, wie etwa die Entfernung weiterer axillärer Lymphknoten. Bei einem negativen Ergebnis oder rein mikroskopischem Befall des Sentinel-Lymphknotens ist eine axilläre Dissektion (ALND) nicht indiziert (Leitlinienprogramm Onkologie 2020; Galimberti et al. 2013). Bei einem makroskopischen Befund kann ein Verzicht auf die axilläre Lymphknotenentfernung ebenfalls diskutiert werden, sofern die Patientin eine BET mit anschließender systemischer Therapie erhält. Für die reine Sentinel-Lymphknotenentfernung (SLND) wurden, bei verminderter Morbidität nach der Behandlung, ähnliche Ergebnisse für das krankheitsfreie Überleben wie bei der ALND erreicht (Lucci et al. 2007; Giuliano et al. 2010; Giuliano et al. 2011).

## 1 Einleitung

Ergänzend zur operativen Entfernung des Tumors sollte eine systemische Therapie in Erwägung gezogen werden. Diese verfolgt das Ziel, verbliebene TZ zu zerstören, um Rezidive zu verhindern und ein krankheitsfreies Überleben langfristig zu ermöglichen (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2005). Die Behandlung kann prä- und/ oder postoperativ angewendet werden. Eine Indikation für eine neoadjuvante Anwendung mit anschließender operativer Resektion besteht bei fortgeschrittenem, inoperablem Tumor oder inflammatorischem Karzinom bzw. mit bestimmten histologischen Markern (HER2, TNBC und fortgeschrittenen Luminal B Karzinom nach St. Gallen Klassifikation (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Zu den Möglichkeiten der systemischen Behandlung zählen eine endokrine Therapie, Chemo- und/ oder Antikörpertherapie. Die entsprechende Intervention wird anhand der Brustkrebssubtypen ausgewählt. Bei ER-positiven Typen, wie unter anderem Typ Luminal A, wird eine endokrine Behandlung mit Aromatasehemmern oder ein selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) empfohlen. Unter fünfjähriger adjuvanter Medikation senkt Tamoxifen die jährliche Brustkrebssterblichkeitsrate um mehr als 30 % (Goldhirsch et al. 2011; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2005). Liegt ein Luminal-B-Tumor mit erhöhtem Risiko für Rezidive, ein HER2-positiver oder ein Triple-negativer Tumor vor, sollte die Patientin nach der S3-Leitlinie eine Chemotherapie erhalten. Eine prä- oder postoperative Anwendung liefert in Bezug auf das Gesamtüberleben ähnliche Ergebnisse. Eine neoadjuvante Therapie kann den Patientinnen vermehrt jedoch eine anschließende BET ermöglichen. Standardpräparate der adjuvanten Chemotherapie sind Anthrazykline in Kombination mit einem Taxan. Zur Behandlung von HER2-positiven Tumoren wird zusätzlich zur Chemotherapie eine HER2-spezifische Antikörpertherapie mit Trastuzumab empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Wurden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Fernmetastasen festgestellt, ist eine vollständige Heilung in der Regel nicht mehr zu erwarten. Fast zwei Drittel der Patientinnen versterben innerhalb der nächsten fünf Jahre an der Erkrankung und nur ungefähr 11 % leben nach der Diagnose länger als zehn Jahre (Mariotto et al. 2017). Bei dieser ungünstigen Prognose sollte daher das Aufhalten der Progression und der Erhalt der Lebensqualität primäres Therapieziel sein. Grundsätzlich sollten die Patientinnen zur palliativen Behandlung eine systemische Therapie erhalten.

## 1 Einleitung

Vor Anwendung sollte jedoch eine gründliche Abwägung des Nutzens unter Berücksichtigung des Gesundheitszustands und der persönlichen Anliegen der Patientinnen durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2020; Cherny, Paluch-Shimon, and Berner-Wygoda 2018).

## **1.2 Die Bedeutung der microRNA für die Metastasierung ins zentrale Nervensystem**

### **1.2.1 Die Barriere der Blut-Hirn-Schranke**

Hirnmetastasen (HM) treten immer öfter als Spätkomplikation einer bereits stattgefundenen systemischen Metastasierung auf. Die steigenden Fallzahlen lassen sich durch verbesserte Diagnostik, durch eine erfolgreichere therapeutische Kontrolle des Primärtumors sowie einer effektiveren Therapie von extrakraniellen Metastasen erklären, die die Lebensdauer der Patientinnen verlängern (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Trotz systemischer Therapie werden bei 10 – 30 % der Brustkrebspatientinnen Hirnmetastasen (HM) diagnostiziert. Die Inzidenz bei Autopsien ist deutlich höher, da das Screening nicht im Rahmen der Routineuntersuchung durchgeführt wird, sondern meist nur bei Auftreten von Symptomen wie Veränderungen des Geisteszustandes, Übelkeit oder Kopfschmerzen (Hadjipanteli et al. 2020; Martin et al. 2017).

Die Prognose ist mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von nur 2 – 25 Monaten noch immer ungünstig. Zusätzlich nimmt die Lebensqualität der Betroffenen deutlich ab, da HM sowohl die sensorischen als auch die kognitiven Funktionen der Patientinnen einschränken (Li, Peng, et al. 2017; Bublak 2019; Kanchan et al. 2020).

Um ins Gehirn zu streuen, müssen die Krebszellen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) durchdringen (Abbildung 1). Die BHS wird hauptsächlich durch Endothelzellen (EZ) gebildet, die mit Zellen der neurovaskulären Einheit, wie Perizyten, Immunzellen, Gliazellen und Nervenzellen, in Kontakt stehen. Über Tight-Junctions (TJ) werden die EZ untereinander eng verbunden, sodass ein parazellulärer Substanz- und Flüssigkeitsaustausch weitgehend verhindert werden kann (Curtaz, Schmitt, Blecharz-Lang, et al. 2020; Helms et al. 2016; Schick et al. 2021). EZ sind außerdem durch eine geringe Transzytoserate gekennzeichnet, wodurch sie einen transzellulären Austausch wesentlich stoppen können. Diese dichte Barriere ermöglicht, dass ein Wechsel zwischen Substanzen aus Blut und Gehirn nur reguliert über Transporter der Zelle stattfinden kann.

## 1 Einleitung

Die BHS wendet damit eine ungehinderte Diffusion von Molekülen ins zerebrale Gewebe ab und schützt das Gehirn so vor toxischen Metaboliten, Entzündungen und Krankheitserregern (Weidle, Niewohner, and Tiefenthaler 2015; Daneman and Prat 2015).

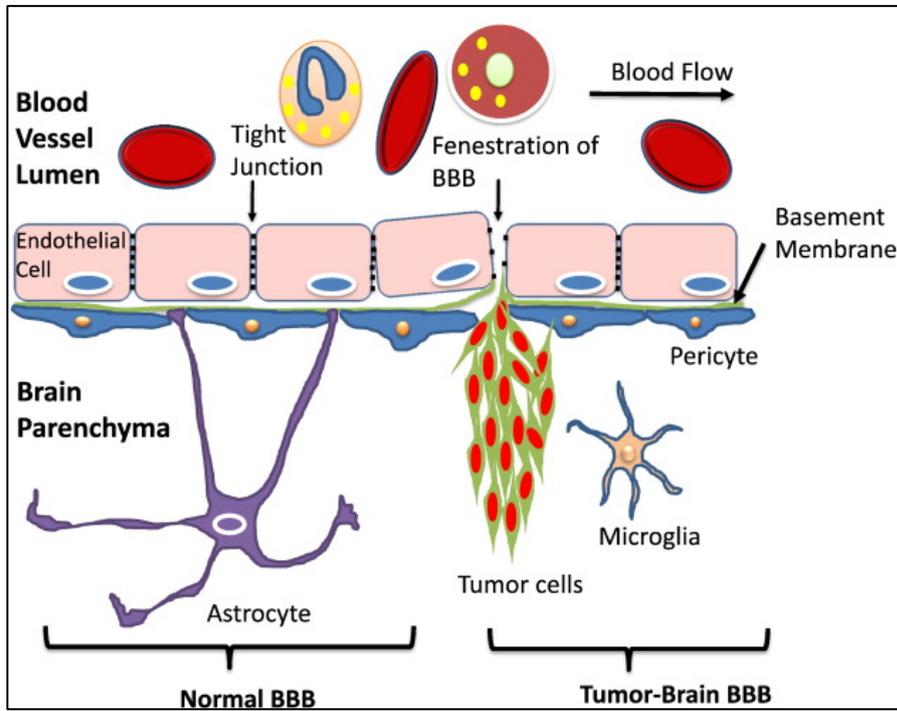


Abbildung 1: Aufbau der BHS im gesunden Hirn und im Tumorgehirn (Ljubimova et al. 2017)  
Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation ist keine Genehmigung erforderlich, da es sich um einen Open-Access-Artikel handelt.

Der genaue Mechanismus, wie die TZ durch die BHS gelangen, ist Ziel derzeitiger Forschungsprojekte. Einige Studien nehmen an, dass die Affinität der TZ zu bestimmten Organen, wie unter anderem dem Gehirn, insbesondere durch freigesetzte Vesikel gelenkt wird. Dabei handelt es sich vorwiegend um Exosome, die vom Primärtumor sekretiert werden und in die organspezifischen Zellen eindringen. Dort errichten sie durch Veränderung der residenten Zellen eine prämetastatische Nische und bereiten die Metastasierung vor (Wilhelm et al. 2018; Rana, Malinowska, and Zoller 2013; Curtaz, Schmitt, Blecharz-Lang, et al. 2020).

Die Schutzbarriere der BHS erhält ein konstantes Milieu im Gehirn, welches essenziell für die reguläre Funktion des zentralen Nervensystems ist. Gleichzeitig verhindert sie unter physiologischen Umständen die Durchdringung vieler Krebsmedikamente ins zerebrale Gewebe. Ursache hierfür ist die geringe Transzytoserate sowie ein begrenzter parazellulärer Transport hydrophiler Moleküle und polarisierte Effluxtransporter, die den Eintritt von lipophilen synthetischen Molekülen ins Nervengewebe abwenden (Arvanitis,

Ferraro, and Jain 2020; Angeli et al. 2019). Dieser Mechanismus behindert systemische Medikamente an der Zerstörung von TZ, die sich bereits im Gehirn angesiedelt haben und die Zellen können sich dort ungehindert im Schutz der Barriere ausbreiten.

Kommt es durch die eingewanderten TZ schließlich zur Metastasenentwicklung im Gehirn, ist die Barrierefunktion nicht mehr intakt (Abbildung 1). Es entsteht die lückenhafte Blut-Tumor-Schranke (engl. Blood-Tumor-Barrier, BTB). Diese eröffnet den Weg für systemische Therapien. Seit dieser Erkenntnis rückt neben der standardmäßigen operativen und strahlentherapeutischen Behandlung auch die Therapie mit systemischen Medikamenten in den Vordergrund. Diese kann bei Penetration durch die permeable BTB auch im Gehirn therapeutische Wirkung erzielen (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

### 1.2.2 Exosome und exosomale miRNA

Erst vor 40 Jahren entdeckten die Arbeitsgruppen Harding und Stahl sowie Pan und Johnstone in reifenden Retikulozyten von Säugetieren die Funktion von extrazellulären Vesikeln (Harding and Stahl 1983; Pan and Johnstone 1983). Seit ihrer Entdeckung 1983 sind Exosome zentrales Thema aktueller Forschungsprojekte, in denen ihre Bedeutung für physiologische, als auch pathologische Vorgänge des Körpers untersucht wird (Teles et al. 2021).

Exosome gehören wie auch Mikrovesikel (MV) und Apoptosekörper (ApK) zu den extrazellulären Vesikeln. Exosome sind 30 – 100 nm große Vesikel aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die sowohl von gesunden, als auch von Tumorzellen in die extrazelluläre Umgebung sekretiert werden (Thery, Zitvogel, and Amigorena 2002). Krebszellen können dabei etwa das Zehnfache der Menge aussenden (Dilsiz 2020).

Die Biosynthese der Exosome basiert auf dem endozytotischen Weg (Abbildung 2). Nach Invagination der Plasmamembran, überwiegend an Clathrin-überzogenen Mikrodomänen, kommt es zur Entwicklung von frühen Endosomen (engl.: early endosomes, EE). Ihre Funktion ist die Sortierung des Inhalts der endozytotischen Vesikel, der neben Bestandteilen der Plasmamembran auch aus Material des Golgi-Apparates besteht. Während Proteine und Lipide durch Recycling zurück an die Membran geführt werden, kommt es zur Reifung zu späten Endosomen (engl. late endosomes, LE) (Huotari and Helenius 2011). Die Einstülpung der LE-Membran führt zur Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV), welche im Lumen der Endosomen verbleiben. Die Endosomen werden nun als multivesikuläre Körper (MVK) bezeichnet, die anschließend entweder lysosomal

## 1 Einleitung

abgebaut werden oder wiederum mit der Membran der Zelle fusionieren, um ihren Inhalt extrazellulär abzugeben. Der Transport der MVK durch die Zelle wird durch RabGTPase-Proteine reguliert. Eine Hemmung dieser führt zu Anhäufung von MVK und stoppt die Exosomensekretion (Hsu et al. 2010; Kalani, Tyagi, and Tyagi 2014).

Studien belegen verschiedene Möglichkeiten der Synthese und Ausschüttung von Exosomen. Dabei wird zwischen dem klassischen ESCRT-abhängigen und dem alternativen ESCRT-unabhängigen Weg unterschieden. Der ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) ist ein Komplex aus vier verschiedenen Proteinen, der für die MVK-Bildung sowie die Formierung und das Sortieren von Vesikeln und Proteinen verantwortlich ist. Alternativ können Sphingomyelinasen in raft-basierten Mikrodomänen für die ESCRT-unabhängige Sortierung der Proteine zuständig sein. Diese produzieren zudem durch Hydrolyse von Sphingomyelin Ceramide, welche durch ihre kegelförmigen Strukturen eine spontane Verformung der endosomalen Membran auslösen können, wodurch die Bildung von Vesikeln gefördert wird (Trajkovic et al. 2008). Oberflächenproteine, wie beispielsweise Tetraspanine, induzieren ebenfalls die Biogenese der Exosome. Ähnlich wie Ceramide sind sie in der Lage, durch ihre kegelförmige Gestalt die Einstülpung der Membran zu begünstigen (Zhang et al. 2019).

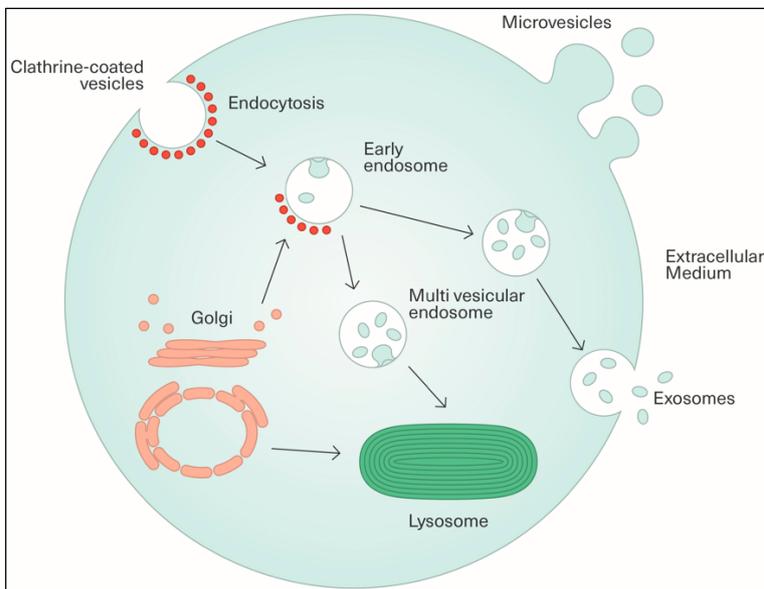


Abbildung 2: *Biogenese der Exosome (Guenat et al. 2017)*  
Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation ist keine Genehmigung erforderlich, da es sich um einen Open-Access-Artikel handelt.

Über Exosome können die Zellen des Tumors mit Zellen der Zielorgane kommunizieren. Die extrazellulären Vesikel transportieren, abhängig von ihrer Herkunft, verschiedene

## 1 Einleitung

bioaktive Verbindungen, wie beispielsweise Proteine, Lipide, Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA), einschließlich messengerRNA (mRNA) und microRNA (miRNA) (Burek et al. 2019; Curtaz, Schmitt, Blecharz-Lang, et al. 2020). Abbildung 3 zeigt die Aufnahme der Exosome in der Zielzelle. Durch Fusion mit der Zielmembran (1), Endozytose (2), Phagozytose (3) oder Rezeptor-Ligand-Bindung (4) können die Inhalte der Exosome in die Zielzelle gelangen und den Phänotyp der Empfängerzelle verändern (Valadi et al. 2007; Wortzel et al. 2019).

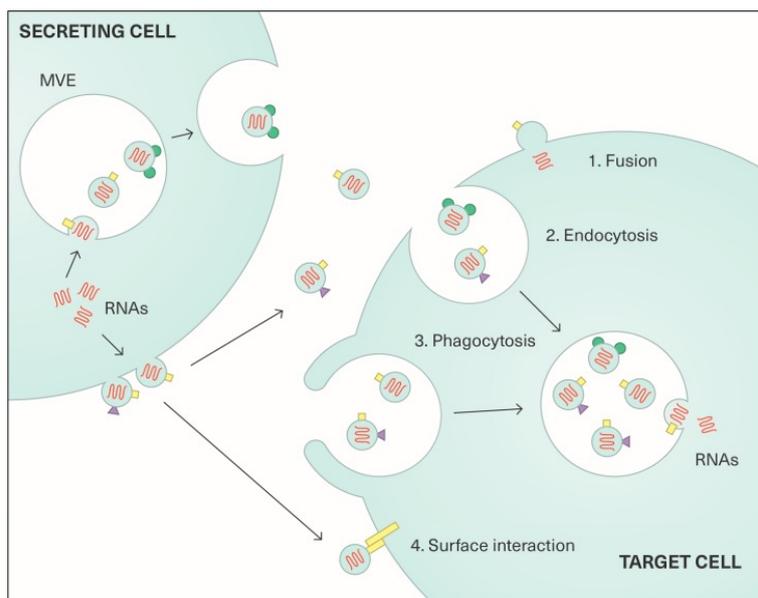


Abbildung 3: *Kommunikation der Exosome und Mikrovesikel mit der Zielzelle (MVE)* (Guenat et al. 2017)  
*Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation ist keine Genehmigung erforderlich, da es sich um einen Open-Access-Artikel handelt.*

In der Krebsforschung erscheint besonders die Funktion der transportierten miRNA interessant. Der genaue Mechanismus für die Beladung von Exosomen mit miRNA ist bisher noch unklar. Forschungsprojekte haben jedoch die Beteiligung mehrerer Proteine an der miRNA-Sortierung identifiziert. Beispielsweise ist dabei das heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1) von Bedeutung. Villarroya-Beltri et al. zeigten, dass hnRNPA2B1 an spezielle Sequenzen der miRNA binden kann und sie zur Aufnahme an die Exosome leitet (Villarroya-Beltri et al. 2013).

Um in der Zielzelle eine Wirkung auszulösen, muss eine entsprechende Konzentration von miRNA vorliegen. Daher wird angenommen, dass die Menge nicht allein durch Aufnahme reifer miRNA erreicht wird, sondern Exosome aus Krebszellen eigenständig in der Lage sind, eine zellunabhängige Biosynthese von miRNAs durchzuführen. Die für die Funktion von reifer miRNA benötigten Enzyme zur Hemmung der mRNA-Targets

sind bereits in den Exosomen erhalten. Dazu gehören Dicer, Argonautenprotein 2 (AGO2) und ds-RNA-Bindeprotein TRBP, die den RISC-loading-Complex (RLC) bilden und damit die Beladung des RNA induced silencing complex (RISC) mit miRNA induzieren. Über Bindung des RISC an die Ziel-mRNA kommt es dann zur Genstummschaltung (Melo et al. 2014).

### 1.2.3 MiRNA in der Tumorentstehung

MiRNAs sind kurze Einzelstrang RNAs mit 21 – 23 Nukleotiden, die sowohl in Zellkulturen und Geweben als auch in Körperflüssigkeiten, wie unter anderem Serum, vorkommen (Li and Rana 2014; Backes, Meese, and Keller 2016). Die erste miRNA, lin-4, wurde 1993 von Lee et al. im *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Lee, Feinbaum, and Ambros 1993). Erst sieben Jahre später wurde die miRNA let-7 gefunden, die damit auch die erste miRNA bei Säugetieren war. Heute umfasst die Datenbank miRBase (v22) miRNA-Sequenzen von 271 Organismen und insgesamt fast 50.000 reife miRNAs (Kozomara, Birgaoanu, and Griffiths-Jones 2019).

Als RNA-induced silencing complex (RISC) binden sie an die 3'-untranslatierte Region korrelierender mRNA-Targets und regulieren dadurch die posttranskriptionelle Genexpression. Durch Translationshemmung, als auch durch den Abbau der mRNA kommt es zur Genhemmung (Fusco 2010). Das Zusammenspiel der miRNA und ihren Zielgenen erscheint als komplexes Netzwerk, da eine einzelne miRNA mehrere mRNAs zum Ziel haben kann. Ebenso kann eine mRNA durch unterschiedliche miRNAs inhibiert werden (Lewis et al. 2003).

MiRNAs sind für zahlreiche pathologische Prozesse des Körpers von Bedeutung. Neben viralen Infektionen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und entzündlichen Krankheiten, spielen miRNAs vor allem bei Tumoren eine zentrale Rolle (Li and Rana 2014; Backes, Meese, and Keller 2016; Burek et al. 2019).

Ihre Funktion besteht dabei in der Förderung oder Suppression der Krebsentstehung (Zhang et al. 2007). MiRNAs begünstigen die Tumorentwicklung, indem sie mRNAs, die für Suppressorproteine kodieren, inhibieren. Umgekehrt wird die Tumorbildung bei Stummschaltung von mRNAs, die für Onkoproteine kodieren, unterdrückt. Kommt es zu einer Dysregulation der miRNA durch beispielsweise epigenetische Veränderungen oder

Mutation, wird dadurch das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und Apoptose beeinflusst. Damit wird die Entartung der Zellen gefördert und schließlich kommt es zur Bildung von Neoplasien (Hosseinahli et al. 2018; Cheng et al. 2005; Rothschild 2014).

### **1.2.3.1 Die Rolle der exosomalen miRNA bei der Fernmetastasierung**

Studien belegen die Beteiligung der miRNA an verschiedenen Prozessen der Fernmetastasierung. Nach Gao et al. sind miRNAs verantwortlich für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), bei der der Verlust von E-Cadherin eine Ablösung der TZ ermöglicht (Gao et al. 2018). Ebenso können miRNAs beispielsweise bei der lokalen Invasion und Intravasation eine Rolle spielen (Sossey-Alaoui, Bialkowska, and Plow 2009; Keklikoglou et al. 2012). Intravasation bezeichnet das Durchdringen der Krebszellen durch die Basalmembran von Lymph- bzw. Blutgefäßen. Des Weiteren bereiten die in Exosomen transportierten miRNAs durch Veränderung des Phänotyps der Empfängerzelle die prämetastatische Nische vor (Rana, Malinowska, and Zoller 2013). In Bezug auf die BHS sind miRNAs zudem in der Lage, die Integrität dieser zu regulieren (Bai et al. 2016).

Ergebnisse von Analysen der miRNA im Zusammenhang mit Fernmetastasierung beim Mammakarzinom zeigen Dysregulationen einzelner miRNAs auf. Beispielsweise haben Xing et al. die Veränderung der miRNA-509 im Zusammenhang mit Brustkrebs und zerebralen Metastasen untersucht. Die Resultate zeigen Wechselwirkungen der miRNA-509 mit dem RhoC-TNF $\alpha$ -Netzwerk auf, welches bei HM durch Herunterregulierung der miRNA aktiviert wird, dadurch die Permeabilität der BHS steigert und letztendlich zum Einstrom von TZ ins Gehirn beiträgt (Xing et al. 2015).

### **1.2.3.2 MiRNA als Biomarker**

Die frühzeitige Entdeckung von Krebs kann die Lebensqualität der Betroffenen wesentlich verbessern und die Mortalität deutlich verringern. Ziel der aktuellen Krebsforschung ist es deshalb, neue zuverlässige und kostengünstige Technologien der Frühdiagnostik zu entwickeln, die in der Lage sind schon kleine pathologische Veränderungen des Körpers zu erkennen. Diese Anzeichen umfassen zahlreiche biochemische Einheiten. Ne-

## 1 Einleitung

ben Enzymen, zytogenetischen und zytokinetischen Parametern und Metaboliten spielen vor allem auch Veränderungen von Nukleinsäuren, wie beispielsweise von miRNAs, eine wichtige Rolle als Krebsbiomarker (Wu and Qu 2015; Renz et al. 2001).

Dysregulationen des miRNA-Expressionsmusters sollen das Erkennen von Brustkrebs in frühen Stadien erleichtern, frühzeitige Hinweise für das Gesamtüberleben liefern und Möglichkeiten zur Verhinderung von Fernmetastasen bieten. Zusätzlich zur Standarddiagnostik wie Mammographie, MRT, histologische Rezeptoren und Biopsie, etc. soll demzufolge mithilfe der im Blut zirkulierenden miRNA eine neue, minimalinvasive und risikoarme Methode zur Diagnostik und Prognostik etabliert werden (Backes, Meese, and Keller 2016).

Die Funktion der miRNA als Biomarker wird in anderen Tumorentitäten, wie zum Beispiel bei Darm- oder Harnblasenkrebs, ebenfalls erforscht (Tang et al. 2019; Usuba et al. 2019). In Bezug auf Brustkrebs wurden bereits verschiedene miRNAs auf ihren Zusammenhang mit dem Überleben untersucht. Beispielsweise muss nach Hong et al. bei hoher Expression von miR-210 mit einer schlechten Prognose gerechnet werden (Hong et al. 2012). Studien prüften auch die Funktion der miRNA als Biomarker für Brustkrebssubtypen. Anhand ihrer Ergebnisse zeigen Sokilde et al., dass durch die Expression von miRNA-99a/ let7c/ mir-125b-2 eine Unterteilung der Luminal-Subtypen möglich ist (Sokilde et al. 2019). MiRNA-Marker für die Entstehung von Hirnmetastasen beim Mammakarzinom sind Thema dieser Dissertationsarbeit.

### **1.2.3.3 Auf miRNA basierender Therapieansatz in der Behandlung von Tumoren**

Das Erkennen von spezifischen miRNAs dient nicht nur als diagnostisches Mittel, sondern ermöglicht auch neue Lösungsansätze zur Prävention und Behandlung von Krebs. Im Allgemeinen wird angestrebt, überexprimierte Onco-miRNA zu hemmen und herunterregulierte Suppressor-miRNA zu ersetzen (Rothschild 2014). Bisherige Versuche zur Inhibition von miRNAs basieren auf Expressionsvektoren (miRNA-Schwämme), niedermolekularen Inhibitoren oder Antisense-Oligonukleotiden (anti-miR), welche zur ausgewählten miRNA komplementär sind und entweder systemisch oder durch lokale Injektion verabreicht werden können (Li and Rana 2014). Durch Verhinderung der Exosomenaufnahme in die Zielzellen und durch die Entfernung von Exosomen aus dem Kreislaufsys-

## 1 Einleitung

tem, sollen ebenfalls neue Therapiemöglichkeiten etabliert werden (Dilsiz 2020). Der Ersatz der miRNA soll durch synthetische miRNA-Mimetika und DNA-Plasmide gelingen (Hosseinahli et al. 2018).

Bisherige *in vivo*-Versuche zeigen teilweise begrenzte Wirksamkeiten der Methoden auf. Ein Problem im Zusammenhang mit modifizierten Oligonukleotiden ist beispielsweise der frühzeitige Abbau dieser. Noch bevor sich die anti-miRs im Gewebe verteilen können werden sie metabolisiert und mit dem Urin ausgeschieden. Zudem wird oftmals eine sehr hohe Dosis an Antisense-Oligonukleotiden (80 mg pro kg) benötigt. Damit steigt das Risiko unerwünschte Nebenwirkungen zu entwickeln (Li and Rana 2014).

Bei den aufgelisteten Beispielen handelt es sich also um Therapiekonzepte, die in Zukunft weiter an Tier- und Zellmodellen erforscht werden müssen, um eine akzeptable Wirksamkeit zu erzielen und Nebenwirkungen zu minimieren.

### 1.3 Zielsetzung

Mit einer Überlebensrate von nur 20 % im ersten Jahr nach der Diagnose sind Hirnmetastasen (HM) eine der gravierendsten Komplikationen bei Brustkrebs (Cheng and Hung 2007). Beim Großteil der Betroffenen treten sie als Spätkomplikation einer systemischen Erkrankung auf. Aus diesem Grund ist es notwendig, Mediatoren zu finden, die an der Auswanderung der Krebszellen durch die BHS beteiligt sind. Besonders interessant erscheint hierbei die Rolle der miRNA. Diese spezifischen Biomarker für HM können dann vor allem bei Risikopatientinnen frühzeitig bestimmt werden und sollen damit zur Therapieentscheidung beitragen.

Diese Promotionsarbeit hat damit zum Ziel, Dysregulationen der miRNA speziell im Zusammenhang mit zerebralen Metastasen zu identifizieren. Dazu werden Serumproben aus einem Patientinnenkollektiv der Frauenklinik des Universitätsklinikum Würzburgs mit unterschiedlichen Formen der Metastasierungen untersucht (Curtaz, Schmitt, Herbert, et al. 2020). Hierbei soll überprüft werden, ob eine vermehrte oder verminderte Expression von miRNA stattfindet und welche Auswirkungen diese auf die Zelle ausübt.

Damit stellt sich die Frage, ob bei Patientinnen, die von Metastasierungen ins Gehirn betroffen sind, miRNAs als Biomarker dienen können und diese ergänzend zur Standarddiagnostik und zur Prognostik herangezogen werden sollten.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Ethikvotum**

Die Serumproben stammen von Patientinnen, die aufgrund eines Mammakarzinoms am Uniklinikum Würzburg vorstellig wurden. Die Patientinnen wurden über das Forschungsprojekt und die Probenentnahmen aufgeklärt und willigten schriftlich ein.

Die Probenentnahme wurde zuvor durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt (Aktenzeichen 137/18-me).

### **2.2 Geräte**

- CO<sub>2</sub>-Inkubator – Heracell VIOS 250i, thermo scientific
- Combi Spin, FVL-2400N
- Eis: Scotsman AF 103
- Eppendorf Centrifuge 5424R
- H<sub>2</sub>O-Wasserbad – GFL
- Heat block – Techne DRI-Block DB2A, Model FDB02AD
- Heraeus Megafuge 16R – thermo scientific, Nr.: 75004270
- Heraeus Megafuge 40 R – Thermo Fisher, Nr.: 75004518
- Infinite M Plex – Tecan, Nr.: 30190085
- IsoFreeze PCR Cooler
- Kühlschrank – LIEBHERR profi line
- Kühltruhe - 20 °C – LIEBHERR/ Kirsch
- Kühltruhe - 80 °C – TDE Series powered by H-Drive, thermo scientific
- Mikroskop – Axiovert 25/ Zeiss
- Multipipette (300 µl) – Eppendorf Research
- NanoDrop (Spektrophotometer)

## 2 Material und Methoden

- PCR-Platten Versiegler – Applied Biosystems, Nr.: S20-3827
- Pipetten – Eppendorf Reference 0,1 – 2,0 µl, 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 50 – 200 µl, 100 – 1000 µl
- Pipettus – BRAND, accu jet pro 11 L 09756
- Quantstudio Flex 7 Real Time PCR Systems – Applied Biosystems, Nr.: 4484643
- Thermo Cycler – Applied Biosystems 2720, Nr.: 4359659
- Vortex – Model L46

### 2.3 Software

- Graph Pad Prism 9
- Magellan Pro 7.3
- NanoDrop 2000
- Quantstudio 6 & 7 Flex Real Time PCR System

### 2.4 Verbrauchsmaterial

- 96-well Platte – Thermo Fischer, Nr.: 167008
- Disposable hemocytometer (4-chambers) – Funakoshi, Nr.: 521-10
- Falcon 15 ml – Cell Star, greiner, Nr.: 188271N
- Falcon 50 ml – Cell Star, greiner, Nr.: 227261
- Filterspitzen (Größe 0,1 – 10 µl, 10 – 100 µl, 2 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Glaspipette (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) – greiner bio one
- Glass Pastuer Pipettes – BRAND, ISO 7712, Nr.: 747720
- Nalgene Cyroware/ Cyrogenic Vials, Nr.: 5000-0020
- RNase Away – Sigma, Nr.: 83931

## 2 Material und Methoden

- RNase-freie Tubes (200 µl, 500 µl, 1,5 ml) – Sarstedt
- TaqMan Advanced miRNA Custom Array Cards
- Zellkulturflasche (Tissue culture flask 75 cm<sup>2</sup>) – Sarstedt

### 2.5 Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol – Sigma, Nr.: M7154
- Ambion™ RNase-freies Wasser – Invitrogen, Nr.: 9937
- Applied Biosystems™ TaqMan™ Fast Advanced Mastermix
- BrdU Cell Proliferation Assay – Merck Millipore, Nr.: 2750
- Destilliertes Wasser – B.Braun
- Dimethylsulfoxid – Sigma Aldrich, Nr.: D2650
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - hoher Glucoseanteil – Sigma-Aldrich, Nr.: D5796
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline – Sigma Aldrich, Nr.: D8537-1L/ D8662-500ml
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, mit MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> – Sigma Aldrich, Nr.: D8662
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose (ohne Phenolrot) – Sigma Aldrich, Nr.: D1145
- Ethanol 100 % – Sigma Aldrich, Nr.: 32205-1L-M
- Ethanol 70 % – Fischar, Nr.: N-88006
- Exosome Resuspension Buffer – Invitrogen, Nr.: 4478562
- Fetal Bovine Serum (FCS) – Sigma, Nr.: F9665
- Fetal Bovine Serum, charcoal stripped – Sigma, Nr.: F6765
- Gelatine – Serva, Nr.: 22151
- HCl 1M – Carl Roth, Nr.: UN 1789

## 2 Material und Methoden

- Isopropanol – Sigma, Nr.: I9516
- L-Glutamine solution – Sigma, Nr.: G7513
- MTT-Pulver (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) – Sigma, Nr.: M2128-1G
- Penicillin-Streptomycin (PS) – Sigma, Nr.: P0781
- Prepare cDNA templates kit (TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis kit) – Applied Biosystems, Nr.: A28007
- Puromycin dihydrochloride from Streptomyces alboniger – Sigma, Nr.: P8833
- RPMI-1640 – Sigma Aldrich, Nr.: R7509
- Total Exosome Isolation Reagent (from serum) – Invitrogen, Nr.: 4478360
- Trypsin-EDTA Solution – Sigma, Nr.: T3924
- Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (+ DMSO) – Invitrogen, Nr.: V12883

### **2.5.1 Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit – Invitrogen**

- 2 x Denaturing Solution, Nr.: 8694G
- Acid-Phenol: Chloroform, Nr.: 9721G
- Collection Tubes, Nr.: 12202G5
- Filter Cartridges, Nr.: 10051G2
- Elution Solution, Nr.: 9911G2
- miRNA Wash Solution 1, Nr.: 8680G
- miRNA Wash Solution 2/3, Nr.: 8543G14

## 2.5.2 Prepare cDNA templates kit (TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis kit)

- 10 x Poly(A) Buffer
- 10 x RT Enzym-Mix
- 2 x miR-Amp Master Mix
- 20 x miR-Amp Primer Mix
- 20 x Universal RT Primer
- 25 x Ligation Adaptor
- 5 x DNA Ligase Buffer
- 5 x RT Buffer
- 50 % PEG 8000
- ATP
- dNTP Mix
- Poly(A)-Enzyme
- RNA Ligase

<b>Poly(A) Tailing Reaktion</b>	<b>Adaptor ligation reaction</b>
10 x Poly(A) Buffer	5 x DNA Ligase Buffer
Poly(A)-Enzyme	50 % PEG 8000
ATP	25 x Ligation Adaptor
RNase-freies Wasser	RNA Ligase
	RNase-freies Wasser

<b>Reverse transcription (RT) reaction</b>	<b>miR-Amp reaction</b>
5 x RT Buffer	2 x miR-Amp Master Mix
dNTP Mix	20 x miR-Amp Primer Mix
20 x Universal RT Primer	RNase-freies Wasser
10 x RT Enzym-Mix	
RNase-freies Wasser	

### 2.5.3 BrdU Cell Proliferation Assay – Merck Millipore

- 50 x Plate Wash Concentrate
- BrdU Reagent – 500 x konzentriert
- Conjugate Diluent
- Fixing Solution
- Goat anti-Mouse IgG, Peroxidase labeled – 2000 x konzentriert
- Prediluted BrdU Detection Antibody
- Stop Solution
- Substrate

### 2.6 Zellkulturen und Medien

<b>cerebEND-210-Zellen</b>	<b>cerebEND Kontrollzellen</b>
- DMEM high glucose	- DMEM high glucose
- 10 % FCS Si	- 10 % FCS Si
- 1 % PS	- 1 % PS
+ 3 µg/ml Puromycin	+ 3 µg/ml Puromycin

<b>4T1-Zellen</b>
- RPMI
- 10 % FCS Si
- 1 % PS
- 2 % L-Glutamin

### 2.7 Serumproben

In dieser Arbeit wurde ein Kollektiv aus 74 Brustkrebspatientinnen und 16 gesunden Probandinnen verwendet.

### 2.7.1 Einteilung nach Metastasierung

Die von Metastasierung betroffenen Körperregionen waren zunächst entscheidend für die Einteilung des Patientinnenkollektivs in fünf Gruppen mit ungefähr 15 – 25 Teilnehmerinnen.

Bei den Patientinnen der Gruppe 1 wurden zuvor zerebrale Metastasen diagnostiziert. Gruppe 4 waren Patientinnen mit viszeralen Metastasen, wie in Leber und Lunge, und bei den Patientinnen aus Gruppe 5 wurden zuvor ossäre Metastasierungen diagnostiziert. Bei den Patientinnen aus Gruppe 3 wurde der Brustkrebs frühzeitig festgestellt, d.h. bei der Erstdiagnostik waren noch keine Metastasen vorhanden. Die Proben der Frauen aus Gruppe 2 dienten der Kontrolle (Tabelle 2).

Von den 90 Patientinnen wurde jeweils eine Blutprobe gewonnen. Diese wurde bei 1000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Serum abpipettiert.

Tabelle 2: Einteilung der Patientinnen nach der Metastasierung

Gruppe 1 (n = 17)	Zerebrale Metastasen
Gruppe 2 (n = 16)	Kontrollgruppe, ohne Tumorleiden
Gruppe 3 (n = 18)	Primärer Krebs, Frühdiagnose ohne Metastasen
Gruppe 4 (n = 26)	Metastasen in Leber/ Lunge, viszeral
Gruppe 5 (n = 13)	Ossäre Metastasen

Die Serumproben wurden bei - 80 °C eingefroren.

### 2.7.2 Einteilung nach Rezeptoren

Zusätzlich zu der Einteilung nach Metastasen wurden die Proben nach Rezeptoren sortiert. Im Hinblick auf die St. Gallen Klassifikation erschien dies sinnvoll, da so die Unterschiede zwischen den einzelnen Brustkrebssubtypen bzw. zwischen den einzelnen Rezeptorstatus untersucht werden konnten (Kapitel 1.1.2). Die Ergebnisse der miRNA-Analyse könnten damit auch einen Ansatzpunkt für die Therapie der verschiedenen klinisch-histologischen Subtypen liefern. Die Einteilung erfolgte in fünf Untergruppen (Tabelle 3).

## 2 Material und Methoden

Tabelle 3: Einteilung der Patientinnen nach Rezeptorstatus

Gruppe 1 (n = 16)	Kontrollgruppe, ohne Tumorleiden
Gruppe 2 (n = 5)	HER 2 +
Gruppe 3 (n = 14)	TNBC
Gruppe 4 (n = 17)	ER/ PR/ HER2 +
Gruppe 5 (n = 7)	ER/ HER2 + oder PR/ HER2 +
Gruppe 6 (n = 31)	ER/ PR +

### 2.7.3 Statistik der klinischen Daten

Zu jeder Patientin wurden die klinischen Daten erfasst. Diese sind in Tabelle 4 aufgezeigt und beinhalten Patientinnen- sowie Tumoreigenschaften. Das Durchschnittsalter der einzelnen Gruppen reichte von 55,9 bis 63,4 Jahre und 77 % der Probandinnen waren zum Zeitpunkt der Serumentnahme postmenopausal.

Tabelle 4: ER Östrogen Rezeptor, HER2 human epidermal growth factor 2, KO Kontrolle von gesunden Probandinnen, OM Ossäre Metastasen, PK Primärer Krebs, PR Progesteron Rezeptor, VM viszerale Metastasen, ZM Zerebrale Metastasen

	KO	PK	VM	OM	ZM
<b>Patientinneneigenschaften</b>					
Gesamtzahl	16	18	26	13	17
Durchschnittsalter	55,9	57,8	60,5	63,4	60,6
Verstorben			10	1	12
Prä-/postmenopausal	4/12	6/12	5/21	3/10	3/14
<b>Tumoreigenschaften</b>					
ER/PR positiv		6	8	7	4
HER2 positiv		5	9	3	7
Triple negative		2	5	1	4
<b>Grading</b>					
Gut differenziert (G1)			2		
Mäßig differenziert (G2)		12	12	8	9
Schlecht differenziert (G3)		5	11	4	7
% der Ki67 positiven Zellen (mittel)		29,7 %	33 %	26,7 %	43 %
Andere		1	1		1

## **2.8 Methoden**

### **2.8.1 Literaturrecherche**

Die Literatur wurde hauptsächlich über die Datenbank Pubmed gesucht. Primär wurden die Begriffe *miRNA and breast cancer* und *brain metastasis and breast cancer* recherchiert und ausgearbeitet. Zudem diente der Onlinezugang der Universitätsbibliothek Würzburg für die Suche von Zeitschriften und Büchern. Die verwendete Literatur war in deutscher sowie englischer Sprache verfasst und umfasste mehr als nur eine Kurzzusammenfassung. Arbeiten, die lediglich über ein „abstract“ verfügten, wurden nicht zur Recherche herangezogen.

### **2.8.2 Ermittlung von miRNA-Expressionsprofilen aus Patientinnenserum**

#### **2.8.2.1 Vorbereitung**

Ziel der Arbeit war es, miRNA aus Patientinnenserum zu untersuchen, um Informationen über verschiedene miRNA-Expressionsmuster zu gewinnen. Zur Erstellung eines Expressionsprofils mussten die Proben jeweils vier Arbeitsschritte durchlaufen.

Um während der Gesamtdauer der Versuche RNase-frei zu arbeiten, wurden für die Pipetten ausschließlich sterile Filterspitzen sowie RNase-freie Tubes verwendet. Außerdem wurde der Arbeitsplatz vor Versuchsbeginn mit RNase Away gereinigt.

#### **2.8.2.2 Isolation von Exosomen aus Patientinnenserum**

Zur Isolation der Exosome aus dem Patientinnenserum wurden Serummengen von 500 – 1000 µl eingesetzt.

Um Zellen und Detritus zu entfernen, wurden die Proben zu Beginn für 30 Minuten bei 4 °C und mit 2.000 x g zentrifugiert und der entstandene Überstand in ein neues Tube überführt. Für die Isolation wurde anschließend das 0,2-fache Volumen von Total Exosome Isolation Reagent (from serum) hinzugefügt und danach im Kühlschrank für 30 Minuten bei 5 °C inkubiert. Die Zugabe der Total Exosome Isolation-Lösung ermöglichte die Bindung von Wassermolekülen und führte dazu, dass weniger lösliche Moleküle, wie

## 2 Material und Methoden

beispielsweise Exosome, anschließend durch das Zentrifugieren isoliert werden konnten. Dementsprechend wurden die Proben nach der Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur bei 10.000 x g zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet, welches die Exosome enthalten hat, wurde durch die Zugabe von 200 µl Exosome Resuspension Buffer gelöst.

Die entstandene Exosomen-Lösung wurde bei - 80 °C eingefroren oder unmittelbar zur miRNA-Isolation verwendet.

### **2.8.2.3 Isolation der RNA aus Exosomen**

Unter Verwendung des Total Exosome RNA and Protein Isolation Kits wurde aus den zuvor gewonnenen Exosomen RNA, die u. A. miRNA beinhaltet, isoliert (Burek et al. 2019). Die Methode basiert auf der Immobilisation der miRNA auf Glasfaserfiltern. Die gewonnene miRNA wurde anschließend zur Herstellung von cDNA verwendet.

Zur Gewinnung der RNA wurde den Exosomen zunächst eine denaturierende Lösung zugesetzt, welche im Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden musste. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit auf Eis wurde anschließend durch Zugabe von Acid-Phenol: Chloroform eine erste Reinigung der RNA durchgeführt. Durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 15.000 x g der Proben wurde die Mischung in eine obere wässrige, eine weiße Interphase und eine untere organische Phase getrennt.

Für das weitere Vorgehen musste die wässrige Phase vorsichtig, ohne die Interphase zu zerstören, in ein neues Tube pipettiert und mit dem 1,25-fachen Volumen von 100 % Ethanol gemischt werden, sodass mit der finalen Reinigung der RNA begonnen werden konnte. Dazu wurde das Ethanol-RNA-Gemisch durch einen Glasfaserfilter abzentrifugiert und anschließend insgesamt drei Mal durch den Filter gewaschen (Wash 1 und Wash 2/3). Nachfolgend wurde die RNA mit 20 – 50 µl einer Low ionic-strength solution eluiert und ein letztes Mal bei 10.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Die RNA befand sich im Durchfluss.

Im Anschluss wurde die gewonnene RNA mittels NanoDrop im Spektrophotometer untersucht. Die gemessene Konzentration der RNA wurde zur Vorbereitung der cDNA-Vorlagen (Kapitel 2.8.2.4) verwendet.

Nach der Messung musste die RNA bis zur Weiterverarbeitung bei - 80 °C eingefroren werden.

#### **2.8.2.4 Vorbereitung der cDNA-Vorlagen mit anschließender Präamplifikation**

Mithilfe des TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthese-Kits wurden die Proben für die Analyse vorbereitet. Die Vorbereitung der cDNA ließ sich in drei Schritte gliedern: Polyadenylierung, Ligation und reverse Transkription. Unter Verwendung einer 3'-Poly-A-Polyadenylierung und 5'-Ligation einer Adaptorsequenz sowie eines RT-Universalprimers konnte jede reife miRNA in cDNA umgeschrieben werden.

Die oben genannten Schritte folgten einem ähnlichen Ablauf. Zunächst wurde ein Mix aus verschiedenen Komponenten vorbereitet, der dann zur miRNA hinzugefügt wurde.

Im ersten Abschnitt wurde für die Polyadenylierungs-Reaktion ein Gemisch aus 10 x Poly(A)-Puffer, ATP, Poly(A)-Enzymen und RNase-freiem Wasser bereitgestellt. Dieses wurde zu 2 µl der miRNA mit einer Konzentration von 6 – 8 ng gegeben. Anschließend wurden die Proben zur Reaktion für 55 Minuten in den Thermo Cycler gestellt. Für die Polyadenylierung wurde die Mischung zunächst für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend zum Reaktionsstopp für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt.

Für die Adaptorligations-Reaktion im zweiten Schritt wurde zum Produkt der Poly(A)-Tailing Reaktion ein Mix aus 5 x DNA-Ligase Puffer, 50 % PEG 8000, 25 x Ligase Adaptor, RNA Ligase und RNase-freiem Wasser gegeben. Anschließend wurde das Gemisch zur Ligation im Thermo Cycler für eine Stunde bei 16 °C inkubiert.

Dem Ergebnis aus der Ligations-Reaktion wurde zur reversen Transkription eine Mixtur aus 5 x RT Puffer, dNTP Mix, 20 x Universal RT Primer, 10 x RT Enzym-Mix und RNase-freiem Wasser zugefügt. Die Mischung wurde erneut in den Thermo Cycler gestellt. Zunächst wurden die Proben zur Reaktion für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert und darauf folgend zum Reaktionsabbruch auf 85 °C erhitzt.

Die dabei entstandene cDNA wurde anschließend in einer Prä-Amplifikations-Reaktion vervielfältigt.

Für die Prä-Amplifikation in der miR-Amp Reaktion wurden jeweils 45 µl eines Mix aus 2 x miR-Amp Master Mix, 20 x miR-Amp Primer Mix und RNase-freiem Wasser vorgelegt. Jeweils 5 µl des Produkts aus der reversen Transkriptase Reaktion wurden hinzugefügt und ein letztes Mal im Thermo Cycler inkubiert. Bei 95 °C für 5 Minuten wurden

die Enzyme zunächst aktiviert. Danach sind die Proben vierzehn Zyklen von Denaturierung (95 °C, 3 Sekunden) und Verlängerung (60 °C, 30 Sekunden) durchlaufen, bevor sie zum Abbruch der Reaktion auf 99 °C erhitzt wurden.

Die entstandenen cDNA-Vorlagen wurden zur Aufbewahrung bei - 20 °C eingefroren.

### **2.8.2.5 Vervielfältigung der cDNA in der Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden TaqMan Advanced miRNA Custom Array Cards verwendet. Jede Platte wurde mit acht verschiedenen cDNAs beladen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde dabei versucht, jeweils zwei Proben aus vier der Patientengruppen zu verarbeiten.

Die cDNA wurde zusammen mit Applied Biosystems TaqMan Fast Advanced Master Mix und RNase-freiem Wasser vorbereitet, wovon 100 µl des Gemisches in die Füllöffnung der Platte gegeben wurden. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde die Pipette nur bis zum ersten Druckpunkt entleert. Zum Befüllen der Vertiefungen wurden die Array Cards anschließend zwei Mal für eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Platten wurden mithilfe des Versiegeler verschlossen, die Füllbehälter abgeschnitten und anschließend ins Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System geladen.

Zur Enzym-Aktivierung wurden die Proben zunächst für 10 Minuten auf 92 °C erhitzt. Danach folgten 50 Zyklen von Denaturierung für 1 Sekunde bei 95 °C und anschließendem Annealing/ Extension für 20 Sekunden bei 60 °C.

## 2 Material und Methoden

Zur Identifizierung der miRNA waren die TaqMan Advanced miRNA Custom Array Cards mit folgenden Targets beladen:

hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-210-3p	hsa-miR-885-5p
hsa-miR-92b-3p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-484
hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-27a-3p
hsa-miR-296-5p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-483-5p
hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-122-5p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-23a-3p
hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-181b-5p
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-32-5p	hsa-miR-20a-5p
hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-326	hsa-miR-491-5p
hsa-miR-132-3p	hsa-miR-340-5p	hsa-miR-576-3p
hsa-miR-143-3p	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-598-3p
hsa-miR-150-5p	hsa-miR-410-3p	hsa-miR-652-3p
hsa-miR-185-5p	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-29a-3p
hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-320a
hsa-miR-197-3p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-625-5p
hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-548d-5p

Die Analyse erfolgte mithilfe der Software Quantstudio. Dafür wurden die Proben nach den zwei Merkmalen – Metastasen und Rezeptoren – in Untergruppen eingeteilt (siehe Kapitel 2.7).

### 2.8.3 Datenbankrecherche nach potenziellen Targets und Signalwegen

Um die Komplexität des miRNA-mRNA-Systems und ihre Effekte auf den gesamten Körper zu verstehen, wurden verschiedene Datenbanken durchsucht. Hierbei wurden lediglich die 26 miRNAs verwendet, die zuvor signifikante Unterschiede in ihrer Expression aufwiesen.

Mithilfe der Datenbank TargetScan 7.2 wurden zunächst potenzielle Targets der jeweiligen miRNA herausgesucht (Whitehead Institute for Biomedical Research 2018). Dabei wurden die fünf Targets berücksichtigt, die den besten, d.h. niedrigsten kumulativ gewichteten Kontextwert ++ („cumulative weighted context++ score“ (CWCS)) aufweisen. Der CWCS berechnet sich nach Agarwal et al. aus dem Bindungstyp (site type) sowie 14 weiteren Eigenschaften. Dabei werden Merkmale, wie beispielsweise eine geringere Zielstellenhäufigkeit (engl. target-site abundance = TA) im Transkriptom oder eine stärkere vorhergesagte Bindungsstabilität der Seed-Sequenz der 5'-miRNA-Region an die

komplementäre Sequenz der mRNA („Seed-pairing Stability“ (SPS)), berücksichtigt. So kann durch den CWCS die Gesamtrepression für jedes vorhergesagte Zielgen geschätzt werden (Agarwal et al. 2015).

Im Anschluss an die Zielgen-Recherche wurden die Targets in der KEGG Pathway-Datenbank zur Identifikation biologischer Signalwege überprüft (Kanehisa and Goto 2000). Zusätzlich wurden die miRNAs in der Human microRNA Disease Database auf Zusammenhänge mit anderen Krankheiten untersucht (Huang et al. 2019).

### **2.8.4 Analyse der miRNA-210 in der Zellkultur**

#### **2.8.4.1 Kultivierung von cerebEND- und 4T1-Zellen**

Für die Versuche mit der Zellkultur wurden cerebEND- und 4T1-Zellreihen von Mäusen verwendet. Nach dem Auftauen wurden diese im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

CerebEND-Zellen sind zerebrale Endothelzellen, die aus der Kleinhirnrinde von neugeborenen Mäusen isoliert und in der Arbeitsgruppe für verschiedene Forschungsfragen verwendet wurden (Burek, Salvador, and Forster 2012; Gabbert et al. 2020; Salvador et al. 2021; Burek et al. 2020; Dilling et al. 2017; Gerhartl et al. 2020; Rosing et al. 2020). Es wurde sowohl eine reine cerebEND- (= Kontroll-), als auch eine cerebEND-210-Zellkultur, d.h. mit überexprimierter miRNA-210, verwendet. Die cerebEND-210-Zellreihe wurde im Vorfeld dieser Arbeit etabliert. Ein murines in vitro BHS-Modell cerebEND (Silwedel and Forster 2006) wurde mit einem pEGP-miR-Plasmid transfiziert. Die Überexpression von miR-210 wurde durch qPCR nachgewiesen.

Beide Zellreihen wurden in DMEM/ high glucose mit einem Zusatz von 10 % ml FCS, 1 % ml PS sowie 3 µg/ml Puromycin kultiviert.

4T1-Zellen sind Brustkrebszellen aus Brustdrüsengewebe von BALB/c-Mäusen. Die Zelllinie wurde in einem Medium aus RPMI 1640 mit Zusätzen von 10 % FCS, 2 % L-Glutamin und 1 % PS kultiviert.

Die Zellreihen wurden wöchentlich ein bis dreimal subkultiviert. Durch Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA auf die mit PBS gewaschenen Zellen wurden diese abgelöst. Der Ablösungsvorgang wurde durch Zugabe von 4 ml Medium abgebrochen. Im Anschluss konnten die Zellen entweder in einem Einfriermedium aus 80 % Medium, 10 % DMSO und

## 2 Material und Methoden

10 % FCS eingefroren oder zur weiteren Kultivierung in einer neuen Zellflasche ausgesät werden.

### 2.8.4.2 BrdU-Proliferationsassay

Für den Proliferationsassay wurde das Kit BrdU Cell Proliferation Assay verwendet. Das Kit basiert auf Bromdesoxyuridin (BrdU), ein Thymidin-Analogon, welches proliferierende Zellen beim Eintritt in die S-Phase in ihre neu synthetisierte DNA einbauen. Je höher die Proliferationsrate der Zellen ist, desto mehr BrdU wird in die DNA eingebaut.

BrdU kann immunchemisch nachgewiesen werden, sodass Zellen, die neue DNA produzieren, bewertet werden können.

Der Proliferationsassay wurde zweimal unabhängig voneinander unter jeweils gleichen Bedingungen wiederholt. Für das Verfahren wurden die cerebEND-210-Zellen und die Kontrollzellen zunächst nach dem folgenden Schema auf 0,5 %-Gelatine auf einer 96-well-Platte ausgesät. Die Konzentration der Zellen betrug jeweils 8.000, 4.000 oder 2.000 Zellen pro Pipettiervertiefung (= well).

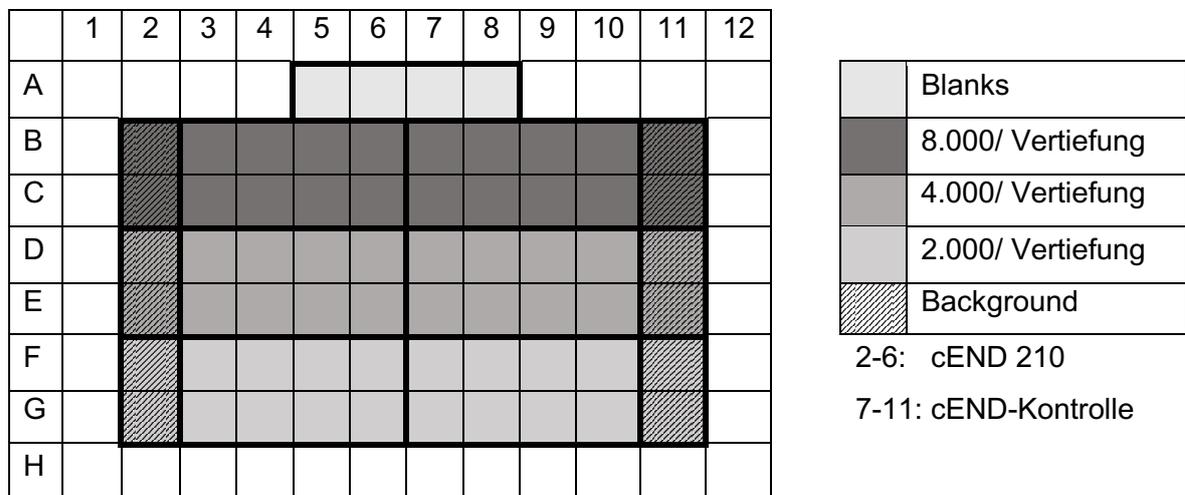


Abbildung 4: Schema der 96-well-Platte beim Proliferationsassay

Um den Versuch weiterführen zu können, wurde nach ausreichender Inkubationszeit bei einer mikroskopischen Kontrolle geprüft, ob sich die Zellen auf dem Boden der Vertiefungen abgesetzt hatten, damit das Medium gewechselt werden konnte. Dazu wurden 100 µl des DMEM-Zellkulturmediums in jede Pipettiervertiefung pipettiert. Zudem wur-

## 2 Material und Methoden

den 20 µl einer Lösung, in der das BrdU-Label 1:500 in Medium verdünnt wurde, hinzugefügt. Anschließend wurde die Zellplatte für 24 Stunden in den Inkubator gestellt, um dem BrdU ausreichend Zeit zum Einbau in die proliferierenden Zellen zu geben.

Nach 24 Stunden wurde erneut mikroskopisch kontrolliert, welche Zellkonzentrationen für den Versuch geeignet sind. Dabei wurden Zellen bevorzugt, die nicht sehr dicht gewachsen sind. Dementsprechend wurden für das weitere Experiment nur Konzentrationen von 2.000 Zellen und 4.000 Zellen pro Pipettiervertiefung verwendet.

Im nächsten Versuchsschritt wurde das Medium zunächst aus den Vertiefungen entfernt und jeweils 200 µl der Fixing Solution hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen drei Mal mit einer Waschlösung aus 50 x Wash Buffer und destilliertem Wasser (verdünnt im Verhältnis 1:50) ausgewaschen, bevor 100 µl pro Pipettiervertiefung des Detector Antibody (BrdU-Antibody) hinzupipettiert wurden.

Die Zellen wurden nach einer Inkubation von 60 Minuten erneut drei Mal mit der Waschlösung gewaschen. Darauffolgend wurde eine verdünnte Lösung aus Goat anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugate und dem zugehörigen Conjugate Dilute hergestellt. Von dieser Lösung wurden 100 µl pro Pipettiervertiefung zu den Zellen zugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor 100 µl des TMB Peroxidase Substrates in die Vertiefungen pipettiert wurden, musste wieder drei Mal mit der Waschlösung und ein weiteres Mal mit destilliertem Wasser gewaschen werden. Während einer Inkubationszeit von 30 Minuten färbten sich die BrdU-positiven Zellen blau. Um die Reaktion zu stoppen, wurden abschließend 100 µl der Stop Solution pro Pipettiervertiefung hinzugefügt. Dabei änderte sich die Farbe der positiven Vertiefungen zu gelb.

Zum Auslesen der Pipettiervertiefungen wurde der Infinite M Plex der Firma Tecan benutzt. Dafür wurde die 96-well-Platte in das Gerät gelegt und die Ergebnisse mithilfe des Magellan Pro 7.3 Programms bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 550 nm) ausgelesen.

### **2.8.4.3 MTT-Assay**

Der MTT-Assay wurde 1983 von Tim Mosmann zur Identifizierung von lebenden Zellen durch Erfassung ihrer Aktivität entwickelt. Mithilfe des MTT-Assays können Rück-

## 2 Material und Methoden

schlüsse auf die Zytotoxizität, Proliferation oder Aktivität gezogen und zwischen lebenden und toten Zellen differenziert werden (Mosmann 1983). Der Versuch beruht auf Tetrazoliumsalz MTT (gelb), welches aufgrund seiner molekularen Struktur in der Lage ist, durch die Zellmembran zu gelangen. Dort wird es durch mitochondriale Enzyme, Enzyme im Zellplasma oder nichtenzymatische Reaktionen, wie beispielsweise durch Glutathion, zu Formazan (violett) reduziert. Die nadelförmigen Formazankristalle zerstören die Zellmembran, was unmittelbar zum Zelltod führt. Dadurch wird die Formazanbildung gestoppt. Durch Lyse der Zellen werden die intrazellulären Kristalle freigelegt und können gelöst werden. So können sie im Anschluss durch spektroskopische Messungen erfasst werden (Präbst et al. 2017).

Ergänzend zum Proliferationsassay sowie zum Vergleich der metabolischen Aktivität wurde der MTT-Assay zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Für den Versuch wurden die cerebEND-210-Zellen und die cerebEND-Kontrollzellen auf 0,5 %-Gelatine auf jeweils einer 96-well-Platte in einer Verdünnungsreihe ausgesät und anschließend für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	16.000/ Vertiefung
	8.000/ Vertiefung
	4.000/ Vertiefung
	2.000/ Vertiefung
	1.000/ Vertiefung
	500/ Vertiefung

Abbildung 5: Schema der 96-well Platte beim MTT-Assay

Am Versuchstag wurden die Pipettiervertiefungen zunächst vom Medium entleert und gewaschen. Dazu wurde PBS mit einem Zusatz von Magnesium und Calcium verwendet. Anschließend wurden 100 µl einer MTT-Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Die Lösung setzte sich aus 5 mg/ml MTT-Pulver und DMEM ohne Phenolrot zusammen. Die Platten wurden zur Inkubation zurück in den Inkubator gestellt.

Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurde das Medium erneut entfernt und die Pipettiervertiefungen anschließend zur Lyse der Zellen mit 100 µl Acid-Isopropanol pro

Vertiefung, einer Lösung aus Salzsäure und Isopropanol, befüllt. Vertiefungen mit metabolischer Aktivität färbten sich violett. Die Absorption des violetten Formazans wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenz 630 nm) im Tecan-Scanner photometrisch erfasst.

### 2.8.4.4 Adhäsionsassay

Der Adhäsionsversuch untersucht die Anheftung der Brustkrebszellen (4T1) an die Endothelzellen (cerebEND) und wurde zweimal unabhängig voneinander wiederholt. Dazu wurden die cerebEND-210-Zellen sowie die cerebEND-Kontrollzellen in einer Konzentration von 40.000 Zellen pro Vertiefung auf 0,5 %-Gelatine auf jeweils einer 96-well-Platte ausgesät und über Nacht im Inkubator kultiviert. Die Adhäsion mit 4T1-Zellen wurde im Vorversuch mit zwei Konzentrationen (25.000 pro Vertiefung, 15.000 pro Vertiefung) durchgeführt. In einem zweiten Versuch wurde lediglich eine Konzentration von 15.000 4T1-Zellen pro Vertiefung verwendet.

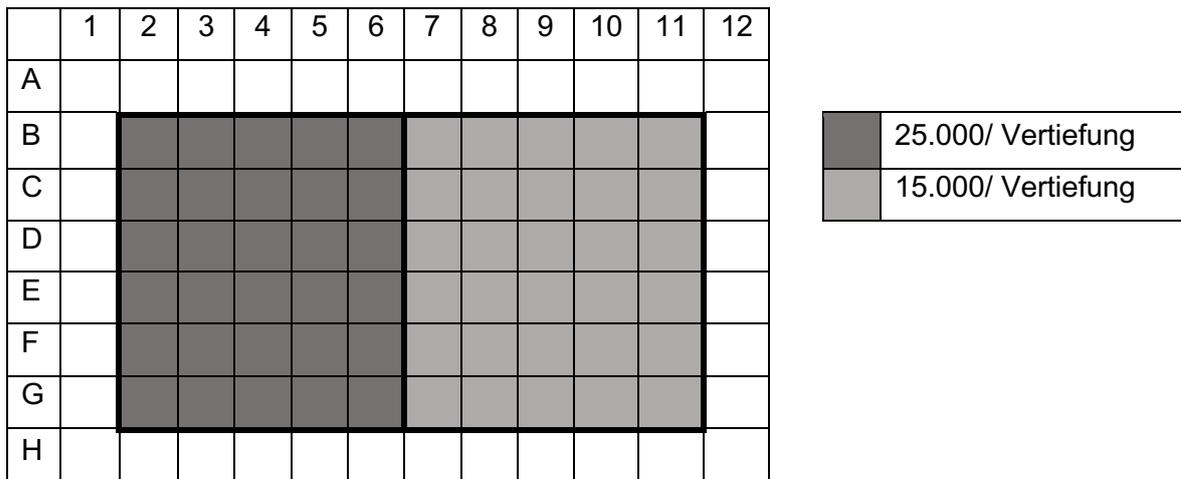


Abbildung 6: Schema der 96-well Platte beim Adhäsionsassay

Am nächsten Tag wurde das Medium durch ein DMEM-Medium mit ssFCS Zusatz ausgetauscht und die Zellen erneut für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

Am Versuchstag wurden zunächst die 4T1-Krebszellen für den Versuch vorbereitet. Dazu wurden die mit Trypsin-EDTA abgelösten Zellen im Medium für 5 Minuten bei 100 x g zentrifugiert und das entstandene Pellet anschließend mithilfe eines Farbstoffes angefärbt. Der verwendete Farbstoff stammte aus dem Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit und musste zuvor in DMSO gelöst werden. Die angefärbten Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Brutschrank erneut zentrifugiert und in Zellmedium

## 2 Material und Methoden

(DMEM + ssFCS + PS) resuspendiert. Dieser Schritt wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wiederholt und anschließend konnten die Zellen in frischem Zellmedium in einer Konzentration von 15.000 Zellen pro Vertiefung und 25.000 Zellen pro Vertiefung auf den Endothelzellen ausgesät werden. Die Endothelzellen wurden dafür zuvor zwei Mal mit PBS gereinigt.

Nach 30 Minuten und nach einer Stunde Inkubationszeit, in der sich die Krebszellen an die Endothelzellen binden konnten, wurden die Pipettiervertiefungen erneut mit PBS gewaschen und zur Messung im Tecan-Scanner mit 100 µl PBS pro Vertiefung gefüllt.

Das Auslesen der Vertiefungen im Tecan-Scanner wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenz 535 nm) bei 50 Gains durchgeführt.

### 2.8.5 Statistische Auswertungsmethode

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Software Graph Pad Prism 9.

Die Ergebnisse der miRNA-Expressionsprofile aus Versuch 2.8.2 (Ermittlung von miRNA-Expressionsprofilen aus Patientinnenserum) wurden mithilfe des one-way ANOVA-Tests ausgewertet. Dabei wurde jede Untergruppe mit der Kontrollgruppe verglichen.

Der unpaired t-Test wurde verwendet, um die Ergebnisse der Versuche aus der Zellkultur, d.h. Proliferations-, MTT- und Adhäsionsassay, auf statistische Signifikanz zu untersuchen. Alle Zellkulturversuche wurden zweimal unabhängig voneinander wiederholt.

Signifikante Daten wurden in den Abbildungen der Ergebnisse mit dem Symbol (\*) kenntlich gemacht. Die Bedeutung der jeweiligen Symbole zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: P-Value

ns	=	0.1234
*	=	0.0332
**	=	0.0021
***	=	0.0002
****	=	<0.0001

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Isolierung der RNA aus Serumexosomen**

Die aus den Serumexosomen isolierte Gesamt-RNA zur Detektion von Expressionsprofilen wurden zunächst mit NanoDrop gemessen. Bei den 90 Proben wurden Konzentrationen von 3,1 ng/µl bis 25,7 ng/µl festgestellt (Ø: 7,8 ng/µl). Die Daten dienten der Berechnung der benötigten Menge (6 – 8 ng) für die Herstellung von cDNA.

### **3.2 MiRNA-Expressionsprofile beim Mammakarzinom**

Mithilfe der miRNA Array Cards wurde das Expressionsmuster von 48 verschiedenen miRNAs aus 90 Serumproben untersucht. Die Proben wurden anhand von Metastasierungsregionen und Rezeptorstatus in jeweilige Untergruppen eingeteilt. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software Quantstudio und der endogenen Kontrolle hsa-miR-320.

#### **3.2.1 MiRNA-Expressionsprofile nach Metastasierung**

Zunächst wurden die Proben anhand ihrer Metastasierung in die verschiedenen Körperregionen analysiert: Metastasierung ins zentrale Nervensystem, viszerale Metastasierung, ossäre Metastasierung und Brustkrebs ohne Metastasierung (BC ohne M). Die Einteilung in Untergruppen ermöglichte es festzustellen, ob eine bestimmte miRNA-Dysregulation einer spezifischen Metastasierungsform zuzuordnen ist.

Jede einzelne Gruppe wurde mithilfe des one-way ANOVA-Tests mit der Kontrollgruppe verglichen, sodass sich für die Metastasierungsgruppen bei 14 miRNAs ein signifikanter Unterschied im Expressionsprofil zeigte. Bei sechs miRNAs wurde ein erhöhtes und bei acht miRNAs ein erniedrigtes Profil identifiziert. Die jeweiligen miRNAs sind in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt und zeigen die Veränderung des Expressionsmusters der einzelnen Gruppen im Verhältnis zur Kontrolle. Statistisch signifikante Daten sind entsprechend mit dem Symbol (\*) gekennzeichnet. Die Ergebnisse aller miRNAs sind im Anhang aufgelistet.

Die in Abbildung 7 A-F aufgezeigten miRNAs weisen eine signifikante Überexpression bei mindestens einer Untergruppe auf. Es fällt auf, dass keine der sechs miRNAs in allen

### 3 Ergebnisse

Untergruppen eine signifikante Regulation aufweist. Zudem ist auffällig, dass hsa-miR-122-5p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-490-3p und hsa-miR-576-3p hauptsächlich bei Metastasen im ZNS vermehrt exprimiert werden, während hsa-miR-486-5p sowohl bei Metastasen im ZNS als auch bei viszeralen und ossären Metastasen ein erhöhtes Expressionsniveau vorweist.

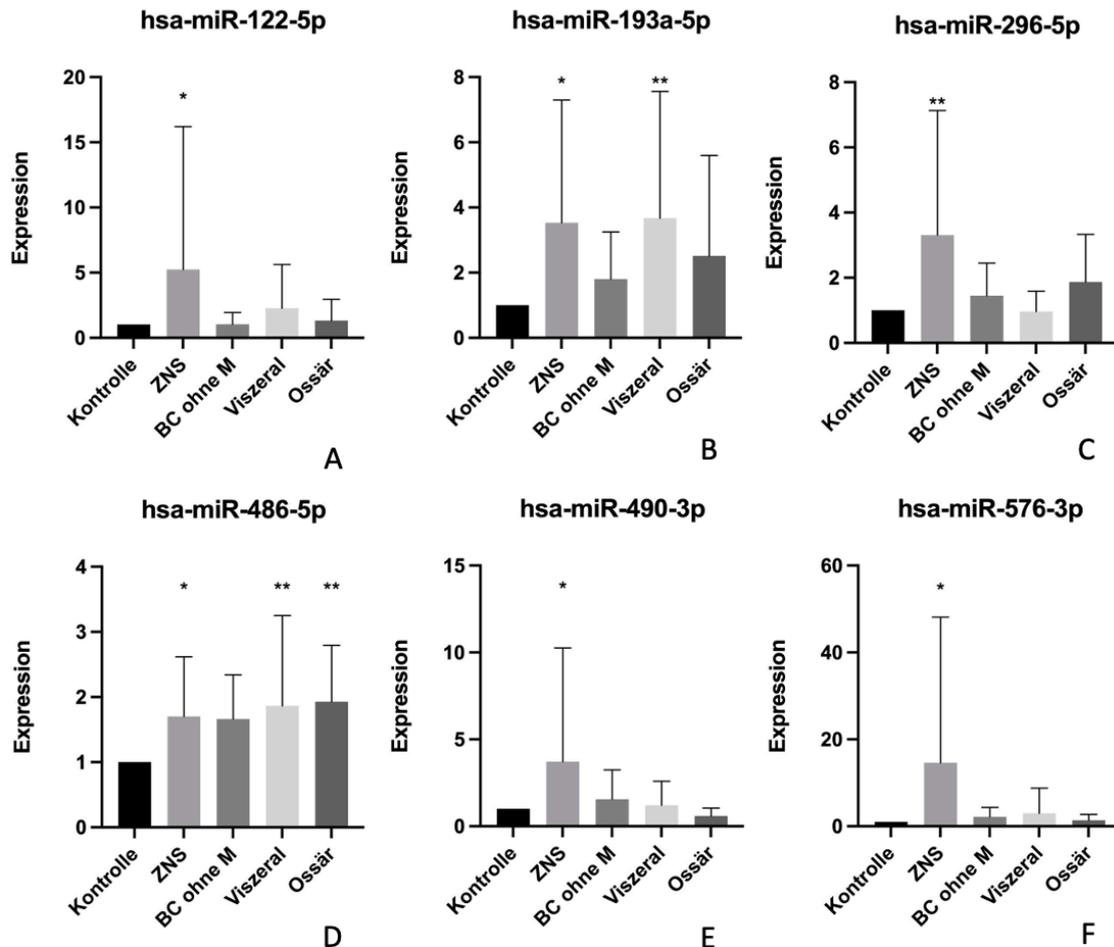


Abbildung 7: miRNA-Expression im Verhältnis zur Kontrolle, A-F: Überexprimierte miRNA Mittelwert + Standardabweichung  
 (A): hsa-miR-122-5p (B): hsa-miR-193a-5p (C): hsa-miR-296-5p (D): hsa-miR-486-5p  
 (E): hsa-miR-490-3p (F): hsa-miR-576-3p  
 BC ohne M: Breast Cancer ohne Metastasierung  
 \* =  $p \leq 0.0332$ ; \*\* =  $p \leq 0.0021$ , one-way ANOVA-Test

Abbildung 8 A-H stellt die acht miRNAs mit verminderter Expression bei mindestens einer der Metastasierungsgruppen dar. Auch hier lässt sich bei keiner der miRNAs ein signifikanter Unterschied in allen Untergruppen erkennen. Hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-148b-3p und hsa-miR-326 zeigen für Metastasen im ZNS sowie für viszerale und ossäre Metastasen eine signifikante Abnahme der Expression auf. Insbesondere die Expression von hsa-miR-130a-3p ist bei ZNS-Metastasen deutlich reduziert.

### 3 Ergebnisse

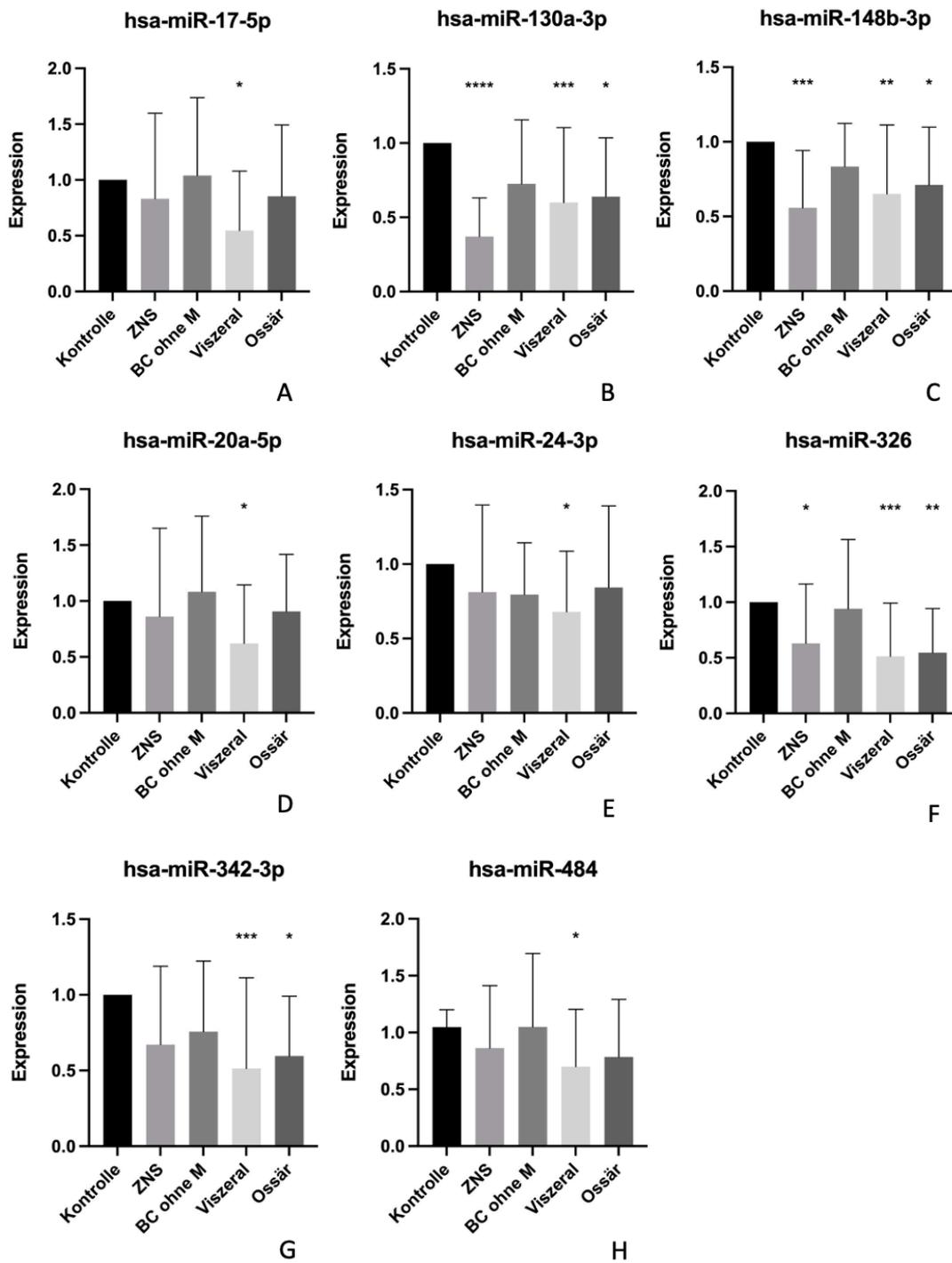


Abbildung 8: miRNA-Expression im Verhältnis zur Kontrolle, A-F: Herunterregulierte miRNA (A): hsa-miR-17-5p (B): hsa-miR-130a-3p (C): hsa-miR-148b-3p (D): hsa-miR-20a-5p (E): hsa-miR-24-3p (F): hsa-miR-326 (G): hsa-miR-342-3p (H): hsa-miR-484 BC ohne M: Breast Cancer ohne Metastasierung \* =  $p \leq 0.0332$ ; \*\* =  $p \leq 0.0021$ , \*\*\* =  $p \leq 0.0002$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , one-way ANOVA-Test

Für alle untersuchten miRNAs fällt außerdem auf, dass die Ergebnisse der Patientinnen-Gruppe mit Brustkrebs, aber ohne Metastasen, bei keiner miRNA eine statistische Signifikanz aufzeigen.

#### **3.2.2 MiRNA-Expressionsprofile nach Tumorrezeptoren**

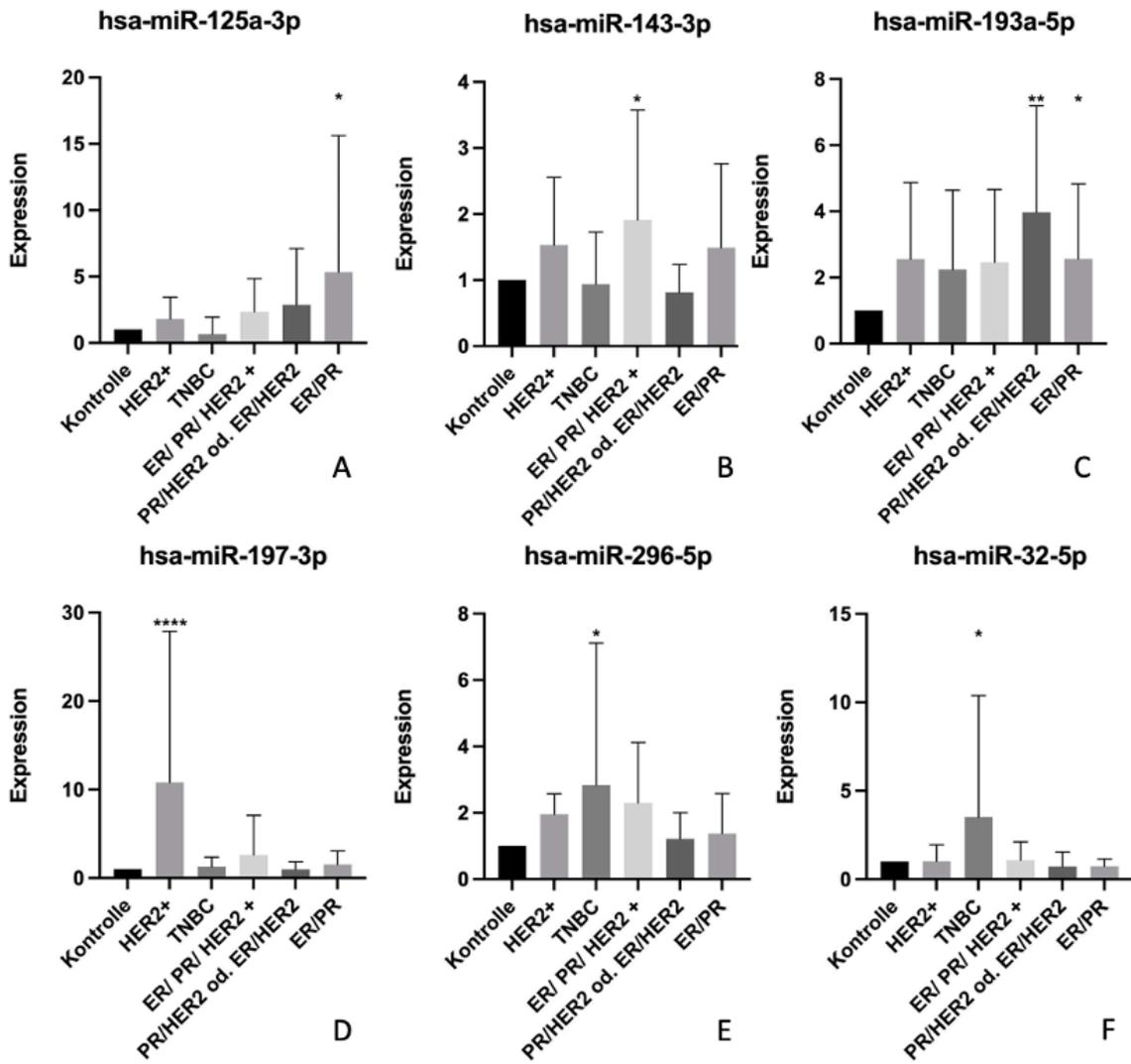
Um Unterschiede zwischen den einzelnen Brustkrebssubtypen festzustellen, wurden die Proben außerdem nach Rezeptorstatus sortiert und anschließend in fünf Untergruppen zusammengefasst: (1) HER2 + (n = 5), (2) TNBC (n = 14), (3) ER/ PR/ HER2 + (n = 17), (4) ER oder PR/ HER2 + (n = 17) und (5) ER/ PR + (n = 31). Dadurch konnten Rückschlüsse gezogen werden, ob ein Zusammenhang zwischen einer bestimmten miRNA-Dysregulation und einem Rezeptorstatus besteht.

Wie für die Metastasierungsgruppen wurde ebenfalls für die einzelnen Rezeptorgruppen der one-way ANOVA-Test durchgeführt. Beim Vergleich jeder einzelnen Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich insgesamt bei 21 miRNAs ein signifikanter Unterschied im Expressionsmuster. Bei zehn miRNAs wurde ein erhöhtes Expressionsprofil festgestellt, während das Expressionsniveau bei elf miRNAs erniedrigt war.

In Abbildung 9 und Abbildung 10 sind die jeweiligen miRNAs dargestellt, die mindestens bei einer Untergruppe eine signifikante Veränderung der Expression aufweisen. Abgebildet ist das Verhältnis der einzelnen Untergruppen zur Kontrolle. Ergebnisse der weiteren untersuchten miRNAs sind im Anhang aufgelistet.

Abbildung 9 A-J zeigt die miRNAs mit erhöhtem Expressionsmuster. Keine der untersuchten miRNAs weist eine signifikante Dysregulation in allen Untergruppen auf. Hsa-miR-197-3p, hsa-miR-410-3p und hsa-miR-490-3p zeigen im Zusammenhang mit einem positiven HER2-Rezeptor eine deutlich erhöhte Expression auf. Eine Überexpression der hsa-miR-32-5p lässt sich lediglich bei einem triple-negativen Rezeptorstatus feststellen. Bei hsa-miR-125a-3p lässt sich eine Steigerung der Expression bei einem ER/ PR positiven Status erkennen.

### 3 Ergebnisse



### 3 Ergebnisse

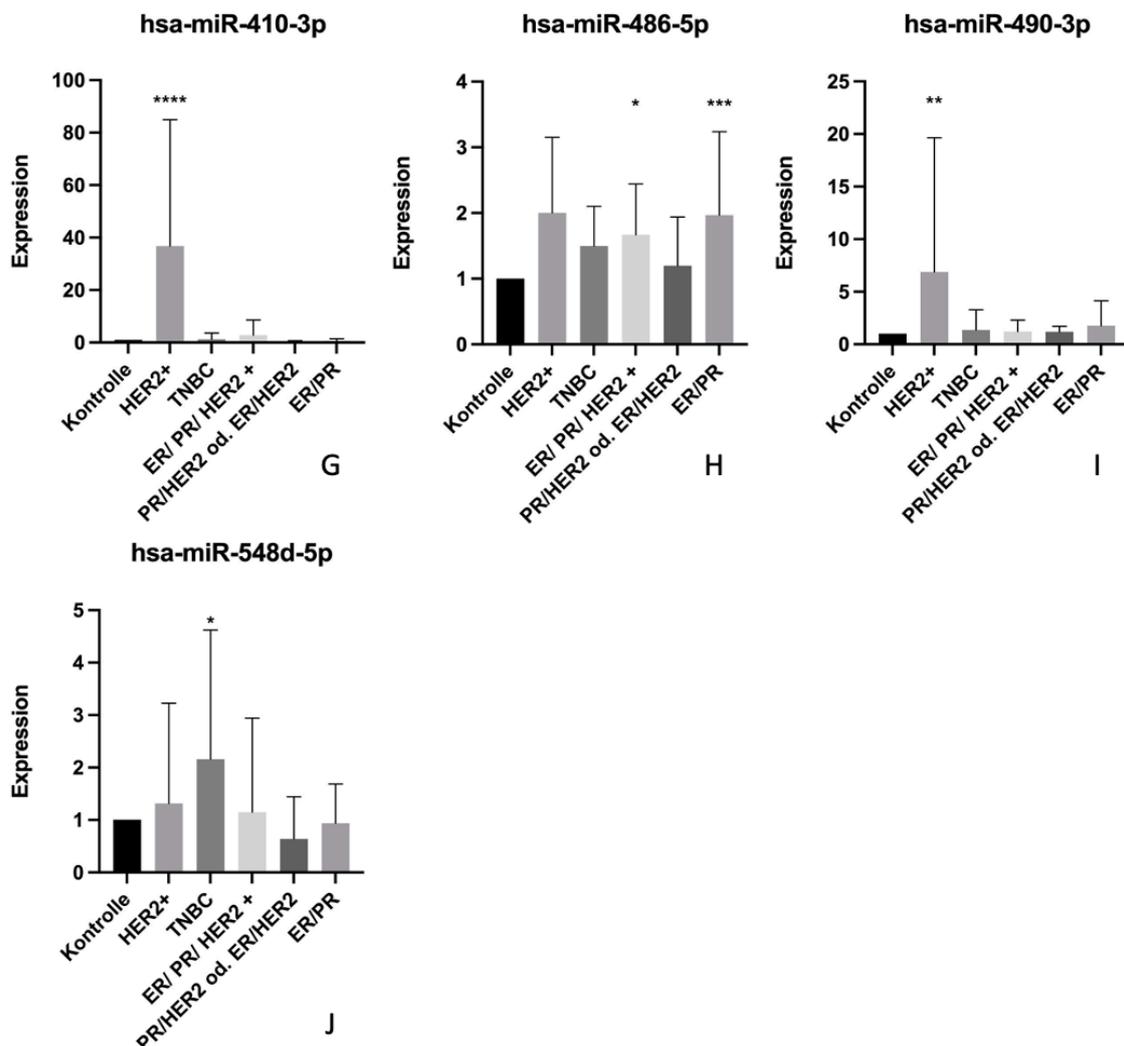
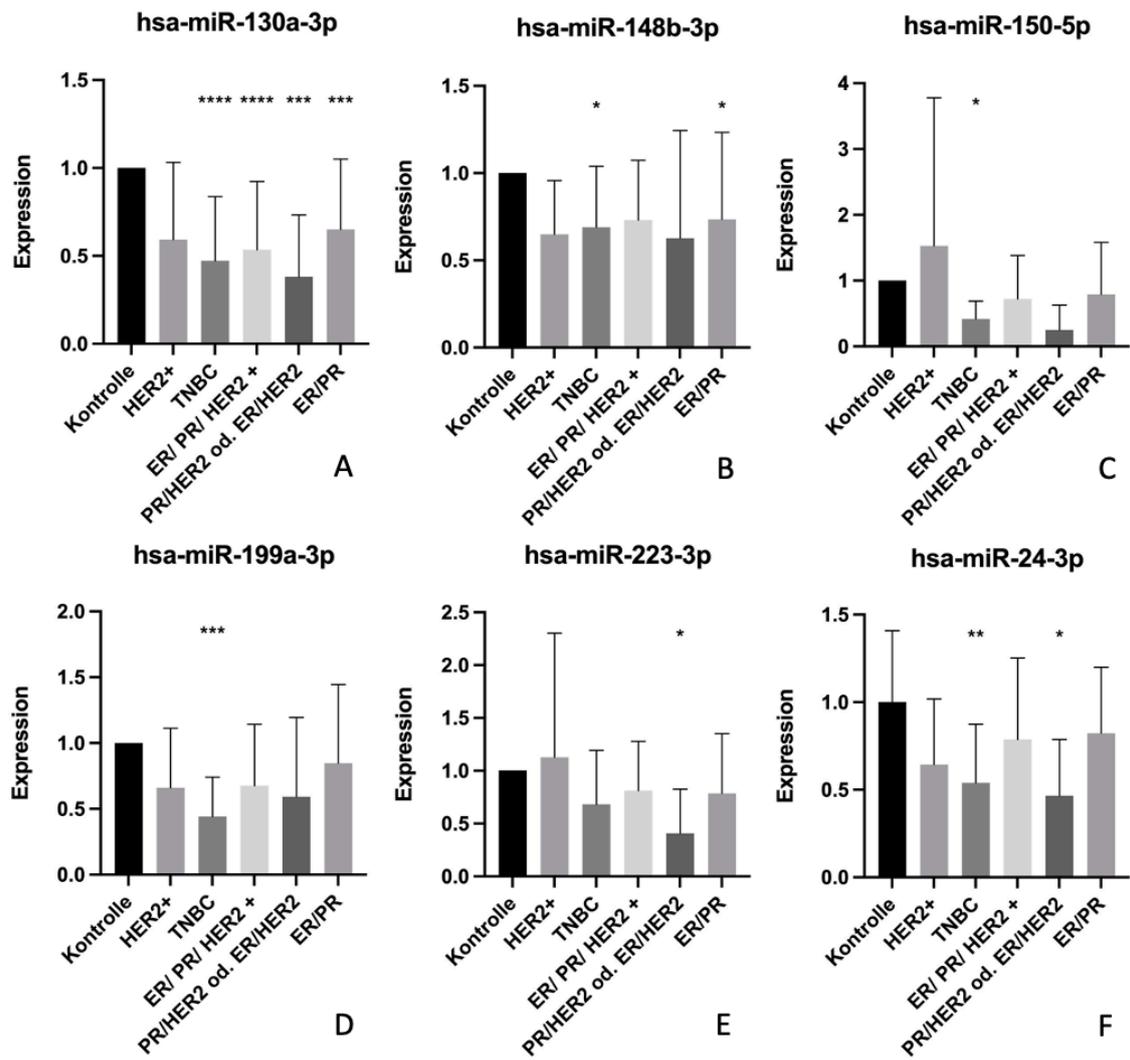


Abbildung 9: miRNA-Expression im Verhältnis zur Kontrolle, A-J: Überexprimierte miRNA Mittelwert + Standardabweichung (A): hsa-miR-125-3p (B): hsa-miR-143-3p (C): hsa-miR-193-5p (D): hsa-miR-197-3p (E): hsa-miR-296-5p (F): hsa-miR-32-5p (G): hsa-miR-410-3p (H): hsa-miR-486-5p (I): hsa-miR-490-3p (J): hsa-miR-548d-5p \* =  $p \leq 0.0332$ ; \*\* =  $p \leq 0.0021$ , \*\*\* =  $p \leq 0.0002$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , one-way ANOVA-Test

Abbildung 10 A-K zeigt die miRNAs mit verringertem Expressionsmuster. Auch hier lässt sich keine miRNA identifizieren, die bei allen Untergruppen signifikante Unterschiede aufweist. Während hsa-miR-326 und hsa-miR-342-3p eine deutlich reduzierte Expression bei triple-negativem, ER/HER2 oder PR/HER2 positivem oder ER/PR positivem Rezeptorstatus aufweisen, ist hsa-miR-130-3p zusätzlich auch bei dreifach positivem (ER/PR/HER2+) Status signifikant herunterreguliert. Für hsa-miR-199a-3p und hsa-miR-150-5p lässt sich zudem eine deutlich erniedrigte Expression bei triple-negativem Rezeptorstatus feststellen.

### 3 Ergebnisse



### 3 Ergebnisse

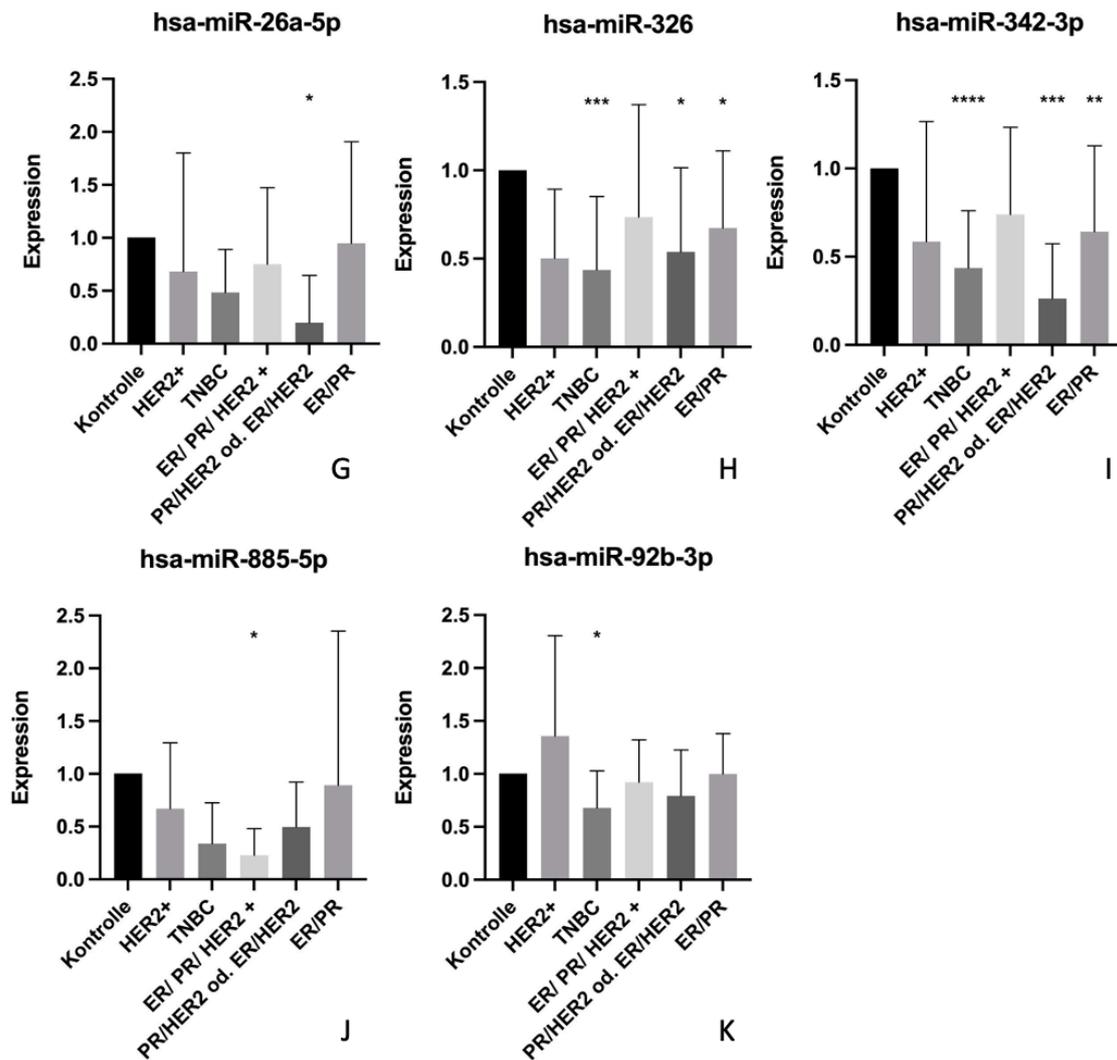


Abbildung 10: miRNA-Expression im Verhältnis zur Kontrolle, A-J: Herunterregulierte miRNA Mittelwert + Standardabweichung  
 (A): hsa-miR-130a-3p (B): hsa-miR-148b-3p (C): hsa-miR-150-5p (D): hsa-miR-199a-3p  
 (E): hsa-miR-223-3p (F): hsa-miR-24-3p (G): hsa-miR-26-5p (H): hsa-miR-326 (I): hsa-miR-342-3p (J): hsa-miR-885-5p (K): hsa-miR-92-3p  
 \* =  $p \leq 0.0332$ ; \*\* =  $p \leq 0.0021$ , \*\*\* =  $p \leq 0.0002$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , one-way ANOVA-Test

### 3.3 Datenbankrecherche: Identifikation von möglichen Zielgenen und Signalwegen

Für die Recherche von Zielgenen und Signalwegen für die 26 unter 2.8.2 identifizierte miRNAs wurde sowohl die Datenbank TargetScan als auch die KEGG pathway Datenbank verwendet. Die Datenbank TargetScan hat für jede miRNA mehrere Hundert Targets vorgeschlagen. Als mögliche Targets wurden die fünf Gene ausgewählt, die in der

### 3 Ergebnisse

Datenbank TargetScan den niedrigsten CWCS vorweisen. Zur Identifikation von Signalwegen, an denen die Targets beteiligt sind, wurde die KEGG pathway Datenbank durchsucht (Tabelle 6).

Tabelle 6: *miRNAs und zugehörige Targets, Signalwege und assoziierte Krankheiten*  
kursiv: indirekter Zusammenhang, **fett**: direkter Zusammenhang

	<b>Hauptzielgene (TargetScan)</b>	<b>KEGG Signalwege</b>	<b>Assoziierte Krankheiten (HMDD v3.2)</b>
<b>hsa-miR-122-5p</b>	<b>GNG13</b> , ALDOA, PLEKHB2, RFXAP, MASP1	<b>Signalwege beim Karzinom</b> , <i>HIF-1 Signalweg</i> , Metabolischer Signalweg, Antigenverarbeitung und -präsentation, COVID-19	Apoplex, Hepatitis B Virus Infektion, Sepsis
<b>hsa-miR-125a-3p-AL11</b>	BOK, NIT1, MEAF6, OXLD1, TRAF3IP3	Apoptose	Rheumatoide Arthritis, Herzversagen, Lungenneoplasmen
<b>hsa-miR-130a-3p</b>	KDM2A, <i>MDM4</i> , KLF7, ENPP5, MYBL1	MicroRNAs beim Karzinom, <i>p53 Signalweg</i>	Schilddrüsen-Neoplasmen, Muskelatrophie, Epilepsie
<b>hsa-miR-143-3p</b>	C1orf74, ITM2B, SLC25A15, ABHD14A, SLC30A8	Metabolischer Signalweg	Dickdarm-Neubildungen, Kolorektales Karzinom, B-Zell-Lymphom
<b>hsa-miR-148b-3p</b>	C18orf25, S1PR1, DCP2, PNRC2, PTPRA	FoxO Signalweg, Sphingolipid Signalweg, RNA-Degradation	Asthma, Angststörungen, Lungenneoplasmen
<b>hsa-miR-150-5p</b>	MYB, <i>MDM4</i> , ENSA, ADIPOR2, HILPDA	MicroRNAs beim Karzinom, <i>p53 Signalweg</i> , Zelluläre Seneszenz, Reninsekretion	Lupus Vulgaris, Sepsis, HIV-Infektion
<b>hsa-miR-17-5p</b>	GPR6, HAUS8, VSX1, PKD2, NKIRAS1	Geschmackstransduktion	Leukämie, Melanom, Endometriose
<b>hsa-miR-193a-5p</b>	PCDHA7, PCDHA5, CA7, SPRED3, GANAB	Metabolischer Signalweg, ABC Transporter	Eosinophile Ösophagitis, Sepsis, Intrahepatisches Cholangiokarzinom
<b>hsa-miR-197-3p</b>	CD53, ZIK1, RNF146, USP41, TMEM30C	Herpes simplex virus 1 Infektion	Diabetes Mellitus Typ 2, Myokardinfarkt, Lungenneoplasmen
<b>hsa-miR-199a-3p</b>	KLHL3, SERPINE2, TMSB4X, PAWR, <i>NLK</i>	Regulierung des Aktin-Zytoskeletts, <i>Adherens junction</i> , <i>MAPK Signalweg</i>	Parkinson, Graft-Ver-sus-Host Erkrankung, Chronische Hepatitis C

### 3 Ergebnisse

	Hauptzielgene (TargetScan)	KEGG Signalwege	Assoziierte Krankheiten (HMDD v3.2)
<b>hsa-miR-20a-5p</b>	GPR137C, CYBRD1, VLDLR, CROT, COX8C	Mineralische Absorption, Lipid und Arteriosklerose, Signalwege beim Karzinom, <i>mTOR Signalweg</i>	Leukämie, Leberzellkarzinom
<b>hsa-miR-223-3p</b>	FBXW7, RHOB, LELP1, PTS, TBC1D17	Ubiquitin-vermittelte Proteolyse, Salmonellen-Infektion, RNA-Degradation	Akute lymphatische Leukämie, Sepsis, Diabetes Mellitus Typ 2
<b>hsa-miR-24-3p</b>	SNN, <b>FASLG</b> , REEP2, <i>STRADB</i> , NFASC	<b>Apoptose, Signalwege beim Karzinom</b> , Proteoglykane beim Karzinom, Zelladhäsionsmoleküle, <i>mTOR Signalweg</i>	Lungenneoplasmen, Neoplasmen der Bauchspeicheldrüse, Leukämie
<b>hsa-miR-26a-5p</b>	<i>STRADB</i> , ARPP19, MAB21L1, CREBZF, ZDHHC6	AMPK Signalweg, <i>mTOR Signalweg</i>	Alzheimer, Diabetische Nephropathie, Chronische Hepatitis B
<b>hsa-miR-296-5p</b>	HMGA1, EPN1, RNF44, <i>TFRC</i> , TEAD3	Endozytose, <i>HIF-1-Signalweg</i>	Lupus Vulgaris, Atherosklerose, Hypertonie
<b>hsa-miR-32-5p</b>	ZFYVE21, PCOLCE2, BTLA, ANP32E, G3BP2		Lungenneoplasmen, Kolorektales Karzinom, virale Infektionskrankheiten
<b>hsa-miR-326</b>	KCNIP2, CEP85, CTRC, SYS1, ZNF394		Multiple Sklerose, Akute lymphatische Leukämie, Diabetes Mellitus Typ 1
<b>hsa-miR-342-3p</b>	DTNBP1, BTN2A1, RGS4, UBE2D2, MATN1	Proteinverarbeitung im endoplasmatischen Retikulum	Glioblastom, Multiples Myelom, Sepsis
<b>hsa-miR-410-3p</b>	NPPC, DCTN6, CBFB, TRAPPC3, ARFIP1	cGMP-PKG Signalweg, Kontraktion der vaskulären glatten Muskulatur, Signalwege der Neurodegeneration	Apoplex, chronisch myeloische Leukämie, Kolorektales Karzinom
<b>hsa-miR-484</b>	HSDL2, DBNDD2, TARBP2, CYB561D1, ARSD		Neoplasmen der Bauchspeicheldrüse, Metabolisches Syndrom, Prostatatumore
<b>hsa-miR-486-5p</b>	GPX8, CSPG5, SRSF3, KIAA0226L, BTAf1	Metabolischer Signalweg, Herpes simplex virus 1 Infektion	Lupus Vulgaris, Sepsis, Diabetes Mellitus Typ 2

### 3 Ergebnisse

	<b>Hauptzielgene (TargetScan)</b>	<b>KEGG Signalwege</b>	<b>Assoziierte Krankheiten (HMDD v3.2)</b>
<b>hsa-miR-490-3p</b>	VDAC1, TMOD3, COMMD10, PROSC, HNRNPA1	Alzheimer, Influenza A, Spleißosom	Kolorektales Kar- zinom, Chondro- sarkom, Ovarial- karzinom
<b>hsa-miR-548d- 5p</b>	TBCA, CAMLG, GHRL, SRP9, CBWD7	<i>cAMP</i> Signalweg, Proteinexport	Chronische Hepatitis B, Gliom, Non-Hodg- kin-Lymphom
<b>hsa-miR-576-3p</b>	NPFFR2, ZNF616, MARCH11, GIMAP7, KRTAP21-2	Neuroaktive Ligand- Rezeptor-Wechsel- wirkung, Herpes simplex virus 1 Infek- tion	Gliom, Melanom, Harnblasenkarzinom
<b>hsa-miR-885-5p</b>	GALNT3, ZNF812, ZADH2, FAM229B, NUDCD2	Metabolischer Signal- weg	Neoplasmen der Bauchspeicheldrüse, Alzheimer, Myasthe- nia Gravis
<b>hsa-miR-92b-3p</b>	OAZ3, CHCHD10, SERTAD3, MARCH4, NKX2-4	Amyotrophe Late- ralsklerose	Herzversagen, Harn- blasenkarzinom, Ma- gentumoren

Die Menge an unterschiedlichen Targets und Signalwegen zeigt die weitreichenden Konsequenzen einer miRNA-Dysregulation. Betroffen sind nicht nur Stoffwechselwege, sondern das miRNAs-mRNA-Netzwerk ist auch in der Lage eine HSV1-Infektion, COVID-19-Erkrankung oder Alzheimer zu regulieren. Wichtiger Aspekt im Zusammenhang mit Signalwegen ist der Einfluss der miRNA auf die Krebsentstehung. Durch Beeinflussung der Zellapoptose sowie mTOR-, cAMP-, MAPK-, HIF1- und p53-Signalwegen können miRNAs die Entwicklung von Karzinomen steuern. Acht der gelisteten Targets sind direkt oder indirekt an dem Signalweg der Krebsentstehung beteiligt (Abbildung 11).

### 3 Ergebnisse

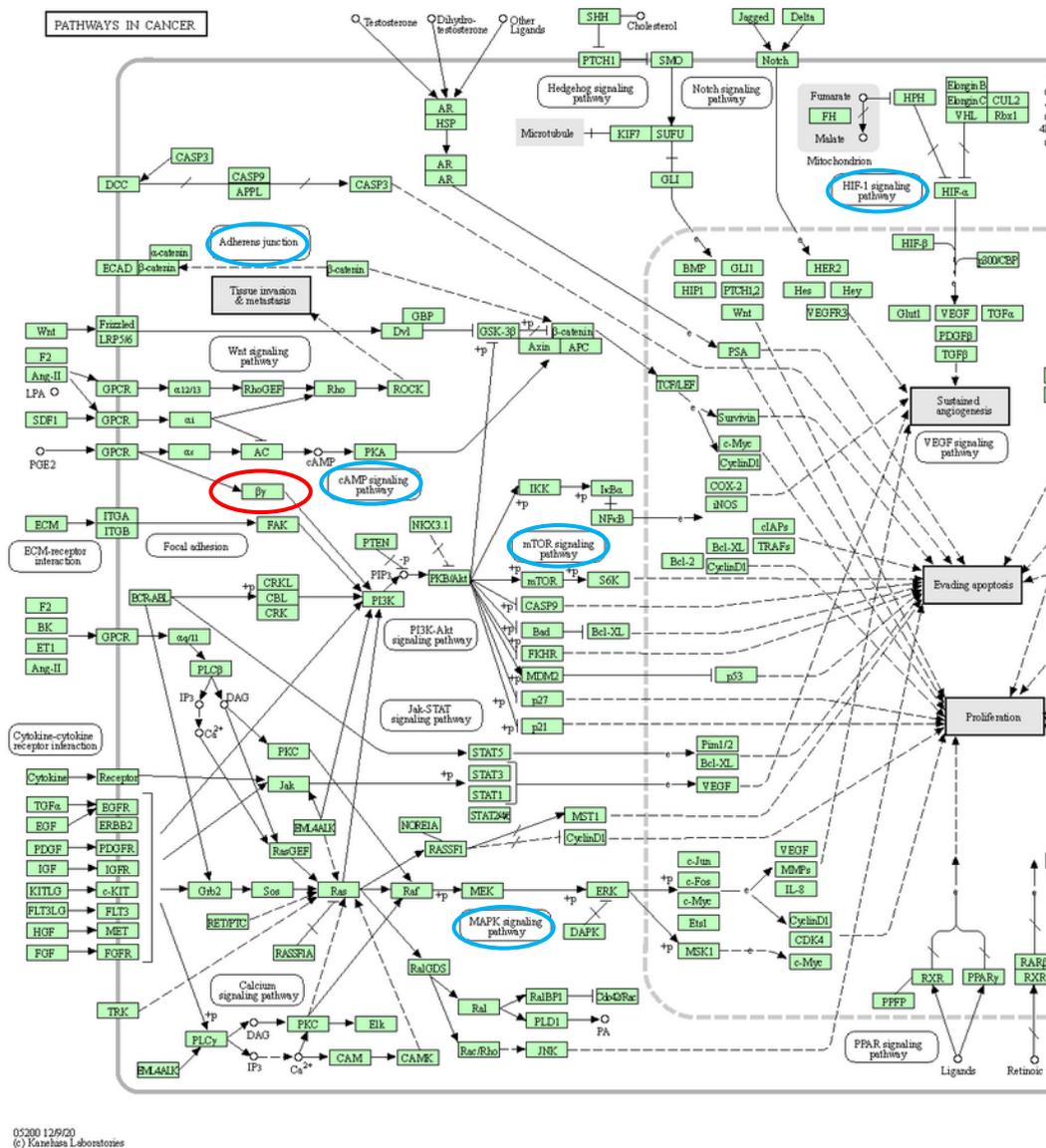


Abbildung 11 A

### 3 Ergebnisse

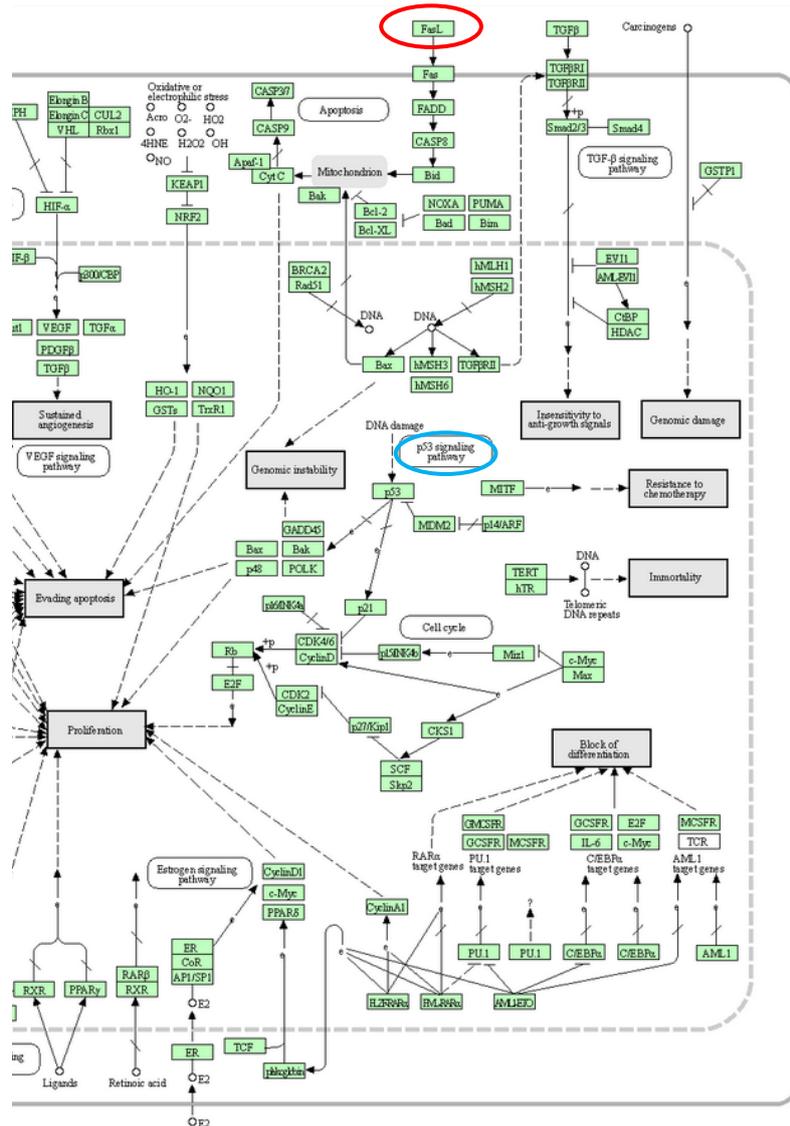


Abbildung 11 B: A und B  
 Pathways in cancer, KEGG pathway Datenbank  
 (Kanehisa and Goto 2000)  
 rot: direkter Zusammenhang, blau: indirekter Zusammenhang mit Krebsentstehung  
 Die Genehmigung für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation liegt vor.

Zusätzlich wurde in der Human microRNA Disease Database nach Krankheiten recherchiert, die in Assoziation mit den jeweiligen miRNAs stehen. Auch hierbei wird das Ausmaß des miRNA-Netzwerks deutlich. Neben der Entstehung von Neoplasien hängen beispielsweise auch chronische Hepatitis B, Asthma und Schlaganfälle mit miRNA-Dysregulationen zusammen (Tabelle 6).

## **3.4 Zellkulturversuche**

### **3.4.1 MiRNA-210**

Immer mehr experimentelle Studien belegen eine klinische Relevanz für miRNA-210.

Dysregulationen der miRNA-210 zeigen sich besonders im Zusammenhang mit hypoxischem Stress. Neben hypoxischen Zellen bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie beispielsweise Arteriosklerose, akutem Myokardinfarkt oder Aortenklappenstenose, ist auch hypoxisches Gewebe solider Tumore in der Lage eine vermehrte Expression von miRNA-210 zu induzieren (Guan et al. 2019; Noman et al. 2016). Über Serum-Exosome gelangt die miRNA zu den Zielzellen und ändert deren Zellphysiologie. MiRNA-210 beeinflusst dort den mitochondrialen Stoffwechsel und die Angiogenese sowie Reaktionen auf DNA-Schäden, Apoptose und Zellüberleben und trägt damit zur Tumorentwicklung bei (Huang and Zuo 2014). Diese Erkenntnis lässt miRNA-210 als Marker für Hypoxie und damit als Marker für hypoxisches Tumorgewebe vermuten.

Die Zellkulturversuche ermöglichten es, das Verhalten zerebraler Endothelzellen bei erhöhter miRNA-210-Expression zu beurteilen. Exosome können transportierte miRNAs in die Zellen anderer Organe integrieren, beispielweise in die zerebralen Endothelzellen, die in direktem Kontakt mit dem Blut stehen. Dadurch wird die Wirkung der spezifischen miRNA in der Zielzelle verstärkt. Ähnliches kann durch Überexpression von miRNA in den zerebralen Endothelzellen erreicht werden. In nachfolgenden Experimenten wurden zerebrale Endothelzellen verwendet, die miRNA-210 überexprimieren. Die Auswirkung dieser Überexpression auf die Endothelzellen wurde in einer Reihe von Experimenten untersucht.

### 3.4.2 BrdU-Proliferationsassay

Mithilfe des Proliferationsassays wurde die proliferierende Aktivität der cerebEND-Zellen untersucht. Dabei wurde jeweils eine Anzahl von 2.000 und 4.000 cerebEND-Zellen pro Vertiefung verwendet.

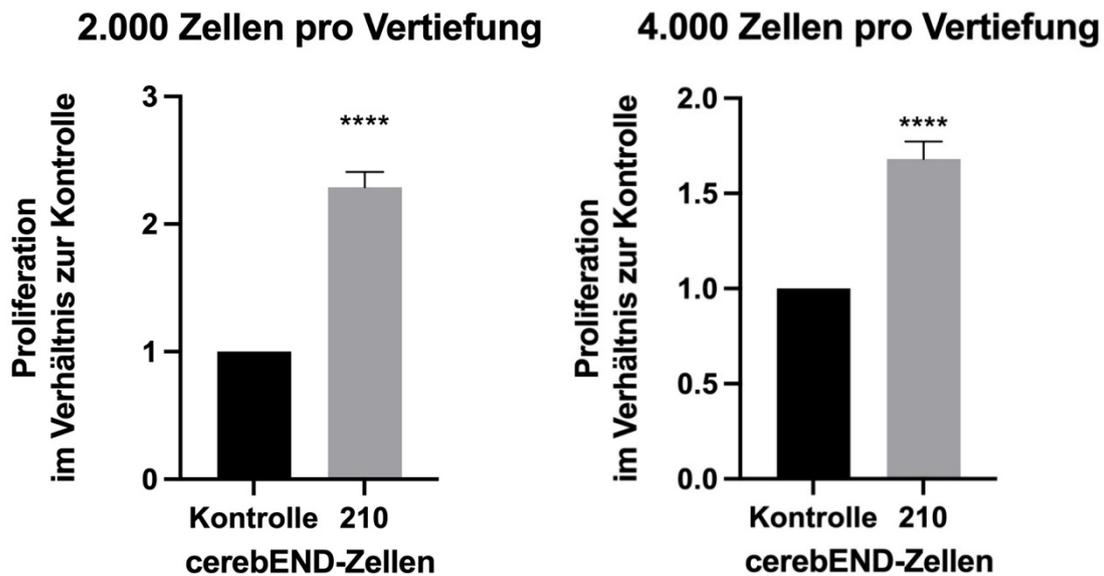


Abbildung 12: Proliferationsassay mit 2.000 und 4.000 cerebEND-Zellen pro Vertiefung  
Mittelwert + Standardabweichung, \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , unpaired t-Test

Bei beiden getesteten Zellzahlen weisen die transfizierten cerebEND-210-Zellen eine signifikant erhöhte Proliferationsrate gegenüber den Kontrollzellen auf. Die Durchführung des Versuchs mit 2.000 Zellen pro Pipettiervertiefung zeigt zudem im Vergleich zu den 4.000 Zellen pro Pipettiervertiefung eine fast doppelt so große Zunahme der Proliferation (+ 128 % bei 2.000 Zellen im Vergleich zu + 68 % bei 4.000 Zellen).

### 3.4.3 MTT-Assay

Ergänzend zum Proliferationsassays wurde der MTT-Assay zur Beurteilung der metabolischen Aktivität durchgeführt. Der Graph in Abbildung 13 zeigt die metabolische Aktivität der cerebEND-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl, d.h. in einer Verdünnungsreihe von 16.000 – 500 Zellen. Zudem wird das Verhältnis der cerebEND-210-Zellen zu den cerebEND-Kontrollzellen in Abbildung 14 dargestellt.

### 3 Ergebnisse

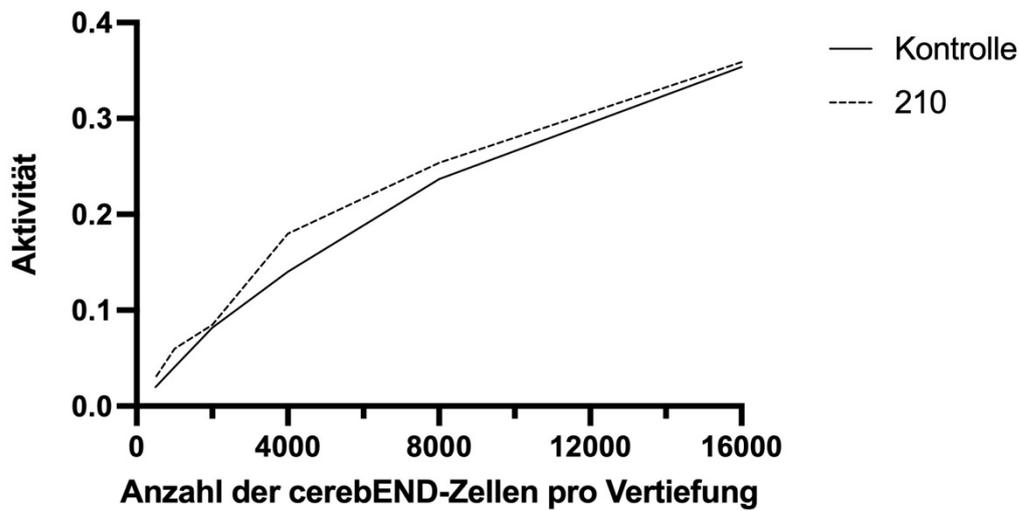


Abbildung 13: MTT-Assay in Abhängigkeit von der Zellzahl

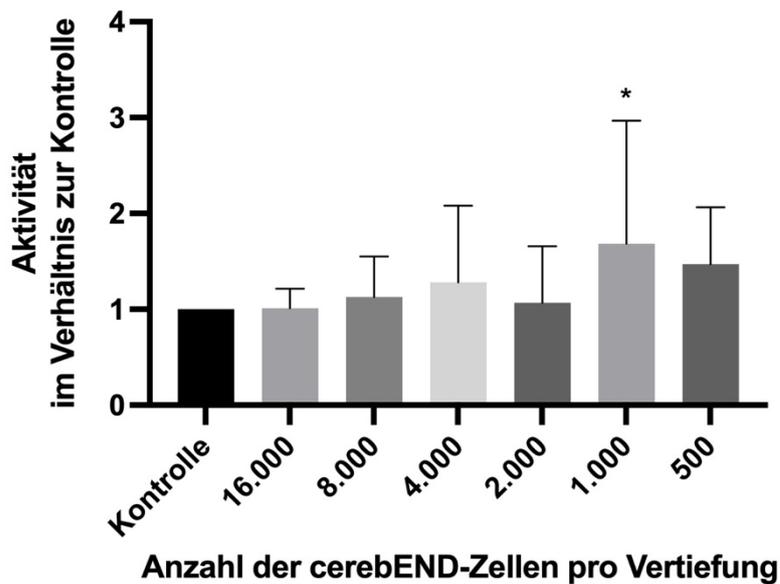


Abbildung 14: MTT-Assay einer Verdünnungsreihe – Verhältnis der cerebEND-210-Zellen zur Kontrolle Mittelwert + Standardabweichung, \* =  $p \leq 0.0332$ , one-way ANOVA-Test

Insgesamt ist die Aktivität und damit die Proliferation der cerebEND-210-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht. Zudem zeigen die ermittelten Werte eine Abhängigkeit der Aktivität von der Zellzahl auf, was auch das Resultat des Proliferationsassays bestätigt (Abbildung 12). Besonders bei Konzentrationen von 1.000 Zellen pro Pipettiervertiefung zeigen sich signifikante Unterschiede in der Aktivität ( $p \leq 0.0332$ ).

### 3.4.4 Adhäsionsassay

#### 3.4.4.1 Vorversuch zur Bestimmung der Zellzahl

Mit dem Adhäsionsversuch lässt sich die Anheftung der Brustkrebszellen an die zerebralen Endothelzellen zeigen. Bei einem Vorversuch zur Ermittlung der benötigten Zellzahl an 4T1-Zellen für die Adhäsion an den cerebEND-Endothelzellen wurden zunächst Zellzahlen von 15.000 Zellen pro Pipettiervertiefung und 25.000 Zellen pro Pipettiervertiefung verwendet.

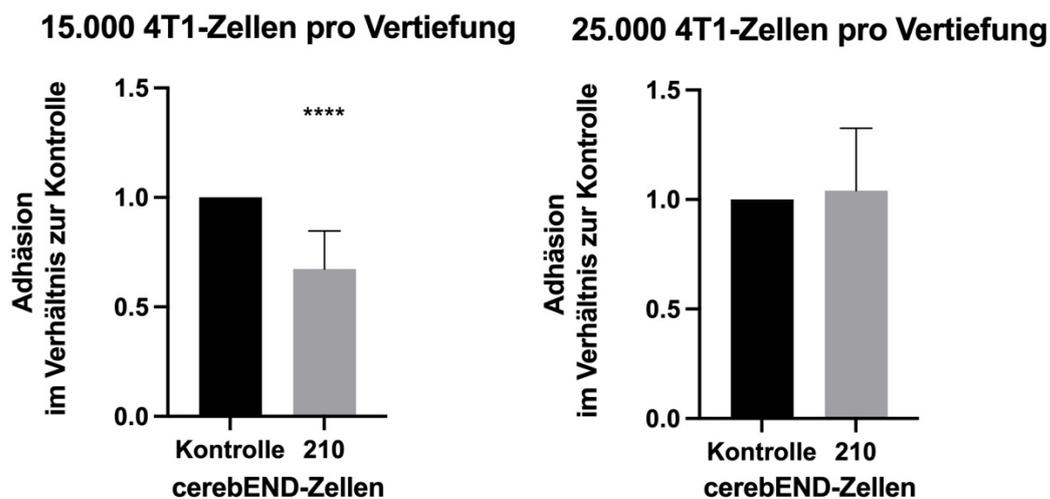


Abbildung 15: Vorversuch des Adhäsionsassays mit 15.000 und 25.000 4T1-Zellen pro Vertiefung Mittelwert + Standardabweichung, \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , unpaired *t*-Test

Während die Adhäsion bei einer Konzentration von 25.000 Zellen pro Pipettiervertiefung bei beiden cerebEND-Zelltypen fast identisch war, war bei einer Zellzahl von 15.000 pro Pipettiervertiefung eine deutliche Abnahme der Adhäsion bei den cerebEND-210-Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (Abbildung 15). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde bei der weiteren Durchführung des Versuchs lediglich eine Konzentration von 15.000 Zellen pro Pipettiervertiefung verwendet.

### 3.4.4.2 Adhäsionsassay mit einer Konzentration von 15.000 4T1-Zellen pro Pipettiervertiefung

Die Resultate aus dem Vorversuch und nach erneuter Durchführung des Versuchs mit einer Zellzahl von 15.000 4T1-Zellen pro Pipettiervertiefung zeigen eine verminderte Anheftung der 4T1-Zellen an die cerebEND-210-Zellen. Bei den cerebEND-210-Zellen zeigte sich im Vergleich zu der Kontrolle letztendlich insgesamt eine Abnahme der Adhäsion um 20 %.

#### 15.000 4T1-Zellen pro Vertiefung

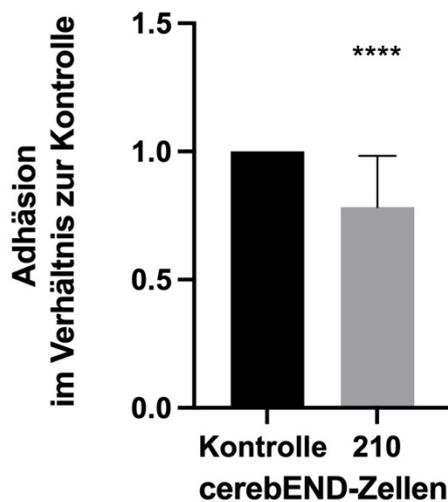


Abbildung 16: Adhäsionsassay mit 15.000 4T1-Zellen pro Vertiefung  
Mittelwert + Standardabweichung, \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , unpaired t-Test

## 4 Diskussion

Hirnmetastasen (HM) beim Mammakarzinom sind noch immer mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden.

Ein besseres Verständnis über miRNAs als mögliche Biomarker könnte bei der frühzeitigen Detektion und Therapie eine zukünftige Hilfe darstellen.

### 4.1 MiRNA-Expressionsmuster beim Mammakarzinom

Zur Erstellung von miRNA-Expressionsprofilen wurden zunächst Exosome aus Serumproben mithilfe des Total Exosome Isolation Reagent (from serum) isoliert. Unter Verwendung des Total Exosome RNA and Protein Isolation Kits wurde anschließend aus den Exosomen RNA extrahiert. Im Anschluss wurde das TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthese-Kit verwendet, um die in der RNA enthaltene miRNA in cDNA umzuwandeln, zu präamplifizieren und sie damit für die qPCR vorzubereiten. Mithilfe der TaqMan Advanced miRNA Custom Array Cards konnte so für jede miRNA ein Expressionsmuster erstellt werden.

Obige Verfahren sind etablierte Methoden, die die Gewinnung von reiner miRNA und die Erfassung von Expressionsprofilen ermöglichen und bereits in unterschiedlichen miRNA-Forschungsprojekten verwendet wurden. Allerdings muss beachtet werden, dass insgesamt vier Schritte durchlaufen werden mussten, bis die isolierte miRNA analysiert werden konnte. Bei jedem Versuchsschritt konnten Fehler auftreten, die sich dann im Ergebnis widerspiegeln. Diese Fehler können nur umgangen werden, indem jede Probe mehrmals analysiert wird.

#### 4.1.1 Probensammlung

Da das Screening auf Hirnmetastasen nicht zur Routineuntersuchung gehört, werden in der Regel entsprechende Untersuchungen nur bei klinischer Symptomatik wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen durchgeführt. Dies erschwert die Rekrutierung von Probandinnen (Hadjipanteli et al. 2020).

Wie oben (Kapitel 1.2) bereits erwähnt, treten Hirnmetastasen zudem oft als Spätfolge einer bereits stattgefundenen systemischen Metastasierung auf. Das bedeutet, dass es

kaum Patientinnen gibt, die nur Metastasen im ZNS aufweisen. Vielmehr entwickeln sie oft erst viszerale Metastasen und im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zur Entstehung von Hirnmetastasen.

### **4.1.2 MiRNA-Expressionsunterschiede bei Metastasierung**

Die Proben wurden zunächst anhand der von Metastasierung betroffenen Körperregion in Untergruppen eingeteilt: Metastasierung ins zentrale Nervensystem, viszerale Metastasierung, ossäre Metastasierung und Brustkrebs ohne Metastasierung.

Über den Zusammenhang der aufgelisteten miRNAs und Metastasen beim Mammakarzinom ist in der Literatur nicht viel bekannt. Nachfolgend werden aktuelle Forschungsergebnisse diskutiert, die für unsere Resultate bzw. für die Entwicklung von Krebs und/oder Metastasen relevant erscheinen.

In einzelnen Fällen weichen unsere Daten von bisherigen Forschungsergebnissen ab. Möglicher Grund dafür ist zum einen, dass sich die genannten Studien auf andere Tumorarten beziehen und damit gegebenenfalls eine Tumorabhängigkeit zeigen. Zum anderen wurden in den Studien unterschiedliche Einteilungen der Proben, d.h. nicht nach Metastasierungsregion, oder unterschiedliche Probenarten verwendet. Das Expressionsmuster von exosomaler miRNA in Serumproben kann sich von dem miRNA-Profil aus Gewebeproben gegebenenfalls unterscheiden. Die Literatur liefert dazu jedoch noch keine genauen Daten (Cui and Cui 2020).

#### **4.1.2.1 Signifikant erhöhte Expressionsprofile**

Die Funktion der miRNA ist die Hemmung ihrer zugehörigen Zielgene. Kommt es zur Zunahme der miRNA-Expression, werden entsprechend mehr Targets gehemmt. Werden dabei Targets gehemmt, die für onkogene Proteine kodieren, kann die Tumorentstehung unterdrückt werden. Kodieren diese Zielgene jedoch für tumorsuppressive Proteine, fehlen wichtige Regulatoren und die Tumorentstehung wird gefördert.

Unsere Ergebnisse der Metastasierungsgruppen zeigen signifikant erhöhte Expressionsprofile bei hsa-miR-122-5p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-490-3p und hsa-miR-576-3p (Kapitel 3.2.1).

### **4.1.2.1.1 miRNA-122-5p**

Nach Uen et. al kann miRNA-122-5p die Metastasierung bei BC begünstigen, indem es durch Stummschaltung von Syndecan-1 die Mobilität der Krebszellen fördert. Diesen Zusammenhang mit Syndecan-1 belegten auch Ibrahim et al. in Verbindung mit miRNA-10b (Ibrahim et al. 2012). Durch Bindung von Botenstoffen über die Hyparansulfat-Kette, wie beispielsweise löslichen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, kann Syndecan-1 die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zell-Matrix-Interaktion regulieren und fördert damit die Metastasenentstehung (Uen et al. 2018). Ob speziell diese Reaktion auch verantwortlich für die Entstehung von ZNS-Metastasen beim Mammakarzinom ist, muss noch untersucht werden.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigen jedenfalls eine vermehrte Expression im Zusammenhang mit der Metastasierungsregion und dabei insbesondere bei ZNS-Metastasen. Eine Hochregulation von miRNA-122-5p im Serum von Brustkrebspatientinnen wurde ebenfalls bereits in Analysen von Li et al. und Wang et al. festgestellt. Die Studien legen aber eine Abhängigkeit vom Rezeptorstatus dar, welche durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden kann (Kapitel 3.2.2., Kapitel 4.1.5), (Li, Zou, et al. 2019; Wang and Wang 2020).

### **4.1.2.1.2 miRNA-490-3p**

Der miRNA-490-3p wurde bislang eine tumorsuppressive Funktion zugeschrieben. Aktuelle Ergebnisse von Lu et al. zeigen jedoch eine erhöhte Expression beim „invasive carcinoma of no special type“ (NST) bei Brustkrebs und bei metastasierenden Zellreihen. *In vitro* Experimente belegen den Einfluss der miRNA-490-3p auf die Metastasierung. Durch Förderung der Proliferation, Koloniebildung, Migration und Invasion ist eine erhöhte miRNA-490-3p-Expression damit insgesamt auch mit einer schlechten Prognose in Bezug auf krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben verbunden (Lu et al. 2021). Unterschiede zwischen den einzelnen Metastasierungsregionen wurden in der Studie nicht berücksichtigt. In unseren Ergebnissen zeigt sich aber insbesondere bei Metastasierung ins ZNS eine signifikante Erhöhung der Expression.

### **4.1.2.1.3 miRNA-296-5p**

Verschiedene Studien schreiben der miRNA-296-5p eine tumorunterdrückende Funktion zu. Beispielsweise soll miRNA-296-5p beim Nasopharynxkarzinom durch Umkehrung des epithelial-mesenchymalen Übergangs die Metastasierung verhindern (Chen et al. 2020). Eine weitere Studie zeigt eine tumorsuppressive Funktion der miRNA beim Prostatakarzinom. Bei Hemmung des Zielgens Pin1 wird das Wachstum und die Proliferation

der Prostatakrebszellen unterdrückt. Pin1 beeinflusst als Peptidyl-Prolyl-Isomerase verschiedene Schlüsselproteine, die an der Regulation des Zellwachstums und des Zellüberlebens beteiligt sind (Lee et al. 2014).

Anhand der oben genannten Forschungsergebnisse von Chen et al. und Lee et al. würde man für die Metastasierung beim Mammakarzinom ebenfalls eine tumorsuppressive Funktion der miRNA-296-5p erwarten. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch besonders in der Gruppe der Patientinnen mit Hirnmetastasen eine Erhöhung der miRNA, was der Funktion als Tumorsuppressor widerspricht. Für den Zusammenhang von miRNA-296-5p und Brustkrebs lassen sich in der Literatur keine Studien finden. Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um die Aufgabe der miRNA-296-5p bei der Metastasenentstehung zu verstehen.

### **4.1.2.1.4 miRNA-193-5p**

Über miRNA-193a-5p ist bekannt, dass sie die systemische Streuung bei einigen Krebsarten, wie beispielsweise beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, unterdrückt. *In vitro* Versuche zeigen, dass durch die Stummschaltung von PIK3R3 und des mTOR Signalwegs die Migration und Invasion der Krebszellen sowie der epithelial-mesenchymale Übergang verhindert wird. Ergebnisse von *in vivo* Versuchen zeigen die direkte Hemmung der Metastasenentwicklung (Yu et al. 2015).

MiRNA-193-5p ist in den Serumproben unserer Probandinnen mit ZNS- und viszerale Metastasen erhöht. Das erhöhte Expressionsniveau würde bedeuten, dass PI3K und mTOR bereits durch die miRNA vermehrt gehemmt und eine Tumorentstehung damit unterdrückt werden würde. Dies widerspricht nicht nur den Forschungsergebnissen der Lungenkrebsforschung, sondern auch den bisherigen Erkenntnissen der Brustkrebsforschung, denn die medikamentöse Hemmung der Targets PI3K und mTOR findet in der Therapie des Mammakarzinoms bereits Anwendung:

Das Krebsmedikament Alpelisib ist ein  $\alpha$ -spezifischer Phosphatidy-inositol-3-Kinase-Antagonist ( $\alpha$ -PI3K-Antagonist), der zusammen mit Fulvestrant bei postmenopausalen Patientinnen und Patienten mit einem HR-positiven, HER2-negativen, lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinom mit Mutation im PIK3CA-Gen gegeben wird. In entsprechenden *in vivo* Versuchen wurde dargelegt, dass durch Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs das Tumorstadium unterdrückt wurde (Novartis Pharma 2021).

mTOR (mammalian Target of Rapamycin) fungiert als Serin-Threoninkinase, deren Aktivität nachweislich bei vielen Tumoren erhöht ist. Das Immunsuppressivum Everolimus

ist ein selektiver mTOR-Antagonist, der unter anderem bei postmenopausalen Frauen mit einem HR-positiven, HER2-negativen, fortgeschrittenen Mammakarzinom angewendet wird. Durch Bindung an das intrazelluläre Protein FKBP-12 kommt es zur Komplexbildung, welcher die Aktivität des mTOR-Komplex-1 hemmt. Dadurch wird die Translation und Synthese von Proteinen, wie beispielsweise VEGF, der die Tumorangiogenese fördert, reduziert und in Folge dessen das Wachstum und die Proliferation von Tumorzellen gehemmt (European Medicines Agency 2018).

Das Zusammenspiel von miRNA-193-5p und PI3K bzw. mTOR könnte sich im Therapiemonitoring zu Nutze gemacht werden. Nach Pasquinelli und Kollegen ist das Zusammenwirken von miRNA und Targets keine Einbahnstraße, sondern Regulationen können in beiden Richtungen stattfinden (Pasquinelli 2012). Die genaue Steuerung von miRNA durch Targets ist zwar noch nicht erforscht, sollte es aber durch die medikamentöse Blockade von PI3K oder mTOR zu einem erniedrigten Spiegel von miRNA-193-5p kommen, könnte dies Grundlage für das Monitoring bei Medikamentengabe sein.

Zur Bestätigung des Expressionsprofils unserer Ergebnisse sollten erneute Analysen von miRNA-193-5p bei Hirnmetastasen durchgeführt werden.

### **4.1.2.1.5 miRNA-576-3p**

Analysen zeigen das Zusammenspiel von miRNA-576-3p und seinem Zielgen Zyklin D1. Durch Stummschaltung von Zyklin D1 wird die Zellteilung in der G1-Phase gestoppt und eine Vermehrung der Krebszellen verhindert. Liang et al. fanden in ihren Untersuchungen mit Blasenkrebszelllinien erniedrigte Spiegel von miRNA-576-3p. Eine vermehrte Expression verhindert demnach die Proliferation der Krebszellen und zeigt beim Blasenkarzinom eine tumorsuppressive Funktion (Liang et al. 2015).

In unseren Ergebnissen zeigt sich miRNA-576-3p bei Brustkrebspatientinnen mit Hirnmetastasen stark erhöht. Damit weichen unserer Ergebnisse nicht nur von den Forschungsergebnissen von Liang et al. ab, sondern auch von den aktuellen Erkenntnissen zur Therapie von Metastasen beim HR-positiven Mammakarzinom. Zur Behandlung werden dabei CDK4/6-Inhibitoren wie Palbociclib oder Ribociclib eingesetzt, die durch Hemmung von Zyklin D1 den Zellzyklus von Krebszellen stoppen (Sobhani et al. 2019). Wie bereits für miRNA-193-5p diskutiert, könnte auch hier die Erkenntnis über einen Rückkopplungseffekt von miRNA und Target Grundlage für ein Therapiemonitoring sein (Kapitel 4.1.2.1.4).

Um die Beteiligung von miRNA-576-3p an der Streuung der Krebszellen ins Gehirn und damit die Funktion als Biomarker für ZNS-Metastasen zu überprüfen, sind weitere Analysen notwendig.

### **4.1.2.1.6 miRNA-486-5p**

Dysregulationen der Expression von miRNA-486-5p zeigen sich bei vielen Krebstumoren, beispielsweise auch bei Tumoren der weiblichen Geschlechtsorgane. In unseren Ergebnissen lassen sich sowohl bei Patientinnen mit Metastasen im ZNS als auch bei viszeralen und ossären Metastasen im Vergleich zur gesunden Gruppe signifikant erhöhte Spiegel der miRNA feststellen. Somit sprechen unsere Ergebnisse dieser miRNA eine tumorfördernde Funktion zu.

Die Literatur legt keine einheitlichen Expressionswerte dar. Nach Li et al. verhindert miRNA-486-5p durch Hemmung von DOCK1 die Metastasierung beim Mammakarzinom. Über den Dock1/NF- $\kappa$ B/Snail-Signalweg kommt es zur Stummschaltung von Interleukin-22 (IL-22) und damit zur Verhinderung des epithelial-mesenchymalen Übergangs (Li, Mou, et al. 2019). Anders als wir haben Li und Kollegen für ihre Studie Gewebeproben und keine Blutproben verwendet.

Im Gegensatz zu Li et al., die der miRNA-486-5p eine tumorsuppressive Funktion zugeschrieben haben, legten Zheng et al. eine onkogene Funktion dar. Zheng et al. zeigten Dysregulationen von miRNA-486-5p beim Endometriumkarzinom im Zusammenhang mit dem Target MARK1 auf. MARK1 ist ein Tumorsuppressor. Durch seine Inhibition wird die Zellproliferation, Migration und Invasivität der Krebszellen gefördert (Zheng et al. 2020).

### **4.1.2.2 Signifikant erniedrigte Expressionsmuster**

Eine erniedrigte miRNA-Expression bedeutet eine fehlende Stummschaltung der entsprechenden Zielgene. Fehlt die Stummschaltung von Targets, die für tumorsuppressive Proteine kodieren, wird die Tumorentstehung unterdrückt. Wird jedoch die Stummschaltung von Zielgenen herabgesetzt, die für onkogene Proteine kodieren, wird die Tumorentstehung gefördert.

Die miRNAs hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-326, hsa-miR-342-3p und hsa-miR-484 zeigen in unseren Untersuchungen der Metastasierungsgruppen signifikant erniedrigte Expressionsmuster.

### **4.1.2.2.1 miRNA-130a-3p**

Kong et al. zeigten in ihren Untersuchungen eine krebsfördernde Funktion der miRNA-130a-3p im Zusammenhang mit RAB5B. Bei erniedrigter Expression der miRNA fehlt die Stummschaltung des RAB-Proteins (Kong et al. 2018). RAB5B wurde 1992 von Wilson und Wilson als Mitglied der Ras-Familie identifiziert. Vermutlich spielt das RAB-Protein beim vesikulären Transport an der Zellmembran eine zentrale Rolle (Wilson and Wilson 1992). Diese Funktion kann der Grund dafür sein, dass bei erniedrigter Expression von miRNA-130-3p die zelluläre Proliferation, die Auswanderung der Krebszellen und damit der Metastasierungsprozess begünstigt wird. MiRNA-130a-3p weist in unseren Ergebnissen eine signifikant erniedrigte Expression im Zusammenhang mit Fernmetastasen auf, was die onkogene Funktion der miRNA bestätigt. Bei Hirnmetastasen zeigt sich eine besonders starke Abnahme.

### **4.1.2.2.2 miRNA-17-5p**

Chen et al. untersuchten bereits die prognostische Funktion der Serum-miRNA-17-5p beim Lungenkarzinom. Ihre Ergebnisse zeigten eine erhöhte Expression, die sie in Verbindung mit einer schlechten Überlebensprognose setzten (Chen et al. 2013).

Auch die Literatur liefert für das Mammakarzinom Angaben zu erhöhten Expressionsmustern. Bei Untersuchungen von Swellam et al. zur frühen Krebsdiagnostik zeigte sich eine erhöhte Konzentration von miRNA-17-5p in Serumproben von Brustkrebspatientinnen. Demnach wird miRNA-17-5p eine vielversprechende Funktion als Biomarker zur frühen Brustkrebsdiagnostik zugeschrieben (Swellam et al. 2019). Im Gegensatz zu den Resultaten von Chen et al. und Swellam et al. zeigen unsere Ergebnisse eine erniedrigte Expression. Da sich unsere Studie mit der Funktion von miRNAs als Biomarker für die Metastasenentstehung, d.h. beim fortgeschrittenen Mammakarzinom, beschäftigt, sind Abweichungen der Ergebnisse nicht abnorm. Inwiefern sich aber eine erniedrigte Konzentration auf die Entstehung von viszerale Metastasen auswirkt, muss weiter untersucht werden.

### **4.1.2.2.3 miRNA-148b-3p**

Die Literatur liefert bisher noch keine Daten für einen Zusammenhang zwischen miRNA-148b-3p und der Entwicklung von Karzinomen. Da unsere Resultate für alle drei Gruppen mit Fernmetastasen erniedrigte Expressionsmuster aufzeigen, scheint miRNA-148b-3p am Metastasierungsprozess beteiligt zu sein. Dies sollte in weiteren Experimenten erforscht werden.

### **4.1.2.2.4 miRNA-20a-5p**

Yu et al. untersuchten bereits die Funktion von miRNA-20a-5p beim Neuroblastom (Yu et al. 2018). Demnach ist die miRNA-Konzentration bei einem Neuroblastom erniedrigt, was die Tumorproliferation begünstigt und die Apoptose der Tumorzellen hemmt. Als Ursache wurde die fehlende Stummschaltung des Zielgens ATG7 beschrieben.

In unseren Ergebnissen zeigt sich miRNA-20a-5p besonders bei Brustkrebspatientinnen mit viszeralen Metastasen erniedrigt. Die Literatur liefert für den Zusammenhang mit Brustkrebs noch keine Daten. Welche genauen Targets und Signalwege am Metastasierungsprozess beteiligt sind, sollte daher in weiteren Forschungsprojekten untersucht werden.

### **4.1.2.2.5 miRNA-24-3p**

In unseren Ergebnissen ist miRNA-24-3p bei Brustkrebspatientinnen mit viszeralen Metastasen erniedrigt.

In der Literatur finden sich bereits Daten zu Dysregulationen von miRNA-24-3p beim Mammakarzinom. Lu und Kollegen haben in Gewebeproben eine Hochregulation von miRNA-24-3p festgestellt. Durch vermehrte Stummschaltung von p27Kip1 soll die Zellproliferation gefördert und die Krebszellapoptose gehemmt werden (Lu et al. 2015). Im Unterschied zu unserer Studie wurden bei Lu und Kollegen Gewebe- und keine Serumproben verwendet. Dies könnte der Grund für die Abweichungen der Ergebnisse sein. Zudem geht es in ihrer Studie um das Wachstum der Krebszellen, nicht jedoch um die Ausbreitung bzw. Metastasierung.

### **4.1.2.2.6 miRNA-326**

Pan et al. fassten 2019 in einem Review alle bereits bekannten Daten zu miRNA-326 und der Tumorentstehung zusammen. Demnach stellten Studien zu verschiedenen Tumorentitäten einen Zusammenhang von miRNA-326 und der zellulären Apoptose, dem Tumorwachstum, der Zellinvasion und weiteren Zellmechanismen fest.

Beispielsweise verhindert eine erhöhte Expression beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom die Metastasierung. Durch Stummschaltung der Targets ADAM17, NSBP1 und Phox2a wird die Invasion der Krebszellen gestoppt. Beim Magenkarzinom lässt sich einer erniedrigten Expression eine schlechte Prognose zuordnen (Pan, Wan, and Wang 2019).

Unsere Ergebnisse zeigen eine erniedrigte Expression von miRNA-326 und bestätigen damit die tumorsuppressive Funktion. Vor allem die Patientinnengruppen mit Fernmetastasen zeigen einen erniedrigten Spiegel auf.

Für das Mammakarzinom liegen Daten vor, die eine negative Korrelation von miRNA-326 und dem Target B7-H3 beschreiben. Sun et al. stellten in ihren Untersuchungen ein erniedrigtes Expressionsniveau von miRNA-326 und damit eine Erhöhung von B7-H3 bei etwa 80 % der Brustkrebspatientinnen fest. B7-H3 ist ein Immunmodulin der B7-Familie, welches nach Sun et al. das Wachstum des Mammakarzinoms durch Inhibition von VEGF und damit der Angiogenese hemmt (Sun et al. 2014).

Inwiefern die Hemmung des Tumorwachstums mit einer Förderung der Metastasierung zusammenhängt, muss durch weitere Untersuchungen erforscht werden.

### **4.1.2.2.7 miRNA-342-3p**

Die Studie von Krupinova et al. belegt eine prognostische Funktion der miRNA-342-3p beim Nebenschilddrüsenkarzinom. Ihre Daten zeigen eine herabregulierte Expression der miRNA (Krupinova et al. 2021).

Unsere Ergebnisse weisen bei Patientinnen mit viszeralen und ossären Metastasen ebenfalls erniedrigte Expressionsmuster auf.

Aktuell gibt es in der Literatur keine Daten dazu, welche Rolle die miRNA-342-3p bei der Metastasierung beim Mammakarzinom spielt. Informationen zu deren Funktion bei Brustkrebs liefert lediglich die Studie von Ma et al. Diese untersuchten beim TNBC die Funktion von miRNA-342-3p auf einen Zusammenhang mit der Sensitivität für eine Chemotherapie (Ma et al. 2014). Weitere Forschungen sollten daher durchgeführt werden, um die Funktion der miRNA-342-3p als Biomarker beim Mammakarzinom zu überprüfen.

### **4.1.2.2.8 miRNA-484**

Über miRNA-484 ist bekannt, dass sie das Tumorwachstum beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom fördert. Als verantwortliches Zielgen wurde Apaf-1 identifiziert. Apaf-1 leitet als Apoptotic protease activating factor-1 den programmierten Zelltod ein. Durch Stummschaltung von Apaf-1 wird die Apoptose der Krebszellen verhindert und damit das Tumorwachstum begünstigt (Li, Ding, et al. 2017).

Entgegen den Ergebnissen von Li et al. ist das Expressionsniveau von miRNA-484 in unseren Ergebnissen bei Brustkrebspatientinnen mit viszeralen Metastasen signifikant erniedrigt. Möglicherweise sind die Daten von Li und Kollegen tumorabhängig, was der

Grund für die Abweichungen der Ergebnisse sein könnte. Um die genaue Funktion von miRNA-484 beim Mammakarzinom festzustellen, sind weitere Forschungsprojekte nötig.

### **4.1.2.3 Sonderfall: Brustkrebspatientinnen ohne Metastasen**

Für die Patientinnengruppe, die bei der Erstdiagnostik noch keine Metastasen entwickelt hatte, zeigt sich bei keiner der untersuchten miRNAs eine statistische Signifikanz. Nach unseren Daten kann man daher annehmen, dass miRNAs nur als Targetmarker bei bereits metastasierten Patientinnen angewendet werden können, nicht aber zur Diagnostik eines Primärtumors. Damit Metastasierungsprozesse dennoch frühzeitig erkannt werden, könnten engmaschige Blutkontrollen mit regelmäßigen miRNA-Analysen zur Beobachtung des Krankheitsverlaufs durchgeführt werden. Zuvor sollten diese Marker jedoch in größeren klinischen Studien weiter validiert werden.

Unsere Studie beschäftigt sich speziell mit dem veränderten miRNA-Muster bei ZNS-Metastasen. Um auch Metastasen in anderen Regionen frühzeitig diagnostizieren zu können, müssen ebenfalls die miRNA-Muster der jeweiligen Orte der Metastasierung herangezogen bzw. genauer analysiert werden. Diese wurden in unserer Studie vernachlässigt.

### **4.1.3 Targets der Blut-Hirn-Schranke**

Eine Metastasierung ins Hirn kann durch Veränderung der Stummschaltung von Targets begründet werden, die das Durchschreiten der Krebszellen durch die BHS regulieren. Dabei kommt es, wie oben beschrieben, entweder zu einer vermehrten Hemmung von tumorsuppressiven Zielgenen oder aber zu einer verminderten Hemmung von onkogenen Targets.

Schon vor mehr als 15 Jahren wurden suppressive Targets, die das Durchwandern der Krebszellen durch die BHS verhindern, von Stark et al. identifiziert. Dazu gehören beispielsweise KISS1, KAI1, BRMS1 und Mkk4 (Stark et al. 2005). Bei erhöhten Spiegeln der jeweiligen regulatorischen miRNA im Blut kommt es zur Stummschaltung dieser Gene, womit die Durchlässigkeit der BHS und damit die Einwanderung von Krebszellen ins Hirn gefördert wird.

Konkrete Targets, die die Metastasierung durch die BHS begünstigen, wurden bisher noch nicht festgelegt. Dennoch kann vermutet werden, dass unter physiologischen Umständen diese Targets durch die miRNAs gehemmt werden würden. Kommt es zu einem Abfall der miRNA-Konzentration im Blut, verringert sich auch die Stummschaltung der Zielgene. Das heißt, sie können ihre onkogene Funktion ausüben, die BHS wird durchlässiger und damit wird der Metastasierungsprozess begünstigt.

Die Suche nach Targets und ihrer entsprechenden regulatorischen miRNAs, die die BHS kontrollieren, sollte ein weiterer Ansatzpunkt für Forschungen der Hirnmetastasen sein.

### **4.1.4 Bewertung der miRNA als Biomarker für Hirnmetastasen beim Mammakarzinom**

Unsere Ergebnisse zeigen für die Metastasierung ins ZNS erhöhte Expressionswerte der miRNA-122-5p, miRNA-296-5p, miRNA-490-3p und miRNA-576-3p. Erniedrigte Expressionsniveaus bei Patientinnen mit Hirnmetastasen zeigen sich bei miRNA-130a-3p, miRNA-148b-3p und miRNA-326.

Wird die aktuelle Datenlage von miRNA-Analysen der bisherigen Forschungsprojekte am Mammakarzinom und anderen Krebsarten zusammen mit unseren Ergebnissen betrachtet, zeigen sich besonders bei vier miRNAs Übereinstimmungen: miRNA-122-5p, miRNA-490-3p und miRNA-130a-3p, miRNA-326.

Anhand der Kongruenzen mit der Literatur kann daher behauptet werden, dass miRNA-122-5p, miRNA-490-3p, miRNA-130a-3p und miRNA-326 für ZNS-Metastasen spezifisch sind. Allerdings muss für miRNA-130a-3p und miRNA-326 erwähnt werden, dass sie bei allen drei Fernmetastasierungsregionen erniedrigte Expressionsmuster aufzeigen und damit gegebenenfalls nicht allein spezifisch für ZNS-Metastasen sind. Weitere Studien mit einer größeren Kohorte sowie funktionelle und statistische Analysen sollten durchgeführt werden, um die Funktion der miRNAs als prognostisch zuverlässige Biomarker für Hirnmetastasen zu überprüfen.

Obwohl die Literatur für miRNA-296-5p, miRNA-576-3p und miRNA-148b-3p keine übereinstimmenden Daten liefert, sollten sie trotzdem als Anhaltspunkt für weitere Experimente verwendet werden.

Die kausalen Zusammenhänge zwischen der dysregulierten Expression und der Entstehung von Hirnmetastasen lassen sich nur verstehen, indem zusätzliche Forschungsprojekte zur Identifikation der beteiligten Zielgene durchgeführt werden.

### **4.1.5 MiRNA-Expressionsunterschiede bei Rezeptorstatus**

Zusätzlich zur Unterteilung nach Metastasierung wurden die Proben anhand des Rezeptorstatus in fünf Untergruppen eingeteilt: HER2 +, TNBC, ER/ PR/ HER2 +, ER/ HER2 + oder PR/ HER2 + und ER/ PR +.

Während bei der Einteilung nach Metastasen lediglich 14 miRNAs signifikant veränderte Expressionsmuster vorweisen, zeigen sich bei der Gliederung nach Rezeptorstatus 21 miRNAs signifikant dysreguliert. Dieses Erkenntnis lässt darauf schließen, dass die untersuchten miRNAs auch als Biomarker für den Rezeptorstatus dienen können.

Jedoch sollte bei der Analyse der Ergebnisse beachtet werden, dass bei der Auswahl unserer Probandinnen primär nur die Metastasierungsregion beachtet und die Proben erst danach nach Rezeptorstatus sortiert wurden. Dementsprechend ergeben sich für die einzelnen Untergruppen starke Abweichungen in der Anzahl der Proben. An dieser Stelle muss also erwähnt werden, dass den Gruppen mit einem HER2 positiven Status und einem ER/ HER2 oder PR/ HER2 positiven Status lediglich fünf bzw. sieben Proben zugeordnet wurden, während die Gruppe ER/ PR positiv aus 31 Probandinnen bestand (Tabelle 3). Aufgrund der unterschiedlichen Fallzahl erscheint ein Vergleich der Ergebnisse der Untergruppen mit der Kontrollgruppe nur bei der Gruppe ER/ PR positiv sinnvoll.

Für die Patientinnen mit einem ER/ PR positiven Rezeptorstatus zeigen sich in unseren Ergebnissen signifikant erhöhte Expressionsmuster bei miRNA-125-3p, miRNA-193-5p und miRNA-486-5p. Signifikant erniedrigte Expressionsniveaus weisen miRNA-130a-3p, miRNA-148b-3p, miRNA-326 und miRNA-342-3p auf.

Auffällig ist, dass fast alle, mit Ausnahme von miRNA-125-3p, der aufgelisteten miRNAs auch bei mindestens einer der Gruppen mit Fernmetastasen Dysregulationen aufweisen (Tabelle 7). Obwohl ein ER/ PR positiver Rezeptorstatus als prognostisch günstig gilt und ca. 50 % der Probandinnen aus dieser Gruppe noch keine Metastasen entwickelt hatten, zeigen sich die gleichen potentiellen miRNA-Biomarker wie bei Patientinnen mit entwickelten Fernmetastasen, was eher für eine ungünstige Prognose spricht

## 4 Diskussion

(Dunnwald, Rossing, and Li 2007). Ob ein Zusammenhang besteht und inwiefern dieser zur Vorhersage der Metastasenentwicklung bei ER/ PR positivem Status herangezogen werden kann, muss durch weitere Forschung geklärt werden.

*Tabelle 7: Vergleich der dysregulierten miRNAs bei ER/ PR+ Rezeptorstatus mit Dysregulationen bei Fernmetastasen  
+ = erhöhte Expression, - = erniedrigte Expression*

<b>miRNA</b>	<b>ER/ PR +</b>	<b>ZNS</b>	<b>viszeral</b>	<b>ossär</b>
<b>125-3p-AL11</b>	+			
<b>193-5p</b>	+	+	+	
<b>486-5p</b>	+	+	+	+
<b>130a-3p</b>	-	-		
<b>148b-3p</b>	-	-	-	-
<b>326</b>	-	-	-	-
<b>342-3p</b>	-		-	-

Um eine prognostische Funktion der miRNA bei den übrigen Untergruppen zu bestätigen, sollten erneute miRNA-Analysen durchgeführt werden, bei denen die Frage nach Biomarkern für Rezeptorstatus im Mittelpunkt steht und die Probandinnen dementsprechend ausgewählt werden.

### 4.1.6 Datenbankrecherche

Die Datenbankrecherche lieferte zuverlässige Target-Vorhersagen sowie Informationen über die Beteiligung an Signalwegen.

Für die Zielgensuche wurden computergestützte Verfahren, wie beispielsweise TargetScan, verwendet, welche anhand der Komplementarität der 3'UTR-Sequenz des Zielgens und der Seed-Region gute Prognosen liefern. Jeder miRNA werden dabei mehrere Hunderte Targets zugeordnet. Allerdings kann es dabei häufig zu falsch-positiven Ergebnissen kommen, da die Seed-Region der miRNA lediglich aus sechs bzw. sieben Nukleotiden besteht (Huang and Zuo 2014). Mithilfe der Datenbank-Suche konnten acht miRNAs identifiziert werden, die über insgesamt acht Targets direkt oder indirekt an der Krebsentstehung beteiligt sind. Dabei ist zu beachten, dass es sich nicht nur um die Entwicklung von Mammakarzinomen handelt, sondern die Krebsentstehung im Allgemeinen berücksichtigt wurde.

## 4 Diskussion

Über die KEGG-Pathway Plattform wurden die jeweiligen Targets auf ihre Beteiligung an Signalwegen kontrolliert (Abbildung 11). Die Targets GNG13 und FASLG stehen nach Datenbank-Überprüfung in direktem Zusammenhang mit der Krebsentwicklung, d.h. sie haben direkten Einfluss auf die Zellphysiologie der Krebszelle. GNG13 wird durch miRNA-122-5p beeinflusst und reguliert die Apoptose der Krebszellen. FASLG ist Target der miRNA-24-3p und steuert über Signalwege ebenfalls die Apoptose, ist aber zusätzlich für die genomische Instabilität der Zellen verantwortlich.

ALDOA, MDM4, NLK, TFRC, STRADB und GHRL regulieren Signalwege, die Einfluss auf die Entwicklung eines Karzinoms nehmen, und stehen damit in indirektem Zusammenhang. ALDOA wird ebenfalls durch miRNA-122-5p reguliert und fördert über den Signalweg HIF-1 den anaeroben Stoffwechsel der Krebszelle. Die miRNAs 130a-3p und 150-5p haben das Gen MDM4 zum Ziel. MDM4 ist Bestandteil des p53-Signalwegs und nimmt vor allem bei der Entstehung von Blasenkrebs eine zentrale Rolle ein. NLK ist Zielgen der miRNA-199a-3p. Über Steuerung der Adherens Junction-Funktion reguliert NLK das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. Zusätzlich wird über den MAPK-Signalweg der Zellzyklus gesteuert. Über den HIF-1-Signalweg reguliert TFRC den Sauerstofftransport der Zelle. TFRC wird durch miRNA-296-5p reguliert. STRADB wird durch miRNA-26a-5p und miRNA-24-3p reguliert und gehört zum mTOR-Signalweg. GHRL ist Target der miRNA-548d-5p und Teil der cAMP-Signalkette (KanehisaLaboratories 2020).

Oben aufgezeigte Targets haben prinzipiell eine onkogene Funktion. Durch ihre Wirkung auf die Krebszelle fördern sie die Karzinomentwicklung. Diese Erkenntnis entspricht in den meisten Fällen unseren Ergebnissen. Fünf der zugehörigen miRNAs sind in unseren Resultaten herunterreguliert. Ein erniedrigter miRNA-Spiegel bedeutet, dass die onkogenen Targets nicht inhibiert werden und sie ihre Funktion ausüben können. Ausnahmen stellen dabei miRNA-122-5p, miRNA-296-5p und miRNA-543d-5p dar. In unseren Ergebnissen zeigen sich diese drei mit erhöhten Expressionswerten.

An dieser Stelle muss kritisch angemerkt werden, dass bei unserer Datenbankrecherche nur die fünf Targets mit dem niedrigsten Cumulative Weighted Context++ Score (CWCS) berücksichtigt wurden. Dies lässt vermuten, dass bei der Auswahl der Gene relevante Zielgene außer Acht gelassen wurden.

Allerdings kann diese Methode als Grundlage für weitere Forschungsansätze dienen. So zeigt diese Arbeit mit *miR-122-5p/ GNG13/ ALDO*, *miR-130a-3p/ MDM4*, *miR-150-5p/ MDM4*, *miR-199a-3p/ NLK*, *miR-24-3p/ FASLG/ STRADB*, *miR-26a-5p/ STRADB*,

*miR-296-5p/ TFRC* und *miR-548d-5p/ GHRL* Zusammenspiele von miRNA und jeweiligem Zielgen auf, die an der Krebsentstehung beteiligt sind.

Werden die Informationen der Datenbankrecherche mit den Ergebnissen der miRNA-Analysen verglichen, zeigt sich eine Übereinstimmung bei miRNA-130a-3p. In weiteren Experimenten sollte daher ein Zusammenhang zu potenziellen Zielgenen, wie beispielsweise MDM4, erforscht werden, um die prognostische Funktion zu bestätigen.

## **4.2 Verhalten der Endothelzellen unter Einfluss von miRNA-210**

### **4.2.1 Bedeutung der miRNA-210 für die Krebsentstehung**

Bei umfangreichen Literaturrecherchen nach den miRNAs, die mithilfe der TaqMan Advanced miRNA Custom Array Cards im Rahmen unserer Studie analysiert wurden, zeigte sich, dass insbesondere miRNA-210 interessant für die Krebsentwicklung ist.

Eine Überexpression von miRNA-210 ist vor allem bei hypoxischen Zellen bekannt. Durch Hemmung der Apoptose sowie Steuerung der Zellaktivität und Angiogenese nimmt sie bei Gefahr von Sauerstoffmangel eine schützende Funktion für die Zelle ein (Guan et al. 2019; Kaiser et al. 2018; Blecharz-Lang et al. 2018; Ittner et al. 2020).

Tumorgewebe ist ein heterogenes Gewebe, bei dem durch Anomalien der Blutversorgung auch hypoxische Gewebsabschnitten entstehen. Es ist also nicht verwunderlich, dass Tumore zum Schutz ihrer Zellen vermehrt miRNA-210 exprimieren, um damit ihre Blutversorgung sicherzustellen. In verschiedenen Studien ließen sich deswegen bei Tumorpatienten und -patientinnen erhöhte miRNA-210-Blutspiegel feststellen (Gee et al. 2010; Huang and Zuo 2014).

Die Bedeutung der miRNA-210 für das Mammakarzinom ist umstritten. Während einige Studien der miRNA keine prognostische Funktion zuschreiben, setzen andere sie bei Überexpression mit einer ungünstigen Prognose in Verbindung (Block et al. 2018; Hong et al. 2012). Volinia et al. stellten in Untersuchungen fest, dass die miRNA-210 beim Übergang eines Carcinoma in situ zu einem invasiven Karzinom eine Rolle spielt. Als verantwortliche Targets identifizierten sie BRCA1, FANCD, FANCF, PARP1, E-Cadherin und Rb1 (Volinia et al. 2012):

## 4 Diskussion

Zahlreiche Studien haben eine tumorsuppressive Funktion des BRCA1-Gens erwiesen. Mutationen im BRCA1 gelten als Hochrisikomutation für Brustkrebs, da sie verantwortlich für ca. 40 – 45 % der genetisch bedingten Krebsfälle sind. Sollte BRCA1 wie bei Volinia und Kollegen beschrieben durch miRNA-210 gehemmt werden, wird die tumorunterdrückende Funktion verhindert und die Krebsentstehung begünstigt. Beides, d.h. eine Mutation des Gens und eine Stummschaltung durch die miRNA, fördern zwar die Tumorentwicklung, aber eine miRNA-Stummschaltung führt nicht zu einer Mutation des Gens. Eine Funktion der miRNA-210 als Marker für BRCA1-Mutationen kommt daher nicht in Frage (Rosen et al. 2003).

Volinia und Kollegen haben als weitere Ursache für die Entstehung eines Mammakarzinoms einen Zusammenhang von miRNA-210 und PARP1 (Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase 1) erwiesen. Während sich bei der Entwicklung eines Carcinomas in situ eine Erhöhung von PARP1 zeigt, ist PARP1 bei der Entstehung eines invasiven Karzinoms erniedrigt. Die Aufgabe von PARP1 besteht in dem Überwachen von DNA-Strangbrüchen. Eine Hemmung von PARP1 führt demnach zu einer fehlerhaften DNA-Reparatur.

Eine Studie von Malyuchenko und Kollegen untersuchte bereits die Funktion von PARP1 bei Tumoren. Entgegen den Ergebnissen von Volinia et al. zeigte sich PARP1 in ihren Experimenten bei verschiedenen invasiven Tumoren, unter anderem auch beim Brustkrebs, erhöht. Es wird angenommen, dass sich Krebszellen mithilfe von PARP1 vor einem Zelltod aufgrund von zytotoxischen DNA-Läsionen schützen wollen, um damit ihr Überleben zu sichern. Malyuchenko und Kollegen identifizierten PARP1 daher als Tumormarker, dessen erhöhte Expression mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Malyuchenko et al. 2015).

Basierend auf dieser Erkenntnis wurde eine Therapie mit PARP-Hemmern, wie Olaparib und Talazoparib entwickelt. Da besonders BRCA-mutierte Zellen sensitiv reagieren, soll mit der Therapie ihr Zelltod erzwungen werden, während gesunde Zellen verschont bleiben. Dieses Konzept wird synthetische Letalität genannt (Turk and Wisinski 2018). Die genaue Funktion von miRNA-210 im Zusammenhang mit PARP1 beim Mammakarzinom sollte nochmals untersucht werden, um zu klären, ob bzw. wann es zu einer erhöhten Expression von PARP1 kommt.

E-Cadherine haben nicht nur Einfluss auf die Entstehung eines invasiven Karzinoms, sondern sind auch für die Metastasierung von Bedeutung. Sie unterdrücken die Invasion

von Tumorzellen, indem sie die Zell-Zell-Adhäsion steuern. Kommt es durch Überexpression von miRNA-210 zur Stummschaltung von E-Cadherin, werden die Zell-Zell-Kontakte instabil und die Krebszellen lösen sich vom Primärtumor. Gleichzeitig können die Zellkontakte der BHS bei Verlust der E-Cadherin-Funktion beschädigt und die BHS damit durchlässig werden (Zeljko et al. 2011).

Basierend auf der Literaturrecherche hatte diese Arbeit zum Ziel, die Auswirkung einer Überexpression von miRNA-210 auf Endothel- und Brustkrebszellen in Zellversuchen zu untersuchen, um die bereits festgestellte onkogenen Eigenschaften im Zusammenhang mit Hirnmetastasen zu überprüfen.

### **4.2.2 Auswirkung der miRNA-210-Überexpression auf die Endothelzelle**

#### **4.2.2.1 Zellkultur**

Die Zellkultur ist eine etablierte Methode, um Auswirkungen auf Zellen zu erforschen. Mittels dieser Technik lassen sich gezielt Zellmechanismen und Zusammenhänge untersuchen und verstehen. Allerdings muss beachtet werden, dass die Zellen nur einen kleinen Teil einer Einheit, wie beispielsweise in unserem Fall der BHS, darstellen und nicht als alleinstehendes System verstanden werden können.

Bei der hier verwendeten Zellkultur handelt es sich um eine manuell durchgeführte Methode, bei der Störfaktoren auftreten, die nicht vermieden werden können. Durch den Transport der Zellkultur vom Inkubator zur Zellbank, Mediumwechsel, Verzögerungen bei Behandlung mehrerer Zellkulturen, Auszählen der Zellen bei Aussaat, Dauer der Kultivierung, etc. kommt es zu Abweichungen zwischen den einzelnen Zellkulturen.

Um diese Fehlerquellen zu umgehen, suchen Forschungsprojekte nach Möglichkeiten der Standardisierung. Bisher stehen diese Verfahren jedoch noch nicht zur allgemeinen Verfügung, sodass die konventionelle Zellkultur stets obligatorisch ist.

#### **4.2.2.2 Proliferation und metabolische Aktivität**

Mithilfe des verwendeten BrdU-Proliferationsassays wurde die Zellaktivität der Endothelzellen bestimmt. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde ergänzend der MTT-Assay

durchgeführt. In beiden Versuchen wurde sowohl eine Zellreihe mit gesunden Endothelzellen als auch eine Zellreihe Endothelzellen mit überexprimierter miRNA-210 verwendet.

Bei den Proliferationsassays wurde versucht Störfaktoren weitestgehend zu vermeiden. Dazu wurden beide Versuche jeweils zwei Mal durchgeführt. Um die idealen Zellmengen und Ergebnisse zu erhalten, wurden außerdem verschiedene Zellzahlen pro Pipettiervertiefung verwendet. Beim BrdU-Proliferationsassay wurden zur Kontrolle zusätzlich auf jeder Platte Blank- und Background-Wells angelegt. Die Blank-Wells enthielten keine Zellen und den Zellen in den Background-Wells wurde kein BrdU-Reagent zugefügt.

Unsere Ergebnisse der Proliferationsassays zeigen eine vermehrte Proliferation bei Überexpression von miRNA-210 auf.

Wie bereits beschrieben (Kapitel 4.2.1) exprimieren Zellen in Stresssituationen, wie beispielsweise bei Sauerstoffmangel, vermehrt miRNA-210. Damit versuchen sie, ihre Versorgung aufrecht zu erhalten und ihr Überleben durch Beeinflussung des Zellzyklus und durch Steuerung der Angiogenese zu sichern. Wird der Zelle miRNA-210 künstlich hinzugefügt, finden vermutlich ähnliche Mechanismen statt. MiRNA-210 hemmt den Zelltod, fördert die Zellteilung und die Angiogenese. Eine vermehrte Proliferation bei Überexpression erscheint damit plausibel und kann als Anhaltspunkt für weitere Experimente herangezogen werden.

### **4.2.2.3 Zell-Zelladhäsion an der Blut-Hirn-Schranke**

Die Zell-Zelladhäsion ist ein komplexer Prozess, bei dem verschiedene molekulare Wechselwirkungen stattfinden. Durch Rezeptor-Ligand-Bindung kommt es zum Austausch von Molekülen und Veränderungen der Zellphysiologie sind möglich (Humphries 2009). Eine Adhäsion von Krebszellen an die zerebralen Endothelzellen kann als erster Schritt der Metastasierung ins Gehirn gedeutet werden. Dementsprechend interessant sind Forschungsprojekte wie unseres, welche die Anheftung an Zellen der BHS untersuchen, um mögliche Therapieansätze zu finden.

Mithilfe des verwendeten Adhäsionsassays wurde die Menge an Brustkrebszellen bestimmt, die sich nach einer genau definierten Zeit an Endothelzellen festgesetzt hat. Dabei wurde in unseren Versuchen sowohl eine Zellreihe mit gesunden Endothelzellen als auch eine Endothelzellreihe mit überexprimierter miRNA-210 verwendet.

## 4 Diskussion

Aufgrund der erwiesenen Stummschaltung von E-Cadherinen erwarteten wir bei Überexpression von miRNA eine erhöhte Metastasierung ins Gehirn, bzw. in unserem Experiment eine erhöhte Adhäsion (Kapitel 4.2.1.) Zudem schreiben Studien, wie beispielsweise von Hong et al. einer Überexpression von miRNA-210 eine schlechte Prognose zu. Da Hirnmetastasen ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind, rechneten wir für die Adhäsion der Krebszellen mit einer Steigerung bei Überexpression von miRNA-210 (Hong et al. 2012).

Unsere Ergebnisse zeigen jedoch eine signifikante Abnahme der Adhäsion bei Überexpression von miRNA-210. Vermutlich wird bei einer vermehrten Expression der Phänotyp der Endothelzellen so verändert, dass weniger Bindungsstellen für die Krebszellen zur Verfügung stehen (Kapitel 1.2.2). Die entsprechenden Rezeptoren und Signalmoleküle wurden in unseren Versuchen nicht identifiziert.

In unseren Daten zeigt sich zwar eine Abnahme um ca. 30 %, dieses Ergebnis erscheint jedoch unzureichend, um eine Therapie mit miRNA-210 in Betracht zu ziehen. Zudem müssen bisherige Studiendaten berücksichtigt werden, bei denen ein erhöhtes Expressionsniveau von miRNA-210 oftmals als prognostisch ungünstig bewertet wurde. Eine Therapie mit miRNA-210 erscheint daher nicht sinnvoll.

## 5 Ausblick

Während miRNAs in anderen Bereichen der Krebsdiagnostik und -therapie bereits Anwendung finden, wurden für die Diagnostik und Behandlung von Metastasen beim Mammakarzinom bislang noch keine konkreten Ansätze gefunden.

Lassen sich obige miRNAs als zuverlässige Biomarker für ZNS-Metastasen bestätigen, werden auch hier neue Diagnostik- und Therapieverfahren ermöglicht. Dazu sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig. In Zukunft müssen die an der Tumorentstehung beteiligten Mechanismen weiter untersucht und die entsprechenden Moleküle und Signalwege identifiziert werden, um die Rolle der einzelnen miRNAs zu verstehen und entsprechende Diagnostik- und Gentherapiestrategien für die Klinik zu entwickeln. Dabei sollte insbesondere die Identifikation der entsprechend zugehörigen Targets im Fokus stehen. Anhand der zur Verfügung stehenden online-Datenbanken sollten potenzielle Zielgene recherchiert werden, die anschließend durch qPCR belegt werden sollten. Für die gezielte Suche nach Biomarkern für Hirnmetastasen sollte das Patientinnenkollektiv entsprechend angepasst und vergrößert werden.

Gleiches sollte auch für die anderen Metastasierungsorte beim Mammakarzinom, die in unserer Studie nicht im Fokus standen, durchgeführt werden.

Das Ziel ist es schließlich, eine auf Blutuntersuchungen basierende, kostengünstige und risikoarme Technologie zur Frühdiagnostik von Metastasen beim Mammakarzinom einzurichten und eine miRNA-Inhibitions- bzw. Ersatz-Therapie zu etablieren.

Die ermittelten Daten und Ergebnisse dieser Promotionsarbeit sollen als Anhaltspunkt für weitere Forschungsprojekte dienen und Tendenzen aufzeigen.

## 6 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen. Fortschritte in der Therapie ermöglichen zwar eine Verlängerung der Lebensdauer, jedoch kommt es dadurch vermehrt zur Bildung von Metastasen im zentralen Nervensystem (ZNS). Die Diagnostik und Behandlung von ZNS-Metastasen sind begrenzt und die Lebensqualität sowie Lebensdauer der Betroffenen nimmt bei zerebraler Metastasierung rapide ab. Ziel aktueller Forschungsprojekte ist daher, Biomarker zu identifizieren, die Hinweise auf eine Brustkrebserkrankung oder Metastasierung liefern. So soll eine kostengünstige, risikoarme und minimalinvasive Methode etabliert werden, die zuverlässige Daten über die Prognose und dementsprechende Therapien erbringt. Diese Arbeit hatte daher die Absicht, mithilfe von qPCR Expressionsprofile von miRNAs aus Serumproben von Brustkrebspatientinnen zu erstellen und deren Funktion als prognostische Biomarker für eine Metastasierung ins ZNS zu erweisen. Anhand von Metastasierung und Rezeptorstatus wurden die Proben in Untergruppen eingeteilt und statistisch mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Insgesamt zeigte sich bei 26 miRNAs eine signifikante Dysregulation der Expression bei mindestens einer der Untergruppen. Insbesondere bei ZNS-Metastasen war das Expressionsmuster bei miRNA-122-5p, miRNA-296-5p, miRNA-490-3p und miRNA-576-3p signifikant erhöht, während die Expression von miRNA-130a-3p, miRNA-148b-3p und miRNA-326 signifikant reduziert war. Basierend auf den Übereinstimmungen unserer Ergebnisse mit den Daten bisheriger Forschungsprojekten wiesen vier miRNAs eine potenzielle Funktion als Biomarker für Metastasen auf: miRNA-122-5p, miRNA-490-3p und miRNA-130a-3p, miRNA-326. Bei ZNS-Metastasen zeigten besonders miRNA-122-5p und miRNA-490-3p statistisch relevante Veränderungen.

Um den Einfluss von miRNAs auf den gesamten Körper darzustellen, wurde mithilfe verschiedener Datenbanken nach entsprechenden Zielgenen und Signalwegen für die 26 identifizierten miRNAs recherchiert. Neben dem Einfluss auf Stoffwechselwege und Erkrankungen, zeigte sich bei acht Targets ein Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs.

Ergänzend zur Identifikation von miRNA-Expressionsprofilen wurden Zellkulturversuche mit zerebralen Endothel- (cerebEND) und Brustkrebszellen (4T1) durchgeführt. Verwen-

## 6 Zusammenfassung

det wurden zwei cerebEND- und eine 4T1-Zellreihe von Mäusen, von denen eine cerebEND-Kultur zuvor in der Arbeitsgruppe Burek mit einem miRNA-210-Vektor transfiziert wurde.

Studien belegen den Einfluss von miRNA-210 auf den mitochondrialen Stoffwechsel, Angiogenese, Reaktionen auf DNA-Schäden, Apoptose und Zellüberleben sowie auf die Proteine BRCA1, PARP1 und E-Cadherin und schreiben ihr damit eine Funktion in der Krebsentstehung und Metastasierung zu.

Zur Bestimmung der Proliferation und Aktivität der transfizierten cerebEND-210-Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle, wurden BrdU-Proliferationsassays und MTT-Assays mit verschiedenen Zellzahlen durchgeführt. Bei der Untersuchung der Proliferation zeigte sich in beiden Versuchen eine erhöhte Aktivität der cerebEND-210-Zellen, da miRNA-210 vermutlich auch hier das Zellüberleben gesichert hat. Zudem wurde die Anheftung der Brustkrebszellen an den zerebralen Endothelzellen im Adhäsionsversuchs überprüft. Hierbei wurde eine Abnahme der Adhäsion der cerebEND-210-Zellen beobachtet. Vermutet wird eine Veränderung des Phänotyps der Rezeptorbindungen der cerebEND-210-Zellen.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche dienen als Grundlage für weitere Experimente.

## 7 Literaturverzeichnis

- Agarwal, V., G. W. Bell, J. W. Nam, and D. P. Bartel. 2015. 'Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs', *Elife*, 4.
- Angeli, E., T. T. Nguyen, A. Janin, and G. Bousquet. 2019. 'How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood-Brain Barrier to Treat Brain Metastases', *Int J Mol Sci*, 21.
- Apantaku, L. M. 2000. 'Breast cancer diagnosis and screening', *Am Fam Physician*, 62: 596-602, 05-6.
- Arvanitis, C. D., G. B. Ferraro, and R. K. Jain. 2020. 'The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases', *Nat Rev Cancer*, 20: 26-41.
- Backes, C., E. Meese, and A. Keller. 2016. 'Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects', *Mol Diagn Ther*, 20: 509-18.
- Bai, Y., Y. Zhang, J. Hua, X. Yang, X. Zhang, M. Duan, X. Zhu, W. Huang, J. Chao, R. Zhou, G. Hu, and H. Yao. 2016. 'Silencing microRNA-143 protects the integrity of the blood-brain barrier: implications for methamphetamine abuse', *Sci Rep*, 6: 35642.
- Bennani-Baiti, B., N. Bennani-Baiti, and P. A. Baltzer. 2016. 'Diagnostic Performance of Breast Magnetic Resonance Imaging in Non-Calcified Equivocal Breast Findings: Results from a Systematic Review and Meta-Analysis', *PLoS One*, 11: e0160346.
- Blecharz-Lang, K. G., V. Prinz, M. Burek, D. Frey, T. Schenkel, S. M. Krug, M. Fromm, and P. Vajkoczy. 2018. 'Gelatinolytic activity of autocrine matrix metalloproteinase-9 leads to endothelial de-arrangement in Moyamoya disease', *J Cereb Blood Flow Metab*, 38: 1940-53.
- Block, I., M. Burton, K. P. Sorensen, L. Andersen, M. J. Larsen, M. Bak, S. Cold, M. Thomassen, Q. Tan, and T. A. Kruse. 2018. 'Association of miR-548c-5p, miR-7-5p, miR-210-3p, miR-128-3p with recurrence in systemically untreated breast cancer', *Oncotarget*, 9: 9030-42.
- Bravi, F., A. Decarli, and A. G. Russo. 2018. 'Risk factors for breast cancer in a cohort of mammographic screening program: a nested case-control study within the FRiCaM study', *Cancer Med*, 7: 2145-52.
- Bublak, Robert. 2019. 'Mammakarzinom: Prognose nach Hirnmetastasen hängt vom Tumortyp ab', *Im Fokus Onkologie*, 22: 15-15.

## 7 Literaturverzeichnis

- Burek, M., S. Burmester, E. Salvador, K. Moller-Ehrlich, R. Schneider, N. Roewer, M. Nagai, and C. Y. Forster. 2020. 'Kidney Ischemia/Reperfusion Injury Induces Changes in the Drug Transporter Expression at the Blood-Brain Barrier in vivo and in vitro', *Front Physiol*, 11: 569881.
- Burek, M., A. Konig, M. Lang, J. Fiedler, S. Oerter, N. Roewer, M. Bohnert, S. C. Thal, K. G. Blecharz-Lang, J. Woitzik, T. Thum, and C. Y. Forster. 2019. 'Hypoxia-Induced MicroRNA-212/132 Alter Blood-Brain Barrier Integrity Through Inhibition of Tight Junction-Associated Proteins in Human and Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells', *Transl Stroke Res*, 10: 672-83.
- Burek, M., E. Salvador, and C. Y. Forster. 2012. 'Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model', *J Vis Exp*: e4022.
- Carter, C. L., C. Allen, and D. E. Henson. 1989. 'Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases', *Cancer*, 63: 181-7.
- Chen, M., C. Chen, H. Luo, J. Ren, Q. Dai, W. Hu, K. Zhou, X. Tang, and X. Li. 2020. 'MicroRNA-296-5p inhibits cell metastasis and invasion in nasopharyngeal carcinoma by reversing transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition', *Cell Mol Biol Lett*, 25: 49.
- Chen, Q., Q. Si, S. Xiao, Q. Xie, J. Lin, C. Wang, L. Chen, Q. Chen, and L. Wang. 2013. 'Prognostic significance of serum miR-17-5p in lung cancer', *Med Oncol*, 30: 353.
- Cheng, A. M., M. W. Byrom, J. Shelton, and L. P. Ford. 2005. 'Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis', *Nucleic Acids Res*, 33: 1290-7.
- Cheng, X., and M. C. Hung. 2007. 'Breast cancer brain metastases', *Cancer Metastasis Rev*, 26: 635-43.
- Cherny, N. I., S. Paluch-Shimon, and Y. Berner-Wygoda. 2018. 'Palliative care: needs of advanced breast cancer patients', *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 10: 231-43.
- Christgen, M., F. Langer, and H. Kreipe. 2016. '[Histological grading of breast cancer]', *Pathologe*, 37: 328-36.
- Cserni, G., E. Chmielik, B. Cserni, and T. Tot. 2018. 'The new TNM-based staging of breast cancer', *Virchows Arch*, 472: 697-703.
- Cui, C., and Q. Cui. 2020. 'The relationship of human tissue microRNAs with those from body fluids', *Sci Rep*, 10: 5644.

## 7 Literaturverzeichnis

- Curtaz, C. J., C. Schmitt, K. G. Blecharz-Lang, N. Roewer, A. Wockel, and M. Burek. 2020. 'Circulating MicroRNAs and Blood-Brain-Barrier Function in Breast Cancer Metastasis', *Curr Pharm Des*, 26: 1417-27.
- Curtaz, C. J., C. Schmitt, S. L. Herbert, J. Feldheim, N. Schlegel, F. Gosselet, C. Hagemann, N. Roewer, P. Meybohm, A. Wockel, and M. Burek. 2020. 'Serum-derived factors of breast cancer patients with brain metastases alter permeability of a human blood-brain barrier model', *Fluids Barriers CNS*, 17: 31.
- Daneman, R., and A. Prat. 2015. 'The blood-brain barrier', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a020412.
- Deutsches Mammographie-Screening-Programm, Kooperationsgemeinschaft Mammographie. 2019. 'Jahresbericht Evaluation 2017'. [https://www.mammo-programm.de/download/downloads/berichte/KOOPMAMMO\\_Jahresbericht\\_Eval\\_2017-web.pdf](https://www.mammo-programm.de/download/downloads/berichte/KOOPMAMMO_Jahresbericht_Eval_2017-web.pdf).
- Dilling, C., N. Roewer, C. Y. Forster, and M. Burek. 2017. 'Multiple protocadherins are expressed in brain microvascular endothelial cells and might play a role in tight junction protein regulation', *J Cereb Blood Flow Metab*, 37: 3391-400.
- Dilsiz, N. 2020. 'Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer', *Future Sci OA*, 6: FSO465.
- Dunnwald, L. K., M. A. Rossing, and C. I. Li. 2007. 'Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients', *Breast Cancer Res*, 9: R6.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, Group. 2005. 'Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials', *Lancet*, 365: 1687-717.
- European Medicines Agency. 2018. 'Afinitor (Everolimus)', Accessed 06.03.2022. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/afinitor-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/afinitor-epar-product-information_de.pdf).
- Fisher, B., S. Anderson, J. Bryant, R. G. Margolese, M. Deutsch, E. R. Fisher, J. H. Jeong, and N. Wolmark. 2002. 'Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer', *N Engl J Med*, 347: 1233-41.
- Fusco, A. 2010. 'MicroRNAs: a great challenge for the diagnosis and therapy of endocrine cancers', *Endocr Relat Cancer*, 17: E3-4.
- Gabbert, L., C. Dilling, P. Meybohm, and M. Burek. 2020. 'Deletion of Protocadherin Gamma C3 Induces Phenotypic and Functional Changes in Brain Microvascular Endothelial Cells In Vitro', *Front Pharmacol*, 11: 590144.

- Galimberti, V., B. F. Cole, S. Zurrída, G. Viale, A. Luini, P. Veronesi, P. Baratella, C. Chifu, M. Sargenti, M. Intra, O. Gentilini, M. G. Mastropasqua, G. Mazzarol, S. Massarut, J. R. Garbay, J. Zgajnar, H. Galatius, A. Recalcati, D. Littlejohn, M. Bamert, M. Colleoni, K. N. Price, M. M. Regan, A. Goldhirsch, A. S. Coates, R. D. Gelber, U. Veronesi, and investigators International Breast Cancer Study Group Trial. 2013. 'Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial', *Lancet Oncol*, 14: 297-305.
- Gao, Y., H. Ma, C. Gao, Y. Lv, X. Chen, R. Xu, M. Sun, X. Liu, X. Lu, X. Pei, and P. Li. 2018. 'Tumor-promoting properties of miR-8084 in breast cancer through enhancing proliferation, suppressing apoptosis and inducing epithelial-mesenchymal transition', *J Transl Med*, 16: 38.
- Gee, H. E., C. Camps, F. M. Buffa, S. Patiar, S. C. Winter, G. Betts, J. Homer, R. Corbridge, G. Cox, C. M. West, J. Ragoussis, and A. L. Harris. 2010. 'hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer', *Cancer*, 116: 2148-58.
- Gerhartl, A., K. Hahn, A. Neuhoff, H. P. Friedl, C. Y. Forster, C. Wunder, M. Schick, M. Burek, and W. Neuhaus. 2020. 'Hydroxyethylstarch (130/0.4) tightens the blood-brain barrier in vitro', *Brain Res*, 1727: 146560.
- Giancotti, F. G. 2013. 'Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation', *Cell*, 155: 750-64.
- Giuliano, A. E., K. K. Hunt, K. V. Ballman, P. D. Beitsch, P. W. Whitworth, P. W. Blumencranz, A. M. Leitch, S. Saha, L. M. McCall, and M. Morrow. 2011. 'Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial', *JAMA*, 305: 569-75.
- Giuliano, A. E., L. McCall, P. Beitsch, P. W. Whitworth, P. Blumencranz, A. M. Leitch, S. Saha, K. K. Hunt, M. Morrow, and K. Ballman. 2010. 'Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial', *Ann Surg*, 252: 426-32; discussion 32-3.
- Goldhirsch, A., W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, B. Thurlimann, H. J. Senn, and members Panel. 2011. 'Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011', *Ann Oncol*, 22: 1736-47.
- Guan, Y., X. Song, W. Sun, Y. Wang, and B. Liu. 2019. 'Effect of Hypoxia-Induced MicroRNA-210 Expression on Cardiovascular Disease and the Underlying Mechanism', *Oxid Med Cell Longev*, 2019: 4727283.

## 7 Literaturverzeichnis

- Guenat, D., F. Hermetet, J. L. Pretet, and C. Mougin. 2017. 'Exosomes and Other Extracellular Vesicles in HPV Transmission and Carcinogenesis', *Viruses*, 9.
- Gupta, G. P., and J. Massague. 2006. 'Cancer metastasis: building a framework', *Cell*, 127: 679-95.
- Hadjipanteli, A., P. Doolan, E. Kyriacou, and A. Constantinidou. 2020. 'Breast Cancer Brain Metastasis: The Potential Role of MRI Beyond Current Clinical Applications', *Cancer Manag Res*, 12: 9953-64.
- Harding, C., and P. Stahl. 1983. 'Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing', *Biochem Biophys Res Commun*, 113: 650-8.
- Heer, E., A. Harper, N. Escandor, H. Sung, V. McCormack, and M. M. Fidler-Benaoudia. 2020. 'Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study', *Lancet Glob Health*, 8: e1027-e37.
- Helms, H. C., N. J. Abbott, M. Burek, R. Cecchelli, P. O. Couraud, M. A. Deli, C. Forster, H. J. Galla, I. A. Romero, E. V. Shusta, M. J. Stebbins, E. Vandenhoute, B. Weksler, and B. Brodin. 2016. 'In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use', *J Cereb Blood Flow Metab*, 36: 862-90.
- Hong, L., J. Yang, Y. Han, Q. Lu, J. Cao, and L. Syed. 2012. 'High expression of miR-210 predicts poor survival in patients with breast cancer: a meta-analysis', *Gene*, 507: 135-8.
- Hosseinahli, N., M. Aghapour, P. H. G. Duijf, and B. Baradaran. 2018. 'Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review', *J Cell Physiol*, 233: 5574-88.
- Hsu, C., Y. Morohashi, S. Yoshimura, N. Manrique-Hoyos, S. Jung, M. A. Lauterbach, M. Bakhti, M. Gronborg, W. Mobius, J. Rhee, F. A. Barr, and M. Simons. 2010. 'Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C', *J Cell Biol*, 189: 223-32.
- Huang et al. 2019. 'HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations', Accessed Oktober 2021. <https://www.cuilab.cn/hmdd>.
- Huang, X., and J. Zuo. 2014. 'Emerging roles of miR-210 and other non-coding RNAs in the hypoxic response', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46: 220-32.
- Hubner, J., A. Katalinic, A. Waldmann, and K. Kraywinkel. 2020. 'Long-term Incidence and Mortality Trends for Breast Cancer in Germany', *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 80: 611-18.

## 7 Literaturverzeichnis

- Humphries, M. J. 2009. 'Cell adhesion assays', *Methods Mol Biol*, 522: 203-10.
- Huotari, J., and A. Helenius. 2011. 'Endosome maturation', *EMBO J*, 30: 3481-500.
- Ibrahim, S. A., G. W. Yip, C. Stock, J. W. Pan, C. Neubauer, M. Poeter, D. Pujalis, C. Y. Koo, R. Kelsch, R. Schule, U. Rescher, L. Kiesel, and M. Gotte. 2012. 'Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism', *Int J Cancer*, 131: E884-96.
- Ittner, C., M. Burek, S. Stork, M. Nagai, and C. Y. Forster. 2020. 'Increased Catecholamine Levels and Inflammatory Mediators Alter Barrier Properties of Brain Microvascular Endothelial Cells in vitro', *Front Cardiovasc Med*, 7: 73.
- Jin, X., and P. Mu. 2015. 'Targeting Breast Cancer Metastasis', *Breast Cancer (Auckl)*, 9: 23-34.
- John, E. M., A. I. Phipps, J. A. Knight, R. L. Milne, G. S. Dite, J. L. Hopper, I. L. Andrulis, M. Southey, G. G. Giles, D. W. West, and A. S. Whittemore. 2007. 'Medical radiation exposure and breast cancer risk: findings from the Breast Cancer Family Registry', *Int J Cancer*, 121: 386-94.
- Kaiser, M., M. Burek, S. Britz, F. Lankamp, S. Ketelhut, B. Kemper, C. Forster, C. Gorzelanny, and F. M. Goycoolea. 2018. 'The Influence of Capsaicin on the Integrity of Microvascular Endothelial Cell Monolayers', *Int J Mol Sci*, 20.
- Kalani, A., A. Tyagi, and N. Tyagi. 2014. 'Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics', *Mol Neurobiol*, 49: 590-600.
- Kanchan, R. K., J. A. Siddiqui, S. Mahapatra, S. K. Batra, and M. W. Nasser. 2020. 'microRNAs Orchestrate Pathophysiology of Breast Cancer Brain Metastasis: Advances in Therapy', *Mol Cancer*, 19: 29.
- Kanehisa, M., and S. Goto. 2000. 'KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes', *Nucleic Acids Res*, 28: 27-30.
- KanehisaLaboratories. 2020. 'KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes', Accessed 12.10.2021.
- Katalinic, A., N. Eisemann, K. Kraywinkel, M. R. Noftz, and J. Hubner. 2020. 'Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program', *Int J Cancer*, 147: 709-18.
- Keklikoglou, I., C. Koerner, C. Schmidt, J. D. Zhang, D. Heckmann, A. Shavinskaya, H. Allgayer, B. Guckel, T. Fehm, A. Schneeweiss, O. Sahin, S. Wiemann, and U. Tschulena. 2012. 'MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-kappaB and TGF-beta signaling pathways', *Oncogene*, 31: 4150-63.

## 7 Literaturverzeichnis

- Kennecke, H., R. Yerushalmi, R. Woods, M. C. Cheang, D. Voduc, C. H. Speers, T. O. Nielsen, and K. Gelmon. 2010. 'Metastatic behavior of breast cancer subtypes', *J Clin Oncol*, 28: 3271-7.
- Kong, X., J. Zhang, J. Li, J. Shao, and L. Fang. 2018. 'MiR-130a-3p inhibits migration and invasion by regulating RAB5B in human breast cancer stem cell-like cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 501: 486-93.
- Kooperationsgemeinschaft Mammographie GbR. 2021. 'Mammo-Programm', Accessed März 16, 2021. [www.mammo-programm.de](http://www.mammo-programm.de).
- Kozomara, A., M. Birgaoanu, and S. Griffiths-Jones. 2019. 'miRBase: from microRNA sequences to function', *Nucleic Acids Res*, 47: D155-D62.
- Krebs in Deutschland*. 2006. (Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.).
- Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 2019. (Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.).
- Krupinova, J., N. Mokrysheva, V. Petrov, E. Pigarova, A. Eremkina, E. Dobreva, A. Ajnetdinova, G. Melnichenko, and A. Tiulpakov. 2021. 'Serum circulating miRNA-342-3p as a potential diagnostic biomarker in parathyroid carcinomas: A pilot study', *Endocrinol Diabetes Metab*, 4: e00284.
- Lee, K. H., F. C. Lin, T. I. Hsu, J. T. Lin, J. H. Guo, C. H. Tsai, Y. C. Lee, Y. C. Lee, C. L. Chen, M. Hsiao, and P. J. Lu. 2014. 'MicroRNA-296-5p (miR-296-5p) functions as a tumor suppressor in prostate cancer by directly targeting Pin1', *Biochim Biophys Acta*, 1843: 2055-66.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75: 843-54.
- Leitlinienprogramm Onkologie, (Deutsche Krebsgesellschaft Deutsche Krebshilfe AWMF). 2020. 'S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms', Accessed März 2021. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, and C. B. Burge. 2003. 'Prediction of mammalian microRNA targets', *Cell*, 115: 787-98.
- Li, H., Q. Mou, P. Li, Z. Yang, Z. Wang, J. Niu, Y. Liu, Z. Sun, S. Lv, B. Zhang, and C. Yin. 2019. 'MiR-486-5p inhibits IL-22-induced epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cell by repressing Dock1', *J Cancer*, 10: 4695-706.

## 7 Literaturverzeichnis

- Li, J., Z. Chen, K. Su, and J. Zeng. 2015. 'Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer', *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 8500-5.
- Li, M., X. Zou, T. Xia, T. Wang, P. Liu, X. Zhou, S. Wang, and W. Zhu. 2019. 'A five-miRNA panel in plasma was identified for breast cancer diagnosis', *Cancer Med*, 8: 7006-17.
- Li, T., Z. L. Ding, Y. L. Zheng, and W. Wang. 2017. 'MiR-484 promotes non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression through inhibiting Apaf-1 associated with the suppression of apoptosis', *Biomed Pharmacother*, 96: 153-64.
- Li, Z., Z. Peng, S. Gu, J. Zheng, D. Feng, Q. Qin, and J. He. 2017. 'Global Analysis of miRNA-mRNA Interaction Network in Breast Cancer with Brain Metastasis', *Anticancer Res*, 37: 4455-68.
- Li, Z., and T. M. Rana. 2014. 'Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges', *Nat Rev Drug Discov*, 13: 622-38.
- Liang, Z., S. Li, X. Xu, X. Xu, X. Wang, J. Wu, Y. Zhu, Z. Hu, Y. Lin, Y. Mao, H. Chen, J. Luo, B. Liu, X. Zheng, and L. Xie. 2015. 'MicroRNA-576-3p inhibits proliferation in bladder cancer cells by targeting cyclin D1', *Mol Cells*, 38: 130-7.
- Liu, J., and L. Huang. 2018. 'Image-guided vacuum-assisted breast biopsy in the diagnosis of breast microcalcifications', *J Int Med Res*, 46: 2743-53.
- Ljubimova, J. Y., T. Sun, L. Mashouf, A. V. Ljubimov, L. L. Israel, V. A. Ljubimov, V. Falahatian, and E. Holler. 2017. 'Covalent nano delivery systems for selective imaging and treatment of brain tumors', *Adv Drug Deliv Rev*, 113: 177-200.
- Lu, K., J. Wang, Y. Song, S. Zhao, H. Liu, D. Tang, B. Pan, H. Zhao, and Q. Zhang. 2015. 'miRNA-24-3p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in human breast cancer by targeting p27Kip1', *Oncol Rep*, 34: 995-1002.
- Lu, N., M. Zhang, L. Lu, Y. Z. Liu, H. H. Zhang, and X. D. Liu. 2021. 'miRNA4903p promotes the metastatic progression of invasive ductal carcinoma', *Oncol Rep*, 45: 706-16.
- Lucci, A., L. M. McCall, P. D. Beitsch, P. W. Whitworth, D. S. Reintgen, P. W. Blumencranz, A. M. Leitch, S. Saha, K. K. Hunt, A. E. Giuliano, and Group American College of Surgeons Oncology. 2007. 'Surgical complications associated with sentinel lymph node dissection (SLND) plus axillary lymph node dissection compared with SLND alone in the American College of Surgeons Oncology Group Trial Z0011', *J Clin Oncol*, 25: 3657-63.
- Luzzi, K. J., I. C. MacDonald, E. E. Schmidt, N. Kerkvliet, V. L. Morris, A. F. Chambers, and A. C. Groom. 1998. 'Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of

## 7 Literaturverzeichnis

- solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases', *Am J Pathol*, 153: 865-73.
- Ma, T., J. Zhang, J. Wu, and J. Tang. 2014. '[Effect of miR-342-3p on chemotherapy sensitivity in triple-negative breast cancer]', *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 39: 488-95.
- Malyuchenko, N. V., E. Y. Kotova, O. I. Kulaeva, M. P. Kirpichnikov, and V. M. Studitskiy. 2015. 'PARP1 Inhibitors: antitumor drug design', *Acta Naturae*, 7: 27-37.
- Mariotto, A. B., R. Etzioni, M. Hurlbert, L. Penberthy, and M. Mayer. 2017. 'Estimation of the Number of Women Living with Metastatic Breast Cancer in the United States', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 26: 809-15.
- Martin, A. M., D. N. Cagney, P. J. Catalano, L. E. Warren, J. R. Bellon, R. S. Punglia, E. B. Claus, E. Q. Lee, P. Y. Wen, D. A. Haas-Kogan, B. M. Alexander, N. U. Lin, and A. A. Aizer. 2017. 'Brain Metastases in Newly Diagnosed Breast Cancer: A Population-Based Study', *JAMA Oncol*, 3: 1069-77.
- McDonald, E. S., A. S. Clark, J. Tchou, P. Zhang, and G. M. Freedman. 2016. 'Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer', *J Nucl Med*, 57 Suppl 1: 9S-16S.
- McPherson, K., C. M. Steel, and J. M. Dixon. 2000. 'ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics', *BMJ*, 321: 624-8.
- Melo, S. A., H. Sugimoto, J. T. O'Connell, N. Kato, A. Villanueva, A. Vidal, L. Qiu, E. Vitkin, L. T. Perelman, C. A. Melo, A. Lucci, C. Ivan, G. A. Calin, and R. Kalluri. 2014. 'Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis', *Cancer Cell*, 26: 707-21.
- Moran, M. S., S. J. Schnitt, A. E. Giuliano, J. R. Harris, S. A. Khan, J. Horton, S. Klimberg, M. Chavez-MacGregor, G. Freedman, N. Houssami, P. L. Johnson, and M. Morrow. 2014. 'Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 88: 553-64.
- Mosmann, T. 1983. 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays', *J Immunol Methods*, 65: 55-63.
- Newman, L. A., and H. M. Kuerer. 2005. 'Advances in breast conservation therapy', *J Clin Oncol*, 23: 1685-97.

## 7 Literaturverzeichnis

- Noman, M. Z., B. Janji, G. Berchem, and S. Chouaib. 2016. 'miR-210 and hypoxic microvesicles: Two critical components of hypoxia involved in the regulation of killer cells function', *Cancer Lett*, 380: 257-62.
- Novartis Pharma. 2021. 'Fachinformation Piqray (Alpelisib)', Novartis Pharma, Accessed 01.03.2022. <https://www.fachinfo.de/pdf/023069>.
- Pan, B. T., and R. M. Johnstone. 1983. 'Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor', *Cell*, 33: 967-78.
- Pan, Y. J., J. Wan, and C. B. Wang. 2019. 'MiR-326: Promising Biomarker for Cancer', *Cancer Manag Res*, 11: 10411-18.
- Pasquinelli, A. E. 2012. 'MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship', *Nat Rev Genet*, 13: 271-82.
- Präbst, Konstantin, Hannes Engelhardt, Stefan Ringgeler, and Holger Hübner. 2017. 'Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin.' in Daniel F. Gilbert and Oliver Friedrich (eds.), *Cell Viability Assays: Methods and Protocols* (Springer New York: New York, NY).
- Rana, S., K. Malinowska, and M. Zoller. 2013. 'Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells', *Neoplasia*, 15: 281-95.
- Redig, A. J., and S. S. McAllister. 2013. 'Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis', *J Intern Med*, 274: 113-26.
- Renz, A., C. Burek, W. Mier, M. Mozoluk, K. Schulze-Osthoff, and M. Los. 2001. 'Cytochrome c is rapidly extruded from apoptotic cells and detectable in serum of anticancer-drug treated tumor patients', *Adv Exp Med Biol*, 495: 331-4.
- Rosen, E. M., S. Fan, R. G. Pestell, and I. D. Goldberg. 2003. 'BRCA1 gene in breast cancer', *J Cell Physiol*, 196: 19-41.
- Rosing, N., E. Salvador, P. Guntzel, C. Kempe, M. Burek, U. Holzgrabe, V. Soukhoroukov, C. Wunder, and C. Forster. 2020. 'Neuroprotective Effects of Isosteviol Sodium in Murine Brain Capillary Cerebellar Endothelial Cells (cerebEND) After Hypoxia', *Front Cell Neurosci*, 14: 573950.
- Rothschild, S. I. 2014. 'microRNA therapies in cancer', *Mol Cell Ther*, 2: 7.
- Sakorafas, G. H. 2001. 'Breast cancer surgery--historical evolution, current status and future perspectives', *Acta Oncol*, 40: 5-18.

## 7 Literaturverzeichnis

- Salvador, E., M. Burek, M. Lohr, M. Nagai, C. Hagemann, and C. Y. Forster. 2021. 'Senescence and associated blood-brain barrier alterations in vitro', *Histochem Cell Biol*, 156: 283-92.
- Schick, M. A., M. Burek, C. Y. Forster, M. Nagai, C. Wunder, and W. Neuhaus. 2021. 'Hydroxyethylstarch revisited for acute brain injury treatment', *Neural Regen Res*, 16: 1372-76.
- Silwedel, C., and C. Forster. 2006. 'Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli', *J Neuroimmunol*, 179: 37-45.
- Sinn, H. P., and H. Kreipe. 2013. 'A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition', *Breast Care (Basel)*, 8: 149-54.
- Sobhani, N., A. D'Angelo, M. Pittacolo, G. Roviello, A. Miccoli, S. P. Corona, O. Bernocchi, D. Generali, and T. Otto. 2019. 'Updates on the CDK4/6 Inhibitory Strategy and Combinations in Breast Cancer', *Cells*, 8.
- Sokilde, R., H. Persson, A. Ehinger, A. C. Pirona, M. Ferno, C. Hegardt, C. Larsson, N. Loman, M. Malmberg, L. Ryden, L. Saal, A. Borg, J. Vallon-Christerson, and C. Rovira. 2019. 'Refinement of breast cancer molecular classification by miRNA expression profiles', *BMC Genomics*, 20: 503.
- Soni, A., Z. Ren, O. Hameed, D. Chanda, C. J. Morgan, G. P. Siegal, and S. Wei. 2015. 'Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases', *Am J Clin Pathol*, 143: 471-8.
- Sossey-Alaoui, K., K. Bialkowska, and E. F. Plow. 2009. 'The miR200 family of microRNAs regulates WAVE3-dependent cancer cell invasion', *J Biol Chem*, 284: 33019-29.
- Stark, A. M., K. Tongers, N. Maass, H. M. Mehdorn, and J. Held-Feindt. 2005. 'Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases', *J Cancer Res Clin Oncol*, 131: 191-8.
- Sun, J., Y. D. Guo, X. N. Li, Y. Q. Zhang, L. Gu, P. P. Wu, G. H. Bai, and Y. Xiao. 2014. 'B7-H3 expression in breast cancer and upregulation of VEGF through gene silence', *Onco Targets Ther*, 7: 1979-86.
- Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray. 2021. 'Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA Cancer J Clin*.
- Swellam, M., R. F. K. Zahran, H. Abo El-Sadat Taha, N. El-Khazragy, and C. Abdel-Malak. 2019. 'Role of some circulating MiRNAs on breast cancer diagnosis', *Arch Physiol Biochem*, 125: 456-64.

## 7 Literaturverzeichnis

- Tang, Y., Y. Zhao, X. Song, X. Song, L. Niu, and L. Xie. 2019. 'Tumor-derived exosomal miRNA-320d as a biomarker for metastatic colorectal cancer', *J Clin Lab Anal*, 33: e23004.
- Teles, R. H. G., R. S. Yano, N. J. Villarinho, A. S. Yamagata, R. G. Jaeger, P. Meybohm, M. Burek, and V. M. Freitas. 2021. 'Advances in Breast Cancer Management and Extracellular Vesicle Research, a Bibliometric Analysis', *Curr Oncol*, 28: 4504-20.
- Thakur, P., R. K. Seam, M. K. Gupta, M. Gupta, M. Sharma, and V. Fotedar. 2017. 'Breast cancer risk factor evaluation in a Western Himalayan state: A case-control study and comparison with the Western World', *South Asian J Cancer*, 6: 106-09.
- Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. 'Exosomes: composition, biogenesis and function', *Nat Rev Immunol*, 2: 569-79.
- Torre, L. A., R. L. Siegel, E. M. Ward, and A. Jemal. 2016. 'Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 25: 16-27.
- Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger, and M. Simons. 2008. 'Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes', *Science*, 319: 1244-7.
- Turk, A. A., and K. B. Wisinski. 2018. 'PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside', *Cancer*, 124: 2498-506.
- Uen, Y., J. W. Wang, C. Wang, Y. Jhang, J. Y. Chung, T. Tseng, M. Sheu, and S. Lee. 2018. 'Mining of potential microRNAs with clinical correlation - regulation of syndecan-1 expression by miR-122-5p altered mobility of breast cancer cells and possible correlation with liver injury', *Oncotarget*, 9: 28165-75.
- Usuba, W., F. Urabe, Y. Yamamoto, J. Matsuzaki, H. Sasaki, M. Ichikawa, S. Takizawa, Y. Aoki, S. Niida, K. Kato, S. Egawa, T. Chikaraishi, H. Fujimoto, and T. Ochiya. 2019. 'Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer', *Cancer Sci*, 110: 408-19.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee, and J. O. Lotvall. 2007. 'Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells', *Nat Cell Biol*, 9: 654-9.
- Villarroya-Beltri, C., C. Gutierrez-Vazquez, F. Sanchez-Cabo, D. Perez-Hernandez, J. Vazquez, N. Martin-Cofreces, D. J. Martinez-Herrera, A. Pascual-Montano, M. Mittelbrunn, and F. Sanchez-Madrid. 2013. 'Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs', *Nat Commun*, 4: 2980.

## 7 Literaturverzeichnis

- Volinia, S., M. Galasso, M. E. Sana, T. F. Wise, J. Palatini, K. Huebner, and C. M. Croce. 2012. 'Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 3024-9.
- Vuong, D., P. T. Simpson, B. Green, M. C. Cummings, and S. R. Lakhani. 2014. 'Molecular classification of breast cancer', *Virchows Arch*, 465: 1-14.
- Wang, Z., and X. Wang. 2020. 'miR-122-5p promotes aggression and epithelial-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer by suppressing charged multivesicular body protein 3 through mitogen-activated protein kinase signaling', *J Cell Physiol*, 235: 2825-35.
- Ward, E. M., C. E. DeSantis, C. C. Lin, J. L. Kramer, A. Jemal, B. Kohler, O. W. Brawley, and T. Gansler. 2015. 'Cancer statistics: Breast cancer in situ', *CA Cancer J Clin*, 65: 481-95.
- Weidle, U. H., J. Niewohner, and G. Tiefenthaler. 2015. 'The Blood-Brain Barrier Challenge for the Treatment of Brain Cancer, Secondary Brain Metastases, and Neurological Diseases', *Cancer Genomics Proteomics*, 12: 167-77.
- Weigel, S., W. Heindel, J. Heidrich, H. W. Hense, and O. Heidinger. 2017. 'Digital mammography screening: sensitivity of the programme dependent on breast density', *Eur Radiol*, 27: 2744-51.
- Whitehead Institute for Biomedical Research. 2018. 'TargetScanHuman', Accessed Oktober 2021. [https://www.targetscan.org/vert\\_72/](https://www.targetscan.org/vert_72/).
- Wilhelm, I., C. Fazakas, K. Molnar, A. G. Vegh, J. Hasko, and I. A. Krizbai. 2018. 'Foe or friend? Janus-faces of the neurovascular unit in the formation of brain metastases', *J Cereb Blood Flow Metab*, 38: 563-87.
- Wilson, D. B., and M. P. Wilson. 1992. 'Identification and subcellular localization of human rab5b, a new member of the ras-related superfamily of GTPases', *J Clin Invest*, 89: 996-1005.
- Wortzel, I., S. Dror, C. M. Kenific, and D. Lyden. 2019. 'Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance', *Dev Cell*, 49: 347-60.
- Wu, L., and X. Qu. 2015. 'Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges', *Chem Soc Rev*, 44: 2963-97.
- Xing, F., S. Sharma, Y. Liu, Y. Y. Mo, K. Wu, Y. Y. Zhang, R. Pochampally, L. A. Martinez, H. W. Lo, and K. Watabe. 2015. 'miR-509 suppresses brain metastasis of breast cancer cells by modulating RhoC and TNF-alpha', *Oncogene*, 34: 4890-900.
- Yeo, S. K., and J. L. Guan. 2017. 'Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor?', *Trends Cancer*, 3: 753-60.

## 7 Literaturverzeichnis

- Yu, T., J. Li, M. Yan, L. Liu, H. Lin, F. Zhao, L. Sun, Y. Zhang, Y. Cui, F. Zhang, J. Li, X. He, and M. Yao. 2015. 'MicroRNA-193a-3p and -5p suppress the metastasis of human non-small-cell lung cancer by downregulating the ERBB4/PIK3R3/mTOR/S6K2 signaling pathway', *Oncogene*, 34: 413-23.
- Yu, Y., J. Zhang, Y. Jin, Y. Yang, J. Shi, F. Chen, S. Han, P. Chu, J. Lu, H. Wang, Y. Guo, and X. Ni. 2018. 'MiR-20a-5p suppresses tumor proliferation by targeting autophagy-related gene 7 in neuroblastoma', *Cancer Cell Int*, 18: 5.
- Zeljko, M., N. Pecina-Slaus, T. N. Martic, V. Kusec, V. Beros, and D. Tomas. 2011. 'Molecular alterations of E-cadherin and beta-catenin in brain metastases', *Front Biosci (Elite Ed)*, 3: 616-24.
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut. 2021a. "Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten." In.
- . 2021b. "Mortalitätsdaten bereitgestellt vom Statistischen Bundesamt." In.
- Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb, and T. A. Anderson. 2007. 'microRNAs as oncogenes and tumor suppressors', *Dev Biol*, 302: 1-12.
- Zhang, Y., Y. Liu, H. Liu, and W. H. Tang. 2019. 'Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential', *Cell Biosci*, 9: 19.
- Zheng, X., K. Xu, L. Zhu, M. Mao, F. Zhang, and L. Cui. 2020. 'MiR-486-5p Act as a Biomarker in Endometrial Carcinoma: Promotes Cell Proliferation, Migration, Invasion by Targeting MARK1', *Onco Targets Ther*, 13: 4843-53.

## I Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
ACR	American College of Radiology
ADAM17	A disintegrin and metalloprotease 17
AKT	Proteinkinase B
ALDOA	Aldolase A
ALND	Axilläre Lymphknoten-Dissektion
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ApK	Apoptosekörper
ATG7	Autophagy-related protein 7
ATP	Adenosintriphosphat
B7-H3	B7 Homolog 3
BC ohne M	Breast Cancer ohne Metastasierung
BET	Brusterhaltende Therapie
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BRCA1	Breast Cancer 1
BRMS1	Breast cancer metastasis suppressor 1
BTB	Blood-Tumor-Barrier
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDK4/6	Cyclin-abhängige Kinase 4/6
cDNA	complementary DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
d.h.	das heißt
DCIS	Duktales Carcinoma in Situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dock	Dedicator of cytokinesis 1
DTC	Disseminierte Tumorzelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Early Endosomes
ER	Östrogenrezeptor
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
et al.	et alii

EV	Extrazelluläre Vesikel
EZ	Endothelzelle
FANCD	Fanconi anemia group D protein
FANCF	Fanconi anemia group F protein
FASLG	Fas Ligand
FCS	Fetal Calf (Bovine) Serum
FKBP-12	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase FKBP12
g	Erdbeschleunigung
GHRL	Ghrelin And Obestatin Prepropeptide
GNG13	G Protein Subunit Gamma 13
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIF1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HM	Hirnmetastase
hsa	Homo sapiens
ILV	Intraluminale Vesikel
LCIS	Lobuläres Carcinoma in Situ
LK	Lymphknoten
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARK1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1
MDM4	Double Minute 4 Protein
miRNA	microRNA
Mkk4	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 4
ml	Milliliter
mRNA	messengerRNA
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MV	Mikrovesikel
MVK	Multivesikuläre Körper
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NLK	Nemo Like Kinase
nm	Nanometer
NSBP1	nucleosome binding protein 1

OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
p27Kip1	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor 1B
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Phox2a	Paired Like Homeobox 2A
PIK3	Phosphoinositid-3-Kinase
Pin1	Peptidyl-Prolyl-Isomerase 1
PR	Progesteronrezeptor
PS	Penicillin-Streptomycin
qPCR	quantitative PCR
Rb1	Retinoblastom-Protein
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SLND	Sentinel-Lymphknoten-Dissektion
Snail	Zinkfingerprotein SNAI1
STRADB	STE20 Related Adaptor Beta
TFRC	Transferrinrezeptorprotein 1
TJ	Tight-Junctions
TNBC	Triple-negative Breast Cancer
TZ	Tumorzelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## II      **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1:      Aufbau der BHS im gesunden Hirn und im Tumorchirn (Ljubimova et al. 2017) Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation ist keine Genehmigung erforderlich, da es sich um einen Open-Access-Artikel handelt.
- Abbildung 2:      Biogenese der Exosome (Guenat et al. 2017) Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation ist keine Genehmigung erforderlich, da es sich um einen Open-Access-Artikel handelt.
- Abbildung 3:      Kommunikation der Exosome und Mikrovesikel mit der Zielzelle (MVE) (Guenat et al. 2017) Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation ist keine Genehmigung erforderlich, da es sich um einen Open-Access-Artikel handelt.
- Abbildung 4:      Schema der 96-well-Platte beim Proliferationsassay
- Abbildung 5:      Schema der 96-well Platte beim MTT-Assay
- Abbildung 6:      Schema der 96-well Platte beim Adhäsionsassay
- Abbildung 7:      miRNA-Expression im Verhältnis zur Kontrolle, A-F:  
Überexprimierte miRNA Mittelwert + Standardabweichung (A):  
hsa-miR-122-5p (B): hsa-miR-193a-5p (C): hsa-miR-296-5p  
(D): hsa-miR-486-5p (E): hsa-miR-490-3p (F): hsa-miR-576-3p  
BC ohne M: Breast Cancer ohne Metastasierung \* =  $p \leq 0.0332$ ; \*\* =  $p \leq 0.0021$ , one-way ANOVA-Test
- Abbildung 8:      miRNA-Expression im Verhältnis zur Kontrolle, A-F:  
Herunterregulierte miRNA (A): hsa-miR-17-5p (B): hsa-miR-130a-3p (C): hsa-miR-148b-3p (D): hsa-miR-20a-5p (E): hsa-miR-24-3p (F): hsa-miR-326 (G): hsa-miR-342-3p (H): hsa-miR-484 BC ohne M: Breast Cancer ohne Metastasierung \* =  $p \leq 0.0332$ ; \*\* =  $p \leq 0.0021$ , \*\*\* =  $p \leq 0.0002$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , one-way ANOVA-Test
- Abbildung 9:      miRNA-Expression im Verhältnis zur Kontrolle, A-J:  
Überexprimierte miRNA Mittelwert + Standardabweichung (A):  
hsa-miR-125-3p (B): hsa-miR-143-3p (C): hsa-miR-193-5p (D):  
hsa-miR-197-3p (E): hsa-miR-296-5p (F): hsa-miR-32-5p (G):  
hsa-miR-410-3p (H): hsa-miR-486-5p (I): hsa-miR-490-3p (J):  
hsa-miR-548d-5p \* =  $p \leq 0.0332$ ; \*\* =  $p \leq 0.0021$ , \*\*\* =  $p \leq 0.0002$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , one-way ANOVA-Test
- Abbildung 10:      miRNA-Expression im Verhältnis zur Kontrolle, A-J:  
Herunterregulierte miRNA Mittelwert + Standardabweichung  
(A): hsa-miR-130a-3p (B): hsa-miR-148b-3p (C): hsa-miR-150-5p (D): hsa-miR-199a-3p (E): hsa-miR-223-3p (F): hsa-miR-24-3p (G): hsa-miR-26-5p (H): hsa-miR-326 (I): hsa-miR-342-3p (J): hsa-miR-885-5p (K): hsa-miR-92-3p \* =  $p \leq 0.0332$ ; \*\* =  $p \leq 0.0021$ , \*\*\* =  $p \leq 0.0002$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , one-way ANOVA-Test

0.0021, \*\*\* =  $p \leq 0.0002$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , one-way ANOVA-Test

- Abbildung 11 B: A und B Pathways in cancer, KEGG pathway Datenbank (Kanehisa and Goto 2000) rot: direkter Zusammenhang, blau: indirekter Zusammenhang mit Krebsentstehung Die Genehmigung für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation liegt vor.
- Abbildung 12: Proliferationsassay mit 2.000 und 4.000 cerebEND-Zellen pro Vertiefung Mittelwert + Standardabweichung, \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , unpaired t-Test
- Abbildung 13: MTT-Assay in Abhängigkeit von der Zellzahl
- Abbildung 14: MTT-Assay einer Verdünnungsreihe – Verhältnis der cerebEND-210-Zellen zur Kontrolle Mittelwert + Standardabweichung, \* =  $p \leq 0.0332$ , one-way ANOVA-Test
- Abbildung 15: Vorversuch des Adhäsionsassays mit 15.000 und 25.000 4T1-Zellen pro Vertiefung Mittelwert + Standardabweichung, \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , unpaired t-Test
- Abbildung 16: Adhäsionsassay mit 15.000 4T1-Zellen pro Vertiefung Mittelwert + Standardabweichung, \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , unpaired t-Test

### III Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Einteilung der Subtypen anhand klinisch-histologischer Faktoren
- Tabelle 2: Einteilung der Patientinnen nach der Metastasierung
- Tabelle 3: Einteilung der Patientinnen nach Rezeptorstatus
- Tabelle 4: ER Östrogen Rezeptor, HER2 human epidermal growth factor 2, KO Kontrolle von gesunden Probandinnen, OM Ossäre Metastasen, PK Primärer Krebs, PR Progesteron Rezeptor, VM viszerale Metastasen, ZM Zerebrale Metastasen
- Tabelle 5: P-Value
- Tabelle 6: miRNAs und zugehörige Targets, Signalwege und assoziierte Krankheiten kursiv: indirekter Zusammenhang, **fett:** direkter Zusammenhang
- Tabelle 7: Vergleich der dysregulierten miRNAs bei ER/ PR+ Rezeptorstatus mit Dysregulationen bei Fernmetastasen + = erhöhte Expression, - = erniedrigte Expression
- Tabelle 8: Expressions-Mittelwerte, Einteilung nach Metastasen
- Tabelle 9: Expressions-Mittelwerte, Einteilung nach Rezeptoren

## **IV Eigene Veröffentlichungen**

Curtaz CJ, **Reifschläger L**, Strähle L, Feldheim J, Feldheim JJ, Schmitt C, Kiesel M, Herbert S-L, Wöckel A, Meybohm P, Burek M (2022) Analysis of microRNAs in exosomes of breast cancer patients in search of molecular prognostic factors in brain metastases. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(7), 3683; <https://doi.org/10.3390/ijms23073683>



## Anhang

Tabelle 8: Expressions-Mittelwerte, Einteilung nach Metastasen

	Kontrolle	ZNS	BC ohne M	Viszeral	Ossär
hsa-miR-148a-3p	1,000	1,057	0,889	1,016	1,039
hsa-miR-92b-3p	1,000	0,926	0,982	0,805	0,913
hsa-miR-148b-3p	1,000	0,558	0,835	0,651	0,712
hsa-miR-296-5p	1,000	3,307	1,447	0,967	1,868
hsa-miR-130a-3p	1,000	0,371	0,726	0,598	0,640
hsa-miR-122-5p	1,000	5,029	1,038	2,231	1,602
hsa-miR-181a-5p	1,000	1,222	1,172	0,542	0,633
hsa-miR-16-5p	1,000	0,905	0,870	0,864	1,091
hsa-miR-125a-3p	1,000	2,595	2,137	4,399	2,908
hsa-miR-132-3p	1,000	2,716	13,113	1,347	0,836
hsa-miR-143-3p	1,000	1,235	1,395	1,559	1,553
hsa-miR-150-5p	1,000	0,810	0,962	0,497	0,566
hsa-miR-185-5p	1,000	0,937	0,911	0,878	0,936
hsa-miR-193a-5p	1,000	3,531	1,731	3,547	2,681
hsa-miR-197-3p	1,000	3,802	1,285	1,839	2,094
hsa-miR-199a-3p	1,000	0,678	0,850	0,691	0,686
hsa-miR-210-3p	1,000	1,054	0,847	0,855	1,300
hsa-miR-214-3p	1,000	2,013	1,465	1,777	1,112
hsa-miR-21-5p	1,000	0,973	0,896	0,858	0,789
hsa-miR-222-3p	1,000	0,888	0,898	0,721	0,766

hsa-miR-223-3p	1,000	0,919	0,921	0,680	0,862
hsa-miR-24-3p	1,000	0,811	0,796	0,679	0,843
hsa-miR-26a-5p	1,000	0,895	0,986	0,554	0,663
hsa-miR-32-5p	1,000	1,219	1,156	1,967	0,938
hsa-miR-326	1,000	0,629	0,942	0,513	0,546
hsa-miR-340-5p	1,000	1,245	1,259	1,022	0,745
hsa-miR-342-3p	1,000	0,671	0,756	0,513	0,596
hsa-miR-410-3p	1,000	4,638	0,778	5,925	0,293
hsa-miR-425-5p	1,000	0,810	0,927	0,817	0,834
hsa-miR-485-3p	1,000	1,192	1,008	0,357	0,628
hsa-miR-486-5p	1,000	1,702	1,663	1,865	1,929
hsa-miR-490-3p	1,000	3,722	1,557	1,203	0,597
hsa-miR-491-5p	1,000	1,999	1,039	0,459	0,641
hsa-miR-576-3p	1,000	14,618	2,177	2,982	1,387
hsa-miR-598-3p	1,000	1,344	1,301	0,869	0,988
hsa-miR-652-3p	1,000	0,830	1,029	0,817	0,820
hsa-miR-885-5p	1,000	2,434	0,299	0,835	0,534
hsa-miR-484	1,000	0,863	1,049	0,700	0,785
hsa-miR-27a-3p	1,000	0,904	1,068	0,800	0,912
hsa-miR-483-5p	1,000	1,513	1,161	1,064	0,437
hsa-miR-17-5p	1,000	0,831	1,039	0,546	0,852
hsa-miR-23a-3p	1,000	1,864	1,172	0,983	1,457
hsa-miR-181b-5p	1,000	1,598	1,176	0,963	1,144

hsa-miR-20a-5p	1,000	0,860	1,082	0,620	0,907
hsa-miR-29a-3p	1,000	2,842	2,662	0,818	0,899
hsa-miR-320a					
hsa-miR-625-5p	1,000	1,102	1,050	0,600	1,010
hsa-miR-548d-5p	0,980	1,341	2,118	1,191	0,999

Tabelle 9: Expressions-Mittelwerte, Einteilung nach Rezeptoren

	Kontrolle	HER2+	TNBC	Triple Positive	ER/HER2+ PR/HER2+	ER/PR+
hsa-miR-148a-3p	1,000	0,985	0,836	1,167	0,846	0,977
hsa-miR-92b-3p	1,000	1,358	0,678	0,921	0,793	0,999
hsa-miR-148b-3p	1,000	0,649	0,689	0,730	0,627	0,734
hsa-miR-296-5p	1,000	1,957	2,834	2,296	1,215	1,378
hsa-miR-130a-3p	1,000	0,593	0,473	0,535	0,382	0,651
hsa-miR-122-5p	1,000	1,258	1,648	1,272	2,262	3,214
hsa-miR-181a-5p	1,000	0,538	0,746	0,846	0,463	1,116
hsa-miR-16-5p	1,000	1,091	0,622	0,919	0,826	0,937
hsa-miR-125a-3p	1,000	1,824	0,670	2,337	2,881	5,336
hsa-miR-132-3p	1,000	3,263	2,245	0,820	0,906	1,078
hsa-miR-143-3p	1,000	1,531	0,937	1,912	0,816	1,491
hsa-miR-150-5p	1,000	1,529	0,419	0,723	0,252	0,791
hsa-miR-185-5p	1,000	0,889	0,727	0,746	0,873	0,993
hsa-miR-193a-5p	1,000	2,553	2,244	2,462	3,971	2,565
hsa-miR-197-3p	1,000	10,807	1,279	2,588	0,998	1,540

hsa-miR-199a-3p	1,000	0,661	0,443	0,676	0,592	0,847
hsa-miR-210-3p	1,000	0,683	1,189	0,912	1,051	0,830
hsa-miR-214-3p	1,000	2,425	1,510	2,126	1,292	1,364
hsa-miR-21-5p	1,000	0,639	0,657	0,834	0,718	1,035
hsa-miR-222-3p	1,000	0,820	0,623	0,795	0,769	0,919
hsa-miR-223-3p	1,000	1,128	0,682	0,811	0,408	0,786
hsa-miR-24-3p	1,000	0,644	0,539	0,787	0,466	0,823
hsa-miR-26a-5p	1,000	0,683	0,484	0,751	0,200	0,949
hsa-miR-32-5p	1,000	1,025	3,514	1,084	0,716	0,725
hsa-miR-326	1,000	0,502	0,435	0,736	0,538	0,673
hsa-miR-340-5p	1,000	1,790	1,554	1,004	0,458	0,963
hsa-miR-342-3p	1,000	0,585	0,435	0,739	0,263	0,642
hsa-miR-410-3p	1,000	36,784	1,257	2,832	0,461	0,652
hsa-miR-425-5p	1,000	0,927	0,673	0,848	0,694	0,906
hsa-miR-485-3p	1,000	0,185	0,616	0,872	0,698	0,736
hsa-miR-486-5p	1,000	2,000	1,498	1,670	1,200	1,967
hsa-miR-490-3p	1,000	6,877	1,363	1,219	1,208	1,781
hsa-miR-491-5p	1,000	0,672	2,063	0,833	0,299	0,791
hsa-miR-576-3p	1,000	4,046	3,367	2,709	1,596	4,273
hsa-miR-598-3p	1,000	0,644	0,873	1,004	0,470	1,242
hsa-miR-652-3p	1,000	0,565	0,578	0,806	0,575	1,113
hsa-miR-885-5p	1,000	0,670	0,338	0,228	0,497	0,892
hsa-miR-484	1,000	0,902	0,708	0,871	0,626	0,920

hsa-miR-27a-3p	1,000	0,837	0,953	1,163	0,653	0,823
hsa-miR-483-5p	1,000	2,135	0,789	0,559	1,092	1,073
hsa-miR-17-5p	1,000	1,043	0,612	0,814	0,634	0,814
hsa-miR-23a-3p	1,000	1,302	1,026	1,257	0,579	1,589
hsa-miR-181b-5p	1,000	1,280	1,608	1,172	0,722	1,231
hsa-miR-20a-5p	1,000	1,207	0,737	0,896	0,620	0,808
hsa-miR-29a-3p	1,000	1,434	2,832	0,751	0,677	0,891
hsa-miR-320a						
hsa-miR-625-5p	1,000	0,837	0,737	1,102	0,576	0,966
hsa-miR-548d-5p	0,980	1,315	2,161	1,149	0,639	0,940