

**Der Einfluss des E2F1/miR-888/APLF-Signalweges auf die c-NHEJ-
vermittelte DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und Tumorprogression
im humanen Harnblasenkarzinom**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Christin Richter

geboren am 15.02.1990 in Altdöbern

Dresden, Dezember 2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004338



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen
4.0 International Lizenz.

Gutachter:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat Brigitte M. Pützer
Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung
Biomedizinisches Forschungszentrum
Schillingallee 69
D-18057 Rostock

PD Dr. rer. nat. habil. Nadja Engel
Department of Oral, Maxillofacial and Plastic Surgery
Schillingallee 35
&
Oscar Langendorff Institute of Physiology
Getrudenstrasse 9
Rostock University Medical Center
D-18057 Rostock

Datum der Einreichung: Dezember 2022

Datum der Verteidigung: April 2023

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms	1
1.1.1 Inzidenz des Harnblasenkarzinoms	1
1.1.2 Pathogenese und klinische Vielfalt des humanen Harnblasenkarzinoms	2
1.2 Genomische Instabilität, DNA-Reparatur und Auswirkungen auf die Krebs- Progression.....	3
1.2.1 DNA-Doppelstrang-Reparatur.....	3
1.2.1.1 Homologe rekombinante Reparaturmechanismen.....	4
1.2.1.2 Nicht-homologes End-Joining.....	4
1.2.2 DNA-Reparatur und Blasenkrebsprogression	7
1.3 Der Transkriptionsfaktor E2F1	7
1.3.1 Die Rolle des E2F1-miR-Netzwerks bei der Tumorprogression	8
1.3.1.1 MiRs in humanen Malignomen und speziell im humanen BC	9
1.3.1.2 Die Interaktion von E2F1 und miRs.....	10
1.3.2 Die Rolle von E2F1 bei der DNA-Reparatur und der genomischen Stabilität	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2. Material & Methoden.....	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	15
2.1.3 Kits	15
2.1.4 Plasmide.....	16
2.1.5 Adenovirale Vektoren	17
2.1.6 Bakterienstämme.....	18
2.1.7 Zelllinien	18
2.1.8 Antikörper	19
2.1.9 Oligonukleotide.....	20
2.1.10 Online-Datenbanken und -Softwares.....	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Nukleinsäure-Arbeitstechniken	24
2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA.....	24
2.2.1.2 RNA- und miR-Extraktion	24
2.2.1.3 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration und -Reinheit.....	24
2.2.1.4 Bisulfit-Konvertierung	24
2.2.1.5 Reverse Transkription	25
2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion	25

2.2.1.7	Quantitative Real-Time PCR	26
2.2.1.8	TaqMan® MicroRNA Assay.....	26
2.2.1.9	Copy Number Variation Assay	26
2.2.1.10	Enzymatische Restriktion von DNA	27
2.2.1.11	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.2.1.12	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	28
2.2.1.13	Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol-Aufreinigung.....	28
2.2.1.14	Ligation	28
2.2.1.15	Sequenzspezifische Mutagenese	29
2.2.1.16	Hitzeschock-Transformation	29
2.2.1.17	Plasmid-Minipräparation.....	29
2.2.1.18	Plasmid-Maxipräparation.....	30
2.2.2	Protein-Arbeitstechniken.....	30
2.2.2.1	Protein-Extraktion.....	30
2.2.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	30
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
2.2.2.4	Western-Blot und Immundetektion	31
2.2.2.5	Chromatinimmunpräzipitation	32
2.2.3	Zellbiologische Arbeitstechniken	33
2.2.3.1	Kultivierung von Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom.....	33
2.2.3.2	Zellzahlbestimmung	33
2.2.3.3	Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA.....	34
2.2.3.4	Adenovirale Transduktion von Zellen	34
2.2.3.5	Herstellung stabiler Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion	35
2.2.3.6	Einzelklonselektion.....	35
2.2.4	Zellfunktionsanalysen	35
2.2.4.1	Luziferase-Assay.....	35
2.2.4.2	Proliferations- / XTT-Assay.....	36
2.2.4.3	Invasions- / Boyden-Chamber-Assay	37
2.2.4.4	Migrations- / Scratch-Assay.....	37
2.2.5	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur-Assay	38
2.2.5.1	Pulsfeldgelelektrophorese	38
2.2.5.2	Plasmid-basierter NHEJ-Assay	39
2.2.6	Bioinformatische und statistische Analysen	40
3.	Ergebnisse	42
3.1	E2F1 ist ein transkriptioneller Regulator des kanonischen nicht-homologen End-Joinings	42
3.1.1	Die Expression des Transkriptionsfaktors E2F1 und der Faktoren des kanonischen NHEJ korrelieren im humanen Blasenkarzinom.....	42
3.1.2	E2F1 ist ein direkter Transaktivator der c-NHEJ-Faktoren aber gleichzeitig ein indirekter negativer Regulator von APLF.....	45

3.2	Eine E2F1-induzierte Transaktivierung des APLF-Inhibitors hsa-miR-888-5p wird durch die Hypomethylierung des MIR888-Promotors ermöglicht.....	50
3.2.1	Hsa-miR-888-5p ist ein negativer Regulator von APLF im humanen Blasenkarzinom	50
3.2.2	E2F1 hemmt APLF über die Transaktivierung von hsa-miR-888-5p	54
3.2.3	Die Aktivierung der Gewebe-spezifischen hsa-miR-888-5p wird durch Hypomethylierung des Promotors ermöglicht.....	56
3.2.4	Das gesamte miR-888-Cluster ist im humanen Blasenkarzinom aktiv.....	58
3.3	Auswirkungen des E2F1/miR-888/APLF-Signalwegs auf die DSB-Reparatur, BC-Progression und Überlebensraten von BC-Patienten.....	62
3.3.1	Hsa-miR-888 und APLF beeinflussen die DSB-Reparatur im humanen Blasenkarzinom	62
3.3.2	Hsa-miR-888 und APLF beeinflussen die BC-Progression	67
3.3.3	APLF beeinflusst die Überlebensprognosen von Blasenkrebspatienten.....	69
4.	Diskussion	71
4.1	E2F1 als Masterregulator der c-NHEJ-vermittelten DSB-Reparatur	72
4.2	Tumorsuppressor oder Onkogen?: Die duale Rolle von APLF	74
4.3	OncomiR hsa-miR-888: neues Werkzeug für die Diagnostik und Therapie des humanen Harnblasenkarzinoms	76
5.	Zusammenfassung	81
6.	Literaturverzeichnis	VI
	Anhang	XX
	Doktorandinnen/Doktoranden-Erklärung	XXXI
	Lebenslauf	XXXIII
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	XXXIV

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5'-3'-Resektion	5'- zu -3'DNA-Endresektion
alt-EJ	alternatives End-Joining
APLF	Aprataxin und PNK-like Faktor
BC	Harnblasenkarzinom/ Blasenkarzinom/ Blasenkrebs
BIR	Break-induced Replication
CDH1	E-Cadherin
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
c-NHEJ	kanonisches nicht-homologes End-Joining
DCLRE1C	Artemis
D _{eq}	äquivalente Strahlendosis
dHJ	Double Holliday Junction
D-Loop	Displacement-Loop
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
FACS	Durchflusszytometrie
FDR	Anteil der freigesetzten DNA
HR	Homologe Rekombination
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
LIG4	DNA-Ligase IV
MIBC	muskelinvasives Blasenkarzinom
miRISC	miRNA-induced silencing complex
miRs	microRNAs
MMEJ	Microhomology-Mediated End-Joining
NHEJ	nicht-homologes End-Joining
NHEJ1	XLF/Cernunnos
NMIBC	nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pRb	Retinoblastom-Protein
PRKDC	katalytische Untereinheiten der DNA-abhängigen Proteinkinase, DNA-PKcs
SDSA	Synthesis-Dependent Strand Annealing
SSA	Single-Strand Annealing
TNBC	Triple-Negative Brustkrebszelllinie
TopBP1	Topoisomerase-II-Bindungsprotein
XRCC5	Ku80
XRCC6	Ku70

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Absolute Fallzahlen (2018) und altersstandardisierte Inzidenz- und Mortalitätsraten nach Geschlecht in Deutschland 1999 – 2018 je 100.000 (Welt-Standard) für das Harnblasenkarzinom (ICD-10 C67).....	1
Abbildung 2: Kanonisches nicht-homologes End-Joining.....	6
Abbildung 3: NHEJ-Reporterkassette für die Analyse der DSB-Reparatur.....	39
Abbildung 4: Korrelation zwischen E2F1 und kanonischen NHEJ-Faktoren im humanen Blasenkarzinom.....	44
Abbildung 5: E2F1 reguliert essentielle Faktoren des c-NHEJ.....	45
Abbildung 6: Cscan-Hitmap überrepräsentierter Transkriptionsfaktoren der c-NHEJ-Faktoren.....	47
Abbildung 7: E2F1 ist ein direkter Transaktivator der essentiellen c-NHEJ-Faktoren aber gleichzeitig ein indirekter negativer Regulator von APLF.....	49
Abbildung 8: Identifikation von hsa-miR-888-5p als potentieller APLF-Inhibitor.....	52
Abbildung 9: Hsa-miR-888-5p ist ein direkter Inhibitor von c-NHEJ-Faktor APLF...	54
Abbildung 10: E2F1 ist ein direkter Transaktivator der hsa-miR-888-5p.....	56
Abbildung 11: Methylierungsgrad der CpG-Island im <i>MIR888</i> -Promotor reguliert hsa-miR-888-5p-Expression.....	58
Abbildung 12: Expressions- und Genlocus-Analyse des gesamten miR-888-Clusters.....	61
Abbildung 13: Hsa-miR-888-5p und APLF beeinflussen die DSB-Reparatur humaner invasiver BC-Zellen.....	64
Abbildung 14: Hsa-miR-888-5p und APLF beeinflussen die NHEJ-vermittelte DNA-Reparatureffizienz in humane BC-Zellen.....	66
Abbildung 15: Hsa-miR-888-5p und APLF beeinflussen die BC-Progression.....	68
Abbildung 16: APLF beeinflusst die Überlebensprognose von Blasenkrebspatienten.....	70
Abbildung 17: Mechanistisches Modell des E2F1-Einflusses auf die c-NHEJ-vermittelte DSB-Reparatur und BC-Progression.....	73

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Funktion der miRs des miR-888-Clusters in verschiedenen Krebsarten und ihre validierten Zielgene.....	59
--	----

1. EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms

Bösartige Neubildungen der Harnblase werden als Harnblasenkarzinom oder Blasenkrebs (BC) bezeichnet. Sie gehören zu den malignen, epithelialen Tumoren, da sie meistens von der Schleimhaut der ableitenden Harnwege ausgehen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

1.1.1 Inzidenz des Harnblasenkarzinoms

In Deutschland zählt das Harnblasenkarzinom zu den zehn häufigsten Tumorentitäten. Dabei sind etwa 5,1% der Krebsneuerkrankungen bei Männern (viert häufigste Krebsart), aber nur etwa 2% der Krebsneuerkrankungen bei Frauen (12. häufigste Krebsart) als Blasenkrebs diagnostiziert (Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut, 2019). Im Jahr 2018 erkrankten daran etwa 13.500 Männer und 4.770 Frauen, dabei stieg das Erkrankungsrisiko mit dem Alter deutlich an (Abbildung 1). Zudem sind die altersstandardisierten Inzidenz- und Mortalitätsraten bei Männern seit dem Jahr 2000 rückläufig. Bei Frauen sind beide Raten annähernd konstant geblieben, aber deutlich niedriger als bei den Männern (Abbildung 1).

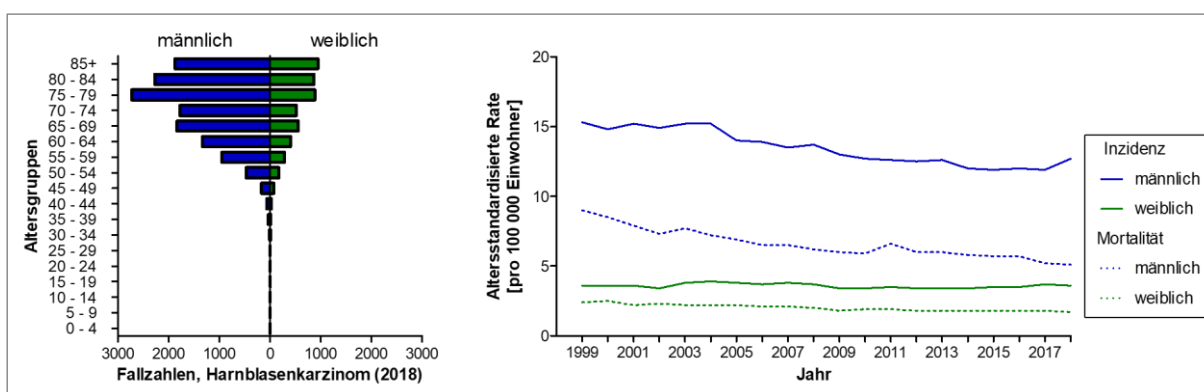


Abbildung 1: Absolute Fallzahlen (2018) und altersstandardisierte Inzidenz- und Mortalitätsraten nach Geschlecht in Deutschland 1999 – 2018 je 100.000 (Welt-Standard) für das Harnblasenkarzinom (ICD-10 C67). Basierend auf Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert Koch-Institut (Stand: 2022)

Weltweit zählt das Harnblasenkarzinom auch zu den zehn häufigsten Tumorerkrankungen und macht 3% der Krebsneuerkrankungen sowie 2,1% der gesamten Krebstodesfälle aus. Auch global gesehen treten Blasenkarzinome bei

Männern häufiger auf als bei Frauen, wobei die Inzidenz- und Sterblichkeitsraten bei Männern mit 9,5 bzw. 3,3 pro 100.000 Neuerkrankungen etwa viermal höher sind als bei Frauen. Damit ist Blasenkrebs die sechsthäufigste Krebsart und die neunthäufigste Krebstodesursache bei Männern weltweit (Sung et al., 2021).

1.1.2 Pathogenese und klinische Vielfalt des humanen Harnblasenkarzinoms

In Deutschland, Europa und Nordamerika handelt es sich bei mehr als 90% der BC-Fälle histologisch gesehen um Urothelkarzinome. Die verbleibenden Anteile der Harnblasenkarzinome sind entweder Plattenepithelkarzinome (1%), Adenokarzinome (1%), andere spezifische Karzinome/Malignome (1%) oder unbekannt (3%, Knowles und Hurst, 2015, Kraywinkel, Fiebig und Schulz, 2018). Für Urothelkarzinome gibt es derzeit zwei Klassifizierungssysteme: die TNM-Klassifikation (Ta-T4) und die WHO-Klassifikation (nicht-muskelinvasiv versus muskelinvasiv, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020). Bei der Diagnose handelt sich bei etwa 80% der Fälle um nicht-muskelinvasive Blasenkarzinome (NMIBC) im Stadium Ta-T1. Bei etwa 20% der diagnostizierten BCs geht man von muskel-invasiven Blasenkarzinomen (MIBC, T2-T4) aus. In Deutschland liegt zudem der Anteil von MIBC bei Frauen mit 32% deutlich höher als bei Männern mit 24% (Knowles und Hurst, 2015, Kraywinkel, Fiebig und Schulz, 2018). Bei etwa 80% der NMIBC-Patienten treten Rezidive auf, während es bei etwa 30% zu einer Progression zum MIBC kommt (Batista et al., 2020). MIBCs haben eine ungünstige Prognose, neigen zu Metastasierung und sind therapierefraktär (Knowles und Hurst, 2015).

NMIBC und MIBC unterscheiden sich stark auf molekularbiologischer Ebene. NMIBC gelten als genomisch stabil und weisen in der Regel einen diploiden Karyotyp mit wenigen strukturellen genomischen Rearrangements auf. Der Verlust von Chromosom 9 zählt als ein frühes Ereignis in der BC-Pathogenese, das sowohl bei NMIBC als auch bei MIBC-Subtypen auftritt (Knowles und Hurst, 2015, Batista et al., 2020). MIBCs gelten als genomisch instabil, da sie häufig aneuploid sind, mehrere Chromosomenumlagerungen aufweisen und eine beeinträchtigte DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur besitzen (Bentley et al., 2009, Knowles und Hurst, 2015).

1.2 Genomische Instabilität, DNA-Reparatur und Auswirkungen auf die Krebs-Progression

Genomische Stabilität ist eine wichtige Voraussetzung für die Vitalität und Funktionalität eukaryotischer Zellen. Jedoch kommt es jeden Tag in jeder humanen Zelle zu mehr als 55.000 DNA-Schädigungen, entweder in Form eines DNA-Einzelstrang- oder Doppelstrangbruches (DSB, Bernstein et al., 2013). Diese Schäden können durch endogene Prozesse wie DNA-Replikation, Transkription und Chromosomensegregation, aber auch durch äußere Einflüsse wie chemische Mutagene und Strahlung verursacht werden. Obwohl DSB essentiell sind für physiologische Prozesse wie die meiotische Rekombination während der Gametogenese (Massy, 2013), die V(D)J-Rekombination während der Bildung von Antikörpern und Lymphozytenrezeptoren (ein Schlüsselmechanismus des adaptiven Immunsystems, Alt et al., 2013) oder die neuronale Entwicklung (Alt und Schwer, 2018), gehören sie doch zu den gefährlichsten Arten von DNA-Schäden, da sie zu Insertionen, Deletionen oder chromosomalen Translokationen führen können. Solche weitreichenden Veränderungen des Genoms tragen zur Krebsentstehung und -progression bei (Hanahan und Weinberg, 2011, Gao et al., 2016). Eine effiziente Reparatur von DSB mit minimalen bzw. gar keinen Veränderungen der DNA-Bruchstelle ist somit für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und der Krankheitsvorbeugung unerlässlich.

1.2.1 DNA-Doppelstrang-Reparatur

Die DSB-Reparaturmechanismen lassen sich weitestgehend unterteilen in solche, die eine umfangreiche Homologie von einem Schwesterchromosom oder einer homologen Sequenz nutzen, oder die wenig bis gar keine Sequenzhomologien nutzen. Die zwei bekanntesten hierfür sind die homologe Rekombination (HR) und das sogenannte kanonische nicht-homologe End-Joining (c-NHEJ). Während HR vorwiegend in der S-Phase des Zellzyklus der vorrangige DSB-Reparaturmechanismus ist, da in dieser Phase unter anderem Schwester-Chromatide als Template zur Verfügung stehen, ist c-NHEJ während des gesamten Zellzyklus aktiv (Mao et al., 2008).

1.2.1.1 Homologe rekombinante Reparaturmechanismen

HR benötigt umfangreiche (>100 bp) DNA-Sequenzhomologien und DNA-Einzelstränge zur Stranginvasion (Pannunzio, Watanabe und Lieber, 2018), daher ist der erste Schritt der rekombinanten Reparaturmechanismen die Einleitung der 5'- zu -3'-Resektion der DSB-Enden (5'-3'-Resektion) durch den MRN-Komplex. Der dadurch entstandene DNA-Einzelstrang wird durch das Replikationsprotein A (RPA) zur Stabilisierung, zum Schutz vor Degradation und zur Verhinderung der Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen gebunden. RPA wird durch RAD51 ersetzt, sodass es zur Ausbildung des RAD51-Nukleoproteinfilaments kommt, welches eine Homologiesuche durchführt. Ist das homologe Template gefunden, erfolgt die sogenannte Stranginvasion. Hierfür dringt das RAD51-Nukleoproteinfilament der beschädigten DNA in das unbeschädigte homologe DNA-Molekül ein, wodurch es zur Ausbildung eines *Displacement-Loops* (D-Loop) kommt. Für die anschließend erfolgende Reparatur gibt es vier verschiedene Möglichkeiten: *Break-Induced Replication* (BIR), *Double Holliday Junction* (dHJ), *Synthesis-Dependent Strand Annealing* (SDSA) oder *Single-Strand Annealing* (SSA).

BIR kommt in Abwesenheit eines zweiten DNA-Endes zum Einsatz. Hier wächst sich der D-Loop zu einer vollständig geformten Replikationsgabel aus und vervollständigt den DNA-Strang bis zum Chromosomenende. Beim dHJ-Mechanismus kommt es zur Bildung von Holliday-Junctions an beiden Enden des Doppelstrangbruchs. Das bedeutet, der neu synthetisierte DNA-Strang verbindet sich im D-Loop mit dem zweiten DSB-Ende, wodurch die namensgebende dHJ-Struktur entsteht. Bei der Auflösung dieser Struktur können im Gegensatz zu allen anderen homologen Reparaturmechanismen Crossover-Produkte entstehen. Beim SDSA kommt es direkt zur Auflösung des D-Loops nach der Replikation des 3'-Endes des eindringenden DNA-Strangs bevor dieser mit dem anderen DSB-Ende ligiert wird. SSA repariert DSB zwischen zwei sich wiederholenden Sequenzen, sogenannten *Tandem-Repeats*, dabei kommt es zur Überlappung der homologen DNA-Stränge an diesen Tandem-Repeats. Jedoch führt SSA immer zum Verlust der DNA-Sequenz zwischen den beiden Tandem-Repeats (Li und Heyer, 2008, Li et al., 2019a).

1.2.1.2 Nicht-homologes End-Joining

C-NHEJ ist der schnellste DSB-Reparaturmechanismus (Mao et al., 2008) und benötigt keine bzw. nur bis zu 4 bp Mikrohomologien sowie keine 5'-3'-Resektion, tatsächlich werden die DNA-Enden durch Anlagerung des Ku-Heterodimers sogar vor

dem Abbau geschützt (Pannunzio, Watanabe und Lieber, 2018). Diese Anlagerung des Ku-Heterodimers, das aus einer 70 kDa (Ku70, kodiert durch XRCC6) und einer 80 kDa (Ku80, kodiert durch XRCC5) großen Untereinheit besteht, sowie der katalytischen Untereinheiten der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs, kodiert durch PRKDC) an beide DSB-Enden ist sogleich auch der erste Schritt der c-NHEJ-vermittelten DNA-Reparatur. DNA-PKcs haben einerseits eine katalytische Funktion, infolge derer sie sich und andere c-NHEJ-Faktoren phosphorylieren und dadurch aktivieren können (Chiruvella, Liang und Wilson, 2013), andererseits fungieren sie als Scaffold für andere c-NHEJ-Proteine (Iliakis, Murmann und Soni, 2015). Zudem regulieren DNA-PKcs die Aktivierung der Nuklease Artemis (kodiert durch DCLRE1C), die vor allem wichtig für die V(D)J-Rekombination (Moshous et al., 2001) ist. Weiterhin wird Artemis für die Verarbeitung strahlungsinduzierter DSB benötigt, damit stabile ligierbare DNA-Enden zur Verfügung stehen (Chiruvella, Liang und Wilson, 2013). Die eigentliche Ligation erfolgt durch den DNA-Ligase IV (kodiert durch LIG4)-XRCC4-Komplex. Diese Reaktion wird durch XLF (kodiert durch NHEJ1) stimuliert, das mit XRCC4 Filamente bildet, die sich helikal um die DNA wickeln (Ropars et al., 2011). Der LIG4-XRCC4-Komplex wird außerdem durch den Aprataxin und PNK-like Faktor (APLF) mit dem Ku/DNA-PKcs-Komplex verbunden (Hammel et al., 2016), was den NHEJ-Reparatur-Komplex an den DSB-Enden stabilisiert und die XRCC4-LIG4-vermittelte DNA-Ligation beschleunigt (Grundy et al., 2013, Rulten et al., 2011). Der Ablauf des c-NHEJ und die beteiligten Proteine sind in Abbildung 2 dargestellt.

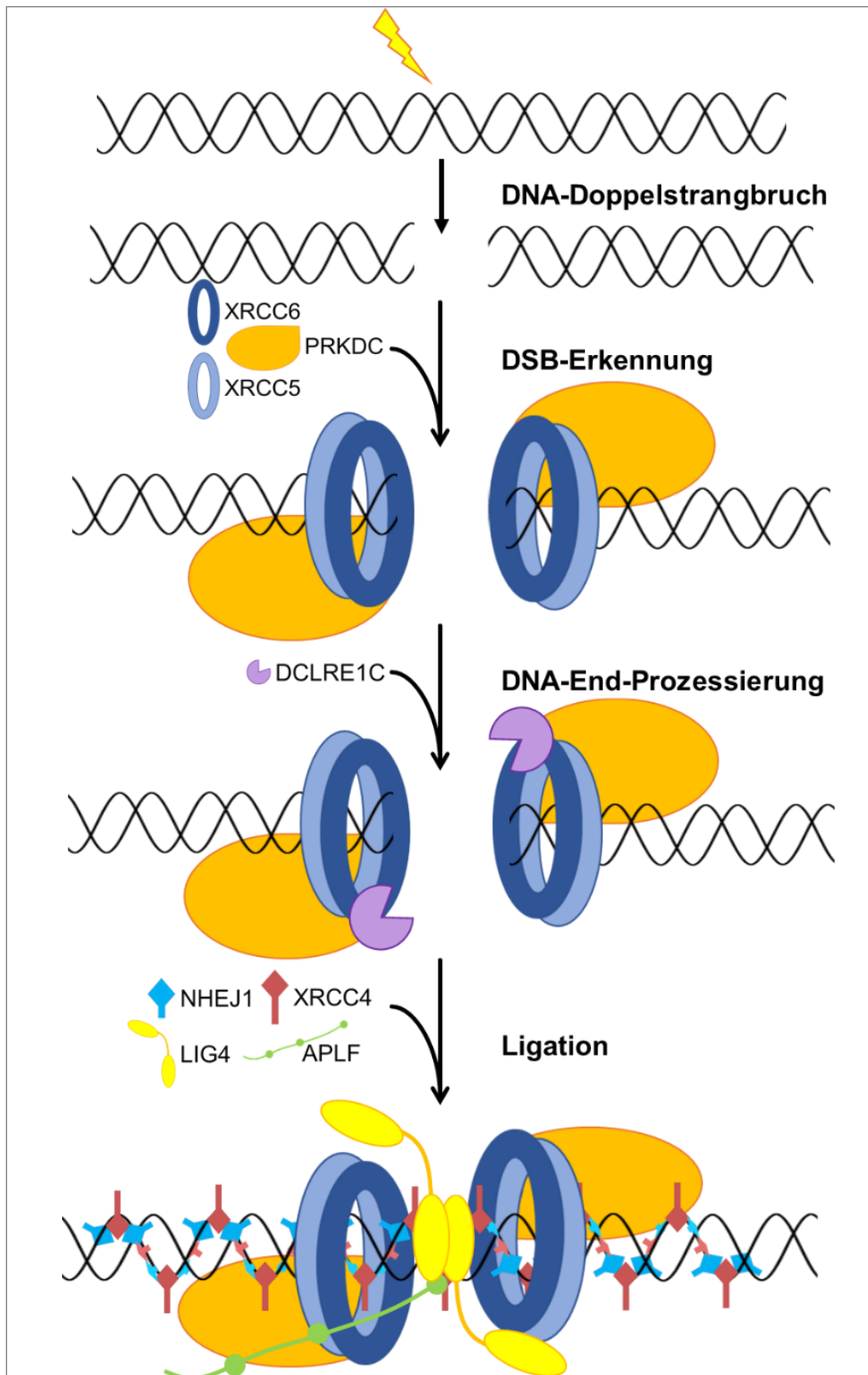


Abbildung 2: Kanonisches nicht-homologes End-Joining. DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) werden durch XRCC5/XRCC6 (Ku-Komplex) erkannt. Daraufhin bindet der XRCC5/XRCC6/PRKDC (Ku/DNA-PKcs)-Komplex an die DSB-Enden. Wenn nötig werden DSB-Enden durch PRKDC-reguliertes DCLRE1C (Artemis) prozessiert. Die Ligation der DSB-Enden erfolgt durch den LIG4 (DNA-Ligase IV)-XRCC4-Komplex, der durch NHEJ1 (XLF) stimuliert und durch APLF stabilisiert wird. Eigene Darstellung in Anlehnung an Iliakis, Murmann und Soni, 2015, Hammel et al., 2016, Pannunzio, Watanabe und Lieber, 2018, Frit et al., 2019.

Wenn es bei der c-NHEJ-vermittelten DSB-Reparatur Verzögerungen gibt, kann es zur Initiierung der 5'–3'-Resektion und damit zu einem Wechsel hin zu alternativen End-Joining (alt-EJ)- Reparaturmechanismen kommen (Pannunzio, Watanabe und Lieber, 2018, Shibata und Jeggo, 2020). Alt-EJ sind sowohl Ku als auch LIG4/XRCC4-unabhängig (Bétermier, Bertrand und Lopez, 2014, Rulten et al., 2011) und sind wie das *Microhomology-Mediated End-Joining* (MMEJ) auf homologe Sequenzen angewiesen. Sie erfordern, ähnlich wie das SSA, 5'–3'-Resektion, um Mikrohomologien (2-20 bp) für die Ligation freizulegen. MMEJ führt immer zu Deletionen und ist dadurch hochgradig mutagen (Rulten et al., 2011, McVey und Lee, 2008, Sfeir und Symington, 2015).

1.2.2 DNA-Reparatur und Blasenkrebsprogression

Für den Erhalt der genomischen Stabilität müssen sowohl HR als auch c-NHEJ korrekt funktionieren. Kommt es zu Beeinträchtigungen der DSB-Hauptreparaturmechanismen, werden alternative fehleranfällige Reparaturmechanismen aktiviert, welche zu Deletionen und chromosomalen Rearrangements führen können. Dadurch wird die genomischen Instabilität, die Krebsentstehung und -progression gefördert (Rodgers und McVey, 2016, McVey und Lee, 2008, Gao et al., 2016). So konnte gezeigt werden, dass primäre Epithelkarzinomzellen einen invasiven mesenchymalen Phänotyp erwerben, wenn sie durch chromosomale Rearrangements Chromosomen mit *Tight Junctions*-Gene verlieren (Gao et al., 2016).

Bentley et al. (2004) konnten zeigen, dass in muskelinvasiven BCs DSB nicht mittels c-NHEJ sondern durch MMEJ repariert wurden, wodurch Chromosomentranslokationen mit umfangreichen Mikrohomologien an den DNA-Bruchstellen entstanden. In einer weiteren Studie der Autoren (Bentley et al., 2009) wurde gezeigt, dass der Unterschied in der DSB-Reparatur zwischen NMIBC, die c-NHEJ fähig waren, und MIBC, die nicht c-NHEJ fähig waren, durch eine verminderte Ku-DNA-Bindungsaktivität zustande kam, die aber nicht auf Mutationen oder veränderte Expressionslevel von XRCC5 oder XRCC6 zurückzuführen war. Die genaue Ursache für den Wechsel von c-NHEJ zu alt-EJ in MIBC blieb damit weiterhin unbekannt.

1.3 Der Transkriptionsfaktor E2F1

Der Transkriptionsfaktor E2F1 gilt als ein Schlüsselprotein bei der Regulation des Zellzyklus und der Initiierung von Apoptose als Reaktion auf DNA-Schäden. Jedoch ist

er auch als Hauptmediator der Tumorprogression und Chemotherapieresistenz bekannt (Engelmann und Pützer, 2012, Pützer und Engelmann, 2013). E2F1 gehört zur Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren, die aus acht verschiedenen Mitgliedern (E2F1-E2F8) besteht und die alle in der Transkription, der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose involviert sind (DeGregori und Johnson, 2006). E2F-Proteine bestehen aus mehreren evolutionär konservierten Domänen, die bei den meisten Mitgliedern der Familie zu finden sind. Zu diesen Domänen gehören die DNA-Bindungs-, die Dimerisierungs-, die Transaktivierungs- und die Pocket-Protein-Bindungsdomäne. Aufgrund von strukturellen, funktionellen und molekularen Unterschieden werden die Mitglieder der E2F-Familie in drei Hauptgruppen unterteilt: Aktivatoren (E2F1 - E2F3a), kanonische Repressoren (E2F3b-E2F6) und atypische Repressoren (E2F7 und E2F8) der Gentranskription (Lammens et al., 2009).

E2F1 gehört zu den Transkriptionsaktivatoren, wobei die E2F1-Aktivität selbst durch das Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein (pRb) sowie die Pocketproteine p107 und p130 kontrolliert wird. Durch die Bindung von dephosphoryliertem Rb an E2F1 kommt es zur Maskierung der Transaktivierungsdomäne und zur Inhibierung der E2F1-Aktivität. Während der Zellzyklusprogression werden die Rb-Proteine durch Cyclin-abhängigen Kinasen phosphoryliert, wodurch die Bindung zu E2F1 gelöst und dessen Inaktivierung aufgehoben wird (Dyson, 1998).

Während der Krebsentstehung und -progression zeigt E2F1 eine ambivalente Funktion. So fungiert es zu Beginn der Karzinogenese als Tumorsuppressor durch Aktivierung von Apoptose-Signalwegen nach DNA-Schädigung, um die maligne Transformation der Zellen zu verhindern (Stanelle und Pützer, 2006). In späteren Krebsstadien kommt es jedoch zu einer Deregulierung der E2F1-Expression und damit zu einem Wechsel hin zu einer Tumoraggressivitäts-fördernden Funktion, welche die Initiierung der Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), die Tumorangiogenese und Extravasation sowie die Erhöhung der Motilität, Invasivität und Chemoresistenz von Tumorzellen beinhaltet (Engelmann und Pützer, 2010, Alla et al., 2012, Engelmann et al., 2013, Knoll et al., 2014, Meier et al., 2014, Wang et al., 2016, Jusino und Saavedra, 2019).

1.3.1 Die Rolle des E2F1-miR-Netzwerks bei der Tumorprogression

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass zwischen dem Transkriptionsfaktor E2F1 und verschiedenen microRNAs (miRs) eine regulatorische Verbindung besteht. MiRs werden durch E2F1 oder andere Transkriptionsfaktoren

aktiviert und hemmen dann entweder E2F1 direkt oder Gene, die in der Tumorprogression eine Rolle spielen (O'Donnell et al., 2005, Pulikkan et al., 2010, Knoll, Emmrich und Pützer, 2013, Knoll et al., 2014, Aguilar et al., 2021). Diese gegenseitige Regulation von miRs und E2F1 beeinflusst möglicherweise das Gleichgewicht zwischen den tumorsuppressiven und aggressivitätsfördernden Eigenschaften von E2F1.

1.3.1.1 MiRs in humanen Malignomen und speziell im humanen BC

MiRs sind 20 bis 24 Nukleotid lange nicht-kodierende RNA-Moleküle, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Sie wurden erstmals in *C. elegans* als wichtige Regulatoren in der larvalen Entwicklung des Nematoden gefunden (Lee, Feinbaum und Ambros, 1993, Reinhart et al., 2000). Für die miR-Biogenese werden die bis zu mehreren Kilobasen großen primären (pri)-miRs mit der charakteristischen doppelsträngigen *stem loop* - Struktur von der RNA-Polymerase II, gelegentlich auch von der RNA-Polymerase III produziert (Borchert, Lanier und Davidson, 2006, Lee et al., 2004). Mit Hilfe der miR-Prozessierungsenzyme Drosha und Dicer werden pri-miRs zunächst zu pre-miRs und anschließend den reifen miRs prozessiert. Dabei werden sie vom Zellkern in das Zytoplasma transloziert (Kim, Han und Siomi, 2009). Zusammen mit einem Protein aus der Argonauten-Familie bilden die reifen miRs den *miR-induced silencing complex* (miRISC), der für die Erkennung und Inhibierung der entsprechenden Ziel-mRNAs verantwortlich ist (Bartel, 2004, He und Hannon, 2004, Carthew und Sontheimer, 2009). MiRs interagieren durch eine komplementäre Antisense-Sequenz mit der 3'UTR ihrer Ziel-mRNA, wodurch diese über Deadenylierung destabilisiert und degradiert bzw. ihre Translation behindert oder gehemmt werden kann (Filipowicz, Bhattacharyya und Sonenberg, 2008, Carthew und Sontheimer, 2009).

MiRs sind an einer Vielzahl von physiologischen und regulatorischen Prozessen unter anderem aber auch an der Krebsentwicklung beteiligt (Lee, Feinbaum und Ambros, 1993, Esquela-Kerscher und Slack, 2006, Adams, Kasinski und Slack, 2014, Budakoti et al., 2021). Etwa 50 % der annotierten humanen miRs befinden sich in Regionen des Genoms, die als *Fragile Sites* gelten (Calin et al., 2004). Diese genomischen Loci sind besonders anfällig für die Bildung von Lücken oder Brüchen während der Metaphase, wodurch es zu Chromosomenumlagerungen, Schwesterchromatidaustausch oder auch intrachromosomaler Genamplifikation kommen kann, die dann zur genomischen Instabilität der betroffenen Region oder auch des gesamten Chromosoms beitragen

(Bjerregaard et al., 2018, Glover, 1998). In mehrere Arbeiten konnte gezeigt werden, dass verschiedene miRs veränderte Expressionslevel in humanen Tumoren aufweisen und dass sie je nach ihren Zielgenen als Tumorsuppressor oder Onkogen fungieren können. Ein Paradebeispiel für eine miR mit onkogener Funktion, sogenannte OncomiR, ist die intensiv erforschte hsa-miR-21. Sie ist in einer Vielzahl von Krebsarten wie Gliomen, Brust- oder Darmkrebs hochreguliert und wird aufgrund ihrer Zielgene wie zum Beispiel PTEN, PDCD4, RECK und STAT3 mit erhöhter Proliferation, Migration sowie Tumorinvasivität assoziiert (Bautista-Sánchez et al., 2020). Im BC sind neben hsa-miR-21 (Catto et al., 2009) auch die Mitglieder der hsa-miR-130-Familie (Egawa et al., 2016) durch die Inhibierung von PTEN als OncomiRs bekannt. Des Weiteren ist eine Vielzahl von miRs, die weitestgehend als Tumorsuppressor identifiziert wurden, im BC herunterreguliert (Li et al., 2020). Dazu gehören unter anderem die Mitglieder der hsa-miR-200-Familie, die EMT und die Sensitivität für EGFR-Inhibitoren regulieren (Adam et al., 2009), sowie hsa-miR-34a (Lodygin et al., 2008), hsa-miR-99a und hsa-miR-100 (Catto et al., 2009), die den Zellzyklus, Proliferation und Migration von Krebszellen beeinflussen. Die Herunterregulierung dieser miRs konnte auf die Hypermethylierung ihrer Promotoren in BC zurückgeführt werden (Catto et al., 2009, Lodygin et al., 2008, Adams, Kasinski und Slack, 2014). MiRs und vor allem OncomiRs sind als ein wichtiger Bestandteil der Tumorforschung und Krebstherapieentwicklung etabliert.

1.3.1.2 Die Interaktion von E2F1 und miRs

MiRs sind ein integraler Bestandteil des E2F1-Regulationsnetzwerkes, indem sie entweder E2F1 als Zielgen haben oder selber E2F1-Zielgene sind. Dabei bilden sie mit E2F1 *Feedback-Loops*, die zur Feinabstimmung der E2F1-Aktivität beitragen. Diese Wechselwirkungen sind nicht nur komplex und zellkontextabhängig, sondern auch von großer Bedeutung für die Tumorprogression (Knoll, Emmrich und Pützer, 2013).

MiRs die E2F1 als Zielgen besitzen können sowohl als Tumorsuppressor als auch OncomiRs fungieren. So konnte gezeigt werden, dass E2F1 durch miR-17-5p und miR-20a negativ reguliert wird (O'Donnell et al., 2005), wodurch die E2F1-vermittelte Apoptose inhibiert und die Tumorprogression unterstützt wird (Matsubara et al., 2007, Díaz et al., 2008). Im Gegensatz dazu führte die negative Regulation von E2F1 durch miR-106 in hochmalignen Gliomen zur Hemmung der Proliferation und Initiierung deren Apoptose (Yang et al., 2011). Auch miR-330-3p und miR-205 fungieren als

Tumorsuppressor, indem sie jeweils durch Hemmung von E2F1 die Phosphorylierung von Akt-Kinasen reduzieren und dadurch die Apoptose induzieren (Lee et al., 2009, Dar et al., 2011). Die Wirkung der miRs mit E2F1 als Zielgen ist demnach stark vom Krebsstadium abhängig. Die Hemmung von E2F1 kann einerseits in frühen Krebsstadien zur Inhibierung der Apoptose und damit zur Tumorprogression beitragen, andererseits in späten Krebsstadien die pro-metastatische Funktion von E2F1 unterbinden.

Auch durch E2F1 transaktivierte miRs können als Tumorsuppressor oder Tumorpromotor fungieren. So zum Beispiel induziert E2F1 in einer Art negativen *Feedback Loop* das miR-17/miR-92-Cluster, welches wiederum E2F1 hemmt und dadurch eine übermäßige Akkumulation des Transkriptionsfaktors in den Zellen verhindert (Sylvestre et al., 2007, Woods, Thomson und Hammond, 2007). Als Tumorpromotor fungiert das E2F1-regulierte miR-224/miR-452-Cluster, das in Melanom-Zellen EMT induziert und die Zellmigration sowie -invasion fördert (Knoll et al., 2014). In Melanom-Zellen konnte zudem die ein weitere Interaktion zwischen E2F1 und hsa-miR-205 identifiziert werden, bei der E2F1 über die Regulierung des Verhältnisses von anti-onkogenen und onkogenen Isoformen des Tumorproteins p73 (TAp73/DNp73-Ratio) miR-205 inhibiert und dadurch die Chemotherapieresistenz von Hautkrebszellen erhöht (Vera et al., 2013). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass miRs eine neue Ebene der E2F1-Regulierung darstellen und somit neue therapeutische Ansätze bei der Tumorbehandlung sein könnten.

1.3.2 Die Rolle von E2F1 bei der DNA-Reparatur und der genomischen Stabilität

Neben der physiologischen Funktion als transkriptioneller Regulator für Gene, die für den G1/S-Phasenübergang und den mitotischen Zellzyklus wichtig sind, besitzt E2F1 auch transkriptionsunabhängige Funktionen. Es unterstützt die DSB-Reparatur direkt an der DSB-Stelle, indem es *DNA Damage Foci* bildet, die sich mit klassischen DSB-Markern wie γ H2AX und BRCA1 überschneiden (Chen et al., 2011, Liu et al., 2003). Die Lokalisation von E2F1 an die DSB-Stelle erfolgt durch die ATM/ATR-Kinasen-vermittelte Phosphorylierung von E2F1 an Serin 31, wodurch es zur spezifischen Bindung mit dem Topoisomerase-II-Bindungsprotein (TopBP1) kommt, das während der DNA-Schadensreaktion mehrere Funktionen hat (Lin, Lin und Nevins, 2001, Liu et al., 2003). An der DSB-Stelle ist E2F1 an der Remodellierung der Chromatinstruktur beteiligt, in dem es im acetylierten Zustand die Histonacetyltransferasen p300 und CBP sowie den Chromatinmodulator BRG1 direkt binden kann. Diese können die

Histonacetylierung induzieren und so den Zugang für DSB-Reparatur- sowie DNA-Resektionsproteine verbessern (Manickavinayaham et al., 2019, Manickavinayaham, Dennehey und Johnson, 2021).

E2F1 unterstützt spezifisch Homologie-abhängige DSB-Reparaturmechanismen. Unter anderem rekrutiert es das MRN-Komplexmitglied NBS1 zum DSB, welches in der 5'–3'-Resektion involviert ist (Chen et al., 2011). Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Wahl des DSB-Reparaturmechanismus, wobei umfangreiche DNA-Endresektionen zur anschließenden HR- oder MMEJ-vermittelten DSB-Reparatur tendieren (Ceccaldi, Rondinelli und D'Andrea, 2016, Pannunzio, Watanabe und Lieber, 2018). Weiterhin ist E2F1 für die transkriptionelle Regulation und Rekrutierung von RAD51 verantwortlich, das essentiell für die Stranginvasion während der HR-vermittelten Reparaturmechanismen ist (Choi und Kim, 2019).

Grundsätzlich ist E2F1 also ein Mediator der DSB-Reparatur und damit der genomischen Stabilität. Jedoch scheint es auch bei der DNA-Reparatur Diskrepanzen zwischen der physiologischen E2F1-Funktion und der E2F1-Funktion während der Tumorprogression besonders im Harnblasenkarzinom zu geben. Im BC korreliert eine hohe E2F1-Expression mit der Entwicklung vom oberflächlichen, NMIBC hin zum MIBC Phänotyp (Lee et al., 2010). Jedoch weisen MIBCs im Vergleich zu NMIBCs auch eine erhöhte genomische Instabilität auf, die mit einer fehlerhaften DSB-Reparatur im Zusammenhang steht (Bentley et al., 2009, Bentley et al., 2004). Das gleichzeitige Auftreten von genomischer Instabilität und hohen E2F1-Level deutet entweder auf eine ineffiziente HR-vermittelte DSB-Reparatur oder auf die Beteiligung von E2F1 an anderen DSB-Reparaturmechanismen hin.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Harnblasenkarzinom gehört zu den zehn häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland und weltweit. Obwohl 80% der diagnostizierten Fälle sich als NMIBC herausstellen, die durch eine transurethrale Resektion entfernt werden können, ist das Harnblasenkarzinom klinisch hochrelevant. So treten bei etwa 80% der NMIBC-Patienten Rezidive auf und etwa 30% entwickeln sich zu einem MIBC weiter. MIBCs haben eine ungünstige Prognose, neigen zu Metastasierung und sind therapierefraktär. NMIBC und MIBC unterscheiden sich stark auf molekularbiologischer Ebene. Während NMIBC als genomisch stabil mit diploiden Karyotyp und wenigen strukturellen genomischen Rearrangements gelten, sind MIBCs

mit einem aneuploiden Karyotyp genomisch instabil und durch mehrere Chromosomenumlagerungen sowie eine beeinträchtigte c-NHEJ-vermittelte DSB-Reparatur charakterisiert. Zudem weisen MIBC eine deutlich erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors E2F1 auf. In seiner Funktion als Mediator der DSB-Reparatur deutet das gleichzeitige Auftreten von genomischer Instabilität in MIBC trotz hoher E2F1-Level entweder auf eine ebenfalls ineffiziente HR-vermittelte DSB-Reparatur in MIBCs oder auf die Beteiligung von E2F1 an anderen DSB-Reparaturmechanismen wie das c-NHEJ hin. Daher standen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen im Vordergrund:

1. In wie fern ist E2F1 in die c-NHEJ-vermittelte DSB-Reparatur, welche nachweislich in MIBC gestört ist, involviert?
2. Sind auch andere Faktoren wie miRs an diesem Prozess beteiligt?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen E2F1, c-NHEJ und der BC-Progression?

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Apparatur	Gerätetyp	Hersteller
Axiovert 25 und 40	Mikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
Bakterieninkubator	Inkubator	Kendro (Langenselbold)
BioPhotometer	Spektralphotometer	Eppendorf (Hamburg)
Celloshaker	Schüttler	Renner (Darmstadt)
Centrifuge 5415C	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5415R	Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
CFX96 Touch™ Real-Time PCR system	Real-Time PCR Detektionssystem	Bio-Rad (München)
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Lumineszenz Detektionssystem	Bio-Rad (München)
CO2 Inkubator CB150	CO2 Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Gel Doc™ EZ Imager	Lumineszenz Detektionssystem	Bio-Rad (München)
GFL-3033	Schüttelinkubator	GFL (Burgwedel)
Hera Cell 240	CO2-Inkubator	Heraeus (Osterode)
Hera Safe	Zellkulturwerkbank	Heraeus (Osterode)
Präzisionswaage 572	Waage	Kern (Balingen-Frommern)
Lumat LB9507	Luminometer	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Mastercycler gradient	Thermozykler	Eppendorf (Hamburg)
MicroCam 3.3	Digitalkamera	dhs (Greifenstein-Beilstein)
Mini-PROTEAN 3	System für vertikale Gelelektrophorese	Bio-Rad (München)
Multifuge 3L-R	Zentrifuge	Heraeus (Osterode)
NanoDrop ND1000	Spektralphotometer	PEQLAB (Erlangen)
Neon Transfection System	Zellelektrophoresegerät	Invitrogen (Carlsbad)

Pico 17 Centrifuge	Tischzentrifuge	Heraeus (Osterode)
S@felow 1.2	Zellkultur-Werkbank	Nunc (Wiesbaden)
SevenExcellence S470-Basic	pH-Tischmessgerät	Mettler-Toledo (Gießen)
T100™ Thermal Cycler	Thermozykler	Bio-Rad (München)
Tecan Spark	Multimode-Mikroplattenlesegerät	Tecan (Männedorf)
Thermomixer 5436	Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer comfort	Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Trans-Blot SD	Blot-Kammer	Bio-Rad (München)
Trockenschrank APTLINE™ Serie FDC	Trockenschrank	Binder (Tuttlingen)
UV- Cleaner UV/CTAR	UV-Transilluminator	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Vortex GENIE®2	Schüttler	Scientific Industries (New York)
Vortex GENIE®2	Schüttler	Scientific Industries (New York)
Yellow Line MSH basic	Magnet-Rührer mit Heizplatte	IKA (Staufen bei Breisgau)

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Dissertation verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind von folgenden Firmen bezogen worden: Amersham Biosciences (Freiburg), BD-Bioscience (Heidelberg), BioLegend (Amsterdam), Bio-Rad (München), Cell Signaling (Frankfurt), Eppendorf (Hamburg), Fermentas (Waltham), Gibco (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt), PAA (Pasching), PAN-Biotech (Aidenbach), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim). Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe) und Promega (Mannheim) bezogen.

2.1.3 Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue	Qiagen (Hilden)

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega (Mannheim)
ECL Plus Western Blotting Detection System	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
EZ DNA Methylation Kit	Zymo Research (Irvine)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
iTaq Universal SYBR® Green Supermix Luciferase Assay System	Bio-Rad (München)
Neon™ Transfection System 100 µL Kit	Invitrogen (Carlsbad)
NucleoBond AX 500 Kit	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin®miRNA	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin®RNAll	Macherey-Nagel (Düren)
pcDNA™3.1 TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen (Carlsbad)
peqGold Hot Start Mix Y	PEQLAB (Erlangen)
Plasmid DNA purification Kit (Nucleo-Bond)	Macherey-Nagel (Düren)
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (Böblingen)
SuperSignal™ West Femto	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
TACS® XTT Cell Proliferation Assay	Trevigen (Frankfurt)
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
TaqMan® Small RNA Assay	Applied Biosystems (Darmstadt)
TaqMan® Universal Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
TaqMan™ Copy Number Assay	Applied Biosystems (Darmstadt)
TaqMan™ Copy Number Reference Assay	Applied Biosystems (Darmstadt)
TaqPath™ ProAmp™ Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
TuroboFect™ Transfection Reagent	Fermentas (Waltham)

2.1.4 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pNHEJ-GFP-Reporter	Reporterplasmid mit NHEJ-Reporter-kassette (GFP mit Pem1-Intron, Ad-Exon mit HindIII- und I-SceI Schnittstellen) (Seluanov, Mao und Gorbunova, 2010)

pcDNA3.1.MIR888	CMV Expressionvektor mit hsa-miR-888-5p
pcDNA3.1.TurboRed	CMV Expressionvektor mit TurboRed
pGL4[hRluc/CMV]	Reporterplasmid mit Renilla-Luziferase mit vorgeschaltetem CMV-Promotor (Promega)
pGL4[luc2]-MIR888-Promotor	Reporterplasmid mit FireFly-Luziferase mit vorgeschaltetem MIR888-Promotor
piLenti.scr.	Lentivektor-basierter Expressionsvektor mit Kontroll siRNA, randomisierter Sequenz gegen kein humanes Zielgen gerichtet (Applied Biological Materials)
piLenti.MIR888	Lentivektor-basierter Expressionsvektor mit hsa-miR-888-5p
piLenti.siAPLF	Lentivektor-basierter Expressionsvektor mit siRNA gegen APLF (Applied Biological Materials)
pLenti.APLF	Lentivektor-basierter Expressionsvektor mit humanem APLF (Applied Biological Materials)
pLenti.control	Lentivektor-basierter Expressionsvektor ohne Gensequenz (Applied Biological Materials)
pMIR-APLF 3'UTR	Reporterplasmid mit Luziferase-Gen mit nachgeschalteter APLF 3'UTR
pmiR-ZIP888	Lentivektor-basierter Expressionsvektor mit AntagomiR gegen hsa-miR-888 (Bioscience)
pmiR-ZIPscr.	Lentivektor-basierter Expressionsvektor mit unspezifischer scramble Sequenz (Bioscience)

Plasmidkarten im Anhang S. XX

2.1.5 Adenovirale Vektoren

Bezeichnung Beschreibung

Ad.E2F1	adenoviraler Expressionsvektor mit E2F1
Ad.GFP	adenoviraler Expressionsvektor mit GFP
Ad.Sh.E2F1	adenoviraler Expressionsvektor mit ShRNA gegen E2F1
Ad.Sh.GFP	adenoviraler Expressionsvektor mit ShRNA gegen GFP

2.1.6 Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung/Hersteller
One shot®TOP10 <i>E. coli</i>	chemisch kompetente Bakterien (Invitrogen)
<i>E. coli</i> JM109	chemisch kompetente Bakterien (Promega)
XL10-Gold® <i>E. coli</i>	Ultrakompetente Bakterien (Agilent)

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Medium
HT-1197	Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom (XY), CVCL_1291	DMEM
J82	Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom (XY), CVCL_0359	DMEM
RT-112	Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom (XX), CVCL_1670	RPMI
RT-4	Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom (XY), CVCL_0036	RPMI
RT-4.miR-888	humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der hsa-miR-888-5p	RPMI + Puromycin
RT-4.miR-scr.	humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression einer miR-scramble, Kontrollzelllinie zu RT-4.miR-888	RPMI + Puromycin
RT-4.si.APLF	humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression von von si.APLF, einer siRNA gegen humanes APLF	RPMI + Puromycin
RT-4.si.Scr.	humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression einer siRNA-scramble, Kontrollzelllinie zu RT-4.siAPLF	RPMI + Puromycin
SW1710	Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom (XX), CVCL_1721	DMEM
T24	Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom (XX), CVCL_0554	DMEM
T24.miR-scr.	humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression einer miR-scramble, Kontrollzelllinie zu T24.miR-ZIP888	DMEM + Puromycin

T24.miR-ZIP888	humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der miR-ZIP888, eine AntagomiR gegen hsa-miR-888	DMEM + Puromycin
UMUC-3	Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom (XY),	DMEM CVCL_1783
UMUC-3.APLF	humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression des humanen APLF	DMEM + Puromycin
UMUC-3.Kontrolle	humane Blasenkarzinom-Zelllinie, transduziert mit pLenti.control, Kontrollzelllinie zu UMUC-3.APLF	DMEM + Puromycin
UMUC-3.miR-888	humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der miR-ZIP888, eine AntagomiR gegen hsa-miR-888	DMEM + Puromycin
UMUC-3.miR-scr.	humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression einer miR-scramble, Kontrollzelllinie zu UMUC-3.miR-ZIP888	DMEM + Puromycin
VM-CUB1	Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom (XY),	RPMI CVCL_1786

DMEM w/o Sodium Pyruvat (PAN-Biotech) + 10% FKS (PAN-Biotech), **RPMI** (PAN-Biotech) + 10% FKS (PAN-Biotech), **Puromycin** 2 µg/mL (Roth)

2.1.8 Antikörper

Bezeichnung

g	Beschreibung	Herkunft
Anti-mouse IgG-HRP	2 nd Antikörper gerichtet gegen Maus-IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Cell Signaling (Frankfurt)
Anti-rabbit IgG-HRP	2 nd Antikörper gerichtet gegen Kaninchen-IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Cell Signaling (Frankfurt)
APLF	polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen humanes APLF	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Artemis	monoklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen humanes Protein Artemis (DCLRE1C)	Cell Signaling (Frankfurt)

β-Actin	monoklonaler Antikörper (Maus) gerichtet gegen humanes β-Aktin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA-PKcs	polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen humane DNA-PKcs (PRKDC)	Cell Signaling (Frankfurt)
E2F-1	polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen humanes E2F1	Cell Signaling (Frankfurt)
Ku70	monoklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen humanes Ku70 (XRCC6)	Cell Signaling (Frankfurt)
Ku80	monoklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen humanes Ku80 (XRCC5)	Cell Signaling (Frankfurt)
Ligase IV	monoklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen humane Ligase IV (LIG4)	Cell Signaling (Frankfurt)
normal rabbit IgG	unkonjugiertes Isotyp-Kontroll-Immunglobulin (Kaninchen)	Santa Cruz (Heidelberg)
XLF	polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen humanes XLF (NHEJ1)	Cell Signaling (Frankfurt)
XRCC4	monoklonaler Antikörper (Maus) gerichtet gegen humanes XRCC4	Santa Cruz (Heidelberg)

2.1.9 Oligonukleotide

Primer **Sequenz (5' - 3')**

Genexpression (semi-quantitative und qPCR)	
Aktin	F: CGGGAAATCGTGCGTGACATTA R: ACCGCTCATTGCCAATGGTGAT
APLF	F: TGAGGCAATGAGCTGTTCTG R: CATGCAGGATGTCCTCTTGA
CDH1	F: TGCCCAGAAAATGAAAAGG R: GTGGTATGTGGCAATGCGTTC
CDH2	F: AGCCCGGTTTCATTTGAGGG R: TTGAGGGCATTGGGATCGTC
DCLRE1C	F: AAAGAAGGTTGGAGTGCAGCTTG R: CCAGCTGGTAAGAGAGTCACAAC
GAPDH	F: ATCGTGGAAGGACTCATGACCACA

	R: AAGGCCATGCCAGTGAGCTTC
Klf4	F: GATGCTCACCCACCTTCTT R: TTTCTCACCTGTGTGGGTTTCG
LIG4	F: CTCAGAGTTCAGCACTTGAGCA R: GAGTCCTACAGAAGGATCATGCAG
Nanog	F: AACTGGCCGAAGAATAGCAA R: ACTGGATGTTCTGGGTCTGG
NHEJ1	F: CACTGATTCTACGGGTGCGA R: AACGTTGCTAGCTCCCTCAC
OCT4	F: TCGCAAGCCCTCATTTACC R: CCACAGAACTCATACGGCGG
PRKDC	F: CTTTGTTCGTGTGGAGGGAAT R: CACAACGGGGTTCAGAAGTT
SNAI1	F: CGAGTGGTTCCTTCTGCGCTA R: CTGCTGGAAGGTAAACTCTGGA
VIM	F: CTCCCTGAACCTGAGGGAAAC R: TTGCGCTCCTGAAAACTGC
XRCC4	F: TTGTTGTCAGGAGCAGGACC R: TCTGCAATGGTGTCCAAGCA
XRCC5	F: GGACGTGGGCTTTACCATGA R: GGGGATTGTCAGTGCCATCT
XRCC6	F: CCGAGATACAGGCATCTTCCT R: AGCTTTAACCTGCTGAGTGCT
ZEB1	F: GCTGTTTCAAGATGTTTCCTTCCA R: CCTTTCCTGTGTCATCCTCCC
Chromatin-Immunpräzipitation	
APAF-1_BS	F: GCCCCGACTTCTTCCGGCTCTTCA R: GGAGCTGGCAGCTGAAAGACTC
APLF_BS1	F: CGTCAGCGTTGACTGTCACT R: TTCGAATTCCGGTGGATTTA
APLF_BS2	F: TAAATCCACCGGAATTCGAA R: AGTCCTGGTGGCTTTCTTCA
DCLRE1C_BS	F: CCTTTCCTGCCATTTTTCTTT R: CTTGTGGGATTACCGTGAGG
LIG4_BS	F: CGGTCCGCTCCTTCTAGG

	R: TTTGGCTTCAGTTTGCTTCC
MIR888_BS1	F: AGGGTTCAGGCATTCTGTTG R: TCGAGAAGGCAGTTGAAAGG
MIR888_BS2	F: AGTTGAAGGGCAATGAGCTG R: TAATCTGGGCGACTGACACA
NHEJ1_BS	F: CTGGCCGAGTGGAAAGAATA R: CCTGGGAGACTCCTTCCTTC
PRKDC_BS	F: GGCCTCACCAATCACAG R: CTGGTGCTGTAGGACCCAGT
XRCC4_BS	F: CAACCCCTTCTCGAAGATCA R: ATCTAAATCCCGCCTTTTCC
XRCC5_BS	F: CAAGTGCAGTTGCTCACACC R: ATAGCTCTCTGCACCCTGGA
XRCC6_BS	F: CATGCGTGATGACGTAGAGG R: TCGCACACTTAAGGCTAACG
Klonierung	
APLF 3'UTR	F: TAGCTACTAGTGGATTTCTTTTGAGTGATAAA
HindIII/Spel	R: TAGCTAAGCTTTAGTTATACTCAAAGGTGTCTTCAGG
MIR888	F: TCTTGCCTCGAGCTGGTCCTGGCAATCATCCAGATA R: GAATTTACGCGTCACTGCCCTCCAATTGGCAT
MIR888	F: catctgcagCCACAATTAGCCATGTTGTG
PstI/XbaI	R: CATTCTAGACACCACAAAAGTGTACTTGG
MIR888-Prom.	F: GGTACCTGAGtttggctggcctttggac
KpnI/HindIII	R: GCCGGAAGCTTACcatggcgctgaacct
Methylierungsspezifische PCR	
Methylierte	F: AGAAGAATAGAAAATGGAATAAGATGGTC
CpG-Island	R: TAAAACGAAATCTCGCTCTATCGCC
Unmethylierte	F: AAGAATAGAAAATGGAATAAGATGGTT
CpG-Island	R: TTAAAACAAAATCTCACTCTATCACCC
Sequenzspezifische Mutagenese	
CopGFPmut	F: CTACCCCAGCGGCTAAGAGAACCCCTTCC R: GGAAGGGGTTCTCTTAGCCGCTGGGGTAG

2.1.10 Online-Datenbanken und -Softwares

Name	Link	Referenz
Cellosaurus	https://web.expasy.org/cellosaurus/	Bairoch, 2018
Cscan	http://159.149.160.88/cscan/	Zambelli et al., 2012
dbDEMOC	https://www.biosino.org/dbDEMOC/index	Yang et al., 2017
DIANA -microT-CDS	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=MicroT_CD_S/index	Paraskevopoulou et al., 2013
JASPAR	https://jaspar.genereg.net/	Fornes et al., 2020
MethPrimer	https://www.urogene.org/methprimer/	Li und Dahiya, 2002
miRBase	https://www.mirbase.org	Kozomara, Birgaoanu und Griffiths-Jones, 2019
miRmap	https://mirmap.ezlab.org/	Vejnar und Zdobnov, 2012
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	-
Primer3Plus	https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi	Untergasser et al., 2007
QuikChange Primer Design	https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp	Novoradovsky et al., 2005
TargetScan	http://www.targetscan.org/vert_80/	McGeary et al., 2019
TCGA	http://cancergenome.nih.gov/ https://xenabrowser.net/	Goldman et al., 2020
DiseaseMeth	http://diseasemeth.edbc.org/	Xing et al., 2021
Tissue Atlas	https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas2	Keller et al., 2021
UCSC Genome Browser	https://genome.ucsc.edu/	Kent et al., 2002
Venn diagram	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn	-

2.2 Methoden

2.2.1 Nukleinsäure-Arbeitstechniken

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Krebszellen mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Zum Abbau von Proteinen in den Zelllysaten wurden 2 mg/ml Proteinase K (Qiagen) verwendet. Die gereinigte DNA wurde in 150 µL Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte spektroskopisch mittels NanoDrop ND1000.

2.2.1.2 RNA- und miR-Extraktion

RNAs oder miRs wurden aus Krebszellen mit Hilfe des *NucleoSpin® RNA Kit* bzw. *NucleoSpin® miRNA Kit* (Macherey-Nagel) nach den Herstellerangaben isoliert. Die Aufreinigung der miR verlief über die Auftrennung der Gesamt-RNA in zwei Fraktionen mit großen (> 200 bp) oder kleinen RNAs (< 200 bp), wobei letztere die miRs enthielt. Aufgereinigte RNA wurde anschließend mit 30 µL RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte spektroskopisch mittels NanoDrop ND1000.

2.2.1.3 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration und -Reinheit

Die optische Dichte (OD) der Nukleinsäure wurde mit Hilfe des NanoDrop ND1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen, bestimmt das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ die Reinheit der Nukleinsäuren. Ein Verhältnis von $\sim 1,8$ gilt allgemein als "rein" für DNA und ein Verhältnis von $\sim 2,0$ gilt allgemein als "rein" für RNA.

2.2.1.4 Bisulfit-Konvertierung

Für die methylierungsspezifische PCR erfolgte im Anschluss der genomischen DNA-Extraktion eine Bisulfit-Konvertierung, bei der unmethyliertes Cytosin zu Uracil desaminiert wurde, während methylierte Cytosine (sowohl 5-Methylcytosin als auch 5-Hydroxymethylcytosin) unverändert blieben. Hierfür wurden 500 ng genomische DNA mit dem *EZ DNA Methylation Kit* (Zymo Research) nach Herstellerangaben behandelt.

Aufgereinigte konvertierte DNA wurde mit 10 µL Elutionspuffer M eluiert und für methylierungsspezifische PCRs verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

2.2.1.5 Reverse Transkription

Im Anschluss der RNA-Extraktion erfolgte die reverse Transkription. Für mRNA-Expressionsanalysen wurde 1 µg der Gesamt-RNA mit Hilfe des *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) unter der Verwendung von Oligo(dT)-Primern und nach Herstellerangaben in cDNA transkribiert. Das Umschreiben erfolgte für 1 h bei 37° C mit anschließender Hitzeinaktivierung für 5 Minuten bei 95° C. Die entstandene cDNA wurde zur Amplifizierung sequenzspezifischer Bereiche mittels PCR (Detektions-PCR) oder für Klonierungs-PCRs verwendet. Für miR-Expressionsanalysen wurden 25 ng der „kleinen RNA“-Fraktion mit Hilfe des *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben in cDNA transkribiert. Das Umschreiben erfolgte für 30 Minuten bei 16° C, gefolgt von 30 Minuten bei 42° C und anschließender Hitzeinaktivierung für 5 Minuten bei 85° C. Die entstandene cDNA wurde als DNA-Template für das TaqMan® MicroRNA Assay verwendet.

2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein enzymabhängiges Verfahren zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen eines DNA-Templates. Die PCR besteht aus drei sich wiederholenden Schritten: Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA bei 95° C, gefolgt von der Anlagerung der spezifischen Primer als Startpunkt der Neusynthese bei Annealingtemperaturen zwischen 55° und 60° C und anschließend die Elongation der DNA durch die DNA-Taq-Polymerase bei 72° C. Durch das zyklische Wiederholen dieser drei Schritte wird eine exponentielle Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz, die durch die eingesetzten Oligonukleotid-Primer definiert wird, erreicht.

Zur Detektion der mRNA-Expressionslevel und für die Methylierungsspezifische PCR wurde der *peqGOLD Hot Start-Mix* (PEQLAB) verwendet, der bereits bis auf die Primer und Template-DNA alle nötigen Komponenten enthält. Bei jeder PCR wurde eine *No-Template*-Kontrolle mit Wasser mitgeführt. Für die Amplifikation der hsa-miR-888-5p, des MIR888-Promotors sowie der APLF 3'UTR wurde ebenfalls der *peqGOLD Hot Start-Mix* (PEQLAB) bzw. zusätzlich die *Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase*

(New England Biolabs) nach Herstellerangaben verwendet. Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.1.7 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative real-time PCR (qPCR) wurde mit dem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detektionssystem (BioRad, München) durchgeführt. Für die Quantifizierung der mRNA-Expression (nach Reverser Transkription) wurde der *iQ™ SYBR® Green Supermix* (BioRad) nach Herstellerangaben verwendet, der den Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* enthält. *SYBR Green* interkaliert mit doppelsträngiger DNA und bildet dadurch einen DNA-Fluoreszenz-Komplex. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur enthaltenen DNA, wodurch die Vervielfältigung der DNA während der qPCR quantifiziert werden kann. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte über die gemittelte Expression der Referenzgene GAPDH und Aktin.

2.2.1.8 TaqMan® MicroRNA Assay

Das TaqMan® MicroRNA Assay wurde mit dem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detektionssystem (BioRad, München) durchgeführt. Für die Quantifikation der miR-Expression (nach Reverser Transkription) wurde der *TaqMan® Universal Master Mix* (Applied Biosystems) in Kombination mit den *TaqMan® Small RNA Assays* für hsa-miR-888-5p, hsa-miR-891b und hsa-miR-892c, welche Primer-Sonden enthalten, nach Herstellerangaben verwendet. Die Primer-Sonden bestehen aus einem FAM-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende, der die FAM-Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer reduziert. Während der DNA-Amplifikation kommt es zur Spaltung der Sonde durch die DNA-Taq-Polymerase, wodurch das FAM-Fluoreszenzsignal nicht mehr durch den Quencher gehemmt werden kann. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur enthaltenen DNA, wodurch die Vervielfältigung der DNA quantifiziert werden kann. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte über die Expression des Referenzgens RNU6B.

2.2.1.9 Copy Number Variation Assay

Das Copy Number Variation Assay wurde mit dem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detektionssystem (BioRad, München) durchgeführt. Zur Bestimmung der Kopienzahl der genomischen Loci wurden der *TaqPath™ ProAmp™ Master Mix* (Applied

Biosystems) in Kombination mit den *TaqMan™ Copy Number Assays* (Applied Biosystems) für MIR888, MIR891b und MIR892c sowie dem *TaqMan™ Copy Number Reference Assay* (Applied Biosystems) für die humane RNase P nach Herstellerangaben verwendet. Das Assay funktioniert ebenfalls über das Prinzip von Primer-Sonden, die entweder einen FAM-bzw. im Falle der Referenz einen VIC - Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende enthalten. Während der DNA-Amplifikation kommt es zur Spaltung der Sonde durch die DNA-Taq-Polymerase, wodurch das Fluoreszenzsignal nicht mehr durch den Quencher gehemmt werden kann. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur enthaltenen DNA, wodurch die Vervielfältigung der DNA quantifiziert werden kann. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte über die Signalstärke des Referenz-Assays.

2.2.1.10 Enzymatische Restriktion von DNA

Die enzymatische Restriktion von DNA erfolgte zur Durchführung und Überprüfung von Klonierungen, sowie zur Linearisierung des pNHEJ-GFP-Reporterplasmids. Für die Herstellung der Plasmide piLenti MIR888, pGL4[luc2]-MIR888-Promotor und pMIR-APLF 3'UTR wurden die jeweiligen PCR-Produkte und jeweiligen DNA-Vektoren mit folgenden Restriktionsenzymen in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Herstellerangaben geschnitten: PstI und XbaI, KpnI und HindIII, HindIII und SpeI. Zur Entfernung der GFP-Gensequenz wurden alle piLenti-Vektoren mit BamHI und alle pmiR-ZIP-Vektoren mit XbaI und XcmI geschnitten. Die Restriktionsansätze wurden anschließend auf 1% [w/v] Agarose-Gel aufgetragen, aufgetrennt, extrahiert und anschließend ligiert. Zur Überprüfung der durchgeführten Klonierungen wurden Kontrollverdauungen mit verschiedenen Enzymen in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch die bei der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese entstandenen Bandenmuster konnten Aussagen über den Klonierungserfolg getroffen werden. Zur Linearisierung des pNHEJ-GFP-Reporterplasmids wurden 95 µg der Plasmid-DNA mit HF-HindIII (New England BioLabs) über Nacht bei 37° C inkubiert und anschließend mit Hilfe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol aufgereinigt.

2.2.1.11 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren werden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, bei

dem die negativ geladenen DNA-Fragmente durch ein poröses Agarose-Gel zur Anode wandern. Es wurden je nach Fragmentgröße Gele mit 2% oder 1% [w/v] Agarose, 1x TAE (50x TAE-Stock: 2 M TRIS, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA) und 0,2 µg/mL Ethidiumbromid verwendet. Vor dem Beladen der Agarosegele wurden die DNA-Proben mit 6x Gelladepuffer (New England Biolabs) versetzt. Die anschließende DNA-Auftrennung erfolgte bei 100 V für 30-60 Minuten. Ein mitgeführter Längenmarker diente zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen. Die Detektion der DNA-Fragmente wurde durch Anregung mit UV-Licht bei der Wellenlänge 312 nm erreicht.

2.2.1.12 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die zu extrahierende DNA wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.1.13 Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol-Aufreinigung

Für die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Aufreinigung wurden die Restriktionsansätze für die Linearisierung des pNHEJ-GFP-Reporterplasmids 1:20 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und anschließend 1:2 mit ROTI® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roth) versetzt. Durch Schütteln und anschließender Zentrifugation entstand ein 2-Phasen-Gemisch, bei dem sich in der unteren organischen Phase die Proteine und in der oberen wässrigen Phase die Nukleinsäuren sammelten. Die obere Phase wurde abgenommen, erneut mit ROTI® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurde durch Zugabe von Natriumacetat und reinem Ethanol zur wässrigen Phase die enthaltene DNA gefällt. Das entstandene DNA-Pellet wurde mehrmals mit Ethanol gewaschen, getrocknet und abschließend in 20 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.1.14 Ligation

Für die Klonierungen wurden DNA-Ligationen mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden jeweils 50 ng Vektor-DNA (piLenti, pGL4[luc2] und pMIR-Report) mit der Insert-DNA (MIR888, MIR888-Promotor und APLF 3'UTR) in den molaren Verhältnissen 1:1, 1:3 oder 1:6, dem Ligationspuffer und der 1 U T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16° C inkubiert und zur

anschließenden Vervielfältigung bei der Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* One shot[®]TOP10 bzw. *E. coli* JM109 verwendet.

2.2.1.15 Sequenzspezifische Mutagenese

Zur Entfernung der GFP-Gensequenz wurde in allen pLenti-Vektoren mit Hilfe des *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, USA) und spezifischen Primern eine Punktmutation bei TYR70 des enthaltenen CopGFP eingeführt, um ein verfrühtes Stoppsignal zu generieren. Die Oligonukleotide, die in diesem Kit Anwendung fanden, wurden entsprechend der gewünschten Mutation der CopGFP-Sequenz nach Herstelleranleitung und der *QuikChange Primer Design*-Software entworfen und synthetisiert. Die Mutations-PCR wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt und mit einem anschließenden DpnI-Verdau maternale, nicht mutierte DNA entfernt. Die verbliebenen mutierten Plasmide wurden zur anschließenden Vervielfältigung bei der Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* XL10-Gold[®] verwendet.

2.2.1.16 Hitzeschock-Transformation

Für die Hitzeschock-Transformation wurden 50 µL-Aliquots der chemisch kompetenten *E. coli*-Suspensionen mit 5 µL Ligationsansatz versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei dem der Transformationsansatz exakt 45 Sekunden auf 42° C erwärmt und direkt danach 2 Minuten auf Eis abgekühlt wird. Nach Zugabe von 500 µL angewärmten SOC-Medium (2% [w/v] Trypton, 0,5% [w/v] Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glukose) erfolgte eine einstündige Inkubation im Thermoschüttler bei 37° C und 450rpm. Danach wurden die Bakterien durch kurzes Anzentrifugieren sedimentiert, in etwa 100 µL SOC-Medium resuspendiert, auf LB-Agarplatten (500 mL LB-Medium mit 7,5 g Agar) mit entsprechenden Antibiotika (Ampicillin 50 µg/mL oder Kanamycin 25 µg/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.1.17 Plasmid-Minipräparation

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien wurden Bakterienkolonien von den LB-Agarplatten einzeln gepickt und in je 2 mL LB-Medium (1% [w/v] Trypton, 0,5% [w/v] Hefeextrakt, 1% [w/v] NaCl, pH7,5) mit entsprechenden Antibiotika bei 37° C und 225rpm über Nacht vermehrt. Die Bakterien wurden dann 3

Minuten bei 14 000rpm pelletiert und in 300 µL RES-Puffer (50 mM Tris/HCl pH8, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A) resuspendiert. Die alkalische Lysis der Bakterienzellen erfolgte durch die Zugabe von 300 µL LYS-Puffer (200 mM NaOH, 1% [w/v] SDS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließender Neutralisierung mit 300 µL NEU-Puffer (2,6 M Kaliumacetat pH 7,2) für 10 Minuten auf Eis. Die entstandene viskose Lösung wurde 10 Minuten bei 14 000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 630 µL Isopropanol präzipitiert und für 20 Minuten bei 14 000rpm und 4°C sedimentiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C im Inkubator getrocknet und abschließend in 30 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Der Ligations-/Klonierungserfolg wurde mit Hilfe von Kontrollverdauen überprüft.

2.2.1.18 Plasmid-Maxipräparation

Zur Gewinnung hochkonzentrierter und -reiner Plasmid-Mengen wurden Plasmid-Maxipräparationen mit Hilfe des *NucleoBond AX 500 Kit* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die aufgereinigten Plasmide wurden zur Sequenz-Überprüfung zu Microsynth Seqlab (Göttingen) geschickt.

2.2.2 Protein-Arbeitstechniken

2.2.2.1 Protein-Extraktion

Proteine wurden aus Krebszellen mit Hilfe eines NP-40-Zelllysispuffers (50 mM TRIS-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1% [v/v] NP-40, 0,5% [w/v] Natriumdesoxycholate) isoliert. Hierfür wurden die Zellen mittels Zellschaber von den Kulturschalen abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde 1:1 mit eiskaltem NP-40-Zelllysispuffer und 1x Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Auftrennung der unlöslichen und löslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 14 000rpm und 4°C für 10 Minuten. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (BioRad) ermittelt. Der im Assay verwendete Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue G-

250 bindet an Proteine. Diese Bindung bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 auf 595 nm Wellenlänge. Die mit höherer Proteinkonzentration steigende Absorption bei 595 nm Wellenlänge kann mittels Photometer gemessen werden (Bradford, 1976). Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde 1 µL der Proteinprobe in 700 µL Wasser, 99 µL PBS und 200 µL *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* verdünnt. Die Extinktion wurde nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von 595 nm im Eppendorf BioPhotometer gemessen. Durch die Verwendung einer vorprogrammierten BSA-Eichkurve wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine das im Überschuss zugesetzte Natriumdodecylsulfat (SDS) und erhalten so eine negative Ladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Zur Probenvorbereitung wurden 50 bis 100 ng Proteine mit 5x non-reducing sample buffer (Pierce Biotechnology, USA), 10x DTT (1 M) und Wasser gemischt, für 10 Minuten bei 95° C erhitzt und anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Proben wurden zunächst in einem Sammelgel (125 mM TRIS-HCl pH6.8, 0,1% SDS [w/v], 4% [v/v] Polyacrylamid, 0,11% [v/v] TEMED, 0,051% [w/v] Ammoniumpersulfat) konzentriert und anschließend im Trenngel (375 mM TRIS-HCl pH8.8, 0,1% SDS [w/v], 10% [v/v] Polyacrylamid, 0,06% [v/v] TEMED, 0,051% [w/v] Ammoniumpersulfat) aufgetrennt. Die Gele liefen bei 100 V für 1-2 Stunden in SDS-Laufpuffer (25 mM TRIS, 190 mM Glycin, 0,1% [w/v] SDS).

2.2.2.4 Western-Blot und Immundetektion

Beim Western-Blot werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) mittels eines senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feldes übertragen. Für den Protein-Transfer wurde das Tankblot-Verfahren angewendet, bei dem die Membran zunächst im Transferpuffer (40 mM TRIS, 25 mM Glycin, 20% [v/v] Methanol) äquilibriert und dann zusammen mit der SDS-PAGE in einer Trans Blot-Kammer (BioRad) einem elektrischen Feld (350 mA, 100 V) für 60 Minuten ausgesetzt wird. Nach Entfernung des Polyacrylamid-Gels wird die Membran in einem Blockpuffer (5% [w/v] Milch, TBST: 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 0,1% [v/v] Tween 20) für eine Stunde

bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in 5% Blockpuffer je nach verwendetem Antikörper 1:100 – 1:1000 verdünnt wurde, über Nacht schüttelnd bei 4° C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit den HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:2500 in Blockpuffer) inkubiert, gefolgt von erneutem dreimaligem Waschen mit TBST. Die Membranen wurden dann in TBS (20 mM TRIS, 140 mM NaCl) gelagert. Durch die Zugabe der Substrate *ECL Plus Western Blotting Detection Kits* (Thermo Fisher Scientific) oder *SuperSignal™ West Femto* (Thermo Scientific) konnte eine Chemilumineszenzreaktion des Sekundärantikörpers hervorgerufen werden und dadurch die Antikörper-markierten Proteine detektiert werden. Die Chemilumineszenz wurde mit dem ChemiDoc™ Touch Imaging System gemessen und mit der dazugehörigen Image Lab Software (Bio-Rad) ausgewertet.

2.2.2.5 Chromatinimmunpräzipitation

Mit der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) kann die Bindung von Proteinen an distinkten DNA-Abschnitte *in vivo* nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode zum Nachweis der Bindung des Transkriptionsfaktors E2F1 an spezifische Sequenzen der NHEJ-Gen-Promotoren und des humanen MIR888-Promotors durchgeführt. Die ChIP erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Nelson, Denisenko und Bomszyk (2006) und mit einem optimierten ChIP-Puffer (50 mM TRIS-HCL pH7.5, 120 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5% Natriumdesoxycholate, 0,5% NP-40, 0,5% Triton-X 100). Für die ChIP wurden Krebszellen mit Formaldehyd (Endkonzentration: 1,42%) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Proteine und DNA über die Bildung von Iminen miteinander zu vernetzen (reversibles Crosslinking, Hoffman et al., 2015). Nachdem die Crosslinking-Reaktion durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 125 mM) gestoppt wurde, wurden zum Freisetzen des Chromatins die Zellen mit Hilfe des ChIP-Puffers und zusätzlichen Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche) lysiert. Anschließend wurde durch Ultraschall die DNA fragmentiert, hierfür wurde insgesamt viermal für 15 Sekunden bei einer Amplitude von 50% gepulst und zwischen den Pulsen die Probe zwei Minuten auf Eis gekühlt. Von jeder Probe wurde ein Aliquot als 10%-Input (10% Volumenanteil der Präzipitationsproben) abgenommen, die DNA über eine Ethanol-Fällung pelletiert und bei -20°C gelagert. Die Immunpräzipitation der Proben erfolgte durch die Zugabe des spezifischen E2F1-Antikörpers oder eines unkonjugierten

Kanninchen-IgGs (Mock-IP). Die Aufreinigung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte mittels Bindung der Antikörper an Protein G-gekoppelte Sepharose (GE Health). Nach mehrmaligem Waschen mit CHIP-Puffer wurde die DNA der aufgereinigten wie auch die der 10%-Input Proben mittels Chelex 100 isoliert. Chelex ist ein in wässriger Lösung suspendiertes Ionenaustauschharz, welches die polaren zellulären Bestandteile, darunter auch DNasen aber nicht DNA bindet. Nach Zugabe von Chelex wurden die Präzipitate zur Auflösung der Protein-DNA-Komplexe auf 95° C erhitzt und anschließend zentrifugiert, um Chelex und die daran gebunden Proteinen zu pelletieren. Die präzipitierte DNA verblieb im wässrigen Überstand und konnte direkt für PCR-basierte Analysemethoden verwendet werden.

2.2.3 Zellbiologische Arbeitstechniken

2.2.3.1 Kultivierung von Zellen aus dem humanen Blasenkarzinom

Die BC-Zelllinien HT-1197, J82, RT-112, RT-4, SW1710, T24, UMUC-3 und VM-CUB1 standen als Aliquotes, gelagert bei -196°C in Flüssigstickstoff, zur Verfügung. Pro Zelllinie wurde ein Aliquot im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 300 g pelletiert und das Einfriermedium entfernt. Die Zellpellets wurden dann im jeweiligen verwendeten Kulturmedium (DMEM oder RPMI mit 10% [v/v] Fötalem Kälberserum [FKS], 1x MEM non-essential amino acids, 100 µg/mL Penicillin, 100 U/mL Streptomycin, 1,25 µg/mL Amphotericin B, optional 2 µg/mL Puromycin) resuspendiert und auf 10 cm-Zellkulturplatten überführt. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% [v/v] CO₂ kultiviert. Bei allen Zelllinien handelte es sich um adhären wachsende Zelllinien, die alle drei bis vier Tage gesplittet werden mussten. Hierfür wurde zunächst das alte Medium entfernt, die Zellen mit etwa DPBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von Trypsin-EDTA abgelöst. Ein Teil der abgelösten Zellen wurde dann auf neue Zellkulturplatten mit frischem Kulturmedium überführt. Zur erneuten Lagerung im Flüssigstickstoff wurden die Zellen mit DBS gewaschen, durch Trypsin-EDTA gelöst und in dem jeweiligen Kulturmedium mit zusätzlich 10% DMSO resuspendiert.

2.2.3.2 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Nach Auszählung der auf den vier Zählfeldern liegenden Zellen konnte unter Berücksichtigung des Volumens der Zählkammer (0,1 µL pro Zählfeld) die Anzahl der

Zellen pro Milliliter bestimmt werden. Hierfür wurde der erhaltene Mittelwert der ausgezählten Zellen der vier Zählfelder mit 10^4 multipliziert. Dadurch war es möglich, eine definierte Anzahl an Zellen für die durchgeführten Zellexperimente auszusäen.

2.2.3.3 Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA

Als transiente Transfektion wird das nicht dauerhafte Einbringen von Fremd-DNA (Plasmid-DNA) in eukaryotischen Zellen bezeichnet. Für Luziferase-Assays wurden Krebszellen mit Hilfe des *TuroboFect™ Transfection Reagents* (Fermentas) transfiziert. Hierfür wurden einen Tag vor der Transfektion Zellen ausgezählt und mit gleichen Zellkonzentrationen ausgesät. Die TurboFect-DNA-Reaktion wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und zu den Zellen gegeben. Für das Plasmid-basierende NHEJ-Assay wurden Krebszellen über Elektroporation mit Hilfe des *Neon™ Transfection Systems* (invitrogen) transfiziert. Hierfür wurden die Zellen ausgezählt und mit der Plasmid-DNA nach Herstellerangaben vermischt. Die Elektroporation erfolgte für UMUC-3-Zelle bei 1150 V für zweimal 30 ms und für RT-4 bei 1300 V für zweimal 20 ms.

2.2.3.4 Adenovirale Transduktion von Zellen

Als adenovirale Transduktion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen mit Hilfe eines adenoviralen Vektors bezeichnet. Die hier verwendeten adenoviralen Vektoren wurden vom Institut für experimentelle Gentherapie und Tumorforschung produziert und bereitgestellt. Für die adenovirale Transduktion wurden 5×10^6 RT-4 Zellen bzw. 3×10^6 T24 und UMUC-3-Zellen am Vortag ausgesät und entsprechend der eingesetzten MOI (*Multiplicity of infection*: Viruspartikel pro Zelle) die benötigten Virusmengen berechnet. RT-4-Zellen wurden mit dem Ad.E2F1 bzw. Ad.GFP und MOI 5, T24- und UMUC-3-Zellen mit dem Ad.sh.E2F1 bzw. Ad.sh.GFP und MOI 15 transduziert. Die entsprechende Virusmenge wurde in 1 mL Nährmedium aufgenommen und direkt auf die Zellen, bei denen vorher der Überstand entfernt wurde, getropft. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37° C wurde frisches Nährmedium zu den Zellen gegeben. RT-4-Zellen wurden 24 Stunden, T24- und UMUC-3-Zellen 72 Stunden nach der Transduktion für Expressionsanalysen und funktionelle Assays geerntet.

2.2.3.5 Herstellung stabiler Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion

Bei der lentiviralen Transduktion wird das verwendete Transgen direkt in das Genom der Wirtszelle eingebaut und so Zelllinien mit stabiler Expression des gewünschten Zielgenes generiert. Die hier verwendeten lentiviralen Partikel zur Überexpression oder Hemmung von hsa-miR-888-5p bzw. APLF wurden vom Institut für experimentelle Gentherapie und Tumorforschung produziert und bereitgestellt. Für die lentivirale Transduktion wurden 1×10^5 RT-4-, T24- oder UMUC-3-Zellen ausgezählt, mit 5 mL der jeweiligen lentiviralen Partikel-Mediumlösung vermischt und für 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen auf frischen Zellkulturplatten ausgesät und das jeweilige Nährmedium mit 2 µg/mL Puromycin zur Selektion versetzt. Die Transgenexpression wurde durch qPCRs, TaqMan® MicroRNA Assays und/oder Immunblots überprüft.

2.2.3.6 Einzelklonselektion

Durch den ungerichteten Einbau der Transgene in das Genom der Wirtszellen bei der lentiviralen Transduktion entstehen multiklonale Zellpopulation. Um klonale Effekte bei weiterführenden Experimenten auszuschließen wurden serielle Verdünnungen zur Gewinnung von Einzelklonen durchgeführt. Hierfür wurde 96-Well-Platten (8 [A bis H] x 12 [1 bis 12] Wells) verwendet, in denen in einem Anfangs-Well (A1) 4000 Zellen der multiklonalen Zelllinie ausgesät wurden. In einer ersten Verdünnungsreihe wurde vom Anfangs-Well A1 bis H1 siebenmal 1:2 verdünnt, bei der anschließenden zweiten Verdünnungsreihe wurde vom 1. bis zum jeweils 12. Well der Plattenreihe die Zellen erneut 1:2 verdünnt. Nach etwa 5-7 Tagen wurden die Platten unter dem Mikroskop auf Zellkolonien, die von einer einzigen Zelle abstammen, überprüft. Identifizierte Einzelklone wurden subkultiviert und ihre Transgenexpression durch qPCRs, TaqMan® MicroRNA Assays und/oder Immunblots bestätigt.

2.2.4 Zellfunktionsanalysen

2.2.4.1 Luziferase-Assay

Mit dem Luziferase-Assay kann die Aktivität von Promotoren und andere regulatorischen Gensequenzen untersucht und quantifiziert werden. In Folge dieser Arbeit wurde zum einen die regulatorische Aktivität der APLF 3'UTR unter Einfluss der hsa-miR-888-5p mit Hilfe des *Luciferase Assay System* (Promega) untersucht. Hierfür

wurden entsprechende Krebszelllinien mit pMIR-APLF 3'UTR transfiziert, nach 24 Stunden mit 1x *Cell Culture Lysis Reagent* (Promega) lysiert und anschließend unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation pelletiert. Die Überstände wurden für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford und zur Messung der Luziferase-Aktivität verwendet. Je Aktivitätsmessung wurden dreimal 25 µL des Überstandes in Messröhrchen überführt und automatisch 50 µL Luziferase-Substrat (Promega) durch das Lumineszenzmessgerät (Berthold Technologie) injiziert. Gemessen wurde anschließend das bei einer Wellenlänge von 562 nm emittierte Lichtsignal, das durch die Katalyse des im Substrat enthaltene Luziferin durch die Luziferase entstanden ist. Der Messwert wurde in RLU (relative luciferase unit) angegeben und gegen die Proteinkonzentrationen der Lysate normalisiert.

Zum anderen wurde die Aktivität des MIR888-Promotors unter Einfluss des Transkriptionsfaktors E2F1 mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) nach Herstellerangaben untersucht. Hierfür wurden Krebszellen mit pGL4[luc2]-MIR888-Promotor (Firefly-Luziferase), pGL4[hRluc/CMV] (Renilla-Luziferase) und entsprechenden Expressionsvektoren co-transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 1x *Passive Lysis Buffer* (Promega) lysiert und anschließend unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation pelletiert. Zur Messung der beiden Luziferase-Aktivitäten wurden je dreimal 20 µL des Überstandes in Messröhrchen überführt. Anschließend wurde durch das Lumineszenzmessgerät (Berthold Technologie) automatisch zuerst 50 µL LARII, das Substrat der Firefly-Luziferase, injiziert und die Lumineszenz gemessen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 50 µL Stop & Glo Reagent, das Substrat der Renilla-Luziferase, welches gleichzeitig die Firefly-Luziferase inhibierte, und eine erneute Messung der Lumineszenz. Die Firefly-RLU wurden mit Hilfe der Renilla-RLU normalisiert.

2.2.4.2 Proliferations- / XTT-Assay

Für das XTT-Assay wurden Zellen in 96-well Platen ausgesät. Zur Messung der Viabilität bzw. der Proliferation wurden das *TACS XTT Kit* (Trevigene) nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden mit dem XTT-Reagenz für zwei Stunden bei 37° C inkubiert, wodurch in vitalen Zellen die Umwandlung von XTT zu Formazan stattfand. Die Menge des gebildeten Formazans wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe des Tecan Sparks (Tecan) gemessen und quantifiziert.

2.2.4.3 Invasions- / Boyden-Chamber-Assay

Zur Analyse der motilen Eigenschaften von Zellen wurden Invasionsassays durchgeführt, in denen die Zellen entlang eines chemotaktischen Gradienten durch eine poröse Membran (Porengröße: 8,0 µm) wandern. Hierfür wurden Tumorzellen in serumfreiem Medium in einem Zellkultureinsatz auf einer mit Matrigel-beschichteten Membran ausgesät und dieser in 6-Well-Platten mit 20%-igem FBS-Medium gehängt. Der eingestellte FBS-Gradient dient als Anreiz zur Migration und bewirkt eine gerichtete Zellbewegung. Sofern die Zellen zur Invasion befähigt sind, verdauen Sie das Matrigel und gelangen auf die Membran. Anschließend migrieren sie durch dessen Poren, und können auf der gegenüberliegenden Seite der Membran detektiert werden. Für die Beschichtung wurde das flüssige Matrigel (BD- Bioscience) auf Eis aufgetaut, mit einem bestimmten Volumen an FBS-freiem Medium versetzt, um die Proteinkonzentration des Matrigels auf 3,1 mg/mL einzustellen, und anschließend auf den Zellkultureinsatz gegeben. Nach mindestens 30-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und dem Aushärten des Gels, wurden die Zellen in serumfreiem Medium auf die mit Matrigel-beschichtete Membran gegeben und die Einsätze in FBS (20%)-haltiges Medium gehängt. Nach 36 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden das Matrigel und nicht migrierte Zellen mit einem Wattetupfer entfernt und die Einsätze mit PBS gewaschen. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden Fluoreszenzaufnahmen von der Unterseite der Membran angefertigt und mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) die Anzahl invasiver Zellen bestimmt.

2.2.4.4 Migrations- / Scratch-Assay

Um einen Aufschluss über das Migrationsverhalten von Zellen zu erhalten, wurde ein Scratch, auch Wundheilungsassay genannt, durchgeführt. Hierfür wurden 2-Well-Silikon-Zellinserts (IBIDI) verwendet, in denen die Zellen ausgesät wurden. Nachdem etwa 90% Konfluenz erreicht war, wurden die Inserts entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde frisches Nährmedium, das mit dem Proliferationshemmer Aphidicolin (5µg/mL) versetzt wurde, dazugegeben und die Größe der Spalte mit dem Durchlichtmikroskop dokumentiert. Diese Messungen wurden nach 24 Stunden wiederholt. Die Migration der Zellen wurde als Reduktion der Wunde in jedem Bild mit Hilfe der Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) gemessen.

2.2.5 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur-Assay

2.2.5.1 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Pulsfeldgelelektrophorese wurde durch das Institut für Medizinische Strahlenbiologie (Leiter: Prof. Dr. med. George E. Iliakis) der Universitätsmedizin Essen nach Standardprotokoll (Singh et al., 2011) durchgeführt. Zur Bestimmung der DSB-Reparaturkinetik wurden die entsprechenden Krebszelllinien mit 20 Gy bei Raumtemperatur bestrahlt und anschließend für 0 bis 4 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, in serum-freien, HEPES-gepufferten Medium in einer Konzentration von 6×10^6 Zellen/mL resuspendiert und mit einem gleichen Volumen vorgewärmter 1% *low-melting*-Agarose (BioRad) gemischt. Die Zellsuspensionen wurden in Glasröhrchen mit 3 mm Durchmesser pipettiert, auf Eis zum Erstarren gebracht und dann in 5 mm lange zylinderförmige Blöcke geschnitten. Für die Bestimmung der Strahlendosiswirkung wurden die Zellen zuerst in Agarose-Gelblöcken gebettet und dann mit 0, 10, 20 oder 30 Gy bestrahlt. Alle Agarose-Blöcke wurden mit Lysis-Buffer (10 mM TRIS-HCl pH7.6, 50 mM NaCl, 100 mM EDTA, 2% [v/v] N-Lauroyl-Sarkosyl, Proteaseinhibitor) für zunächst eine Stunde bei 4° C, gefolgt von 18 Stunden bei 50° C inkubiert. Sie wurden dann schüttelnd für eine Stunde bei 37° C mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH7.6, 50 mM NaCl, 100 mM EDTA) gewaschen und anschließend mit RNase-Lösung (10 mM Tris-HCl pH7.6, 50 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,1 mg/mL RNaseA) für eine Stunde bei 37° C behandelt.

Für die Pulsfeldgelelektrophorese wurden 0,5% Agarosegele mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid hergestellt, die Geltaschen mit den vorbereiteten Agarose-Blöcken beladen und mit 1% Agarose versiegelt. Die asymmetrische Feldinversionsgelelektrophorese wurde für 40 Stunden bei 8° C durchgeführt. Während dieser Zeit wechselten sich Zyklen von 50 V (1,25 V/cm) für 900 s in die Vorwärtsrichtung mit Zyklen von 200 V (5,0 V/cm) für 75 s in die Gegenrichtung ab. Die Gele wurden mit dem 'Typhoon' (GE Healthcare) gescannt und der Anteil der freigesetzten DNA (FDR) wurde mit ImageQuant 5.2 (GE Healthcare) analysiert. Für die Strahlendosiswirkungskurven wurde der FDR, welcher äquivalent zum Anteil der vorhandenen DSB ist, gegen die Strahlendosis aufgetragen. Mit Hilfe dieser wurde dann die äquivalente Strahlendosis (D_{eq}) berechnet und gegen die Zeit aufgetragen, um die Kurven für die DSB-Reparaturkinetik zu erhalten.

2.2.5.2 Plasmid-basierter NHEJ-Assay

Das NHEJ-Reparatur-Assay wurde mit Hilfe eines fluoreszierenden Reporterkonstruktes, das eine präzise und quantitative Messung der NHEJ-Aktivität zulässt, und nach dem Protokoll von Seluanov, Mao und Gorbunova, 2010 durchgeführt. Das dafür verwendete Plasmid pNHEJ-GFP-Reporter wurde freundlicherweise von Dr. Vera Gorbunova und Dr. Andrei Seluanov (The Gorbunova & Seluanov Laboratory) der Universität Rochester bereitgestellt. Die NHEJ-GFP-Reporterkassette (Abbildung 3) besteht aus einem GFP-Gen mit einem eingefügten Pem1-Genintron und einem adenoviralen Exon, welches von HindIII-Erkennungssequenzen flankiert wird. Die intakte NHEJ-Kassette ist GFP-negativ, da das adenovirale Exon den GFP-Leserahmen unterbricht. Nach der Induktion von DSBs durch HindIII wird das adenovirale Exon entfernt und NHEJ stellt die Funktion des GFP-Gens wieder her.

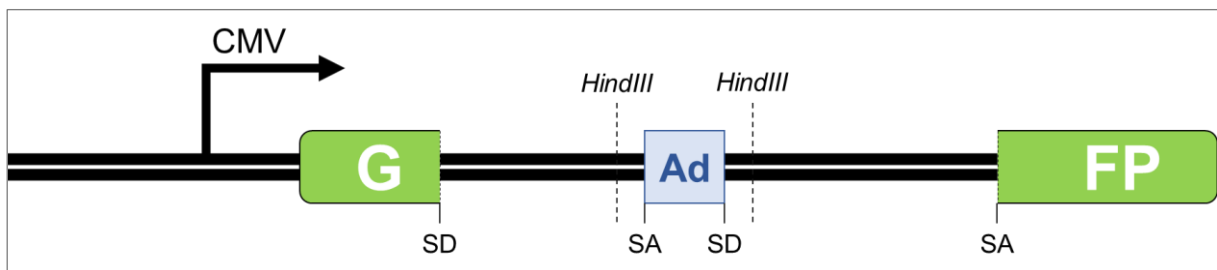


Abbildung 3: NHEJ-Reporterkassette für die Analyse der DSB-Reparatur. Die Reporterkassette besteht aus einem GFP-Gen mit einem eingefügten Pem1-Genintron, welches ein adenovirales Exon enthält, flankiert von HindIII-Erkennungssequenzen. Die intakte NHEJ-Kassette ist GFP-negativ, da das adenovirale Exon den GFP-Leserahmen unterbricht. Nach der Induktion von DSBs durch HindIII wird das adenovirale Exon entfernt und NHEJ stellt die Funktion des GFP-Gens wieder her. **CMV**: Cytomegalovirus-Promoter, **GFP**: offener Leserahmen für grün fluoreszierendes Protein **SD**: Spleißdonor; **SA**: Spleißakzeptor, **Ad**: adenovirales Exon. Eigene Darstellung basierend auf Seluanov, Mao und Gorbunova, 2010.

Für das NHEJ-Reparatur-Assay wurde das pNHEJ-GFP-Reporterplasmid mit HindIII linearisiert und zusammen mit einem TurboRed-Expressionsplasmid in RT-4- und UMUC-3- Zellen mittels Elektroporation eingebracht. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für Durchflusszytometrie (FACS)-Analysen vorbereitet, dafür wurden sie mit Trypsin/EDTA geerntet, zweimal mit PBS gewaschen, in *Cell Staining Buffer* (BioLegend) resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die FACS-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit der *Core Facility* für Zellsortierung und Zellanalyse (Leitung: Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke) der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Die Kalibrierung der FACS-Parameter sowie das *Gating* für die Grün-gegen-Rot-Fluoreszenz-Plots wurden durch die Messung von nur GFP-positiven, nur TurboRed-

positiven und Fluoreszenz-negativen Zellpopulationen erreicht. Anschließend konnte von den mit linearisiertem pNHEJ-GFP-Reporterplasmid und TurboRed-Expressionsvektor co-transfizierten Zellen der Anteil der grünen (GFP+) und roten (RFP+) Zellen ermittelt werden. Dabei entsprach der Prozentsatz der GFP+-Zellen der Effizienz der DSB-Reparatur und der Prozentsatz der RFP+-Zellen zeigte die Effizienz der Transfektion an. Die relative DSB-Reparatureffizienz wurde über das Verhältnis GFP+/RFP+ berechnet.

2.2.6 Bioinformatische und statistische Analysen

Gen- und Promotorsequenzen wurden dem UCSC Human Genome Browser (Kent et al., 2002) oder der miRBase Datenbank (Kozomara, Birgaoanu und Griffiths-Jones, 2019) entnommen. Primersequenzen wurden mit Hilfe der Online-Softwares PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Primer3Plus (Untergasser et al., 2007), QuikChange Primer Design (Novoradovsky et al., 2005) oder MethPrimer (Li und Dahiya, 2002) entworfen. E2F1-Bindestellen wurden mit Cscan (Zambelli et al., 2012), und JASPAR (Fornes et al., 2020) unter Verwendung der offiziellen mRNA-Transkript-IDs (NCBI, 2018), der JASPAR-Positionsgewichtungsmatrix MA0024.1, MA0024.2 bzw. MA0024.3 und eines Bereichs von -1000 bp bzw. -1500 bp bis zum annotierten Transkriptionsstart vorhergesagt. MiRs, die APLF als Zielgen haben, wurden mit Hilfe der Online-Datenbanken TargetScan (McGeary et al., 2019), Diana-microT (Paraskevopoulou et al., 2013) und miRmap (Vejnar und Zdobnov, 2012) identifiziert. MiR-Expressionsprofile in humanen physiologischen Geweben und humanen Blutproben wurden dem Tissue Atlas (Keller et al., 2021) und der DEMC-Datenbank (Yang et al., 2017) entnommen. Die Human Disease Methylation Datenbank DiseaseMeth 2.0 (Xing et al., 2021) wurde zur Untersuchung des Methylierungsstatus des MIR888-Promotors (-1500/±0 bp) verwendet: Array- und NGS-basierte Technologie Experimentelle Plattformen, Kontrollen desselben Gewebes/derselben Zelllinie, t-Test-Methode der differenziellen Analyse, p-Wert von 0,05 und absolute Methylierungsdifferenz > 0,2. Graphen der DBS-Reparaturkinetik (PFGE-Daten) wurden als nicht-lineare Regression von GraphPad Prism dargestellt. FACS-Daten wurden mit Hilfe der FlowJo-Software analysiert (*Gating* und Erstellung der Grün-gegen-Rot-Fluoreszenz-Plots). Patienten-RNA-Seq-Daten aus TCGA-Kohorten mit Blasenkrebs wurden dem Xena-Browser (<https://xenabrowser.net/>) entnommen. Eine hohe (über dem definierten Schwellenwert) oder niedrige (unter dem definierten Schwellenwert) Expression von E2F1 und APLF wurde mit Hilfe des Medians der

Expression definiert. Der Schwellenwert T für E2F1 wurde mit $T = 9,2$ (Median = 9,124) und für APLF wurde mit $T = 6,0$ (Median = 6,22) festgelegt. Die Patienten wurden nach dem kombinierten Expressionsmuster von E2F1 und APLF gruppiert. Die Kurven der Überlebensraten und der rezidivfreien Überlebensraten wurden nach der Kaplan-Meier-Methode analysiert. Mit GraphPad Prism wurden alle Diagramme erstellt und alle Signifikanzlevel berechnet. Dafür wurde je nach Datenlage ungepaarten T-Tests, Mann-Whitney-U-Tests, einfache oder zweifache Varianzanalysen mit Bonferroni-Korrektur oder Log-Rank-Tests mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

3. ERGEBNISSE

Die ambivalente Natur des Transkriptionsfaktors E2F1 als Zellzyklusregulator und Promotor der Tumorprogression ist in zahlreichen Studien demonstriert worden. Neben seiner Funktion als Regulator des Zellzyklus und der Apoptose unterstützt E2F1 die durch homologe Rekombination (HR)-vermittelte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), indem es HR-relevante Gene transaktiviert (Yang, Lin und Lin, 2008, Choi und Kim, 2019), Reparaturfaktoren rekrutiert (Chen et al., 2011) und ein aktiver Bestandteil des DSB-Reparaturkomplexes ist (Biswas und Johnson, 2012, Manickavinayaham, Dennehey und Johnson, 2021). Die pro-metastatische Aktivität von E2F1 wird unter anderem im Blasenkarzinom (BC) deutlich. Eine hohe E2F1-Expression korreliert mit der Entwicklung vom oberflächlichen, nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom (NMIBC) zum muskelinvasiven Blasenkarzinom (MIBC, Lee et al., 2010) und der Expression von EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition)-Markern (Khan et al., 2017). MIBCs weisen im Vergleich zu NMIBCs eine erhöhte genomische Instabilität auf, die mit einer fehlerhaften DSB-Reparatur im Zusammenhang steht (Bentley et al., 2009, Bentley et al., 2004). Das gleichzeitige Auftreten von genomischer Instabilität und hohem E2F1-Level deutet entweder auf eine ineffiziente HR-vermittelte DSB-Reparatur oder auf eine Beteiligung von E2F1 an anderen DSB-Reparaturmechanismen, wie das nicht-homologe End-Joining (NHEJ) hin. Um die ambivalenten Funktionen von E2F1 besser zu verstehen, soll in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkungen zwischen E2F1 und DSB-Reparaturwegen mit dem Fokus auf das kanonische NHEJ (c-NHEJ) und deren Auswirkungen auf die Tumorprogression mechanistisch betrachtet werden.

3.1 E2F1 ist ein transkriptioneller Regulator des kanonischen nicht-homologen End-Joinings

3.1.1 Die Expression des Transkriptionsfaktors E2F1 und der Faktoren des kanonischen NHEJ korrelieren im humanen Blasenkarzinom

Das kanonische NHEJ (c-NHEJ) ist neben der HR der zweite Hauptreparaturmechanismus für DSB. Bisher gibt es keine Studien über den Effekt von E2F1 auf das c-NHEJ. Daher wurden zunächst die Auswirkungen der E2F1-Aktivität auf die Invasivität von aus Patienten stammenden metastatischen BC-

Zelllinien in Verbindung mit der Expression von ausgewählten am c-NHEJ-beteiligten Faktoren untersucht. Hierzu wurden Migrations- und Invasionsassays sowie Immunblot- und PCR-Analysen durchgeführt. Die im Nachfolgenden betrachteten c-NHEJ-Faktoren sind entweder ausschließlich an der c-NHEJ-vermittelten Reparatur, aber nicht an alternativen *End-Joining*-Signalwegen (alt-EJ) beteiligt (XRCC6, XRCC5, PRKDC, NHEJ1, XRCC4 und LIG4; Chiruvella, Liang und Wilson, 2013) oder haben eine Endo- und Exonuklease-Aktivität (DCLRE1C und APLF), die für die Bildung stabiler ligierbarer DNA-Enden und damit für die Reparaturkinetik wichtig ist (siehe auch Abschnitt 1.2.1.2, S. 4, Pannunzio, Watanabe und Lieber, 2018, Shibata und Jeggo, 2020, Iles et al., 2007, Hammel et al., 2016).

In Übereinstimmung mit vorherigen Arbeiten (Khan et al., 2017, Lee et al., 2010) zeigen die invasiven BC-Zelllinien T24 und UMUC-3 konträr zu den nicht-invasiven epithelialen BC-Zelllinie RT-4 ein hohes migratorisches und invasives Verhalten (Abbildung 4A) in Verbindung mit hohen endogenen E2F1-mRNA- und Proteinkonzentrationen (Abbildung 4B). Ähnliche Expressionsprofile wie E2F1 weisen auch die c-NHEJ-Faktoren XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4 und LIG4 auf. Sie sind sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in den invasiven Zelllinien T24 und UMUC-3 im Vergleich zu RT-4 meist deutlich erhöht (Abbildung 4 B). Im Gegensatz dazu zeigt APLF ein inverses Expressionsmuster gegenüber E2F1, es ist in den nicht-invasiven RT-4-Zellen signifikant höher exprimiert als in den invasiven T24 und UMUC-3 (Abbildung 4 Mitte).

Diese positive Korrelation zwischen den Proteinkonzentrationen von E2F1 und den c-NHEJ-Faktoren mit Ausnahme von APLF ist auch bei einem erweiterten Panel aus BC-Zelllinien nachweisbar (Abbildung 4 C). Abundant E2F1-exprimierende Zellen (J82, UMUC-3, VM-CUB1) weisen tendenziell hohe Level der c-NHEJ-Faktoren auf, intermediär E2F1-exprimierende Zellen (SW1710, T24, HT1197) zeigen eine schwankende aber tendenziell niedrigere Expression der c-NHEJ Faktoren und RT-4, die wenig E2F1 exprimieren, weisen durchgängig niedrige Proteinlevel der c-NHEJ-Faktoren auf. Darüber hinaus besteht bei allen hier untersuchten BC-Zelllinien auf Proteinebene eine negative Korrelation zwischen APLF und E2F1: mit ansteigender E2F1-Konzentration sinkt die APLF-Expression.

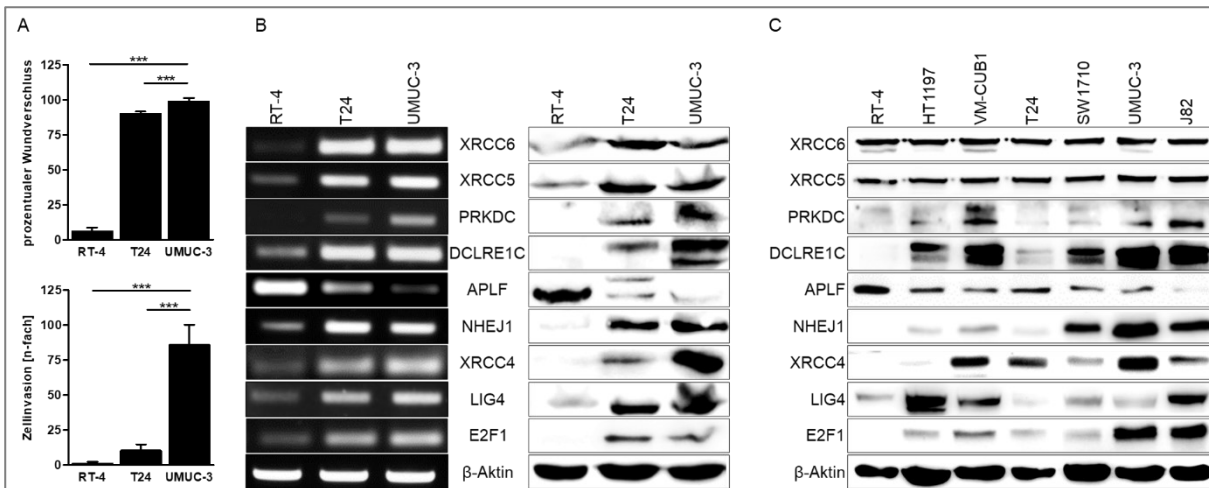


Abbildung 4: Korrelation zwischen E2F1 und kanonischen NHEJ-Faktoren im humanen Blasenkarzinom (A) Zellmigrations- (oben) und Invasionsassays (unten) für die humanen Blasenkarzinomzelllinien RT-4, T24, UMUC-3. Der Fold Change ist relativ zu den Werten der RT-4-Zellen berechnet (auf eins gesetzt). **(B)** semiquantitative PCR (links) und Immunblots (rechts) zur Bestimmung der endogenen mRNA- und Proteinkonzentrationen der kanonischen NHEJ-Faktoren und E2F1 von RT-4, T24 und UMUC-3 bzw. **(C)** von einem erweiterten Panel aus humanen Blasenkarzinomzelllinien (RT-4, HT1197, VM-CUB1, T24, SW1710, UMUC-3 und J82). Beta-Aktin dient jeweils als Ladekontrolle. Signifikanzlevel sind mittels einer einfachen Varianzanalyse (one-way ANOVA) und anschließender Bonferroni-Korrektur $n=3$ bestimmt worden (***) $p < 0,001$.

Sowohl die positive Korrelation zwischen E2F1 und den c-NHEJ-Faktoren XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4 und LIG4 als auch die negativ korrelierenden E2F1- und APLF-Level lassen auf eine Regulation des c-NHEJ durch E2F1 schließen. Um diese Regulation zu validieren, wurde E2F1 mittels adenoviraler Vektoren in den nicht-invasiven RT-4-Zellen transient überexprimiert und in invasiven T24- und UMUC-3-Zellen mit Hilfe von shRNA gegen E2F1 transient ausgeschaltet. Anschließend wurde die Überexpression bzw. Ablation von E2F1 sowie die Expression der c-NHEJ-Faktoren in Verbindung mit der Zellinvasionsfähigkeit mittels funktionellen Assays, qPCR- und Immunblot-Analysen untersucht.

In der Tat führte die Zugabe von E2F1 in den nicht-invasiven RT-4-Zellen neben einer signifikant erhöhten Zellinvasivität (Abbildung 5 A) zu einer deutlich erhöhten mRNA- und Proteinkonzentration der c-NHEJ-Faktoren XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4 und LIG4 im Vergleich zur Kontrolle. APLF bildet erneut eine Ausnahme, da mit gesteigerter E2F1-Expression die APLF-Konzentration eindeutig abnimmt (Abbildung 5 B und C). Parallel dazu zeigen die E2F1-depletierten T24- und UMUC-3-Zellen ein signifikant verringertes invasives Wachstum (Abbildung 5 A) in Verbindung mit einer deutlichen Expressions-Abnahme der untersuchten c-NHEJ-Faktoren, sowie einer gesteigerten APLF-Expression relativ zu den jeweiligen Kontrollen (Abbildung 5 B und C).

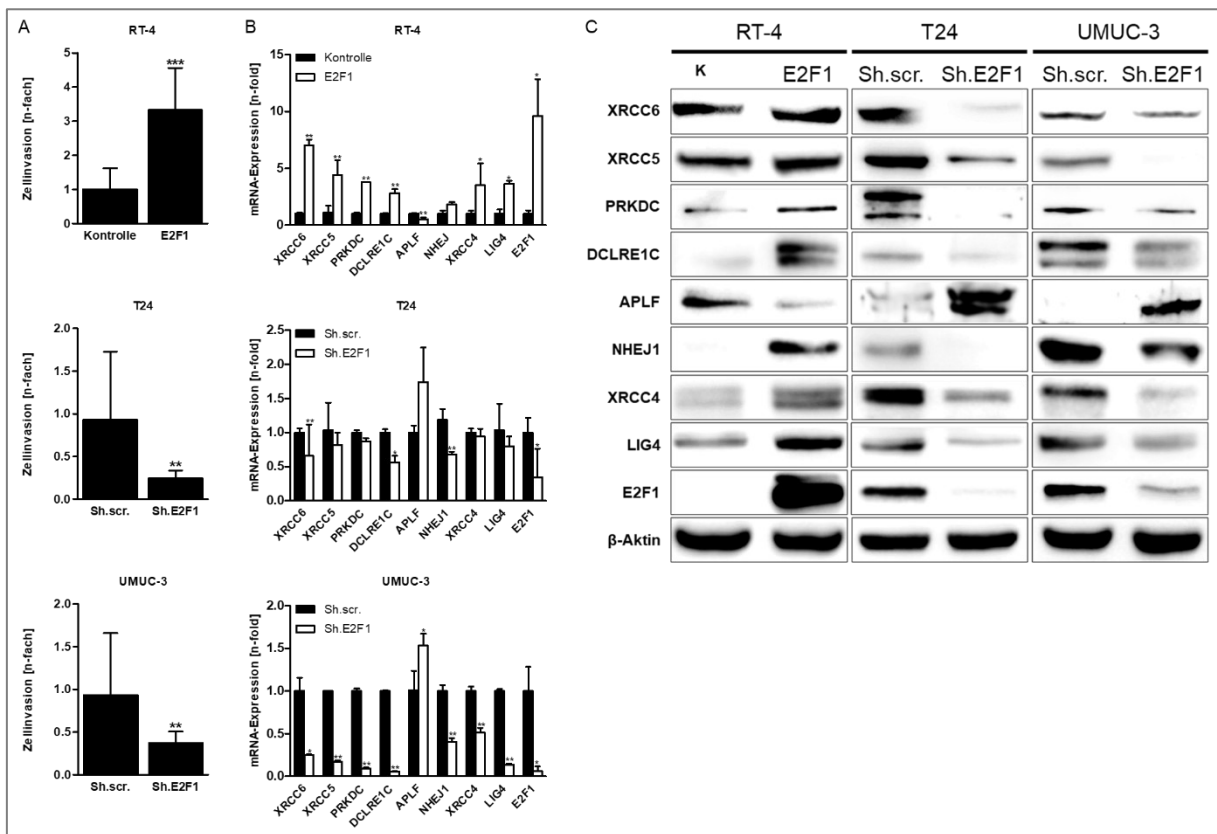


Abbildung 5: E2F1 reguliert essentielle Faktoren des c-NHEJ (A) Invasionsassay, (B) qPCR und (C) Immunblots zur Bestimmung der mRNA- und Proteinkonzentrationen der kanonischen NHEJ-Faktoren, E2F1 und die Ladekontrolle β -Aktin in RT-4-Zellen nach transienter E2F1-Überexpression, in T24- und UMUC-3-Zellen nach transienter E2F1-Ablation mittels shRNA (Sh.E2F1) jeweils im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Fold Changes sind relativ zu den entsprechenden Kontrollen berechnet. Signifikanzlevel sind mit Hilfe von ungepaarten T-Tests bzw. zweifachen Varianzanalysen (two-way ANOVA) und anschließender Bonferroni-Korrektur $n=9$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) bestimmt worden.

Insgesamt gesehen führt eine hohe E2F1-Konzentration in humanen BC-Zellen zu einer gesteigerten Expression aller hier untersuchten c-NHEJ-Faktoren. Eine Ausnahme stellt APLF dar, dessen Expression bei erhöhtem E2F1-Level abnimmt.

3.1.2 E2F1 ist ein direkter Transaktivator der c-NHEJ-Faktoren aber gleichzeitig ein indirekter negativer Regulator von APLF

Die starke Korrelation zwischen den c-NHEJ-Faktoren und E2F1 lässt auf eine transkriptionelle Regulation durch E2F1 schließen. Daher wurden die Promotor-Regionen der c-NHEJ-Faktoren *in silico* mit Hilfe der Online-Datenbanken Cscan (Zambelli et al., 2012), UCSC Human Genome Browser (Kent et al., 2002) und JASPAR (Fornes et al., 2020) sowie *in vivo* mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) untersucht.

Cscan ist eine Online-Datenbank mit genomweiten *ChIP-seq*-Datensätzen, die es ermöglicht gemeinsame Regulatoren einer Gruppe von Genen aufzufinden (Zambelli et al., 2012). Für die hier untersuchten acht c-NHEJ-Faktoren gibt es 53 annotierte Transkripte (NCBI, 2018), von denen 16 in der Cscan-Transkriptdatenbank enthalten sind. Effektiv wurden nur 10 Input-Transkripte für die Cscan-Analyse verwendet, da mehrere Transkript-IDs für dieselbe zu analysierende genomische Region existieren und somit als eine betrachtet werden. Als einziger c-NHEJ-Faktor verblieb LIG4 mit drei verschiedenen Transkript-IDs (siehe Anhang S. XXIV). Insgesamt konnten 103 Transkriptionsfaktoren aus 263 unterschiedlichen *ChIP*-Experimenten als überrepräsentiert in den genomischen Regionen -1000 bis zum annotierten Transkriptionsstart der c-NHEJ-Faktoren identifiziert werden. Abbildung 6 A zeigt die *Hitmap* für diese *ChIP*-Experimente je Input-Transkript. Nur sieben Transkriptionsfaktoren (aus 15 *ChIP*-Experimenten) wurden als signifikant ($p < 0,05$ BONF.pvalue dunkelgrün) überrepräsentiert gefunden, wobei allein NF-E2 als möglicher gemeinsamer Regulator für alle acht c-NHEJ-Faktoren mit neun von zehn Hits (kein Hit bei NM_003401_LIG4) in Frage kommt. E2F1 (HA-E2F1, grün hinterlegt) hat zwar ein *ChIP-seq Peak*-Signal bei acht von zehn Promotorregionen ist aber mit einem p-Wert von 0,143 nicht signifikant überrepräsentiert. Da die zwei fehlenden Promotorregionen eines der drei LIG4-Transkripte und APLF sind, und da die E2F1- und APLF-Expression negativ korreliert (siehe Abschnitt 3.1.1, S. 42), wurde die Cscan-Analyse ohne APLF wiederholt (Abbildung 6 B). Es wurden 101 Transkriptionsfaktoren aus 247 *ChIP*-Experimenten als überrepräsentiert identifiziert. Sieben Transkriptionsfaktoren (aus 14 *ChIP*-Experimenten) sind signifikant ($p < 0,05$ BONF.pvalue dunkelgrün) überrepräsentiert unter anderem auch E2F1 (HA-E2F1, grün hinterlegt) mit einem p-Wert von 0,02 und acht von neun Hits, wobei wieder nur eine der drei LIG4-Transkripte (NM_003401) fehlt. Der Ausschluss von APLF führt somit zur Einstufung von E2F1 zu einem gemeinsamen Regulator der untersuchten c-NHEJ-Faktoren XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4 und LIG4.

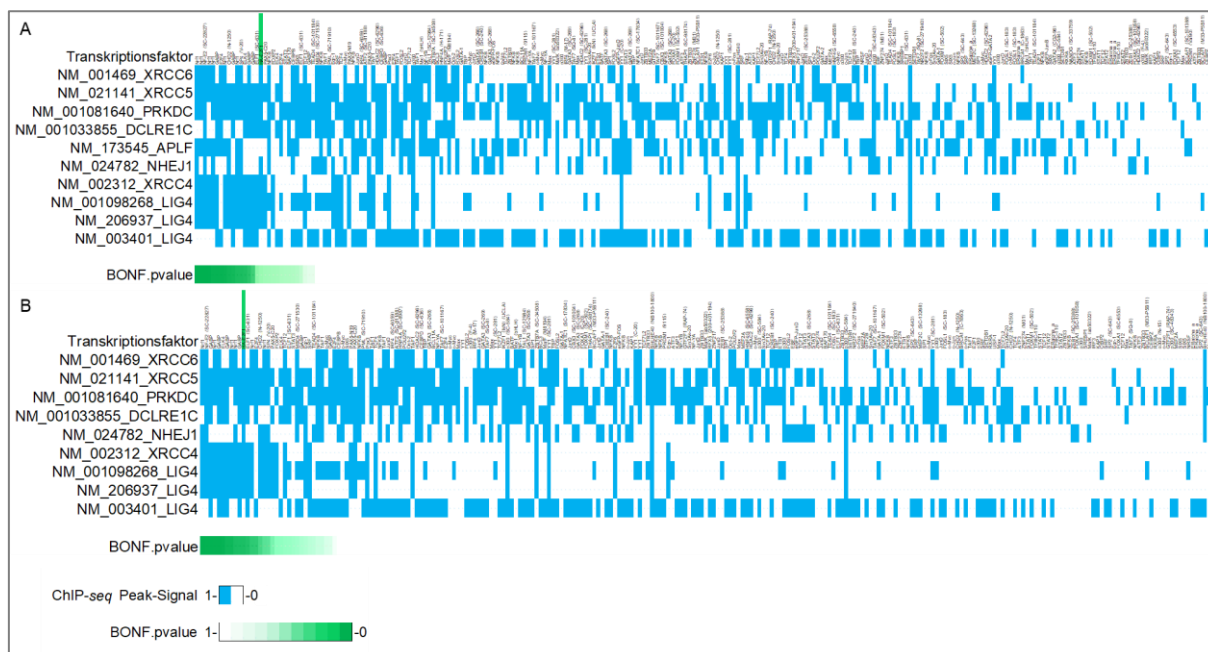


Abbildung 6: Cscan-Hitmap überrepräsentierter Transkriptionsfaktoren der c-NHEJ-Faktoren (A) ChIP-Experimente je c-NHEJ-Input-Transkript mit APLF oder (B) ohne APLF. „Blau“ ChIP-Experiment weist eine Anreicherung der genomischen Region -1000 bp bis zum annotierten Transkriptionsstart des jeweiligen Input-Transkriptes auf, ansonsten „weiß“. Signifikanzlevel (Bonferroni-Korrektur) sind als grüne Balken dargestellt dabei sind p-Werte <0,05 dunkelgrün.

Die ChIP-seq-Daten weisen darauf hin, dass die Promotoren der untersuchten c-NHEJ-Faktoren außer APLF E2F1-Bindestellen besitzen und verstärken die Annahme, dass E2F1 die c-NHEJ-Faktoren transkriptionell reguliert.

Daher wurde im nächsten Schritt die Promotorregionen der c-NHEJ-Faktoren im Detail betrachtet. Abbildung 7 zeigt jeweils schematisch den Aufbau der Promotorregion -1000 bp bis zum annotierten Transkriptionsstart der c-NHEJ-Genloci. Mit Hilfe des UCSC Genome Browsers und JASPAR wurden CpG Islands (grün), *cis*-regulatorische Elemente: Promotor-ähnliche Signaturen (rot) und proximale *Enhancer*-ähnliche Signaturen (orange) (Kent et al., 2002) sowie potentielle E2F1-Bindestellen mit Bindungsaffinitäten (Fornes et al., 2020) identifiziert. Alle Promotorregionen weisen potentielle E2F1-Bindestellen mit einem Bindungsaffinitäts-Score größer q90 (Gewichtung von 0= keine bis 100= hohe Wahrscheinlichkeit für eine Bindestelle) direkt in Promotor-ähnlichen Signaturen (XRCC6, XRCC5, PRKDC, APLF, XRCC4), in *Enhancer*-ähnlichen Signaturen (DCLRE1C) oder zwischen zwei *cis*-regulatorischen Elementen (NHEJ1, LIG4) auf (Abbildung 7 A).

Die Bindung von E2F1 an diesen potentiellen Bindestellen wurden mit Hilfe von ChIP-Experimenten validiert. Hierfür wurden ChIP-Präzipitate von RT-4-Zellen, in denen E2F1 überexprimiert wurde und UMUC-3 mit ausgeschaltetem E2F1 (Knockdown) sowie den jeweiligen Kontrollen hergestellt. Durch qPCRs für die in Abbildung 7 A

gekennzeichneten Bereiche der jeweiligen Promotorregionen konnte deren Anreicherung in den E2F1-Präzipitaten relativ zu den IgG-Präzipitaten (ChIP Fold Enrichment) nachgewiesen werden. Der 10%-Input repräsentiert die vor der Präzipitation eingesetzte etwa gleiche Menge an DNA. Das E2F1-Zielgen APAF-1 diente als Positivkontrolle (Meier et al., 2014). Durch E2F1-Überexpression in RT-4-Zellen kommt es zu einer signifikant erhöhten Anreicherung der Promotorregionen von XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4, und einer nicht signifikanten jedoch erhöhten Anreicherung der Promotorregion von LIG4 jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Damit übereinstimmend führt die Abnahme von E2F1 in UMUC-3 zu einer deutlich verringerten Anreicherung dieser Promotorregionen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 7 B). Außerdem wurden zwei potentielle E2F1-Bindestellen im APLF-Promotor zwischen -500 und -150 bp (Abbildung 7 A) untersucht. Es konnte jedoch keine Anreicherung dieser Regionen weder in den E2F1-Präzipitaten der RT-4-Zellen (nach Überexpression von E2F1) noch in E2F1-depletierten UMUC-3 bzw. in einer der Kontrollen nachgewiesen werden (Abbildung 7 C).

Zusammengefasst (Abbildung 7 D) bestätigen diese Ergebnisse, dass E2F1 an die Promotoren von XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4 und LIG4 binden kann und diese direkt transaktiviert. Gleichzeitig wird die APLF-Expression durch eine indirekte nicht-transkriptionelle Aktivität von E2F1 gehemmt.

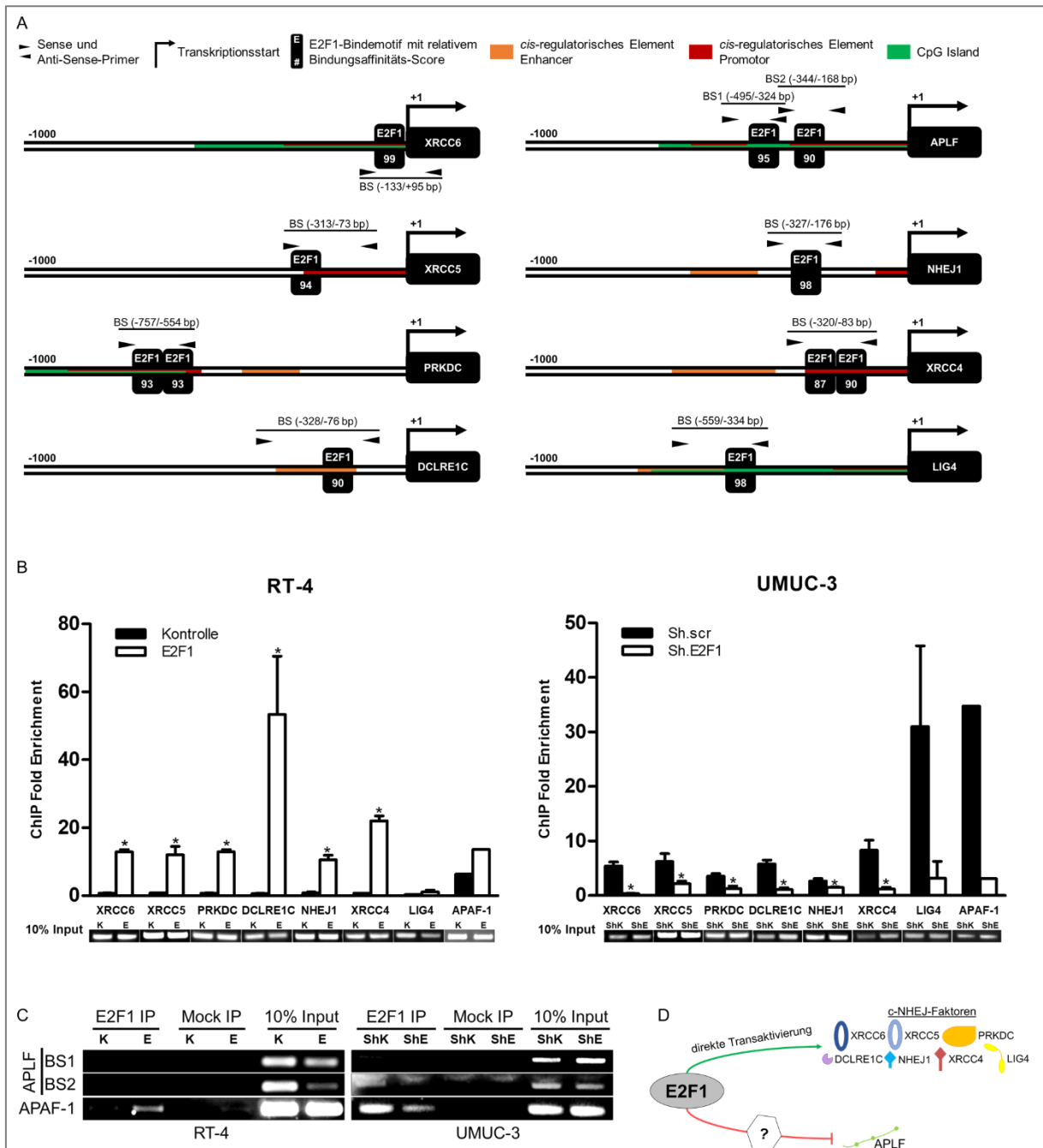


Abbildung 7: E2F1 ist ein direkter Transaktivator der essentiellen c-NHEJ-Faktoren aber gleichzeitig ein indirekter negativer Regulator von APLF (A) Schematischer Aufbau der Promotorregion der c-NHEJ-Faktoren 1000 bp stromaufwärts bis zum annotierten Transkriptionsstart (+1) mit CpG Islands (grün), cis-regulatorische Elemente: Promotor-ähnliche Signaturen (rot), proximale Enhancer-ähnliche Signaturen (orange), potentiellen E2F1-Bindestellen und Primerbindestellen für ChIP-qPCRs. **(B)** ChIP-qPCR dargestellt als ChIP Fold Enrichment (CT-Werte der E2F1-Präzipitate relativ zu denen der IgG-Präzipitate) und **(C)** ChIP-PCR für RT-4-Zellen nach transienter E2F1-Überexpression (E, links), UMUC-3-Zellen nach transienter E2F1-Ablation mittels shRNA (ShE, rechts) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (k, ShK), 10%-Input als Repräsentation der vor der Präzipitation eingesetzten DNA-Menge und APAF-1 als Positivkontrolle. Signifikanzlevel sind mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Bonferroni-Korrektur $n=8$ (* $p < 0,05$) bestimmt worden. **(D)** Möglicher Mechanismus für den Einfluss von E2F1 auf die c-NHEJ-Faktoren.

3.2 Eine E2F1-induzierte Transaktivierung des APLF-Inhibitors hsa-miR-888-5p wird durch die Hypomethylierung des MIR888-Promotors ermöglicht

Es gibt zwei Möglichkeiten wie E2F1 APLF indirekt negativ regulieren kann. Entweder hemmt es einen APLF-Aktivator oder es aktiviert einen APLF-Inhibitor. Das zweite Szenario scheint wahrscheinlicher, da bekannt ist, dass E2F1 in Netzwerke mit negativen Genregulatoren, sogenannten microRNAs (miRs), involviert ist (Knoll, Emmrich und Pützer, 2013). MiRs sind 20 bis 24 Nukleotid lange nicht-kodierende RNA-Moleküle, die meistens an 3'UTRs von mRNAs binden und dadurch deren Translation hemmen oder Abbau induzieren können. Sie sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, unter anderem auch an der Krebsentwicklung, beteiligt (Lee, Feinbaum und Ambros, 1993, Esquela-Kerscher und Slack, 2006, Adams, Kasinski und Slack, 2014, Budakoti et al., 2021). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob APLF durch eine E2F1-regulierte miR inhibiert werden kann.

3.2.1 Hsa-miR-888-5p ist ein negativer Regulator von APLF im humanen Blasenkarzinom

Es gibt mehr als 30 verschiedene Algorithmen und eine Vielzahl von Online-Datenbanken zur Vorhersage von miR-Zielgenen, jedoch unterscheiden sie sich bei der Bestimmung von Interaktionswahrscheinlichkeiten und der Anzahl der Ziele. Laut einer Studie von Fan und Kurgan (2015) sind die drei zuverlässigsten Datenbanken zur Vorhersage von miR-Zielgenen TargetScan (McGeary et al., 2019), Diana-microT (Paraskevopoulou et al., 2013) und miRmap (Vejnar und Zdobnov, 2012). Daher wurden diese benutzt um miRs vorherzusagen, die die 3'UTR von APLF binden und damit potentielle Inhibitoren von APLF sind. Bei einem rigiden Schwellenwert von 95% als Vorhersage-Score wurde von TargetScan, Diana-microT und miRmap 79, 9 bzw. 47 miRs vorhergesagt (siehe Anhang S. XXVI), dabei wurden nur hsa-miR-888-5p und hsa-miR-4657 von allen drei Datenbanken gefunden, die die APLF-3'UTR binden (Abbildung 8 A). Expressionsdaten aus dem Gewebeatlas für miRs (Tissue Atlas, Keller et al., 2021) zeigen, dass beide miRs normalerweise nur gering in physiologischen Geweben exprimiert werden (Abbildung 8 B). Im Gegensatz zu hsa-miR-4657 zeigt hsa-miR-888-5p eine Gewebe-spezifisch erhöhte Expression, die sich neben Hoden auf einige wenige Gewebetypen wie Nieren, Bauchspeicheldrüse und Schilddrüse beschränken (Abbildung 8 B oben). Beide miRs sind im normalen

Blasengewebe nur schwach exprimiert. Diese Unterschiede fanden sich laut DEMC-Datenbank auch bei Expressionsanalysen mit Blutproben von Krebspatienten und gesunden Probanden (Yang et al., 2017). Danach wurde eine erhöhte Expression von hsa-miR-888-5p bei 14 verschiedenen Krebsarten einschließlich dem Blasenkarzinom detektiert (Abbildung 8 C). Im Gegensatz dazu zeigt hsa-miR-4657 in Patienten mit den getesteten Tumortypen gleich hohe bzw. teilweise sogar niedrigere Blutkonzentrationen im Vergleich zum Normalblut (Abbildung 8 C). Weiterhin weisen die invasiven BC-Zelllinien T24 und UMUC-3 konträr zu den nicht-invasiven epithelialen BC-Zelllinie RT-4 etwa 20 - 40-fach höhere endogene hsa-miR-888-5p-Expressionslevel auf (Abbildung 8 D), was dem E2F1-Expressionsprofil ähnelt (Abbildung 4B).

Weiterhin wurde in mehreren Publikationen demonstriert, dass hsa-miR-888-5p in verschiedenen Krebsarten hochreguliert ist und zu den sogenannten OncomiRs zählt, die die Tumorprogression unterstützen (Bobowicz et al., 2016, Cao, 2019, Hasegawa et al., 2018, Hovey et al., 2015, Huang und Chen, 2014, Lewis et al., 2014, Li et al., 2019b). Dies bedeutet möglicherweise, dass der potentielle APLF-Inhibitor hsa-miR-888-5p während der durch E2F1-induzierten Tumorprogression dereguliert wird. Folglich erscheint hsa-miR-888 ein vielversprechender Kandidat zu sein, um die Inhibierung von APLF im Zusammenhang mit E2F1 im humanen Blasenkarzinom mechanistisch zu untersuchen.

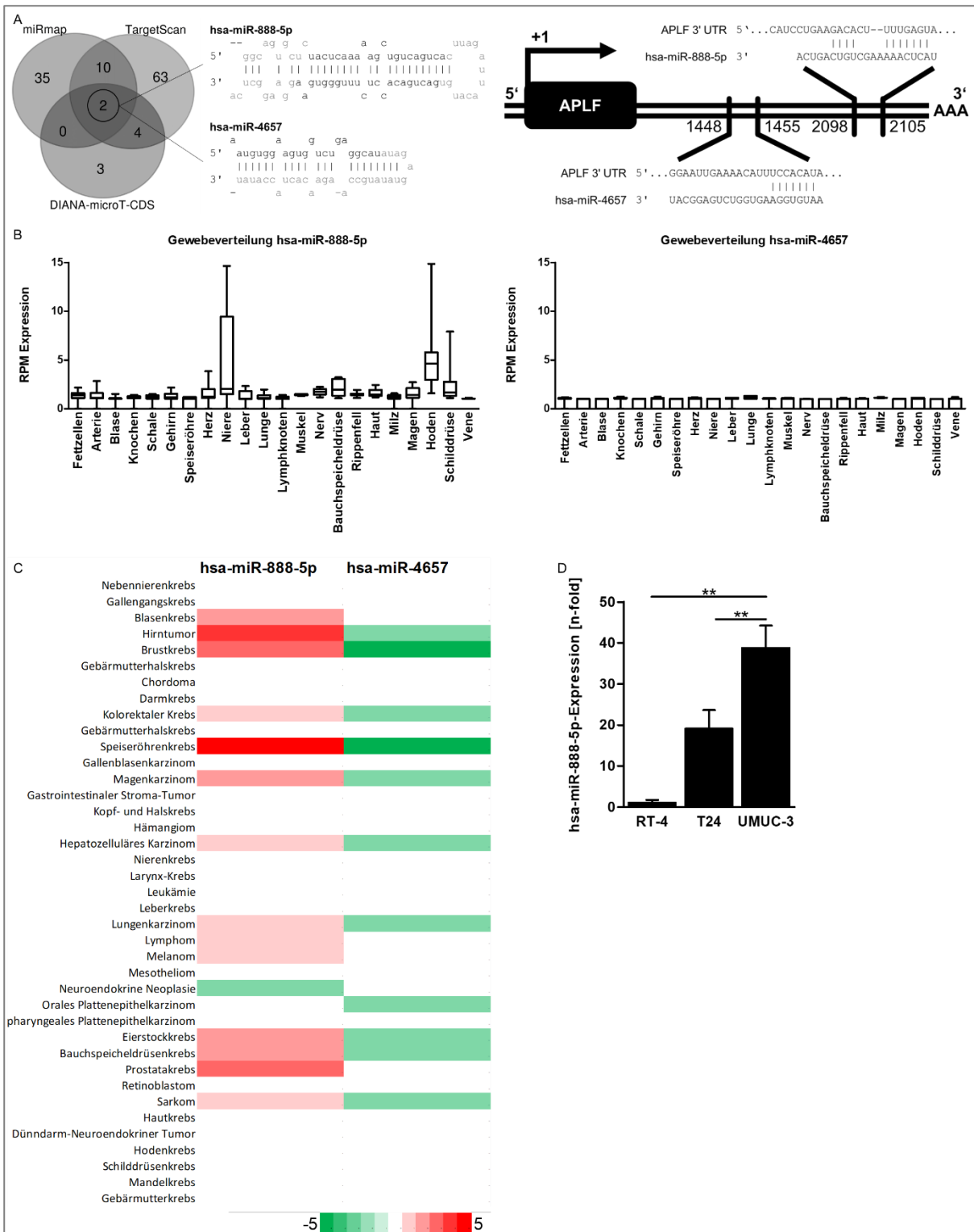


Abbildung 8: Identifikation von hsa-miR-888-5p als potentieller APLF-Inhibitor (A) Venn-Diagramm der drei Vorhersagealgorithmen (TargetScan, Diana-microT und miRmap) zur Identifikation von miRs, die APLF als potentielles Zielgen haben (links) mit den *stem loop*-Sequenzen der beiden potentiellen miRs hsa-miR-888-5p und hsa-miR-4657, entnommen aus der miRBase-Datenbank (Mitte) und der vorhergesagten konsequente Paarung von APLF 3'UTR und den miRs, entnommen aus der TargetScan-Datenbank. Expressionsdaten von hsa-miR-888-5p und hsa-miR-4657 in **(B)** physiologischen Geweben entnommen aus der Tissue Atlas Datenbank und **(C)** im Blut von Krebspatienten entnommen aus der DEMC-Datenbank. **(D)** Nachweis der hsa-miR-888-5p Expression mittels TaqMan® MicroRNA Assay in den BC-Zelllinien RT-4, T24 und UMUC-3. Der Fold Change ist relativ zu den Werten der RT-4-Zellen berechnet (auf eins gesetzt). Signifikanzlevel sind mittels einer einfachen Varianzanalyse (one-way ANOVA) und anschließender Bonferroni-Korrektur n=3 bestimmt worden (** p<0,01).

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese wurde zunächst die Wechselwirkung zwischen hsa-miR-888 und APLF in BC-Zelllinien mittels qPCR- und Immunblots sowie Luziferase-Assays analysiert. Hierfür wurden zum einen RT-4-Zellen hergestellt, die stabil hsa-miR-888-5p exprimieren. Die Produktion des miR- Expressionsvektors erfolgte über die Amplifikation eines 117 bp großen DNA-Fragments, welches den *stem loop* der hsa-miR-888-5p enthält. Die Sequenz für den *stem loop* wurde der miRBase Datenbank entnommen (Kozomara, Birgaoanu und Griffiths-Jones, 2019) und ist in Abbildung 8 A dargestellt. Über eine Zwischenklonierung in das pcDNA3.1-Plasmid wurde die Sequenz anschließend in den piLenti_GFP2APuro Vektor eingefügt. Zum anderen wurden stabil miRZIP-888-xprimierende T24- und UMUC-3-Zelllinien hergestellt. Bei miRZIP-888 handelt es sich um eine AntagomiR gegen miR-888 (miR-Sequenzen mit antisense-Orientierung zur *seed*-Region). Als Kontrolle wurde eine entsprechende miR-scramble Sequenz (miR-scr) verwendet. Nach lentiviraler Transduktion der Zellen wurden Einzelklonkulturen generiert (n=3) und die hsa-miR-888-5p Expression mithilfe des TaqMan® microRNA Assays verifiziert (Abbildung 9 A).

Wie in Abbildung 9 A und B dargestellt, führt die Überexpression von hsa-miR-888-5p in RT-4-Zellen zu einer 40%-igen Abnahme der APLF mRNA-Expression und deutlich niedrigeren APLF-Proteinkonzentration im Vergleich zu den RT-4-Kontrollzellen. In Übereinstimmung damit weisen hsa-miR-888-5p-depletierte invasive T24 und UMUC-3 für APLF eine signifikant erhöhte mRNA- und Proteinexpression auf. Zur Validierung der Interaktion zwischen hsa-miR-888-5p und der humanen APLF-mRNA wurde ein 314 bp großes APLF-3'UTR-Fragment (Abbildung 9 C unten) amplifiziert, das die vorhergesagte sowie eine weitere miR-888-Bindestelle mit niedrigem Vorhersage-Score (<95%, nicht dargestellt) enthält, und in den pMIR-Report stromabwärts des Luziferase-Gens kloniert. Wie in Abbildung 9 C zu sehen ist, führt die verstärkte Expression von hsa-miR-888-5p in RT-4 zu einer um etwa 40% verminderten Luziferase-Aktivität. In den miR-888-depletierten T24- und UMUC-3-Zellen wurde im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen eine vier- bis siebenfach höheren Reporteraktivität gemessen.

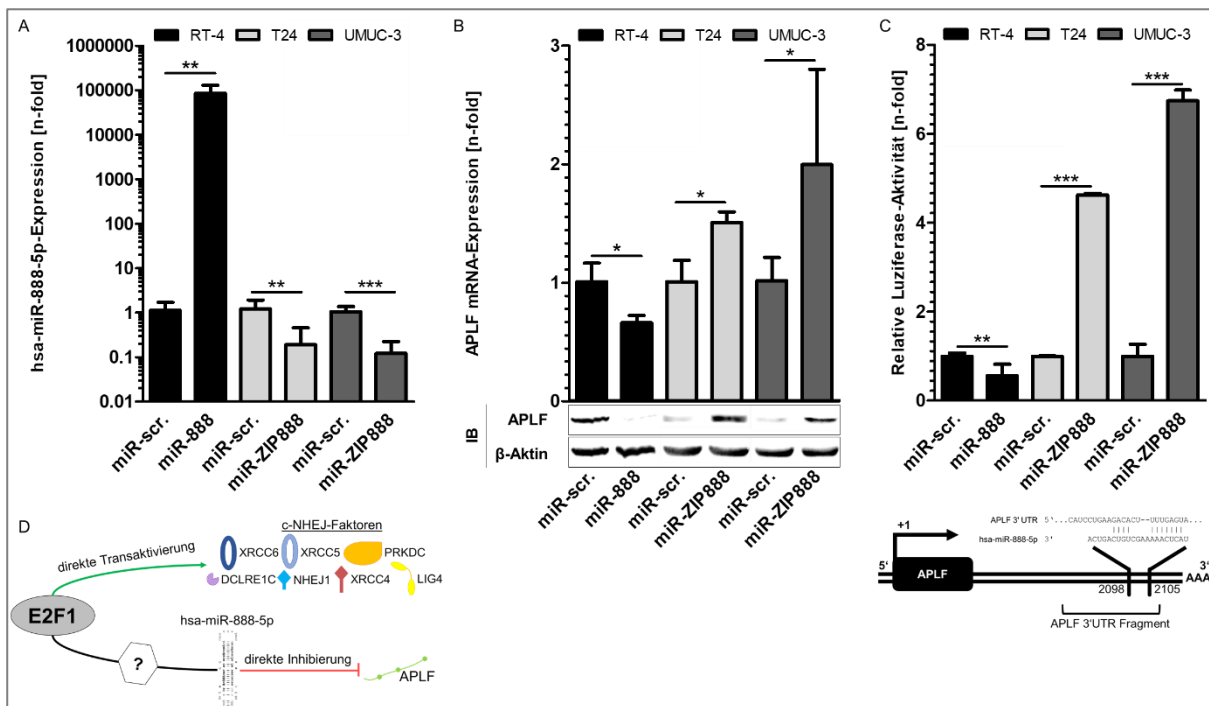


Abbildung 9: Hsa-miR-888-5p ist ein direkter Inhibitor von c-NHEJ-Faktor APLF (A) TaqMan® MicroRNA Assay zur Bestimmung der hsa-miR-888-5p Expression, **(B)** qPCR (oben) und Immunblots (unten) zur Bestimmung der APLF mRNA- und Proteinkonzentrationen sowie **(C)** Luziferase-Assays zur Bestimmung der Interaktion von hsa-miR-888-5p und der APLF-3'UTR in den BC-Zelllinien RT-4, die stabil hsa-miR-888-5p exprimieren, T24 und UMUC-3, die stabil miR-ZIP888, eine AntagomiR gegen hsa-miR-888-5p, exprimieren, jeweils im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (miR-scr.). Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte 24 h nach der Transfektion und wurde gegen die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Ansätze normalisiert. Fold Changes sind relativ zu den entsprechenden Kontrollen berechnet. Signifikanzlevel sind mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) bestimmt worden. **(D)** Möglicher Mechanismus für den Einfluss von E2F1 und hsa-miR-888 auf die c-NHEJ-Faktoren.

Die *in silico*-Analysen konnten somit in humanen BC-Zellen bestätigt werden. Die Gewebe-spezifische hsa-miR-888-5p interagiert mit der APLF-3'UTR und hemmt dadurch die APLF-Expression (Abbildung 9 D). Interessanterweise ist keiner der anderen hier untersuchten c-NHEJ-Faktoren von einem der verwendeten Vorhersagealgorithmen TargetScan (McGeary et al., 2019), Diana-microT (Paraskevopoulou et al., 2013) oder miRmap (Vejnar und Zdobnov, 2012) als Zielgen der hsa-miR-888-5p identifiziert worden, was noch einmal deren hohe Spezifität für APLF unterstützt.

3.2.2 E2F1 hemmt APLF über die Transaktivierung von hsa-miR-888-5p

Die positiv-korrelierenden Expressionsprofile von E2F1 und hsa-miR-888-5p in BC-Zelllinie sowie die verminderten APLF mRNA- und Proteinkonzentrationen aufgrund hoher E2F1- bzw. hsa-miR-888-5p-Expression, lässt auf eine Regulation der hsa-miR-888-5p durch E2F1 schließen. Zur Validierung dieses regulatorischen Signalweges

wurden die Wechselwirkungen zwischen E2F1 und hsa-miR-888 -5p in BC-Zelllinien mittels TaqMan® MicroRNA-Assay und Immunblots, sowie ChIP- und Luziferase-Assays untersucht. Hierfür wurden RT-4-Zellen mit Ad.E2F1 und T24- und UMUC-3-Zellen mit Ad.sh.E2F1 infiziert. Wie in Abbildung 10 A gezeigt, führt die Überexpression von E2F1 in RT-4 zu einer im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich erhöhten hsa-miR-888-5p-Expression. Die Inhibition von E2F1 in den invasiven BC-Zelllinien T24 und UMUC-3 resultiert stattdessen in einer stark verminderten hsa-miR-888-5p-Expression.

In einem nächsten Schritt wurde die Interaktion von E2F1 mit dem *MIR888*-Promotor untersucht. Wie in Abbildung 10 B (oben) dargestellt, weist die *MIR888*-Promotorregion (-1500 bp bis zum annotierten Transkriptionsstart) zwei potentielle E2F1-Bindestellen und ein CpG-Island (grün) auf. Die Bindung von E2F1 an diese potentiellen Bindestellen wurden mit Hilfe von ChIP-Experimenten analysiert. Hierfür wurden ChIP-Präzipitate von RT-4-Zellen mit überexprimiertem E2F1, UMUC-3-Zellen mit E2F1-Knockdown und den jeweiligen Kontrollen hergestellt. Durch PCR-Analysen für die in Abbildung 10 B gekennzeichneten Bereiche konnte deren Anreicherung in den E2F1-Präzipitaten im Vergleich zu IgG-Präzipitaten (Mock-IP) nachgewiesen werden. Der 10%-Input repräsentiert die vor der Präzipitation eingesetzte etwa gleiche Menge an DNA und APAF-1 diente auch hier als E2F1-Bindungskontrolle (Meier et al., 2014). Durch E2F1-Überexpression in RT-4-Zellen kommt es zu einer Anreicherung beider E2F1-Bindestellen im Vergleich zur Kontrolle und der Mock-IP (Abbildung 10 B, Mitte links), während E2F1-depletierte UMUC-3-Zellen eine verringerte Anreicherung beider Regionen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 10 B, Mitte rechts) aufweisen. Zusätzlich wurde ein 371 bp großes Fragment des *MIR888*-Promotors (Abbildung 10 B oben), das die beiden vorhergesagten E2F1-Bindestelle enthält, amplifiziert und in den pGL4[*luc2*]-Vektor stromaufwärts des Luziferase-Reportergens kloniert. Die sequentielle Messung der Luziferase-Aktivitäten erfolgte 24 Stunden nach Co-Transfektion der pGL4[*luc2*]-*MIR888*-Promotor- und pGL4[*hRluc*/CMV]-Vektoren. Die relative Luziferase-Aktivität wurde durch das Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luziferase-Aktivität bestimmt. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen führte die E2F1-Überexpression in RT-4 zu einem Anstieg und die E2F1-Ablation in UMUC-3 zur signifikanten Reduktion der Luziferase-Aktivität im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abbildung 10 B unten).

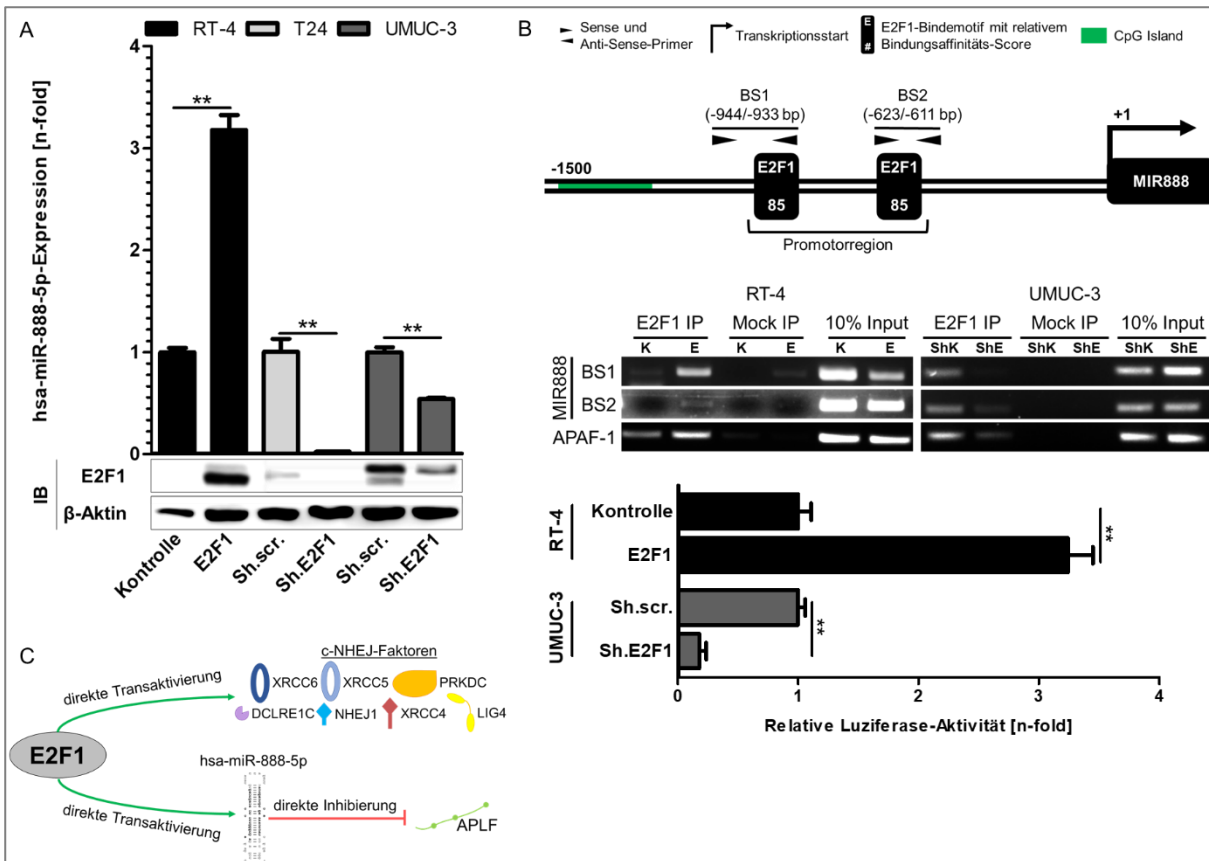


Abbildung 10: E2F1 ist ein direkter Transaktivator der hsa-miR-888-5p (A) TaqMan® MicroRNA und Immunblots zur Bestimmung der hsa-miR-888-5p Expression in RT-4-Zellen nach transienter E2F1-Überexpression, in T24- und UMUC-3-Zellen nach transienter E2F1-Ablation mittels shRNA (Sh.E2F1) jeweils im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (B) Schematischer Aufbau der MIR888-Promotorregion -1500 bp bis zum annotierten Transkriptionsstart (+1) mit CpG Islands (grün), potentiellen E2F1-Bindestellen, Primerbindestellen für CHIP-qPCRs und der für das Luciferase-Assay verwendeten Promotorregion (oben). ChIP-PCR für RT-4-Zellen nach transienter E2F1-Überexpression (E, links), UMUC-3-Zellen nach transienter E2F1-Ablation mittels shRNA (ShE, rechts) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (k, ShK), 10%-Input als Repräsentation der vor der Präzipitation eingesetzten DNA-Menge und APAF-1 als E2F1-Bindungskontrolle (Mitte). Dual-Luciferase® Reporter Assay zur Bestimmung der Interaktion von E2F1 und der MIR888-Promoterregion. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion erfolgte die sequentielle Messung der Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivitäten. Zur Bestimmung der relativen Luciferase-Aktivität wurde das Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luciferase-Aktivität und anschließend Fold Changes zu den entsprechenden Kontrollen berechnet (unten). Signifikanzlevel sind mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (** p<0,01) bestimmt worden. (C) Mechanismus für die Regulation der c-NHEJ-Faktoren durch E2F1 und hsa-miR-888-5p.

Diese Daten weisen darauf hin, dass E2F1 als direkter Transaktivator der c-NHEJ-Faktoren XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4, LIG4 und von hsa-miR-888-5p fungiert, die wiederum APLF inhibiert (Abbildung 10 C).

3.2.3 Die Aktivierung der Gewebe-spezifischen hsa-miR-888-5p wird durch Hypomethylierung des Promotors ermöglicht

Krebsentstehung und Tumorprogression sind nicht nur gekennzeichnet durch genetischen Veränderungen in wichtigen Tumorsuppressor- und Onkogenen, die die

Zellproliferation, DNA-Reparatur, Zelldifferenzierung und andere homöostatische Funktionen regulieren, sondern auch durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung und Histonmodifikationen (Hanahan und Weinberg, 2011). In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von normalerweise stummgeschalteten Gewebe-spezifischen Genen während der Tumorprogression auf epigenetische Veränderungen zurückgeführt werden können (Berdasco und Esteller, 2010, Bert et al., 2013, Rousseaux et al., 2013, Lorient et al., 2014). Damit einhergehend ist bekannt, dass beim Blasenkarzinom häufig epigenetische Modifikationen auftreten und mit veränderten Methylierungsmustern zwischen NMIBC und MIBC assoziiert sind (Knowles und Hurst, 2015, Olkhov-Mitsel et al., 2017). Daher wurde im Folgenden der epigenetische Aspekt der hsa-miR-888-Aktivierung betrachtet. Hierfür wurde der DNA-Methylierungsgrad des *MIR888*-Promotors *in silico* und *in vitro* mittels methylierungsspezifischer PCR untersucht.

Daten aus der Human Disease Methylation Datenbank (Xing et al., 2021) zeigen, dass die *MIR888*-Promotorregion -1500 bp bis zum annotierten Transkriptionsstart beim Blasenkarzinom im Vergleich zu gesundem Blasengewebe hypomethyliert ist (Abbildung 11 A). Damit einhergehend wurde in der *MIR888*-Promotorregion stromaufwärts der E2F1-Bindestellen (-1611 und -1337 bp) ein potentielles CpG-Island (Kent et al., 2002) identifiziert (Abbildung 11 B oben). Methylierungsspezifische-PCRs in RT-4-, T24- und UMUC-3 Zellen, bei denen die Amplifikation des potentiellen CpG-Island mit spezifischen Primern für die unmethylierte oder methylierte Variante des CpG-Island durchgeführt wurde, zeigten bei allen drei Zelllinien schwache Banden für ein methyliertes CpG-Motiv. Stattdessen waren nur bei den invasiven hsa-miR-888-exprimierenden Zelllinien T24 und UMUC-3 prägnante Banden für die unmethylierte CpG-Variante detektierbar (Abbildung 11 B). Zur Validierung des Einflusses des Methylierungsgrades auf die hsa-miR-888-Expression, wurden RT-4 Zellen 120 Stunden mit den Demethylierungsreagenz Azacitidin (AZA) oder DMSO behandelt. Anschließend durchgeführte TaqMan® MicroRNA-Assays und methylierungsspezifische-PCRs zeigten, dass die Demethylierung des im *MIR888*-Promotor gelegenen CpG-Islands zu einem signifikanten Anstieg der hsa-miR-888-5p-Expression im Vergleich zur Kontrolle führte (Abbildung 11 C).

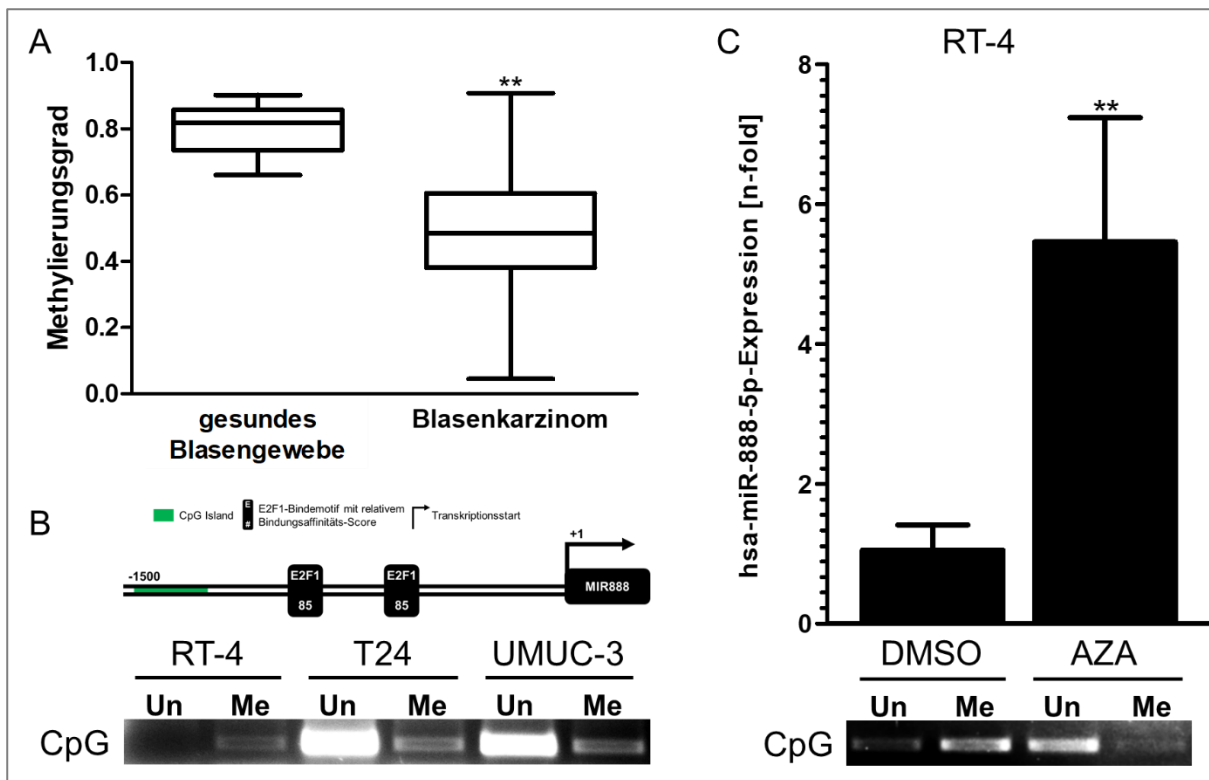


Abbildung 11: Methylierungsgrad der CpG-Island im *MIR888*-Promotor reguliert hsa-miR-888-5p-Expression (A) DNA-Methylierungsgrad der *MIR888*-Promotorregion -1500 bp bis zum annotierten Transkriptionsstart entnommen aus der Human Disease Methylation Datenbank. (B) Schematischer Aufbau der *MIR888*-Promotorregion -1500 bp bis zum annotierten Transkriptionsstart (+1) mit CpG Island (grün) und E2F1-Bindestellen (oben). Methylierungsspezifische PCR der CpG-Island mit spezifischen Primer für die unmethylierte (Un) oder methylierte (Me) Variante der vorhergesagten CpG-Island in RT-4-, T24- und UMUC-3-Zellen. (C) TaqMan® MicroRNA-Assay und Methylierungsspezifische PCR in RT-4-Zellen nach Azacitidin-Behandlung (AZA). Fold Change ist relativ zu der Kontrolle berechnet. Signifikanzlevel ist mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (** $p < 0,01$) bestimmt worden.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass es während der BC-Progression zu einer Hypomethylierung des *MIR888*-Promotors kommt, was diesen für Transkriptionsfaktoren wie E2F1 möglicherweise zugänglicher macht (Héberlé und Bardet, 2019). Dieses Ereignis in Kombination mit der erhöhten E2F1-Expression in invasiven BC-Zellen erleichtert die E2F1-vermittelte Transaktivierung der hsa-miR-888-5p und die damit einhergehende Inhibierung von APLF.

3.2.4 Das gesamte miR-888-Cluster ist im humanen Blasenkarzinom aktiv

Hsa-miR-888 ist Teil eines genomischen Clusters bestehend aus sieben miRs (hsa-miR-892c, hsa-miR-890, hsa-miR-888, hsa-miR-892a, hsa-miR-892b, hsa-miR-891b und hsa-miR-891a), die sich in einer etwa 35 kbp großen Region auf dem Antisense-Strang des humanen X-Chromosoms Xq27.3 befinden (Abbildung 12 A, Kent et al., 2002). Alle sieben miRs wurden in verschiedenen Krebsarten wie dem

hepatozellulären Karzinom, Nephroblastom, Prostata-, Brust-, Bauchspeicheldrüsen-, kolorektalen- und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom entweder als Tumorsuppressor oder Onkogen mit einer Vielzahl von Zielgenen beschrieben (Tabelle 1).

Tabelle 1 Funktion der miRs des miR-888-Clusters in verschiedenen Krebsarten und ihre validierten Zielgene.

miR	F	Krebsart[en]	validierte Zielgene	Referenz
hsa-miR-892c	S	Prostatakrebs	N/A	Hasegawa et al., 2018
hsa-miR-890	S	Prostatakrebs und Triple-negativer Brustkrebs	MAD2L2, WEE1, XPC, CD147	Hasegawa et al., 2018, Wang et al., 2019, Hatano et al., 2015
hsa-miR-888	P	Blasen-, Prostata- und Brustkrebs	APLF, RBL1, KLF5, SMAD4, TIMP2, CHD1	Hasegawa et al., 2018, Lewis et al., 2014, Huang und Chen, 2014, Cao, 2019, Li et al., 2019b, Richter et al., 2019
hsa-miR-892a	P	Prostata- und Kolorektalkrebs, hepatozelluläres Karzinom	CD226, PPP2R2A	Hasegawa et al., 2018, Jia et al., 2017, Liang et al., 2015
hsa-miR-892b	S	Prostata- und Brustkrebs	TRAF2, TAK1, TAB3	Hasegawa et al., 2018, Jiang et al., 2016
hsa-miR-891b	S/P	Prostata-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs, Nephroblastom	PARP1	Hasegawa et al., 2018, Li, Huang und Hang, 2019, Xu et al., 2017
hsa-miR-891a	P	Prostata- und nicht-kleinzelliger Lungenkrebs	N/A	Hasegawa et al., 2018, Lee et al., 2015

F: Funktion, S: Tumorsuppressor, P: Tumorpromotor, N/A: nicht bekannt

Insbesondere beim Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass das gesamte miR-888-Cluster zusammen exprimiert wird und mehrere krebsrelevante Funktionen reguliert (Hasegawa et al., 2018). Interessanterweise befindet sich in der Xq27.3-Region auch eine sogenannte *rare fragile site*, genomische Loci, die besonders anfällig für die Bildung von Lücken oder Brüchen während der Metaphase der Zellteilung sind. An diesen Loci kann es zu Chromosomenumlagerungen, Schwesterchromatid-

austauschen oder auch intrachromosomaler Genamplifikation kommen, die zur genomischen Instabilität der betroffenen Region oder auch des gesamten Chromosoms beitragen (Bjerregaard et al., 2018, Glover, 1998). Daher wurde die miR-Expression sowie die Genkopienzahl des miR-888-Cluster mittels TaqMan® MicroRNA- und Copy Number Variation Assay untersucht.

Expressionsanalysen von drei miRs, die sich am 3'-Ende (miR-892c), mittig (MIR888) und am 5'-Ende (MIR891b) des miR-888-Hauptclusters befinden (Abbildung 12 A, orange markiert), ergaben, dass hoch-invasive UMUC-3 konträr zu RT-4 eine etwa 6- (miR-892c-5p), 50- (miR-888-5p) bzw. 13000- (miR-891b) fach höhere endogene miR-Expression aufweisen (Abbildung 12 B). Zudem besitzen die UMUC-3-Zellen eine veränderte Genkopienzahl der Cluster-miRs. Sowohl RT-4 als auch UMUC-3 entstammen männlichen Spendern (XY, Bairoch, 2018) und sollten daher im Vergleich zur gesunden weiblichen genomischen DNA (XX) eine einfache Kopienzahl von X-Chromosom-ständigen Genen besitzen. Wie in Abbildung 12 C zu sehen, trifft dies für RT-4-Zellen zu, sie weisen eine 1-fache Kopienzahl der drei miR-Loci im Vergleich zur weiblichen genomischen DNA auf. Im Gegensatz dazu zeigen UMUC-3-Zellen eine etwa 1,5-fache Genkopienzahl des miR-888-Clusters.

Genexpressionsanalysen mit Blutproben von Krebspatienten und gesunden Probanden (DEMC-Datenbank, Yang et al., 2017), weisen eine kollektiv erhöhte miR-Expression bei zwölf verschiedenen Krebsarten, unter anderem in den schon genannten Krebsarten (Tabelle 1) auf. Eine Ausnahme davon bilden die Genprodukte der 3'- (miR-892c) und 5'-ständigen (miR-891a) miRs sowie miR-892b (Abbildung 12 D).

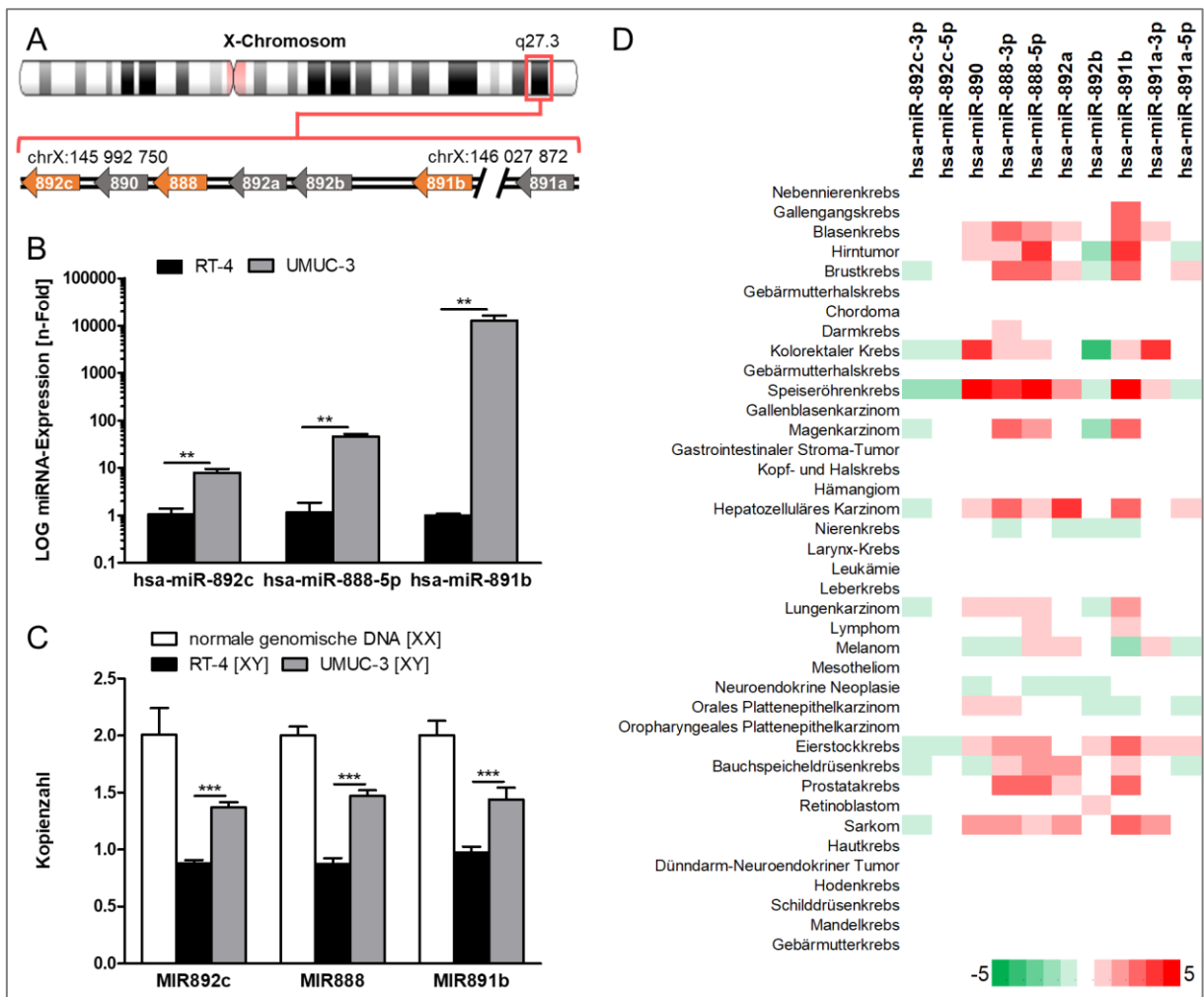


Abbildung 12: Expressions- und Genlocus-Analyse des gesamten miR-888-Clusters (A) Schematische Darstellung des miR-888-Clusters auf dem menschlichen Chromosom Xq27.3 (hg38). **(B)** TaqMan® MicroRNA-Assay und **(C)** Copy Number Variation Assay der orange markierte miRs miR-892c, miR-888 und miR-891b in RT-4- und UMUC-3-Zellen. **(D)** Expressionsdaten aller miRs des miR-888-Clusters im Blut von Krebspatienten entnommen aus der DEMC-Datenbank. Fold Changes sind relativ zu den entsprechenden Kontrollen berechnet. Signifikanzlevel sind mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) bestimmt worden.

Wie schon beim Prostatakrebs beschrieben (Hasegawa et al., 2018) sind auch beim Blasenkarzinom, vor allem in MIBC-Zellen wie UMUC-3, mehrere miRs des miR-888-Clusters zusammen aktiviert. Zudem lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Transaktivierung der Gewebe-spezifischen hsa-miR-888-5p und die damit einhergehende Inhibition von APLF während der BC-Progression durch weitreichende epigenetische (Hypomethylierung) und genomische Veränderungen (Genduplikation) ermöglicht wird.

3.3 Auswirkungen des E2F1/miR-888/APLF-Signalwegs auf die DSB-Reparatur, BC-Progression und Überlebensraten von BC-Patienten

Der Transkriptionsfaktor E2F1 ist ein direkter Transaktivator der c-NHEJ-Faktoren XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4 und LIG4, aber auch der hsa-miR-888-5p, die wiederum APLF inhibiert. Dadurch stört der E2F1/miR-888-Signalweg das relative Verhältnis zwischen den c-NHEJ-Komponenten, indem die essentiellen c-NHEJ-Komponenten hochreguliert, APLF aber depletiert wird.

APLF fungiert sowohl als ein Teil der DNA-Reparaturmaschinerie als auch ein Histon-Chaperon (Iles et al., 2007, Mehrotra et al., 2011). Während der NHEJ-vermittelten DSB-Reparatur verbindet APLF den Ku/DNA-PKcs-Komplex (XRCC5/XRCC6 /PRKDC) mit dem XRCC4/LIG4-Komplex (Hammel et al., 2016). Dadurch stabilisiert es den NHEJ-Reparatur-Komplex an den DSB-Enden und beschleunigt die XRCC4-LIG4-vermittelte DNA-Ligation (Grundy et al., 2013, Rulten et al., 2011). Zudem besitzt APLF Nuclease-Aktivität (Li et al., 2011), weshalb neben DCLRE1C auch APLF für die DNA-Endresektion verantwortlich sein könnte, die für die Bildung kompatibler ligierbarer DNA-Enden und damit für die NHEJ-Reparaturkinetik wichtig ist (Pannunzio, Watanabe und Lieber, 2018, Shibata und Jeggo, 2020).

In der Rolle als Histone-Chaperon kann APLF mit Histone interagieren und den Aufbau von Nukleosomen modulieren (Burgess und Zhang, 2013). Zum einen erleichtert es dadurch die DNA-Reparatur, in dem es die Chromatinstruktur an DSB verändert (Mehrotra et al., 2011, Rulten et al., 2011). Zum anderen beeinflusst APLF die Gentranskription durch Rekrutierung der mit inaktivem Chromatin assoziierten Histon-Variante MacroH2A.1 an Genpromotoren von Pluripotenz- und EMT-Markern (Syed et al., 2016, Varghese et al., 2021), die mit Tumorprogression in Verbindung gebracht werden (Wang et al., 2014, Yin et al., 2015, Roche, 2018). Daher sollten nachfolgend die Auswirkungen des E2F1/miR-888/APLF-Signalwegs auf die DSB-Reparatur sowie die BC-Progression untersucht werden.

3.3.1 Hsa-miR-888 und APLF beeinflussen die DSB-Reparatur im humanen Blasenkarzinom

Um den Einfluss des E2F1/miR-888/APLF-Signalwegs auf die DSB-Reparatur zu untersuchen wurden Pulsfeldgelelektrophoresen (PFGE) und Plasmid-basierte NHEJ-Assays durchgeführt. Hierfür wurden, zusätzlich zu den RT-4- und UMUC-3-

Zellen, die stabil hsa-miR-888-5p bzw. miR-ZIP-888 exprimieren (siehe Abschnitt 3.2.1, S. 50), RT-4-Zellen mit stabiler si.APLF-Expression (APLF-Knockdown durch siRNA gegen APLF) und UMUC-3-Zellen mit stabiler APLF-Expression hergestellt. Nach lentiviraler Transduktion der Zellen wurden Einzelklonkulturen etabliert (n=3) und die APLF-mRNA- und Proteinkonzentration mittels qPCR- und Immunblot-Analysen verifiziert (Abbildung 13 A).

Für die PFGE-Assays, die im Institut für Medizinische Strahlenbiologie (Universitätsmedizin Essen) unter der Leitung von Prof. Dr. med. George E. Iliakis durchgeführt wurden, wurden die Krebszellen mit 0-40 Gy für die Strahlendosiswirkung bzw. 20 Gy für die Reparaturkinetik behandelt und anschließend 0-4 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Strahlendosiswirkung wurde der Anteil der freigesetzten DNA (*fraction of DNA release*, FDR), welcher äquivalent zum Anteil der vorhandenen DSB ist, gegen die Strahlendosis aufgetragen. Mit Hilfe der Strahlendosiswirkungskurven konnte die äquivalente Strahlendosis (*equivalent Gy dose*, D_{eq}) und damit die DSB-Reparaturkinetik berechnet werden.

Die Strahlendosiswirkungskurven zeigen, dass es sowohl bei den RT-4-Zellen mit stabiler si.APLF-Expression als auch bei UMUC-3, mit stabiler miR-ZIP888- und APLF-Expression, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen zu keinen signifikanten Unterschieden bei der Bildung von DSB nach Bestrahlung kommt (Abbildung 13 B und C oben). Auch die DSB-Reparaturkinetik wurde durch die Ablation von APLF in den RT-4-Zellen nicht beeinflusst (Abbildung 13 B unten). Im Gegensatz dazu führt jedoch die Erhöhung der APLF-Expression in UMUC-3-Zellen, sowohl durch die Inhibierung der hsa-miR-888-5p als auch durch die direkte Zugabe von APLF, zu einer verbesserten DSB-Reparatur. Beide Kurven der DSB-Reparaturkinetik zeigen einen geringeren Anteil an unreparierten DSB innerhalb von vier Stunden im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abbildung 13 C unten).

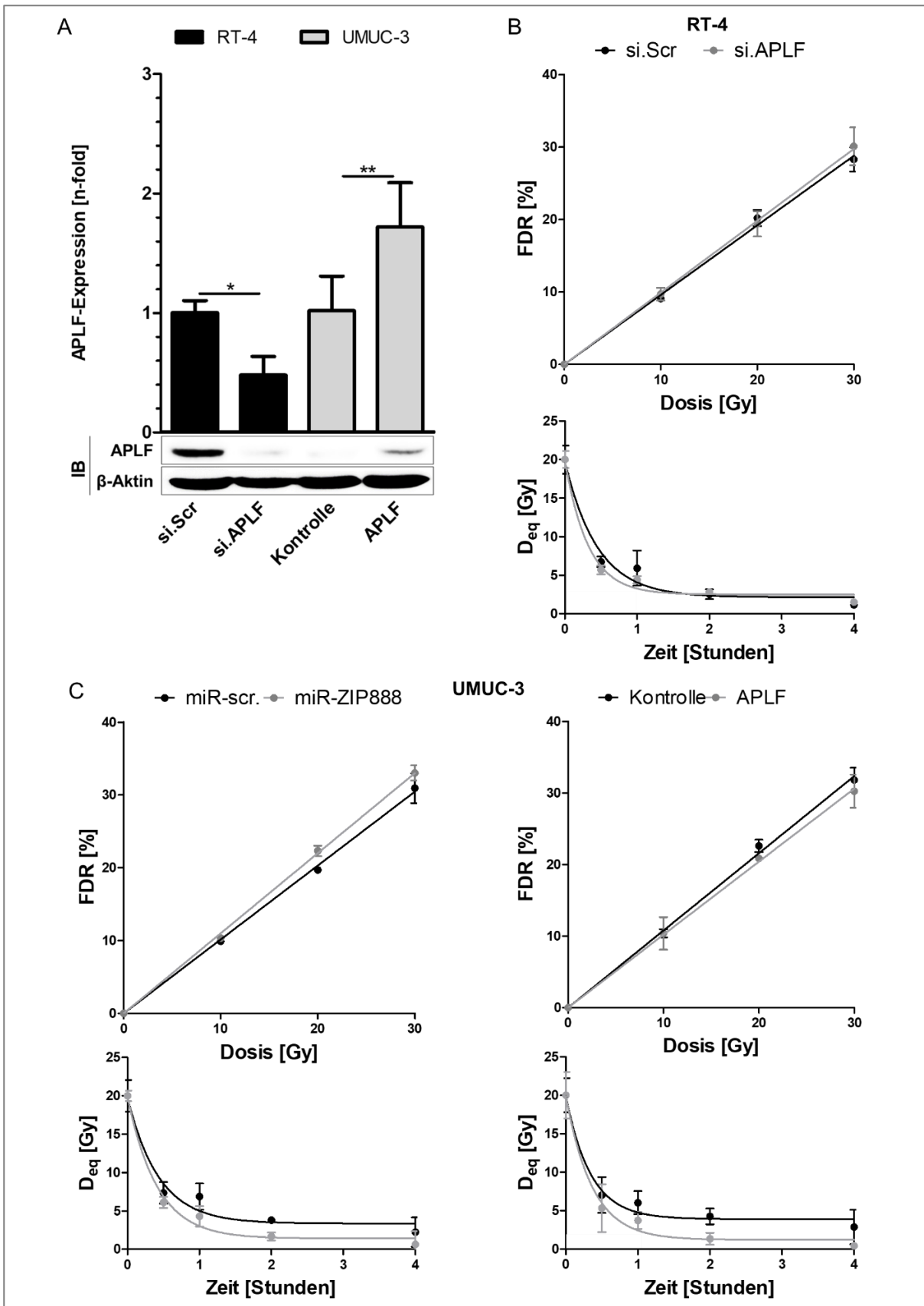


Abbildung 13: Hsa-miR-888-5p und APLF beeinflussen die DSB-Reparatur humaner invasiver BC-Zellen (A) qPCR (oben) und Immunblots (unten) zur Bestimmung der APLF mRNA- und Proteinkonzentrationen in den BC-Zelllinien RT-4, die stabil si.APLF, eine siRNA gegen APLF, exprimieren und UMUC-3, die APLF exprimieren. PFGE-Assays zur Bestimmung der Strahlendosis-Wirkung (oben) und DSB-Reparaturkinetik (unten) in (B) RT-4-Zellen, die stabil si.APLF exprimieren und (C) UMUC-3-Zellen, die stabil miR-ZIP888 (links) oder APLF (rechts) exprimieren.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Expression von hsa-miR-888-5p und APLF die DNA-Reparatur lediglich in invasiven BC-Zellen, nicht aber in nicht-invasiven BC-Zellen beeinflusst. Zu beachten ist dabei jedoch, dass für die PFGE-Assays DSB mittels ionisierender Strahlung verursacht wurden, obwohl RT-4-Zellen hochgradig radioresistent sind. Sie weisen nur eine geringe Bildung von DSB nach Bestrahlung auf, insbesondere im 2D-Zellmodell und bei hohen Strahlendosen >4 Gy (Moneef et al., 2003, Bodgi et al., 2019). Dies spiegelt sich auch in den Dosiswirkungskurven wider, bei allen Dosen weisen RT-4 geringere FDR auf als UMUC-3, so liegt der FDR bei 30 Gy für RT-4 bei etwa 29% und UMUC-3 bei 31,5% (Abbildung 13 B und C oben). Zudem wurden Reparaturzeiten von bis zu 4 Stunden betrachtet, obwohl die NHEJ-vermittelte DSB-Reparatur nur etwa 30 Min benötigt (Mao et al., 2008). Das heißt, die Ergebnisse der Reparaturkinetik könnten durch andere Reparaturmechanismen wie das alt-EJ beeinflusst sein.

Daher wurde ein weiterer DSB-Reparatur-Assay durchgeführt, der auf einen Reporterplasmid mit einer NHEJ-Reporterkassette (pNHEJ-GFP-Reporter) beruht (Seluanov, Mao und Gorbunova, 2010). Das pNHEJ-GFP-Reporterplasmid wurde *in vitro* mittels Restriktionsenzym *HindIII* linearisiert, wodurch der Leserahmen des enthaltenen GFP-Gens unterbrochen wurde und nur durch eine NHEJ-vermittelte Reparatur wiederhergestellt werden kann. RT-4- und UMUC-3-Zellen wurden mit linearisiertem pNHEJ-GFP-Reporterplasmid und TurboRed-Expressionsvektor co-transfiziert. Die Anzahl der grünen (GFP+) und roten (RFP+) Zellen wurde anhand von FACS-Analysen sowie Grün-gegen-Rot-Fluoreszenz-Plotten ermittelt. Die relative DSB-Reparatureffizienz wurde über das Verhältnis GFP+/RFP+ berechnet. Die Überexpression der hsa-miR-888-5p sowie die Ablation von APLF in RT-4-Zellen führte zu einer 30- bzw. 50-prozentigen Reduktion der DSB-Reparatureffizienz im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 14 A). Parallel dazu und in Übereinstimmung mit den PFGE-Assays führte der Knockdown von hsa-miR-888-5p sowie die Zugabe von APLF in den UMUC-3-Zellen zu einer signifikanten Steigerung (ca. 20%) der Reparatureffizienz (Abbildung 14 B).

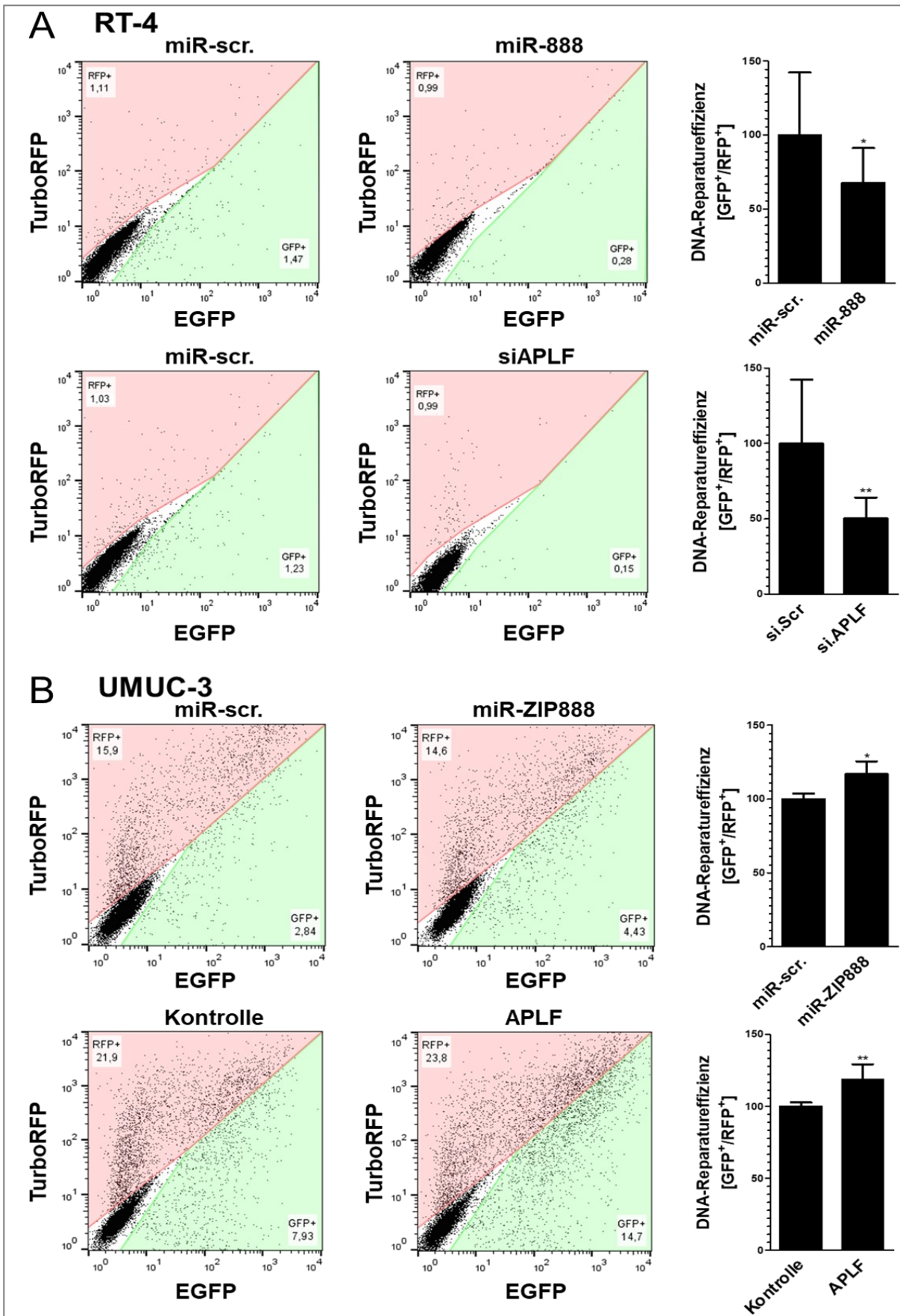


Abbildung 14: Hsa-miR-888-5p und APLF beeinflussen die NHEJ-vermittelte DNA-Reparatureffizienz in humane BC-Zellen. (A) Plasmid-basierter NHEJ-Assay für RT-4-Zellen, die stabil hsa-miR-888-5p (oben) oder si.APLF (unten) exprimieren, sowie **(B)** UMUC-3-Zellen, die stabil miR-ZIP888 (oben) oder APLF (unten) exprimieren. Zellen wurden mit linearisiertem pNHEJ-GFP-

Reporterplasmid und TurboRed-Expressionsvektor co-transfiziert. Die Anzahl der grünen (GFP+) und roten (RFP+) Zellen wurde mittels FACS-Analyse (Grün-gegen-Rot-Fluoreszenz-Plot, links) bestimmt. Das Verhältnis von GFP+ zu RFP+ wurde als Maß für die DNA-Reparatureffizienz (Balkendiagramm, rechts) verwendet. Signifikanzlevel sind mit Hilfe des Student-T-Tests (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) bestimmt worden.

Trotz uneinheitlicher Resultate bei der Untersuchung der DNA-Reparatur in den nicht-invasiven RT-4-Zellen, konnte gezeigt werden, dass die hsa-miR-888-5p und APLF die DSB-Reparatur beeinflussen. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass die DSB-Reparaturkinetik nicht von der APLF-Konzentration alleine, sondern auch von anderen Faktoren wie zum Beispiel die Proteinlevel der essentiellen c-NHEJ-Faktoren und/oder E2F1 bzw. die zusätzliche Aktivität von anderen Reparaturmechanismen abhängt.

3.3.2 *Hsa-miR-888 und APLF beeinflussen die BC-Progression*

Wie E2F1 ist auch APLF in seiner Funktion als Histon-Chaperon als Transkriptionsregulator für EMT-Marker bekannt (Khan et al., 2017, Varghese et al., 2021, Syed et al., 2016) und daher möglicherweise auch in der Lage die Zellinvasivität zu beeinflussen. Um den regulatorischen Effekt von APLF auf Pluripotenz- und EMT-Markern zu überprüfen, wurden Expressionsanalysen in verschiedenen BC-Zelllinien durchgeführt. Anschließend wurde der Einfluss der hsa-miR-888-5p und APLF auf das invasive Verhalten der Zelllinien mittels Boyden-Chamber-Assay untersucht.

In Übereinstimmung mit der Literatur (Syed et al., 2016) führte die Hemmung von APLF in nicht-invasiven RT-4 im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikant höheren Expression der Pluripotenz-Marker NANOG und OCT4. Abweichend davon konnte jedoch keine Erhöhung der Expression von KLF4, CHD1 und ZEB1, welche gleiche (KLF4), signifikant niedrigere (CHD1) oder signifikant höhere (ZEB1) Expressionslevel als die Kontrolle aufwiesen, festgestellt werden (Abbildung 15 A). Weiterhin zeigte der EMT-Marker SNAI1 eine tendenziell höhere Expression nach APLF-Ablation, während CHD2 und VIM schwächer exprimiert wurden (Abbildung 15 A). In UMUC-3 wurden nach Überexpression von APLF signifikant niedrigere mRNA-Level der Pluripotenz-Marker NANOG und OCT4, aber keine Veränderung der KLF4-Expression nachgewiesen (Abbildung 15 B). Außerdem führte die Zugabe von APLF zu einer erhöhten Expression von CHD1 und VIM und verminderten CDH2-Leveln im Vergleich zu UMUC-3-Kontrollzellen (Abbildung 15 B).

Da zumindest einige Pluripotenz- und EMT-Marker durch eine differentielle APLF-Expression beeinflusst waren, wurde in einem nächsten Schritt, der Einfluss des E2F1/miR-888/APLF-Signalweges auf die BC-Zellinvasivität getestet. Wie bereits im Abschnitt 3.1.1 (S. 42) gezeigt, führte die veränderte E2F1-Expression in den RT-4 zu einer Erhöhung der Zellinvasivität, während UMUC-3 weniger invasiv waren. Eine gleiche Wirkung erzielte auch die veränderte Expression der hsa-miR-888-5p und APLF. So wiesen RT-4 mit hsa-miR-888-5p ein etwa 30-fach und RT-4-Zellen mit si.APLF ein etwa 1,5-fach höheres invasives Potenzial im Vergleich zu den Kontrollgruppen auf (Abbildung 15 C). Parallel dazu zeigten UMUC-3-Zellen nach miR-888-5p-Knockdown oder Zugabe von APLF ein deutlich vermindertes invasives Verhalten (Abbildung 15 D).

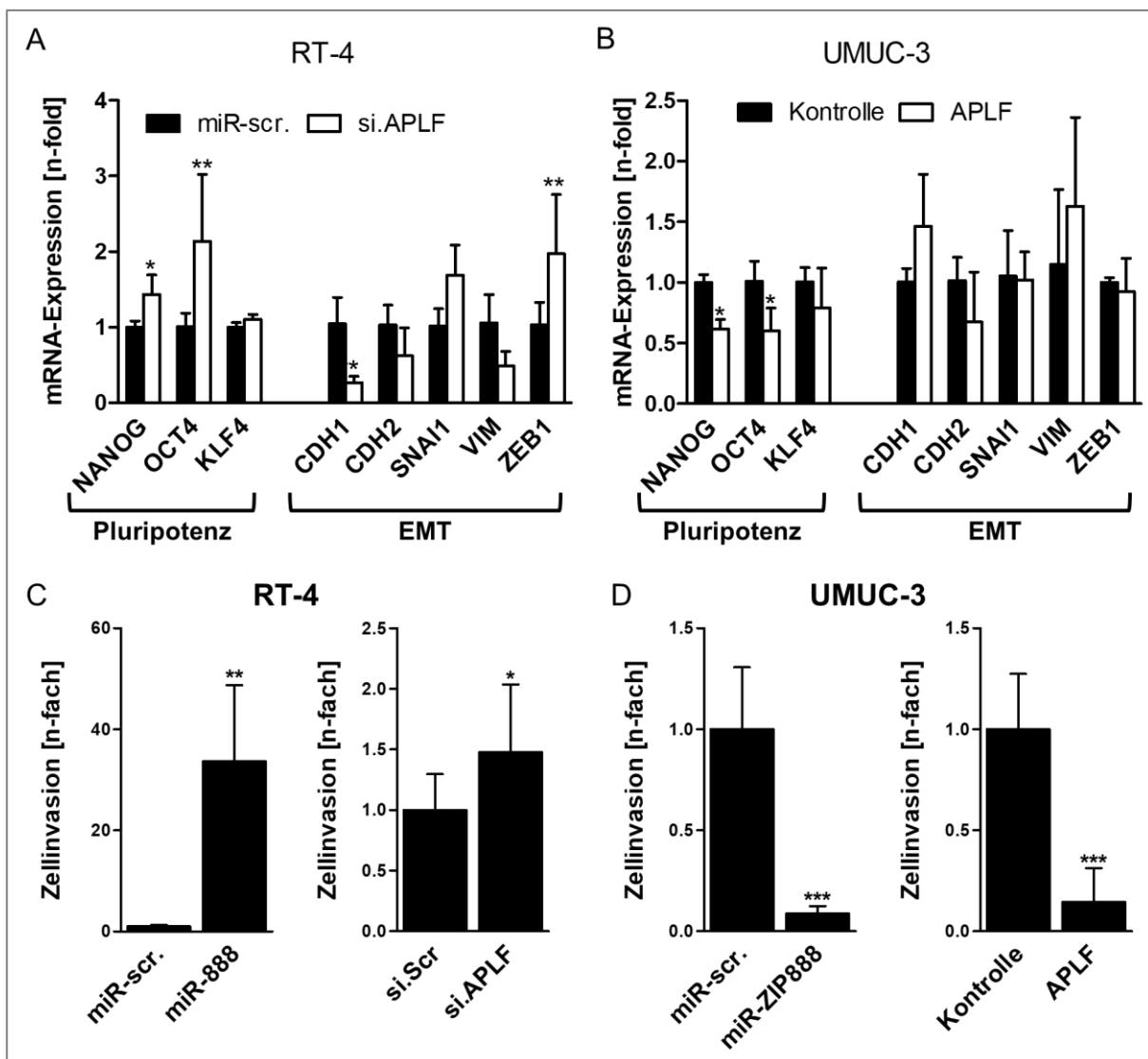


Abbildung 15: Hsa-miR-888-5p und APLF beeinflussen die BC-Progression (A) qPCRs zur Bestimmung der mRNA-Expression der Pluripotenz- und EMT-Marker in RT-4 Zellen, die stabil si.APLF exprimieren, und (B) UMUC-3-Zellen, die stabil APLF exprimieren. (C) Invasionsassays in RT-4-Zellen, die stabil hsa-miR-888-5p exprimieren (links) oder si.APLF (rechts) exprimieren und (D) UMUC-3, die

stabil miR-ZIP888 (links) oder APLF (rechts) exprimieren. Fold Changes sind relativ zu den entsprechenden Kontrollen berechnet. Signifikanzlevel sind mit Hilfe der zweifachen Varianzanalyse und anschließender Bonferroni-Korrektur $n=8$ oder des Mann-Whitney-U-Tests (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$) bestimmt worden.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der E2F1/miR-888/APLF-Signalweg nicht nur die NHEJ-vermittelte DNA-Reparatur, sondern auch die Zellinvasivität beeinflusst. Dabei führt die Senkung der APLF-Konzentration in nicht-invasiven BC-Zellen zum Anstieg der Pluripotenz- und EMT-Marker und zu einer gesteigerten Zellinvasivität. In invasiven BC-Zellen konnte die Deaktivierung der Pluripotenz- aber nicht der EMT-Marker reproduziert werden, trotzdem zeigte auch hier APLF einen deutlich hemmenden Effekt auf die Zellinvasivität.

3.3.3 *APLF beeinflusst die Überlebensprognosen von Blasenkrebspatienten*

Die bisherigen Ergebnisse bestätigen, dass die Reparatur von DSB bei MIBC durch Inhibieren der hsa-miR-888-5p verbessert und die Zellinvasivität reduziert wird, indem primär die APLF-Konzentration erhöht wird, während die Expression von E2F1 und der E2F1-regulierten c-NHEJ-Faktoren im Wesentlichen unverändert bleiben. Dieser nicht-invasive Phänotyp wird nicht durch die Nachahmung des charakteristischen Expressionsmusters von NMIBC (niedrige E2F1-, hohe APLF-, niedrige c-NHEJ-Faktoren-Expression, siehe Abschnitt 3.1.1, S. 42) erzeugt, sondern durch Aktivierung eines neuen Zustands, bei dem sowohl E2F1 als auch alle essentiellen c-NHEJ-Faktoren inklusive APLF stark exprimiert werden. Um herauszufinden, ob dies klinisch bedeutsam für das Überleben von BC-Patienten und damit potenziell therapeutisch genutzt werden kann, wurden Kaplan-Meier-Kurven mit RNA-Seq-Daten von BC-Kohorten der TCGA-Datenbank (Goldman et al., 2020) erstellt. Eine hohe oder niedrige Expression von E2F1 und APLF wurde über den Median der jeweiligen Genexpression definiert. Der Einfluss des gesamten E2F1/miR-888/APLF-Signalweges auf die Überlebensprognosen von BC-Patienten konnte aufgrund unzureichender hsa-miR-888-5p-Expressionsdaten in den aktuellen TCGA-BC-Kohorten nicht durchgeführt werden.

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen aber, dass die Überlebensraten der BC-Patienten mit sowohl hohem E2F1- als auch APLF-Level deutlich besser sind als mit einer niedrigen APLF-Expression (Abbildung 16 A). Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch für die rezidivfreien Überlebensraten mit einer deutlichen Verbesserung der Überlebensrate bei hohen APLF-Expressionsleveln (Abbildung 16 B).

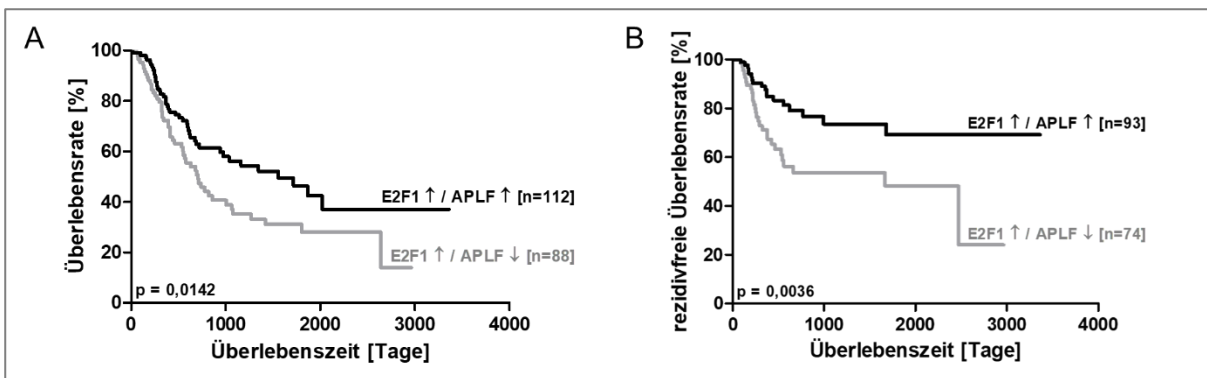


Abbildung 16: APLF beeinflusst die Überlebensprognose von Blasenkrebspatienten (A) Überlebensraten und **(B)** rezidivfreie Überlebensraten von BC-Patienten mit hohen (schwarz) oder niedrigen (grau) APLF-Expressionslevel jeweils in Kombinationen mit hohen E2F1-Expressionslevel. RNA-Seq-Patientendaten wurden der TCGA-Datenbank entnommen. ↑ = hohe (über dem definierten Schwellenwert) ↓ = niedrige (unter dem definierten Schwellenwert) Expression von E2F1 und APLF. Der Schwellenwert T wurde mit Hilfe der jeweiligen Mediane festgelegt: E2F1 T = 9,2 (Median = 9,124), APLF T = 6,0 (Median = 6,22). P-Werte wurden mittels Log-Rank-Test bestimmt

Eine hohe APLF-Expression ist demnach nicht nur notwendig für eine zuverlässige DSB-Reparatur und verminderte BC-Progression, sondern auch für eine verbesserte Überlebensprognose von BC-Patienten. Diese günstige Erhöhung der APLF-Konzentration in MIBC kann zumindest *in vitro* durch Inhibition der hsa-miR-888-5p erreicht werden.

4. DISKUSSION

Harnblasenkarzinome, die bösartigen Neubildungen der Harnblase bzw. der Schleimhaut der ableitenden Harnwege, gehören in Deutschland und weltweit zu den zehn häufigsten Tumorerkrankungen (Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut, 2019, Sung et al., 2021) und sind mit hoher Morbidität, Mortalität und hohen Behandlungskosten verbunden (Abugomaa et al., 2020). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 75 Jahren und Männer sind etwa drei- bis viermal häufiger betroffen als Frauen, wobei die Sterblichkeitsrate vergleichbar ist, was auf den höheren Anteil von MIBC bei Frauen zurückgeführt werden kann (Kraywinkel, Fiebig und Schulz, 2018, Abugomaa et al., 2020, Knowles und Hurst, 2015). Obwohl 80% der diagnostizierten Fälle sich als NMIBC herausstellen, die durch eine transurethrale Resektion entfernt werden können, ist das Harnblasenkarzinom doch klinisch relevant. So treten bei etwa 80% der NMIBC-Patienten Rezidive auf und etwa 30% entwickeln sich zu einem MIBC weiter (Batista et al., 2020). MIBCs haben eine ungünstige Prognose, neigen zu Metastasierung und sind therapierefraktär (Knowles und Hurst, 2015). NMIBC und MIBC unterscheiden sich stark auf molekularbiologischer Ebene. Während NMIBC mit diploiden Karyotyp und wenigen strukturellen genomischen Rearrangements als genomisch stabil gelten, sind MIBCs genomisch instabil und durch einen aneuploiden Karyotyp, Chromosomenumlagerungen und eine beeinträchtigte c-NHEJ-vermittelte DSB-Reparatur charakterisiert (Knowles und Hurst, 2015, Bentley et al., 2009, Batista et al., 2020). Zudem weisen MIBC eine deutlich erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors E2F1 auf (Lee et al., 2010, Khan et al., 2017), der als Regulator des Zellzyklus, der Apoptose und der HR-vermittelten DNA-Reparatur aber auch als Metastasierungsfördernder Faktor bekannt ist (Alla et al., 2010, Engelmann und Pützer, 2012, Pützer und Engelmann, 2013). In seiner Funktion als DSB-Reparaturfaktor deutet das gleichzeitige Auftreten von genomischer Instabilität in MIBC trotz hoher E2F1-Level entweder auf eine ineffiziente HR-vermittelte DSB-Reparatur oder auf die Beteiligung von E2F1 an anderen DSB-Reparaturmechanismen wie das c-NHEJ hin.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte nun in BC-Zelllinien nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor E2F1 am DSB-Reparaturmechanismus c-NHEJ beteiligt ist, indem es die essentiellen c-NHEJ-Faktoren direkt transaktiviert und gleichzeitig die APLF-Expression durch Aktivierung der OncomiR hsa-miR-888-5p in MIBC herunterreguliert. Dieser E2F1/miR-888/APLF-Signalweg hat negative Auswirkungen

auf die DSB-Reparatur, fördert die BC-Progression und verschlechtert die Überlebensraten von BC-Patienten. Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen einen neuen mechanistischen Einblick in die Entstehung der genomischen Instabilität und Tumorprogression des humanen Harnblasenkarzinoms, mit besonderem Fokus auf die Doppelfunktion von APLF, und heben gleichzeitig die Bedeutung des E2F1-miRs-Netzwerkes in der Feinabstimmung der DNA-Reparatur und Invasivität hervor.

4.1 E2F1 als Masterregulator der c-NHEJ-vermittelten DSB-Reparatur

Bisher wurde E2F1 nur mit der HR-vermittelten DSB-Reparatur in Verbindung gebracht, weil es HR-relevante Gene wie RAD51 transaktiviert (Yang, Lin und Lin, 2008, Choi und Kim, 2019), HR-Reparaturfaktoren wie NBS1 rekrutiert (Chen et al., 2011) und als Bindungspartner für Chromatinmodulatoren wie BRG1 aktiv an der DSB-Reparatur beteiligt ist (Biswas und Johnson, 2012, Manickavinayaham, Dennehey und Johnson, 2021). Die Ergebnisse dieser Arbeit definieren E2F1 zusätzlich als Mastergenregulator der c-NHEJ-beteiligten Proteine. Das mechanistische Modell, wie der Transkriptionsfaktor E2F1 die c-NHEJ-vermittelte DSB-Reparatur und dadurch die BC-Progression beeinflusst, ist in Abbildung 17 dargestellt. E2F1 ist ein direkter Regulator (Transaktivator) der c-NHEJ-Gene XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4 und LIG4, aber auch ein indirekter Negativregulator von APLF durch die Aktivierung der OncomiR hsa-miR-888-5p. APLF verbindet den LIG4-XRCC4-Komplex mit dem Ku/DNA-PKcs-Komplex durch direkte Interaktion des Ku-Bindemotivs von APLF und der α/β -Domäne von Ku80 (XRCC6, Nemoz et al., 2018), sowie der direkten Bindung zwischen der N-terminaler Forkhead-assoziierten Domäne von APLF und XRCC4 (Iles et al., 2007). APLF ist ein Hilfsfaktor, der den NHEJ-Reparatur-Komplex an den DSB-Enden stabilisiert, mit dem Chromatin verankert und die XRCC4-LIG4-vermittelte DNA-Ligation beschleunigt (Grundy et al., 2013, Rulten et al., 2011, Hammel et al., 2016). In MIBC führt die erhöhte E2F1-Konzentration (diese Arbeit, Lee et al., 2010) zwar zu einem proportionalen Anstieg der Konzentration essentieller c-NHEJ-Proteine, aber nicht von APLF, da es kein E2F1-Zielgen ist. Zugleich führten weitreichende epigenetische (Hypomethylierung) und genomische Veränderungen (Genduplikation) zu einer Aktivierung der E2F1-regulierten OncomiR hsa-miR-888-5p, die die 3'UTR von APLF binden und dadurch die APLF-Expression hemmen kann. Der APLF-Mangel führt zu einer stöchiometrischen Ungleichheit zwischen den Bindungspartnern Ku80 bzw. XRCC4 und APLF, welche wahrscheinlich

zu einer Destabilisierung des c-NHEJ-Multiproteinkomplexes und der Verlangsamung der DSB-Ligation führt, was sich in eine messbar verschlechterte DSB-Reparatur auswirkte. Zusätzlich zur DSB-Reparatur hat der E2F1/miR-888/APLF-Signalweg einen Einfluss auf die BC-Progression und die Überlebensraten von BC-Patienten.

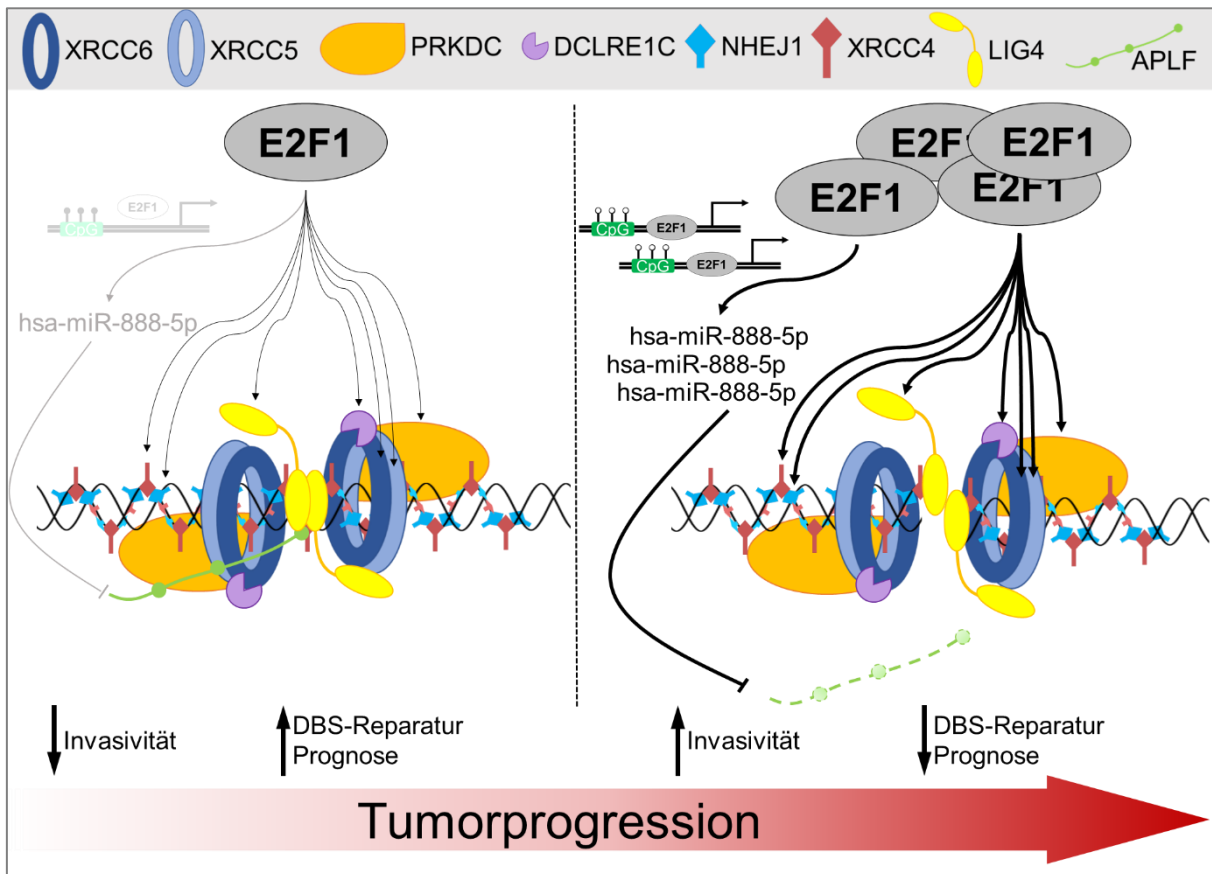


Abbildung 17: Mechanistisches Modell des E2F1-Einflusses auf die c-NHEJ-vermittelte DSB-Reparatur und BC-Progression. E2F1 ist ein direkter Transaktivator der essentiellen Faktoren des c-NHEJ und gleichzeitig ein indirekter Negativregulator von APLF. Während der BC-Progression kommt es zur Vervielfältigung und Hypomethylierung des *MIR888*-Genomlocus, was diesen für den Transkriptionsfaktoren E2F1 zugänglicher macht. Durch die erhöhten E2F1-Level in MIBC ereignet sich parallel eine Hochregulation der essentiellen c-NHEJ-Faktoren und der hsa-miR-888, welche im Gegenzug APLF inhibiert. Die Störung der Stöchiometrie zwischen den essentiellen c-NHEJ-Proteinen und APLF vermindert die DSB-Reparatur und fördert die Tumoraggressivität. Eigene Darstellung basierend auf Richter et al., 2019.

In der MIBC-Zelllinie UMUC-3 konnte durch Zugabe von APLF bzw. Ablation der hsa-miR-888 unabhängig von veränderten E2F1-Leveln die DSB-Reparatur verbessert und das Invasionspotenzial vermindert werden. Damit einhergehend verbessert sich die Prognose für BC-Patienten hinsichtlich der Überlebensraten und der rezidivfreien Überlebensraten, wenn die Tumoren sowohl hohe Level von E2F1 als auch APLF exprimieren. Das bedeutet, dass die Wiederherstellung von APLF für BC-Patienten mit hoher E2F1-Expression von therapeutischem Nutzen sein könnte.

4.2 Tumorsuppressor oder Onkogen?: Die duale Rolle von APLF

APLF wurde in mehreren Veröffentlichungen mit zwei Hauptfunktionen beschrieben. Zum einen fungiert es als Hilfsprotein bei der c-NHEJ-vermittelten DSB-Reparatur, indem es den NHEJ-Reparatur-Komplex an den DSB-Enden stabilisiert und mit dem Chromatin verankert, die Chromatinstruktur an DSB öffnet und somit die XRCC4-LIG4-vermittelte DNA-Ligation beschleunigt (Grundy et al., 2013, Rulten et al., 2011, Hammel et al., 2016). Zum anderen ist es ein H2A-H2B-Histon-Chaperon (Mehrotra et al., 2011, Corbeski et al., 2018), das die Histon-Variante MacroH2A, welche mit Genrepression assoziiert wird, an EMT-Genpromotoren rekrutiert (Burgess und Zhang, 2013, Syed et al., 2016). Beide Funktionen sind in der Krebsentstehung und -Progression kontrovers diskutiert, sodass APLF sowohl als Tumorsuppressor als auch Onkogen betrachtet werden kann. Besitzt demnach APLF wie E2F1 eine ambivalente Natur, dessen Funktion sich während der Tumorprogression ändert?

Im Glioblastom konnte gezeigt werden, dass eine hohe APLF-Expression mit erhöhter DSB-Reparatureffizienz und dadurch erhöhter Chemo- und Strahlungsresistenz einhergeht. Die APLF-Ablation förderte die Chemo- und Strahlungssensitivität *in vitro* und *in vivo* (Dong et al., 2020). Dies ist vergleichbar mit dem Verhalten der RT-4-Zellen, die viel APLF exprimieren (diese Dissertation), aber als hochgradig strahlungsresistent gelten (Moneef et al., 2003, Bodgi et al., 2019). Auch in RT-4-Zellen führte die APLF-Ablation zur verminderten c-NHEJ-vermittelten DSB-Reparatur, was jedoch nur in speziellen Plasmid-basierten NHEJ-Assays, aber nicht in PFGE-Assays nachgewiesen werden konnte. Ob dies auch zu einer verbesserten Strahlungssensitivität führt, bleibt offen. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die APLF-Ablation MMEJ begünstigt (Rulten et al., 2011), ein Reparaturmechanismus, der in Abwesenheit der Ku-Dimere und des XRCC4/LIG4-Komplexes fungiert, als langsam und fehleranfällig gilt und dadurch mit genomischer Instabilität in Verbindung gebracht wird (McVey und Lee, 2008, Sfeir und Symington, 2015). Damit übereinstimmend konnte Bentley et al. (2004, 2009) zeigen, dass NMIBC c-NHEJ-fähig sind, aber die genomisch instabilen MIBC nicht. MIBC tendieren zu mutagenen MMEJ, um DSBs zu reparieren. Dieser Unterschied in der DSB-Reparatur kommt durch eine verminderte Ku-DNA-Bindungsaktivität zustande, die aber nicht auf Mutationen oder die Expressionslevel von XRCC5 und XRCC6 zurückgeführt werden konnte. APLF als Stabilisator des Ku/DNA-PKcs-Komplex und XRCC4/LIG4-Komplex könnte jedoch durchaus dafür verantwortlich sein. Ein APLF-Knockdown hat in diesem

Kontext somit einen negativen Einfluss auf die Tumorprogression, was durch die unterschiedlichen APLF-Konzentrationen der hier verwendeten unterschiedlich aggressiven BC-Zelllinien und deren Verhalten hinsichtlich der NHEJ-Reparatureffizienz nach Inhibierung oder Zugabe von APLF bestätigt wird.

Allgemein wird die Deregulation der DNA-Reparatur und der damit einhergehende Chemo- bzw. Strahlentherapieerfolg kontrovers diskutiert. So wird die Akkumulation von unreparierten DSB als eine treibende Kraft der karzinogenen Transformation angesehen (Hanahan und Weinberg, 2011). Eine geringe DSB-Reparatureffizienz wird einerseits mit der Initiierung der Karzinogenese, schlechten Patientenprognosen, genomischer Instabilität und Tumorprogression, andererseits mit Langzeitüberleben und erhöhter Chemo- sowie Strahlungssensitivität in Verbindung gebracht (Kiwerska und Szyfter, 2019). Daher kann APLF sowohl als Tumorsuppressor als auch Tumorprogressions-fördernder Faktor je nach zellulärem Kontext eingestuft werden.

Auch in der Funktion als Histon-Chaperon mit Einfluss auf Pluripotenz- und EMT-Marker gibt es für APLF widersprüchliche Ergebnisse. Majumder et al. (2018) zeigten, dass APLF in Triple-Negativen Brustkrebszelllinien (TNBC) im Vergleich zu gesunden Brustzellen deutlich erhöht war. Die Ablation von APLF in TNBC induzierte Apoptose, beeinträchtigte die DSB-Reparatur und hemmte die Proliferation. Zudem wurde das invasive und migratorische Potenzial von TNBC-Zellen reduziert in Verbindung mit einer Senkung der EMT-Genexpression bzw. Hochregulierung des MET-spezifischen Gens E-Cadherin (CDH1). Dies steht in einem starken Kontrast zu den Ergebnissen in BC-Zelllinien, da hier die nicht-invasiven RT-4-Zellen eine deutlich höhere APLF-Expression als invasive UMUC-3-Zellen aufweisen. Zwar führte die Ablation von APLF in den RT-4-Zellen auch zu einer Beeinträchtigung der DSB-Reparatur, aber gleichzeitig wurde das invasive Potential erhöht, einhergehend mit einer Verminderung der CDH1-Expression, und es war zudem keine Veränderung der Proliferation erkennbar (Daten nicht gezeigt). Bei Studien zur Reprogrammierung von Maus-Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression von APLF die OCT4- und NANOG-Expression gehemmt wird und APLF-Ablation die NANOG, KLF4 und CDH1-Expression hochreguliert. Dies wurde auf die Funktion von APLF als Histon-Chaperon zurückgeführt, welches den Repressor MacroH2A.1 an Genpromotoren rekrutieren und Histonmodifikationen wie die Methylierung von Histon H3 (H3K4me3) regulieren kann (Syed et al., 2016). In den BC-Zelllinien führte die Inhibition von APLF in nicht-invasiven RT-4 zur erhöhten Expression und die Zugabe von APLF bei invasiven

UMUC-3 zur verminderten Expression der Pluripotenz-Marker NANOG und OCT4. Die Expression von CDH1 wurde in BC-Zelllinien im Gegensatz zu TNBC (Majumder et al., 2018) und iPS-Zellen (Syed et al., 2016) durch APLF-Ablation gehemmt. Die Stammzellmarker NANOG und OCT4 werden mit der Tumorprogression und Aggressivität verschiedener Krebsarten assoziiert, da sie unter anderem die epithelial-mesenchymale Transition durch Regulation von CDH1, CDH2, ZEB1, SNAIL und VIM unterstützen (Wang et al., 2014, Yin et al., 2015, Qin et al., 2017, Palla et al., 2015, Shao et al., 2018). Besonders OCT4, das beim Blasenkarzinom in hohem Maße exprimiert wird (Atlasi et al., 2007), steht unter Verdacht für die Entstehung sogenannter Krebsstammzellen verantwortlich zu sein, die für die Entstehung, Progression und das Wiederauftreten von MIBC verantwortlich gemacht werden (Abugomaa et al., 2020). Obwohl die OCT4- und NANOG-Expression in BC-Zelllinien durch APLF beeinflusst wird, führt die Senkung der APLF-Konzentration in RT-4 bzw die Zugabe von APLF in UMUC-3 nicht zu einer einheitlichen Aktivierung oder Deaktivierung der EMT-Marker. Dennoch hemmt APLF in BC-Zelllinien die Pluripotenz-Marker OCT4 und NANOG sowie das invasive Potenzial der Zellen. Zusammengefasst hat APLF im Blasenkrebs die Tendenz zum Tumorsuppressor, zumindest in späten Stadien, da es die genomische Stabilität durch eine effiziente DSB-Reparatur sichert, die Expression von Stammzellmarkern und invasives Verhalten hemmt, und mit einer guten Prognose für BC-Patienten korreliert. In frühen Krebsstadien könnte es jedoch eher für einen strahlungsresistenten Phänotyp verantwortlich sein. Zudem scheint diese Schlussfolgerung stark von der Krebsart und dem Zellkontext abhängig zu sein, wodurch die Rolle von APLF bei der Tumorprogression umstritten bleibt. Damit und auch im Hinblick auf die nicht erstrebenswerte direkte Manipulation von DNA-Reparaturgenen eignet sich APLF nicht direkt als Therapieansatz zur Krebsbehandlung. Eine vielversprechendere Alternative als therapeutischer Ansatz wäre die E2F1-regulierte hsa-miR-888, die aufgrund der in dieser Doktorarbeit erhaltenen Daten, für die Deregulation der APLF-Expression im humanen Blasenkarzinom verantwortlich ist.

4.3 OncomiR hsa-miR-888: neues Werkzeug für die Diagnostik und Therapie des humanen Harnblasenkarzinoms

Die Wiederherstellung der APLF-Expression durch die Regulation der miR-888-Expression verbessert die DSB-Reparatur, vermindert das invasive Potenzial und könnte für BC-Patienten mit hoher E2F1-Expression von therapeutischem Nutzen sein. Hsa-miR-888-5p wird als OncomiR eingestuft, da sie in mehreren Studien mit einer starken onkogenen Wirkung in Verbindung gebracht wurde. So wurden erhöhte miR-888-Level in Brustkrebs (Huang und Chen, 2014), Prostatakrebs (Lewis et al., 2014, Hasegawa et al., 2018), Gebärmutterhalskrebs (Hovey et al., 2015), Darmkrebs (Bobowicz et al., 2016), hepatozellulären Karzinom (Li et al., 2019b) und Lungenkrebs (Cao, 2019) gefunden. Bei verschiedenen Krebsarten fördert die miR die Zellmigration und -invasion durch Hemmung von CDH1 (Cao, 2019, Huang und Chen, 2014) und die Tumorpheriferation und -progression durch Hemmung von SMAD4 (Hasegawa et al., 2018, Lewis et al., 2014, Li et al., 2019b). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hsa-miR-888 über APLF als Zielgen die DSB-Reparatureffizienz in BC-Zelllinien beeinflusst.

Jedoch scheint hsa-miR-888 nicht allein, sondern in einem Verbund aus mehreren miRs zu agieren. Wie beim Prostatakrebs (Hasegawa et al., 2018) konnte auch in dieser Dissertation untersuchten BC-Zelllinien die Aktivierung des gesamten miR-Clusters, bestehend aus den sieben miRs hsa-miR-892c, hsa-miR-890, hsa-miR-888, hsa-miR-892a, hsa-miR-892b, hsa-miR-891b und hsa-miR-891a, nachgewiesen werden. Seine Funktion und Rolle ist jedoch nicht einheitlich festgelegt, da die Cluster-miRs meistens nur einzeln betrachtet wurden. So werden jeweils drei miRs des miR-888-Clusters als Tumorsuppressor (miR-892c, miR-890, miR-892b) bzw. Tumorprogressions-fördernd (miR-888, miR-892a, miR-891a) eingestuft, während für die hsa-miR-891b beide Funktionen beschrieben wurden (Referenzen siehe Tabelle 1, S. 59). Hatano et al. (2015) zeigten, dass die anti-onkogene Wirkung von hsa-miR-890 durch die Hemmung von DNA-Reparaturgenen und eine dadurch gesteigerte Radiosensitivität hervorgebracht wird. Demnach könnte hsa-miR-890 wie hsa-miR-888-5p bei BC zu einer verringerten DNA-Reparatur beitragen, was, wie zuvor schon diskutiert, in frühen Krebsstadien durch eine erhöhte Chemo- und Strahlensensitivität zur Tumorpheriferation, aber in späten Stadien durch steigende genomische Instabilität zur Tumorprogression führen kann (Kiwerska und Szyfter, 2019). Interessanterweise besitzen alle miRs des Clusters potenzielle Zielgene, die mit c-NHEJ aber auch anderen DNA-Reparaturmechanismen assoziiert werden (Marquardt et al., 2020), sodass das gesamte Cluster an der Deregulation der DNA-Reparatur während der Tumorprogression beteiligt sein könnte.

Auffällig ist zudem, dass der genomische Bereich, insbesondere das CpG-Island, stromaufwärts von *MIR888* beim BC und in UMUC-3 hypomethyliert ist. In mehreren Studien konnte schon gezeigt werden, dass epigenetische Modifikationen, wie veränderte Methylierungsmuster, mit der Entstehung und Progression von Blasenkrebs korrelieren (Reinert et al., 2011, Sánchez-Carbayo, 2012, Wolff et al., 2010, Yu et al., 2018). Dabei wurden NMIBCs mit Hypomethylierungen in nicht-CpG-Island-Regionen und MIBCs mit umfangreichen CpG-Island-Hypermethylierungen in Verbindung gebracht (Knowles und Hurst, 2015). Das bedeutet, die Hypomethylierung der hsa-miR-888-Region und möglicherweise der gesamten Clusterregion ist eine untypische epigenetische Veränderung in MIBCs.

Neben epigenetischen Veränderungen weisen die miRs dieses Clusters in invasiven BC-Zelllinien eine veränderte Kopienzahl der genomischen Loci auf. Das miR-888-Cluster befindet sich in einer etwa 35 kbp großen Region auf dem Antisense-Strang des humanen X-Chromosoms Xq27.3 (Kent et al., 2002). In dieser genomischen Region liegt auch FRAXA, eine sogenannte *rare fragile site*, die besonders anfällig für die Bildung von Lücken oder Brüchen während der Metaphase ist. An diesen Loci kann es zu Chromosomenumlagerungen, Schwesterchromatidaustausch oder auch intrachromosomaler Genamplifikation kommen, die zur genomischen Instabilität der betroffenen Region oder auch des gesamten Chromosoms beitragen (Bjerregaard et al., 2018, Glover, 1998). FRAXA ist folatsensitiv, das bedeutet, die genomische Region wird bei längerem Folatentzug instabil (Bjerregaard et al., 2018). Ein signifikant verringerter Folat-Spiegel wurde insbesondere bei Rauchern festgestellt (McDonald et al., 2002, Tungtrongchitr et al., 2003, Vardavas et al., 2008), wobei Rauchen als Haupterkrankungsrisiko für Harnblasenkrebs gilt und etwa die Hälfte der BC-Inzidenzen dem Rauchen zugeschrieben wird (Antoni et al., 2017, Kraywinkel, Fiebig und Schulz, 2018, Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut, 2019). Eine Ursache für die Entstehung von Blasenkrebs könnte also ein durch Rauchen verringerter Folat-Spiegel sein, wodurch FRAXA induziert wird, gefolgt von genomischen (Genduplikation) und möglicherweise auch epigenetischen (Hypomethylierungen) Veränderungen der Xq27.3-Region, was schließlich die Aktivierung des miR-888-Clusters ermöglicht. Das wiederum könnte die DNA-Reparatur und damit die genomische Stabilität sowie Tumorprogression beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen außerdem, dass hsa-miR-888-5p sowie andere miRs des Clusters als diagnostische Marker für BC aber auch andere Krebsarten fungieren können. Nach den deutschen „S3-Leitlinie Früherkennung,

Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms“ wird bislang kein diagnostischer Marker zum Screening auf das Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms oder zur systematischen Früherkennung des Harnblasenkarzinoms in der Gesamtbevölkerung oder in Risikopopulationen empfohlen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020). Die Zystoskopie ist immer noch der Goldstandard zur Diagnose und zur Überwachung von Tumorpatienten. Jedoch zeigen aktuelle Studien, dass Flüssigbiopsien wie Blut- oder Harnproben sich als vielversprechendes diagnostisches Werkzeug erweisen könnten. Sie sind nicht invasiv, erleichtern dadurch die Probenentnahme und ermöglichen es, genomische sowie molekularbiologische Veränderungen während der Krebsprogression zu überwachen (Piao et al., 2021). So gibt es bereits den *Bladder EpiCheck*, der DNA-Methylierung von Blasenkrebszellen im Urin identifizieren soll (Mancini et al., 2020). Darüber hinaus gibt es mehrere Ansätze zur Detektion von miRs in Urinproben von Patienten mit BC (Kutwin et al., 2018), Prostata- (Fujita und Nonomura, 2018) oder Gebärmutterhalskrebs (Aftab et al., 2021), sowie in Blutproben von BC-Patienten (Usuba et al., 2019) und zur Korrelation dieser mit dem Fortschreiten der Tumorerkrankung. Weder hsa-miR-888 noch eine andere miR des miR-888-Clusters wurden in diese Studien einbezogen, obwohl Expressionsanalysen mit Blutproben von Krebspatienten eine kollektiv erhöhte miR-Expression unter anderem auch bei Blasen- und Prostatakrebs zeigten. Deshalb sollten diese miRs auch als diagnostische Marker mitberücksichtigt werden. Zudem wäre es interessant zu untersuchen, ob die Expression der Cluster-miRs auch im Urin von Krebspatienten nachweisbar ist und ob eine kombinierte Analyse der Expressions- und Methylierungsprofile aus Blut- und Urinproben mit den Krebsstadien korrelieren.

Expressionsanalysen von miR-888 bzw. des gesamten miR-888-Clusters könnten sich auf die Wahl der Therapie auswirken, da sie an der Deregulation der DNA-Reparatur während der Tumorprogression beteiligt sind. So könnte anhand der miR-Expression vorab eine Aussage über den Erfolg der Chemo- und/oder Strahlentherapie getroffen werden, der von der DNA-Reparatureffizienz abhängt (Kiwerska und Szyfter, 2019), bzw. eine Feinabstimmung für eine individualisierte Krebstherapie durchgeführt werden.

Weiterhin könnte auch die Regulation der hsa-miR-888-Expression in Krebszellen einen therapeutischen Ansatz liefern. Hsa-miR-888-5p wird physiologisch sehr restriktiv und nur in wenigen Geweben wie Hoden, Nieren, Bauchspeicheldrüse und Schilddrüse exprimiert. Sie besitzt eine hohe Spezifität für das c-NHEJ-Hilfsprotein

APLF, da sie nur mit der 3'UTR von APLF interagieren und dessen Expression hemmt, aber keine der essentiellen hier untersuchten c-NHEJ-Faktoren als Zielgen hat. Die Aktivierung der hsa-miR-888 in invasiven Krebsstadien ist zudem nicht nur Blasenkrebs-spezifisch, sondern konnte auch in anderen Krebsarten gezeigt werden (Bobowicz et al., 2016, Cao, 2019, Hovey et al., 2015, Huang und Chen, 2014, Lewis et al., 2014, Li et al., 2019b). In diesem Sinne schlug auch schon Bader (2014) die Hemmung von hsa-miR-888 als wirksame und neue therapeutische Anti-Krebsstrategie vor. Darüber hinaus ist die Spezifität dieser miR für therapeutische Eingriffe von Vorteil, da ihre selektive Inaktivierung in benachbarten gesunden Zellen, die hsa-miR-888-5p normalerweise kaum oder gar nicht exprimieren, wenige oder keine Nebenwirkungen verursachen sollte. Durch die gezielte Eliminierung der hsa-miR-888-5p in Geweben, in denen sie normalerweise nicht exprimiert wird, könnte die Deregulierung der DNA-Reparatur verhindert und die physiologische Funktion von E2F1 - Unterstützung der DNA-Reparatur und Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität - wiederhergestellt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Harnblasenkarzinome (BC) gehören zu den zehn häufigsten Tumorentitäten in Deutschland und weltweit. Sie führen zu einer hohen Morbidität, Mortalität und steigenden Behandlungskosten. Die Progression vom nicht-muskelinvasiven (NMIBC) zum aggressiven muskelinvasiven Blasenkarzinom (MIBC) ist durch starke Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene, genomische Instabilität und eine deutlich erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors E2F1 gekennzeichnet. Dieser, als Regulator des Zellzyklus, der Apoptose und HR-vermittelten DNA-Reparatur bekannte Faktor, besitzt Schlüsselfunktionen bei der Tumorprogression und Metastasierung. In der vorliegenden Arbeit wurde E2F1 als Masterregulator c-NHEJ-beteiligter Zielgene identifiziert und ein auf den Daten basierendes mechanistisches Modell entwickelt, wie der Transkriptionsfaktor die c-NHEJ-vermittelte DSB-Reparatur und dadurch die BC-Progression beeinflusst. Die c-NHEJ-Gene XRCC6, XRCC5, PRKDC, DCLRE1C, NHEJ1, XRCC4 und LIG4 werden durch E2F1 direkt transaktiviert, während APLF indirekt inhibiert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass epigenetische und genomische Veränderungen für die Aktivierung der E2F1-regulierten hsa-miR-888-5p verantwortlich sind, die die 3'UTR von APLF bindet und dadurch die APLF-Expression in MIBC hemmt. Die durch den E2F1/miR-888/APLF-Signalweg hervorgerufene Hemmung von APLF führte zu einer ineffizienten DSB-Reparatur, fördert die BC-Progression und hat einen negativen Einfluss auf die Überlebensprognose von BC-Patienten. Die Wiederherstellung der APLF-Expression in MIBCs durch die gezielte Inhibierung der hsa-miR-888-5p, die physiologisch sehr restriktiv und in nur wenigen Geweben exprimiert wird, erhöhte die DSB-Reparatureffizienz, verminderte das invasive Potenzial und verbesserte die Überlebensprognose von BC-Patienten. Zusammenfassend liefern die vorliegenden Ergebnisse einen vielversprechenden Ansatz für die klinische Anwendung der OncomiR hsa-miR-888-5p als ein neues Werkzeug zur Diagnostik und Optimierung der Therapie des Harnblasenkarzinoms.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ABUGOMAA, A., M. ELBADAWY, H. YAMAWAKI, T. USUI und K. SASAKI, 2020. Emerging Roles of Cancer Stem Cells in Bladder Cancer Progression, Tumorigenesis, and Resistance to Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target for Bladder Cancer [online]. *Cells*, **9**(1). Cells. Verfügbar unter: doi:10.3390/cells9010235
- ADAM, L., M. ZHONG, W. CHOI, W. QI, M. NICOLOSO, A. ARORA, G. CALIN, H. WANG, A. SIEFKER-RADTKE, D. MCCONKEY, M. BAR-ELI und C. DINNEY, 2009. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy [online]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **15**(16), 5060-5072. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. Verfügbar unter: doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2245
- ADAMS, B.D., A.L. KASINSKI und F.J. SLACK, 2014. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer [online]. *Current biology : CB*, **24**(16), R762-76. Current biology : CB. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cub.2014.06.043
- AFTAB, M., S.S. POOJARY, V. SESHAN, S. KUMAR, P. AGARWAL, S. TANDON, V. ZUTSHI und B.C. DAS, 2021. Urine miRNA signature as a potential non-invasive diagnostic and prognostic biomarker in cervical cancer [online]. *Scientific reports*, **11**(1), 10323. Scientific reports. Verfügbar unter: doi:10.1038/s41598-021-89388-w
- AGUILAR, C., S. COSTA, C. MAUDET, R.P. VIVEK-ANANTH, S. ZALDÍVAR-LÓPEZ, J.J. GARRIDO, A. SAMAL, M. MANO und A. EULALIO, 2021. Reprogramming of microRNA expression via E2F1 downregulation promotes Salmonella infection both in infected and bystander cells [online]. *Nature communications*, **12**(1), 3392. Nature communications. Verfügbar unter: doi:10.1038/s41467-021-23593-z
- ALLA, V., B.S. KOWTHARAPU, D. ENGELMANN, S. EMMRICH, U. SCHMITZ, M. STEDER und B.M. PÜTZER, 2012. E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry [online]. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **11**(16), 3067-3078. Cell cycle (Georgetown, Tex.). Verfügbar unter: doi:10.4161/cc.21476
- ALLA, V., D. ENGELMANN, A. NIEMETZ, J. PAHNKE, A. SCHMIDT, M. KUNZ, S. EMMRICH, M. STEDER, D. KOCZAN und B.M. PÜTZER, 2010. E2F1 in melanoma progression and metastasis [online]. *Journal of the National Cancer Institute*, **102**(2), 127-133. ISSN 1460-2105. Verfügbar unter: doi:10.1093/jnci/djp458
- ALT, F.W. und B. SCHWER, 2018. DNA double-strand breaks as drivers of neural genomic change, function, and disease [online]. *DNA repair*, **71**, 158-163. DNA repair. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.dnarep.2018.08.019
- ALT, F.W., Y. ZHANG, F.-L. MENG, C. GUO und B. SCHWER, 2013. Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system [online]. *Cell*, **152**(3), 417-429. ISSN 00928674. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cell.2013.01.007
- ANTONI, S., J. FERLAY, I. SOERJOMATARAM, A. ZNAOR, A. JEMAL und F. BRAY, 2017. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends [online]. *European Urology*, **71**(1), 96-108. ISSN 03022838. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.eururo.2016.06.010
- ATLASI, Y., S.J. MOWLA, S.A.M. ZIAEE und A.-R. BAHRAMI, 2007. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer [online]. *International journal of cancer*, **120**(7), 1598-1602. ISSN 0020-7136. Verfügbar unter: doi:10.1002/ijc.22508
- BADER, A.G., 2014. miR-888: hit it when you see it! [online]. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **13**(3), 351. Cell cycle (Georgetown, Tex.). Verfügbar unter: doi:10.4161/cc.27550

- BAIROCH, A., 2018. The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource [online]. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, **29**(2), 25-38. Journal of biomolecular techniques : JBT. Verfügbar unter: doi:10.7171/jbt.18-2902-002
- BARTEL, D.P., 2004. MicroRNAs [online]. *Cell*, **116**(2), 281-297. ISSN 00928674. Verfügbar unter: doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5
- BATISTA, R., N. VINAGRE, S. MEIRELES, J. VINAGRE, H. PRAZERES, R. LEÃO, V. MÁXIMO und P. SOARES, 2020. Biomarkers for Bladder Cancer Diagnosis and Surveillance: A Comprehensive Review [online]. *Diagnostics*, **10**(1). Diagnostics. Verfügbar unter: doi:10.3390/diagnostics10010039
- BAUTISTA-SÁNCHEZ, D., C. ARRIAGA-CANON, A. PEDROZA-TORRES, I.A. de LA ROSA-VELÁZQUEZ, R. GONZÁLEZ-BARRIOS, L. CONTRERAS-ESPINOSA, R. MONTIEL-MANRÍQUEZ, C. CASTRO-HERNÁNDEZ, V. FRAGOSO-ONTIVEROS, R.M. ÁLVAREZ-GÓMEZ und L.A. HERRERA, 2020. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics [online]. *Molecular therapy. Nucleic acids*, **20**, 409-420. ISSN 2162-2531. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.omtn.2020.03.003
- BENTLEY, J., C. L'HÔTE, F. PLATT, C.D. HURST, J. LOWERY, C. TAYLOR, S.C. SAK, P. HARNDEN, M.A. KNOWLES und A.E. KILTIE, 2009. Papillary and muscle invasive bladder tumors with distinct genomic stability profiles have different DNA repair fidelity and KU DNA-binding activities [online]. *Genes, chromosomes & cancer*, **48**(4), 310-321. Genes, chromosomes & cancer. Verfügbar unter: doi:10.1002/gcc.20641
- BENTLEY, J., C.P. DIGGLE, P. HARNDEN, M.A. KNOWLES und A.E. KILTIE, 2004. DNA double strand break repair in human bladder cancer is error prone and involves microhomology-associated end-joining [online]. *Nucleic Acids Research*, **32**(17), 5249-5259. ISSN 0305-1048. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkh842
- BERDASCO, M. und M. ESTELLER, 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry [online]. *Developmental cell*, **19**(5), 698-711. Developmental cell. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.devcel.2010.10.005
- BERNSTEIN, C., A. R., V. NFONSAM und H. BERNSTEI, 2013. DNA Damage, DNA Repair and Cancer. In: C. CHEN, Hg. *New Research Directions in DNA Repair*. Erscheinungsort nicht ermittelbar: IntechOpen. ISBN 978-953-51-1114-6.
- BERT, S.A., M.D. ROBINSON, D. STRBENAC, A.L. STATHAM, J.Z. SONG, T. HULF, R.L. SUTHERLAND, M.W. COOLEN, C. STIRZAKER und S.J. CLARK, 2013. Regional activation of the cancer genome by long-range epigenetic remodeling [online]. *Cancer cell*, **23**(1), 9-22. Cancer cell. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.ccr.2012.11.006
- BÉTERMIER, M., P. BERTRAND und B.S. LOPEZ, 2014. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? [online]. *PLoS Genetics*, **10**(1), e1004086. ISSN 1553-7390. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pgen.1004086
- BISWAS, A.K. und D.G. JOHNSON, 2012. Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage [online]. *Cancer research*, **72**(1), 13-17. Cancer research. Verfügbar unter: doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2196
- BJERREGAARD, V.A., L. GARRIBBA, C.T. MCMURRAY, I.D. HICKSON und Y. LIU, 2018. Folate deficiency drives mitotic missegregation of the human FRAXA locus [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**(51), 13003-13008. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.1808377115
- BOBOWICZ, M., M. SKRZYPSKI, P. CZAPIEWSKI, M. MARCZYK, A. MACIEJEWSKA, M. JANKOWSKI, A. SZULGO-PACZKOWSKA, W. ZEGARSKI, R. PAWŁOWSKI, J. POLAŃSKA, W. BIERNAT, J. JAŚKIEWICZ und J. JASSEM, 2016. Prognostic value of 5-microRNA based signature in T2-T3N0 colon cancer [online]. *Clinical & Experimental*

- Metastasis*, **33**(8), 765-773. ISSN 0262-0898. Verfügbar unter: doi:10.1007/s10585-016-9810-1
- BODGI, L., H.F. BAHMAD, T. ARAJI, J. AL CHOBOQ, J. BOU-GHARIOS, K. CHEAITO, Y.H. ZEIDAN, T. EID, F. GEARA und W. ABOU-KHEIR, 2019. Assessing Radiosensitivity of Bladder Cancer in vitro: A 2D vs. 3D Approach [online]. *Frontiers in oncology*, **9**, 153. ISSN 2234-943X. Verfügbar unter: doi:10.3389/fonc.2019.00153
- BORCHERT, G.M., W. LANIER und B.L. DAVIDSON, 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs [online]. *Nature structural & molecular biology*, **13**(12), 1097-1101. ISSN 1545-9993. Verfügbar unter: doi:10.1038/nsmb1167
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [online]. *Analytical biochemistry*, **72**, 248-254. ISSN 0003-2697. Verfügbar unter: doi:10.1006/abio.1976.9999
- BUDAKOTI, M., A.S. PANWAR, D. MOLPA, R.K. SINGH, D. BÜSSELBERG, A.P. MISHRA, H.D.M. COUTINHO und M. NIGAM, 2021. Micro-RNA: The darkhorse of cancer [online]. *Cellular signalling*, **83**, 109995. Cellular signalling. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cellsig.2021.109995
- BURGESS, R.J. und Z. ZHANG, 2013. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease [online]. *Nature structural & molecular biology*, **20**(1), 14-22. ISSN 1545-9993. Verfügbar unter: doi:10.1038/nsmb.2461
- CALIN, G.A., C. SEVIGNANI, C.D. DUMITRU, T. HYSLOP, E. NOCH, S. YENDAMURI, M. SHIMIZU, S. RATTAN, F. BULLRICH, M. NEGRINI und C.M. CROCE, 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(9), 2999-3004. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.0307323101
- CAO, J.-X., 2019. miR-888 regulates cancer progression by targeting multiple targets in lung adenocarcinoma [online]. *Oncology reports*, **41**(6), 3367-3376. Oncology reports. Verfügbar unter: doi:10.3892/or.2019.7118
- CARTHEW, R.W. und E.J. SONTHEIMER, 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs [online]. *Cell*, **136**(4), 642-655. ISSN 00928674. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cell.2009.01.035
- CATTO, J.W.F., S. MIAH, H.C. OWEN, H. BRYANT, K. MYERS, E. DUDZIEC, S. LARRÉ, M. MILO, I. REHMAN, D.J. ROSARIO, E. DI MARTINO, M.A. KNOWLES, M. MEUTH, A.L. HARRIS und F.C. HAMDY, 2009. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer [online]. *Cancer research*, **69**(21), 8472-8481. Cancer research. Verfügbar unter: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0744
- CECCALDI, R., B. RONDINELLI und A.D. D'ANDREA, 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break [online]. *Trends in cell biology*, **26**(1), 52-64. Trends in cell biology. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.tcb.2015.07.009
- CHEN, J., F. ZHU, R.L. WEAKS, A.K. BISWAS, R. GUO, Y. LI und D.G. JOHNSON, 2011. E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **10**(8), 1287-1294. Cell cycle (Georgetown, Tex.).
- CHIRUVELLA, K.K., Z. LIANG und T.E. WILSON, 2013. Repair of double-strand breaks by end joining [online]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **5**(5), a012757. Cold Spring Harbor perspectives in biology. Verfügbar unter: doi:10.1101/cshperspect.a012757
- CHOI, E.-H. und K.P. KIM, 2019. E2F1 facilitates DNA break repair by localizing to break sites and enhancing the expression of homologous recombination factors [online]. *Experimental & molecular medicine*, **51**(9), 1-12. Experimental & molecular medicine. Verfügbar unter: doi:10.1038/s12276-019-0307-2

- CORBESKI, I., K. DOLINAR, H. WIENK, R. BOELENs und H. VAN INGEN, 2018. DNA repair factor APLF acts as a H2A-H2B histone chaperone through binding its DNA interaction surface [online]. *Nucleic Acids Research*, **46**(14), 7138-7152. ISSN 0305-1048. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gky507
- DAR, A.A., S. MAJID, D. de SEMIR, M. NOSRATI, V. BEZROOKOVE und M. KASHANI-SABET, 2011. miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein [online]. *The Journal of biological chemistry*, **286**(19), 16606-16614. The Journal of biological chemistry. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.M111.227611
- DEGREGORI, J. und D.G. JOHNSON, 2006. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis [online]. *Current molecular medicine*, **6**(7), 739-748. ISSN 1566-5240. Verfügbar unter: doi:10.2174/1566524010606070739
- DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF, 2020. *Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Kurzversion 2.0. AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL*, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html>, (Stand: Februar 2022).
- DÍAZ, R., J. SILVA, J.M. GARCÍA, Y. LORENZO, V. GARCÍA, C. PEÑA, R. RODRÍGUEZ, C. MUÑOZ, F. GARCÍA, F. BONILLA und G. DOMÍNGUEZ, 2008. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients [online]. *Genes, chromosomes & cancer*, **47**(9), 794-802. Genes, chromosomes & cancer. Verfügbar unter: doi:10.1002/gcc.20580
- DONG, W., L. LI, X. TENG, X. YANG, S. SI und J. CHAI, 2020. End Processing Factor APLF Promotes NHEJ Efficiency and Contributes to TMZ- and Ionizing Radiation-Resistance in Glioblastoma Cells [online]. *OncoTargets and therapy*, **13**, 10593-10605. ISSN 1178-6930. Verfügbar unter: doi:10.2147/OTT.S254292
- DYSON, N., 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins [online]. *Genes & development*, **12**(15), 2245-2262. Genes & development. Verfügbar unter: doi:10.1101/gad.12.15.2245
- EGAWA, H., K. JINGUSHI, T. HIRONO, Y. UEDA, K. KITAE, W. NAKATA, K. FUJITA, M. UEMURA, N. NONOMURA und K. TSUJIKAWA, 2016. The miR-130 family promotes cell migration and invasion in bladder cancer through FAK and Akt phosphorylation by regulating PTEN [online]. *Scientific reports*, **6**, 20574. Scientific reports. Verfügbar unter: doi:10.1038/srep20574
- ENGELMANN, D. und B.M. PÜTZER, 2010. Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance [online]. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, **13**(4-5), 119-131. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.drug.2010.06.001
- ENGELMANN, D. und B.M. PÜTZER, 2012. The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis [online]. *Cancer research*, **72**(3), 571-575. Cancer research. Verfügbar unter: doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2575
- ENGELMANN, D., D. MAYOLI-NÜSSLE, C. MAYRHOFER, K. FÜRST, V. ALLA, A. STOLL, A. SPITSCHAK, K. ABSHAGEN, B. VOLLMAR, S. RAN und B.M. PÜTZER, 2013. E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B [online]. *Journal of molecular cell biology*, **5**(6), 391-403. Journal of molecular cell biology. Verfügbar unter: doi:10.1093/jmcb/mjt035
- ESQUELA-KERSCHER, A. und F.J. SLACK, 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer [online]. *Nature reviews. Cancer*, **6**(4), 259-269. Nature reviews. Cancer. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrc1840

- FAN, X. und L. KURGAN, 2015. Comprehensive overview and assessment of computational prediction of microRNA targets in animals [online]. *Briefings in Bioinformatics*, **16**(5), 780-794. ISSN 1467-5463. Verfügbar unter: doi:10.1093/bib/bbu044
- FILIPOWICZ, W., S.N. BHATTACHARYYA und N. SONENBERG, 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [online]. *Nature reviews. Genetics*, **9**(2), 102-114. ISSN 1471-0056. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrg2290
- FORNES, O., J.A. CASTRO-MONDRAGON, A. KHAN, R. VAN DER LEE, X. ZHANG, P.A. RICHMOND, B.P. MODI, S. CORREARD, M. GHEORGHE, D. BARANAŠIĆ, W. SANTANA-GARCIA, G. TAN, J. CHÈNEBY, B. BALLESTER, F. PARCY, A. SANDELIN, B. LENHARD, W.W. WASSERMAN und A. MATHELIER, 2020. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles [online]. *Nucleic acids research*, **48**(D1), D87-D92. Nucleic acids research. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkz1001
- FRIT, P., V. ROPARS, M. MODESTI, J.B. CHARBONNIER und P. CALSOU, 2019. Plugged into the Ku-DNA hub: The NHEJ network [online]. *Progress in biophysics and molecular biology*, **147**, 62-76. Progress in biophysics and molecular biology. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.pbiomolbio.2019.03.001
- FUJITA, K. und N. NONOMURA, 2018. Urinary biomarkers of prostate cancer [online]. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, **25**(9), 770-779. International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association. Verfügbar unter: doi:10.1111/iju.13734
- GAO, C., Y. SU, J. KOEMAN, E. HAAK, K. DYKEMA, C. ESSENBERG, E. HUDSON, D. PETILLO, S.K. KHOO und G.F. VANDE WOUDE, 2016. Chromosome instability drives phenotypic switching to metastasis [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**(51), 14793-14798. ISSN 1091-6490. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.1618215113
- GLOVER, T.W., 1998. Instability at chromosomal fragile sites [online]. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, **154**, 185-199. ISSN 0080-0015. Verfügbar unter: doi:10.1007/978-3-642-46870-4_11
- GOLDMAN, M.J., B. CRAFT, M. HASTIE, K. REPEČKA, F. MCDADE, A. KAMATH, A. BANERJEE, Y. LUO, D. ROGERS, A.N. BROOKS, J. ZHU und D. HAUSSLER, 2020. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform [online]. *Nature biotechnology*, **38**(6), 675-678. Nature biotechnology. Verfügbar unter: doi:10.1038/s41587-020-0546-8
- GRUNDY, G.J., S.L. RULTEN, Z. ZENG, R. ARRIBAS-BOSACOMA, N. ILES, K. MANLEY, A. OLIVER und K.W. CALDECOTT, 2013. APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes [online]. *The EMBO Journal*, **32**(1), 112-125. ISSN 0261-4189. Verfügbar unter: doi:10.1038/emboj.2012.304
- HAMMEL, M., Y. YU, S.K. RADHAKRISHNAN, C. CHOKSHI, M.-S. TSAI, Y. MATSUMOTO, M. KUZDOVICH, S.G. REMESH, S. FANG, A.E. TOMKINSON, S.P. LEES-MILLER und J.A. TAINER, 2016. An Intrinsically Disordered APLF Links Ku, DNA-PKcs, and XRCC4-DNA Ligase IV in an Extended Flexible Non-homologous End Joining Complex [online]. *The Journal of biological chemistry*, **291**(53), 26987-27006. The Journal of biological chemistry. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.M116.751867
- HANAHAAN, D. und R.A. WEINBERG, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation [online]. *Cell*, **144**(5), 646-674. ISSN 00928674. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- HASEGAWA, T., G.J. GLAVICH, M. PAHUSKI, A. SHORT, O.J. SEMMES, L. YANG, V. GALKIN, R. DRAKE und A. ESQUELA-KERSCHER, 2018. Characterization and Evidence of the miR-888 Cluster as a Novel Cancer Network in Prostate [online]. *Molecular cancer research : MCR*, **16**(4), 669-681. Molecular cancer research : MCR. Verfügbar unter: doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0321

- HATANO, K., B. KUMAR, Y. ZHANG, J.B. COULTER, M. HEDAYATI, B. MEARS, X. NI, T.A. KUDROLLI, W.H. CHOWDHURY, R. RODRIGUEZ, T.L. DEWEESE und S.E. LUPOLD, 2015. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation [online]. *Nucleic Acids Research*, **43**(8), 4075-4086. ISSN 0305-1048. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkv273
- HE, L. und G.J. HANNON, 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [online]. *Nature reviews. Genetics*, **5**(7), 522-531. ISSN 1471-0056. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrg1379
- HÉBERLÉ, É. und A.F. BARDET, 2019. Sensitivity of transcription factors to DNA methylation [online]. *Essays in biochemistry*, **63**(6), 727-741. Essays in biochemistry. Verfügbar unter: doi:10.1042/EBC20190033
- HOFFMAN, E.A., B.L. FREY, L.M. SMITH und D.T. AUBLE, 2015. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes [online]. *The Journal of biological chemistry*, **290**(44), 26404-26411. The Journal of biological chemistry. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.R115.651679
- HOVEY, A.M., E.J. DEVOR, P.J. BREHENY, S.L. MOTT, D. DAI, K.W. THIEL und K.K. LESLIE, 2015. miR-888: A Novel Cancer-Testis Antigen that Targets the Progesterone Receptor in Endometrial Cancer [online]. *Translational Oncology*, **8**(2), 85-96. Translational Oncology. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.tranon.2015.02.001
- HUANG, S. und L. CHEN, 2014. MiR-888 regulates side population properties and cancer metastasis in breast cancer cells [online]. *Biochemical and biophysical research communications*, **450**(4), 1234-1240. Biochemical and biophysical research communications. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.022
- ILES, N., S. RULTEN, S.F. EL-KHAMISY und K.W. CALDECOTT, 2007. APLF (C2orf13) is a novel human protein involved in the cellular response to chromosomal DNA strand breaks [online]. *Molecular and cellular biology*, **27**(10), 3793-3803. ISSN 0270-7306. Verfügbar unter: doi:10.1128/MCB.02269-06
- ILIAKIS, G., T. MURMANN und A. SONI, 2015. Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations [online]. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, **793**, 166-175. Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.mrgentox.2015.07.001
- JIA, B., L. TAN, Z. JIN, Y. JIAO, Y. FU und Y. LIU, 2017. MiR-892a Promotes Hepatocellular Carcinoma Cells Proliferation and Invasion Through Targeting CD226 [online]. *Journal of cellular biochemistry*, **118**(6), 1489-1496. Journal of cellular biochemistry. Verfügbar unter: doi:10.1002/jcb.25808
- JIANG, L., L. YU, X. ZHANG, F. LEI, L. WANG, X. LIU, S. WU, J. ZHU, G. WU, L. CAO, A. LIU, L. SONG und J. LI, 2016. miR-892b Silencing Activates NF- κ B and Promotes Aggressiveness in Breast Cancer [online]. *Cancer research*, **76**(5), 1101-1111. Cancer research [Zugriff am: 24. Januar 2022]. Verfügbar unter: doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1770
- JUSINO, S. und H.I. SAAVEDRA, 2019. Role of E2Fs and mitotic regulators controlled by E2Fs in the epithelial to mesenchymal transition [online]. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, **244**(16), 1419-1429. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.). Verfügbar unter: doi:10.1177/1535370219881360
- KELLER, A., L. GRÖGER, T. TSCHERNIG, J. SOLOMON, O. LAHAM, N. SCHAUM, V. WAGNER, F. KERN, G.P. SCHMARTZ, Y. LI, A. BORCHERDING, C. MEIER, T. WYSS-CORAY, E. MEESE, T. FEHLMANN und N. LUDWIG, 2021. miRNATissueAtlas2: an update to the human miRNA tissue atlas [online]. *Nucleic acids research*. Nucleic acids research. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkab808

- KENT, W.J., C.W. SUGNET, T.S. FUREY, K.M. ROSKIN, T.H. PRINGLE, A.M. ZHALER und D. HAUSSLER, 2002. The human genome browser at UCSC [online]. *Genome research*, **12**(6), 996-1006. ISSN 1088-9051. Verfügbar unter: doi:10.1101/gr.229102
- KHAN, F.M., S. MARQUARDT, S.K. GUPTA, S. KNOLL, U. SCHMITZ, A. SPITSCHAK, D. ENGELMANN, J. VERA, O. WOLKENHAUER und B.M. PÜTZER, 2017. Unraveling a tumor type-specific regulatory core underlying E2F1-mediated epithelial-mesenchymal transition to predict receptor protein signatures [online]. *Nature communications*, **8**(1), 198. Nature communications. Verfügbar unter: doi:10.1038/s41467-017-00268-2
- KIM, V.N., J. HAN und M.C. SIOMI, 2009. Biogenesis of small RNAs in animals [online]. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **10**(2), 126-139. Nature reviews. Molecular cell biology. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrm2632
- KIWERSKA, K. und K. SZYFTER, 2019. DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy-a double-edged sword [online]. *Journal of Applied Genetics*, **60**(3-4), 329-334. ISSN 1234-1983. Verfügbar unter: doi:10.1007/s13353-019-00516-9
- KNOLL, S., K. FÜRST, B. KOWTHARAPU, U. SCHMITZ, S. MARQUARDT, O. WOLKENHAUER, H. MARTIN und B.M. PÜTZER, 2014. E2F1 induces miR-224/452 expression to drive EMT through TXNIP downregulation [online]. *EMBO reports*, **15**(12), 1315-1329. EMBO reports. Verfügbar unter: doi:10.15252/embr.201439392
- KNOLL, S., S. EMMRICH und B.M. PÜTZER, 2013. The E2F1-miRNA cancer progression network [online]. *Advances in experimental medicine and biology*, **774**, 135-147. ISSN 0065-2598. Verfügbar unter: doi:10.1007/978-94-007-5590-1_8
- KNOWLES, M.A. und C.D. HURST, 2015. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity [online]. *Nature reviews. Cancer*, **15**(1), 25-41. Nature reviews. Cancer. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrc3817
- KOZOMARA, A., M. BIRGAOANU und S. GRIFFITHS-JONES, 2019. miRBase: from microRNA sequences to function [online]. *Nucleic Acids Research*, **47**(D1), D155-D162. ISSN 0305-1048. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gky1141
- KRAYWINKEL, K., J. FIEBIG und G.B. SCHULZ, 2018. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland [online]. *Der Onkologe*, **24**(1), 6-13. ISSN 0947-8965. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00761-017-0325-4
- KUTWIN, P., T. KONECKI, E.M. BORKOWSKA, M. TRACZYK-BORSZYŃSKA und Z. JABŁONOWSKI, 2018. Urine miRNA as a potential biomarker for bladder cancer detection - a meta-analysis [online]. *Central European journal of urology*, **71**(2), 177-185. ISSN 2080-4806. Verfügbar unter: doi:10.5173/ceju.2018.1605
- LAMMENS, T., J. LI, G. LEONE und L. de VEYLDER, 2009. Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family [online]. *Trends in cell biology*, **19**(3), 111-118. Trends in cell biology. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.tcb.2009.01.002
- LEE, H.-Y., S.-S. HAN, H. RHEE, J.H. PARK, J.S. LEE, Y.-M. OH, S.S. CHOI, S.-H. SHIN und W.J. KIM, 2015. Differential expression of microRNAs and their target genes in non-small-cell lung cancer [online]. *Molecular medicine reports*, **11**(3), 2034-2040. Molecular medicine reports. Verfügbar unter: doi:10.3892/mmr.2014.2890
- LEE, J.-S., S.-H. LEEM, S.-Y. LEE, S.-C. KIM, E.-S. PARK, S.-B. KIM, S.-K. KIM, Y.-J. KIM, W.-J. KIM und I.-S. CHU, 2010. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors [online]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**(16), 2660-2667. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. Verfügbar unter: doi:10.1200/JCO.2009.25.0977
- LEE, K.-H., Y.-L. CHEN, S.-D. YEH, M. HSIAO, J.-T. LIN, Y.-G. GOAN und P.-J. LU, 2009. MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of Akt phosphorylation [online]. *Oncogene*, **28**(38), 3360-3370. ISSN 0950-9232. Verfügbar unter: doi:10.1038/onc.2009.192

- LEE, R.C., R.L. FEINBAUM und V. AMBROS, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [online]. *Cell*, **75**(5), 843-854. ISSN 00928674. Verfügbar unter: doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
- LEE, Y., M. KIM, J. HAN, K.-H. YEOM, S. LEE, S.H. BAEK und V.N. KIM, 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [online]. *The EMBO Journal*, **23**(20), 4051-4060. ISSN 0261-4189. Verfügbar unter: doi:10.1038/sj.emboj.7600385
- LEWIS, H., R. LANCE, D. TROYER, H. BEYDOUN, M. HADLEY, J. ORIANI, T. BENZINE, K. MADRIC, O.J. SEMMES, R. DRAKE und A. ESQUELA-KERSCHER, 2014. miR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration [online]. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **13**(2), 227-239. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. Verfügbar unter: doi:10.4161/cc.26984
- LI, H., D. HUANG und S. HANG, 2019. Salidroside inhibits the growth, migration and invasion of Wilms' tumor cells through down-regulation of miR-891b [online]. *Life sciences*, **222**, 60-68. *Life sciences*. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.lfs.2019.02.052
- LI, J., H. SUN, Y. HUANG, Y. WANG, Y. LIU und X. CHEN, 2019a. Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination [online]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **51**(9), 879-889. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. Verfügbar unter: doi:10.1093/abbs/gmz076
- LI, L.-C. und R. DAHIYA, 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs [online]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **18**(11), 1427-1431. ISSN 1367-4803. Verfügbar unter: doi:10.1093/bioinformatics/18.11.1427
- LI, S., S. KANNO, R. WATANABE, H. OGIWARA, T. KOHNO, G. WATANABE, A. YASUI und M.R. LIEBER, 2011. Polynucleotide kinase and aprataxin-like forkhead-associated protein (PALF) acts as both a single-stranded DNA endonuclease and a single-stranded DNA 3' exonuclease and can participate in DNA end joining in a biochemical system [online]. *The Journal of biological chemistry*, **286**(42), 36368-36377. *The Journal of biological chemistry*. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.M111.287797
- LI, X. und W.-D. HEYER, 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance [online]. *Cell research*, **18**(1), 99-113. *Cell research*. Verfügbar unter: doi:10.1038/cr.2008.1
- LI, Y., G. LI, X. GUO, H. YAO, G. WANG und C. LI, 2020. Non-coding RNA in bladder cancer [online]. *Cancer letters*, **485**, 38-44. *Cancer letters*. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.canlet.2020.04.023
- LI, Y.-B., F.-N. SUN, X.-Y. MA, H. QU und Y. YU, 2019b. MiR-888 promotes cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting SMAD4 [online]. *European review for medical and pharmacological sciences*, **23**(5), 2020-2027. *European review for medical and pharmacological sciences*. Verfügbar unter: doi:10.26355/eurrev_201903_17241
- LIANG, W., J. CAO, B. XU, P. YANG, F. SHEN, Z. SUN, W. LI, Q. WANG und F. LIU, 2015. miR-892a regulated PPP2R2A expression and promoted cell proliferation of human colorectal cancer cells [online]. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, **72**, 119-124. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.biopha.2015.04.015
- LIN, W.C., F.T. LIN und J.R. NEVINS, 2001. Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes & development*, **15**(14), 1833-1844. *Genes & development*.
- LIU, K., F.-T. LIN, J.M. RUPPERT und W.-C. LIN, 2003. Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1 [online]. *Molecular and cellular biology*, **23**(9), 3287-3304. ISSN 0270-7306. Verfügbar unter: doi:10.1128/MCB.23.9.3287-3304.2003
- LODYGIN, D., V. TARASOV, A. EPANCHINTSEV, C. BERKING, T. KNYAZEVA, H. KÖRNER, P. KNYAZEV, J. DIEBOLD und H. HERMEKING, 2008. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer [online]. *Cell cycle (Georgetown,*

Tex.), 7(16), 2591-2600. Cell cycle (Georgetown, Tex.). Verfügbar unter: doi:10.4161/cc.7.16.6533

- LORIOT, A., A. VAN TONGELEN, J. BLANCO, S. KLAESSENS, J. CANNUYER, N. VAN BAREN, A. DECOTTIGNIES und C. de SMET, 2014. A novel cancer-germline transcript carrying pro-metastatic miR-105 and TET-targeting miR-767 induced by DNA hypomethylation in tumors [online]. *Epigenetics*, **9**(8), 1163-1171. ISSN 1559-2294. Verfügbar unter: doi:10.4161/epi.29628
- MAJUMDER, A., K.M. SYED, A. MUKHERJEE, M.B. LANKADASARI, J.M. AZEEZ, S. SREEJA, K.B. HARIKUMAR, M.R. PILLAI und D. DUTTA, 2018. Enhanced expression of histone chaperone APLF associate with breast cancer [online]. *Molecular cancer*, **17**(1), 76. Molecular cancer. Verfügbar unter: doi:10.1186/s12943-018-0826-9
- MANCINI, M., M. RIGHETTO, S. ZUMERLE, M. MONTOPOLI und F. ZATTONI, 2020. The Bladder EpiCheck Test as a Non-Invasive Tool Based on the Identification of DNA Methylation in Bladder Cancer Cells in the Urine: A Review of Published Evidence [online]. *International journal of molecular sciences*, **21**(18). International journal of molecular sciences. Verfügbar unter: doi:10.3390/ijms21186542
- MANICKAVINAYAHAM, S., B.K. DENNEHEY und D.G. JOHNSON, 2021. Direct Regulation of DNA Repair by E2F and RB in Mammals and Plants: Core Function or Convergent Evolution? [online]. *Cancers*, **13**(5). Cancers. Verfügbar unter: doi:10.3390/cancers13050934
- MANICKAVINAYAHAM, S., R. VÉLEZ-CRUZ, A.K. BISWAS, E. BEDFORD, B.J. KLEIN, T.G. KUTATELADZE, B. LIU, M.T. BEDFORD und D.G. JOHNSON, 2019. E2F1 acetylation directs p300/CBP-mediated histone acetylation at DNA double-strand breaks to facilitate repair [online]. *Nature communications*, **10**(1), 4951. Nature communications. Verfügbar unter: doi:10.1038/s41467-019-12861-8
- MAO, Z., M. BOZZELLA, A. SELUANOV und V. GORBUNOVA, 2008. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells [online]. *DNA repair*, **7**(10), 1765-1771. DNA repair. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.dnarep.2008.06.018
- MARQUARDT, S., C. RICHTER, B.M. PÜTZER und S. LOGOTHETI, 2020. MiRNAs Targeting Double Strand DNA Repair Pathways Lurk in Genomically Unstable Rare Fragile Sites and Determine Cancer Outcomes [online]. *Cancers*, **12**(4). Cancers. Verfügbar unter: doi:10.3390/cancers12040876
- MASSY, B. de, 2013. Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes [online]. *Annual review of genetics*, **47**, 563-599. Annual review of genetics. Verfügbar unter: doi:10.1146/annurev-genet-110711-155423
- MATSUBARA, H., T. TAKEUCHI, E. NISHIKAWA, K. YANAGISAWA, Y. HAYASHITA, H. EBI, H. YAMADA, M. SUZUKI, M. NAGINO, Y. NIMURA, H. OSADA und T. TAKAHASHI, 2007. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92 [online]. *Oncogene*, **26**(41), 6099-6105. ISSN 0950-9232. Verfügbar unter: doi:10.1038/sj.onc.1210425
- MCDONALD, S.D., S.L. PERKINS, C.A. JODOUIN und M.C. WALKER, 2002. Folate levels in pregnant women who smoke: an important gene/environment interaction [online]. *American journal of obstetrics and gynecology*, **187**(3), 620-625. ISSN 0002-9378. Verfügbar unter: doi:10.1067/mob.2002.125239
- MCGEARY, S.E., K.S. LIN, C.Y. SHI, T.M. PHAM, N. BISARIA, G.M. KELLEY und D.P. BARTEL, 2019. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy [online]. *Science (New York, N.Y.)*, **366**(6472). Science (New York, N.Y.). Verfügbar unter: doi:10.1126/science.aav1741

- MCVEY, M. und S.E. LEE, 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings [online]. *Trends in genetics : TIG*, **24**(11), 529-538. ISSN 0168-9525. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.tig.2008.08.007
- MEHROTRA, P.V., D. AHEL, D.P. RYAN, R. WESTON, N. WIECHENS, R. KRAEHENBUEHL, T. OWEN-HUGHES und I. AHEL, 2011. DNA repair factor APLF is a histone chaperone [online]. *Molecular cell*, **41**(1), 46-55. *Molecular cell*. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.molcel.2010.12.008
- MEIER, C., A. SPITSCHAK, K. ABSHAGEN, S. GUPTA, J.M. MOR, O. WOLKENHAUER, J. HAIER, B. VOLLMAR, V. ALLA und B.M. PÜTZER, 2014. Association of RHAMM with E2F1 promotes tumour cell extravasation by transcriptional up-regulation of fibronectin [online]. *The Journal of pathology*, **234**(3), 351-364. *The Journal of pathology*. Verfügbar unter: doi:10.1002/path.4400
- MONIEF, M.A.L., B.T. SHERWOOD, K.J. BOWMAN, R.C. KOCKELBERGH, R.P. SYMONDS, W.P. STEWARD, J.K. MELLON und G.D.D. JONES, 2003. Measurements using the alkaline comet assay predict bladder cancer cell radiosensitivity [online]. *British journal of cancer*, **89**(12), 2271-2276. ISSN 0007-0920. Verfügbar unter: doi:10.1038/sj.bjc.6601333
- MOSHOUS, D., I. CALLEBAUT, R. de CHASSEVAL, B. CORNEO, M. CAVAZZANA-CALVO, F. LE DEIST, I. TEZCAN, O. SANAL, Y. BERTRAND, N. PHILIPPE, A. FISCHER und J.-P. de VILLARTAY, 2001. Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency [online]. *Cell*, **105**(2), 177-186. ISSN 00928674. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0092-8674(01)00309-9
- NCBI, 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information [online]. *Nucleic acids research*, **46**(D1), D8-D13. *Nucleic acids research*. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkx1095
- NELSON, J.D., O. DENISENKO und K. BOMSZTYK, 2006. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method [online]. *Nature protocols*, **1**(1), 179-185. *Nature protocols*. Verfügbar unter: doi:10.1038/nprot.2006.27
- NEMOZ, C., V. ROPARS, P. FRIT, A. GONTIER, P. DREVET, J. YU, R. GUEROIS, A. PITOIS, A. COMTE, C. DELTEIL, N. BARBOULE, P. LEGRAND, S. BACONNAIS, Y. YIN, S. TADI, E. BARBET-MASSIN, I. BERGER, E. LE CAM, M. MODESTI, E. ROTHENBERG, P. CALSOU und J.B. CHARBONNIER, 2018. XLF and APLF bind Ku80 at two remote sites to ensure DNA repair by non-homologous end joining [online]. *Nature structural & molecular biology*, **25**(10), 971-980. ISSN 1545-9993. Verfügbar unter: doi:10.1038/s41594-018-0133-6
- NOVORADOVSKY, A., V. ZHANG, M. GHOSH, H.H. HOGREFE, J.A. SORGE und T. GAASTERLAND, 2005. Computational Principles of Primer Design for Site Directed Mutagenesis. *Technical Proceedings of 2005 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show, Anaheim*, 532-535. *Technical Proceedings of 2005 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show, Anaheim*.
- O'DONNELL, K.A., E.A. WENTZEL, K.I. ZELLER, C.V. DANG und J.T. MENDELL, 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression [online]. *Nature*, **435**(7043), 839-843. *Nature*. Verfügbar unter: doi:10.1038/nature03677
- OLKHOV-MITSEL, E., A.J. SAVIO, K.J. KRON, V.V. PETHE, T. HERMANN, N.E. FLESHNER, B.W. VAN RHIJN, T.H. VAN DER KWAST, A.R. ZLOTTA und B. BAPAT, 2017. Epigenome-Wide DNA Methylation Profiling Identifies Differential Methylation Biomarkers in High-Grade Bladder Cancer [online]. *Translational Oncology*, **10**(2), 168-177. *Translational Oncology*. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.tranon.2017.01.001
- PALLA, A.R., D. PIAZZOLLA, N. ALCAZAR, M. CAÑAMERO, O. GRAÑA, G. GÓMEZ-LÓPEZ, O. DOMINGUEZ, M. DUEÑAS, J.M. PARAMIO und M. SERRANO, 2015. The pluripotency factor NANOG promotes the formation of squamous cell carcinomas

- [online]. *Scientific reports*, **5**, 10205. Scientific reports. Verfügbar unter: doi:10.1038/srep10205
- PANNUNZIO, N.R., G. WATANABE und M.R. LIEBER, 2018. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks [online]. *The Journal of biological chemistry*, **293**(27), 10512-10523. The Journal of biological chemistry. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.TM117.000374
- PARASKEVOPOULOU, M.D., G. GEORGAKILAS, N. KOSTOULAS, I.S. VLACHOS, T. VERGOULIS, M. RECZKO, C. FILIPPIDIS, T. DALAMAGAS und A.G. HATZIGEORGIOU, 2013. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows [online]. *Nucleic acids research*, **41**(Web Server issue), W169-73. Nucleic acids research. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkt393
- PIAO, X.-M., E.-J. CHA, S.J. YUN und W.-J. KIM, 2021. Role of Exosomal miRNA in Bladder Cancer: A Promising Liquid Biopsy Biomarker [online]. *International journal of molecular sciences*, **22**(4). International journal of molecular sciences. Verfügbar unter: doi:10.3390/ijms22041713
- PULIKKAN, J.A., V. DENGLER, P.S. PERAMANGALAM, A.A. PEER ZADA, C. MÜLLER-TIDOW, S.K. BOHLANDER, D.G. TENEN und G. BEHRE, 2010. Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia [online]. *Blood*, **115**(9), 1768-1778. Blood. Verfügbar unter: doi:10.1182/blood-2009-08-240101
- PÜTZER, B.M. und D. ENGELMANN, 2013. E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back [online]. *Trends in molecular medicine*, **19**(2), 89-98. Trends in molecular medicine. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.molmed.2012.10.009
- QIN, S., Y. LI, X. CAO, J. DU und X. HUANG, 2017. NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in ovarian cancer [online]. *Bioscience reports*, **37**(1). Bioscience reports. Verfügbar unter: doi:10.1042/BSR20160247
- REINERT, T., C. MODIN, F.M. CASTANO, P. LAMY, T.K. WOJDACZ, L.L. HANSEN, C. WIUF, M. BORRE, L. DYRSKJØT und T.F. ORNTOFT, 2011. Comprehensive genome methylation analysis in bladder cancer: identification and validation of novel methylated genes and application of these as urinary tumor markers [online]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **17**(17), 5582-5592. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. Verfügbar unter: doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2659
- REINHART, B.J., F.J. SLACK, M. BASSON, A.E. PASQUINELLI, J.C. BETTINGER, A.E. ROUGVIE, H.R. HORVITZ und G. RUVKUN, 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [online]. *Nature*, **403**(6772), 901-906. Nature. Verfügbar unter: doi:10.1038/35002607
- RICHTER, C., S. MARQUARDT, F. LI, A. SPITSCHAK, N. MURR, B.A.H. EDELHÄUSER, G. ILIAKIS, B.M. PÜTZER und S. LOGOTHETI, 2019. Rewiring E2F1 with classical NHEJ via APLF suppression promotes bladder cancer invasiveness [online]. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, **38**(1), 292. Journal of experimental & clinical cancer research : CR. Verfügbar unter: doi:10.1186/s13046-019-1286-9
- ROCHE, J., 2018. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer [online]. *Cancers*, **10**(2). Cancers. Verfügbar unter: doi:10.3390/cancers10020052
- RODGERS, K. und M. MCVEY, 2016. Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks [online]. *Journal of cellular physiology*, **231**(1), 15-24. ISSN 0021-9541. Verfügbar unter: doi:10.1002/jcp.25053
- ROPARS, V., P. DREVET, P. LEGRAND, S. BACONNAIS, J. AMRAM, G. FAURE, J.A. MÁRQUEZ, O. PIÉTREMENT, R. GUEROIS, I. CALLEBAUT, E. LE CAM, P. REVY, J.-P. de VILLARTAY und J.-B. CHARBONNIER, 2011. Structural characterization of filaments formed by human Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous

- DNA end-joining [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(31), 12663-12668. ISSN 1091-6490. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.1100758108
- ROUSSEAU, S., A. DEBERNARDI, B. JACQUIAU, A.-L. VITTE, A. VESIN, H. NAGY-MIGNOTTE, D. MORO-SIBILOT, P.-Y. BRICHON, S. LANTUEJOUL, P. HAINAUT, J. LAFFAIRE, A. de REYNIÈS, D.G. BEER, J.-F. TIMSIT, C. BRAMBILLA, E. BRAMBILLA und S. KHOCHBIN, 2013. Ectopic activation of germline and placental genes identifies aggressive metastasis-prone lung cancers [online]. *Science translational medicine*, **5**(186), 186ra66. Science translational medicine. Verfügbar unter: doi:10.1126/scitranslmed.3005723
- RULTEN, S.L., A.E.O. FISHER, I. ROBERT, M.C. ZUMA, M. ROULEAU, L. JU, G. POIRIER, B. REINA-SAN-MARTIN und K.W. CALDECOTT, 2011. PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining [online]. *Molecular cell*, **41**(1), 33-45. Molecular cell. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.molcel.2010.12.006
- SÁNCHEZ-CARBAYO, M., 2012. Hypermethylation in bladder cancer: biological pathways and translational applications [online]. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **33**(2), 347-361. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Verfügbar unter: doi:10.1007/s13277-011-0310-2
- SELUANOV, A., Z. MAO und V. GORBUNOVA, 2010. Analysis of DNA double-strand break (DSB) repair in mammalian cells [online]. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (43). Journal of Visualized Experiments : JoVE. Verfügbar unter: doi:10.3791/2002
- SFEIR, A. und L.S. SYMINGTON, 2015. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? [online]. *Trends in biochemical sciences*, **40**(11), 701-714. ISSN 0968-0004. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.tibs.2015.08.006
- SHAO, M., T. BI, W. DING, C. YU, C. JIANG, H. YANG, X. SUN und M. YANG, 2018. OCT4 Potentiates Radio-Resistance and Migration Activity of Rectal Cancer Cells by Improving Epithelial-Mesenchymal Transition in a ZEB1 Dependent Manner [online]. *BioMed research international*, **2018**, 3424956. BioMed research international. Verfügbar unter: doi:10.1155/2018/3424956
- SHIBATA, A. und P.A. JEGGO, 2020. Roles for 53BP1 in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks [online]. *DNA repair*, **93**, 102915. DNA repair. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.dnarep.2020.102915
- SINGH, S.K., M. WANG, C. STAUDT und G. ILIAKIS, 2011. Post-irradiation chemical processing of DNA damage generates double-strand breaks in cells already engaged in repair [online]. *Nucleic acids research*, **39**(19), 8416-8429. Nucleic acids research. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkr463
- STANELLE, J. und B.M. PÜTZER, 2006. E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics [online]. *Trends in molecular medicine*, **12**(4), 177-185. Trends in molecular medicine. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.molmed.2006.02.002
- SUNG, H., J. FERLAY, R.L. SIEGEL, M. LAVERSANNE, I. SOERJOMATARAM, A. JEMAL und F. BRAY, 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [online]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**(3), 209-249. ISSN 1542-4863. Verfügbar unter: doi:10.3322/caac.21660
- SYED, K.M., S. JOSEPH, A. MUKHERJEE, A. MAJUMDER, J.M. TEIXEIRA, D. DUTTA und M.R. PILLAI, 2016. Histone chaperone APLF regulates induction of pluripotency in murine fibroblasts [online]. *Journal of Cell Science*, **129**(24), 4576-4591. ISSN 0021-9533. Verfügbar unter: doi:10.1242/jcs.194035
- SYLVESTRE, Y., V. de GUIRE, E. QUERIDO, U.K. MUKHOPADHYAY, V. BOURDEAU, F. MAJOR, G. FERBEYRE und P. CHARTRAND, 2007. An E2F/miR-20a autoregulatory

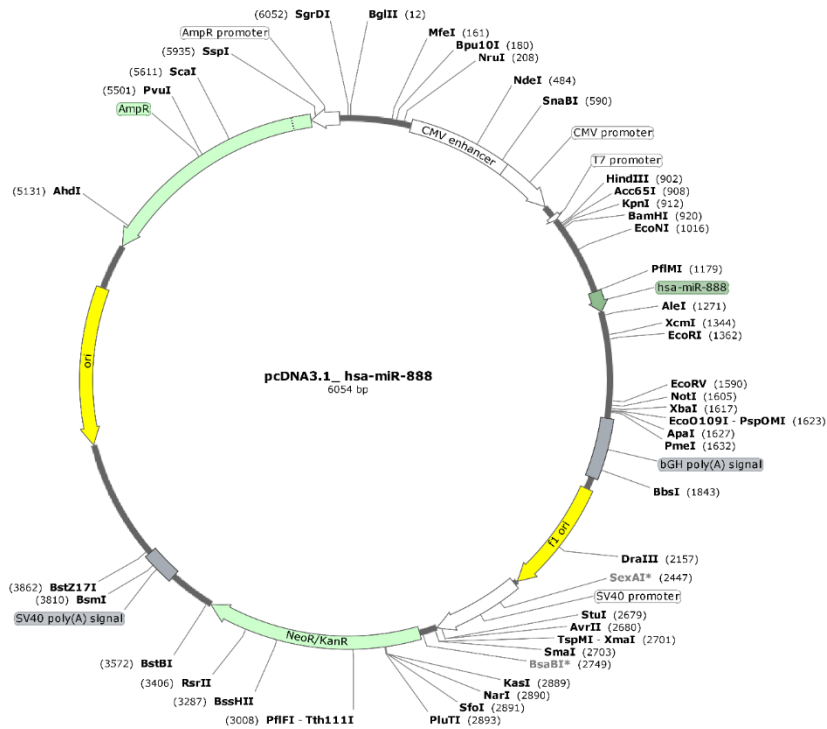
- feedback loop [online]. *The Journal of biological chemistry*, **282**(4), 2135-2143. The Journal of biological chemistry. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.M608939200
- TUNGTRONGCHITR, R., P. PONGPAEW, M. SOONTHORNRUENGYOT, D. VIROONUDOMPHOL, N. VUDHIVAI, A. TUNGTRONGCHITR, B. PHONRAT, S. POOUDONG und F.P. SCHELP, 2003. Relationship of tobacco smoking with serum vitamin B12, folic acid and haematological indices in healthy adults [online]. *Public health nutrition*, **6**(7), 675-681. ISSN 1368-9800. Verfügbar unter: doi:10.1079/phn2003483
- UNTERGASSER, A., H. NIJVEEN, X. RAO, T. BISSELING, R. GEURTS und J.A.M. LEUNISSEN, 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 [online]. *Nucleic Acids Research*, **35**(Web Server issue), W71-4. ISSN 0305-1048. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkm306
- 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 und T. OCHIYA, 2019. Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer [online]. *Cancer science*, **110**(1), 408-419. Cancer science. Verfügbar unter: doi:10.1111/cas.13856
- VARDAVAS, C.I., M.K. LINARDAKIS, C.M. HATZIS, N. MALLIARAKI, W.H. SARIS und A.G. KAFATOS, 2008. Smoking status in relation to serum folate and dietary vitamin intake [online]. *Tobacco Induced Diseases*, **4**(1), 8. ISSN 1617-9625. Verfügbar unter: doi:10.1186/1617-9625-4-8
- VARGHESE, P.C., S.M. RAJAM, D. NANDY, A. JORY, A. MUKHERJEE und D. DUTTA, 2021. Histone chaperone APLF level dictates the implantation of mouse embryos [online]. *Journal of Cell Science*, **134**(1). ISSN 0021-9533. Verfügbar unter: doi:10.1242/jcs.246900
- VEJNAR, C.E. und E.M. ZDOBNOV, 2012. MiRmap: comprehensive prediction of microRNA target repression strength [online]. *Nucleic acids research*, **40**(22), 11673-11683. Nucleic acids research. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gks901
- VERA, J., U. SCHMITZ, X. LAI, D. ENGELMANN, F.M. KHAN, O. WOLKENHAUER und B.M. PÜTZER, 2013. Kinetic modeling-based detection of genetic signatures that provide chemoresistance via the E2F1-p73/DNp73-miR-205 network [online]. *Cancer research*, **73**(12), 3511-3524. Cancer research. Verfügbar unter: doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4095
- WANG, C., C. XU, R. NIU, G. HU, Z. GU und Z. ZHUANG, 2019. MiR-890 inhibits proliferation and invasion and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells by targeting CD147 [online]. *BMC cancer*, **19**(1), 577. BMC cancer. Verfügbar unter: doi:10.1186/s12885-019-5796-9
- WANG, D., P. LU, H. ZHANG, M. LUO, X. ZHANG, X. WEI, J. GAO, Z. ZHAO und C. LIU, 2014. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients [online]. *Oncotarget*, **5**(21), 10803-10815. Oncotarget. Verfügbar unter: doi:10.18632/oncotarget.2506
- WANG, Y., V. ALLA, D. GOODY, S.K. GUPTA, A. SPITSCHAK, O. WOLKENHAUER, B.M. PÜTZER und D. ENGELMANN, 2016. Epigenetic factor EPC1 is a master regulator of DNA damage response by interacting with E2F1 to silence death and activate metastasis-related gene signatures [online]. *Nucleic Acids Research*, **44**(1), 117-133. ISSN 0305-1048. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkv885
- WOLFF, E.M., Y. CHIHARA, F. PAN, D.J. WEISENBERGER, K.D. SIEGMUND, K. SUGANO, K. KAWASHIMA, P.W. LAIRD, P.A. JONES und G. LIANG, 2010. Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue [online]. *Cancer research*, **70**(20), 8169-8178. Cancer research. Verfügbar unter: doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1335

- WOODS, K., J.M. THOMSON und S.M. HAMMOND, 2007. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors [online]. *The Journal of biological chemistry*, **282**(4), 2130-2134. The Journal of biological chemistry. Verfügbar unter: doi:10.1074/jbc.C600252200
- XING, J., R. ZHAI, C. WANG, H. LIU, J. ZENG, D. ZHOU, M. ZHANG, L. WANG, Q. WU, Y. GU und Y. ZHANG, 2021. DiseaseMeth version 3.0: a major expansion and update of the human disease methylation database [online]. *Nucleic Acids Research*. ISSN 0305-1048. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkab1088
- XU, S., C. ZHAO, Z. JIA, X. WANG, Y. HAN und Z. YANG, 2017. Down-regulation of PARP1 by miR-891b sensitizes human breast cancer cells to alkylating chemotherapeutic drugs [online]. *Archives of gynecology and obstetrics*, **296**(3), 543-549. Archives of gynecology and obstetrics. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00404-017-4444-3
- YANG, G., R. ZHANG, X. CHEN, Y. MU, J. AI, C. SHI, Y. LIU, C. SHI, L. SUN, N.G. RAINOV, H. LI, B. YANG und S. ZHAO, 2011. MiR-106a inhibits glioma cell growth by targeting E2F1 independent of p53 status [online]. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, **89**(10), 1037-1050. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany). Verfügbar unter: doi:10.1007/s00109-011-0775-x
- YANG, S.-Z., F.-T. LIN und W.-C. LIN, 2008. MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis [online]. *EMBO reports*, **9**(9), 907-915. EMBO reports. Verfügbar unter: doi:10.1038/embor.2008.128
- YANG, Z., L. WU, A. WANG, W. TANG, Y. ZHAO, H. ZHAO und A.E. TESCHENDORFF, 2017. dbDEM2.0: updated database of differentially expressed miRNAs in human cancers [online]. *Nucleic acids research*, **45**(D1), D812-D818. Nucleic acids research. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gkw1079
- YIN, X., B.-H. ZHANG, S.-S. ZHENG, D.-M. GAO, S.-J. QIU, W.-Z. WU und Z.-G. REN, 2015. Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling [online]. *Journal of hematology & oncology*, **8**, 23. Journal of hematology & oncology. Verfügbar unter: doi:10.1186/s13045-015-0119-3
- YU, Y., H. CAO, M. ZHANG, F. SHI, R. WANG und X. LIU, 2018. Prognostic value of DNA methylation for bladder cancer [online]. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **484**, 207-212. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cca.2018.05.056
- ZAMBELLI, F., G.M. PRAZZOLI, G. PESOLE und G. PAVESI, 2012. Cscan: finding common regulators of a set of genes by using a collection of genome-wide ChIP-seq datasets [online]. *Nucleic acids research*, **40**(Web Server issue), W510-5. Nucleic acids research. Verfügbar unter: doi:10.1093/nar/gks483
- ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN (ZFKD) IM ROBERT KOCH-INSTITUT, 2019. *Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten Epi2018_1, verfügbare Diagnosejahre bis 2016 (für die neuen Bundesländer nur bis Diagnosejahr 2015 auf dem Stand von Epi2017_2)*.

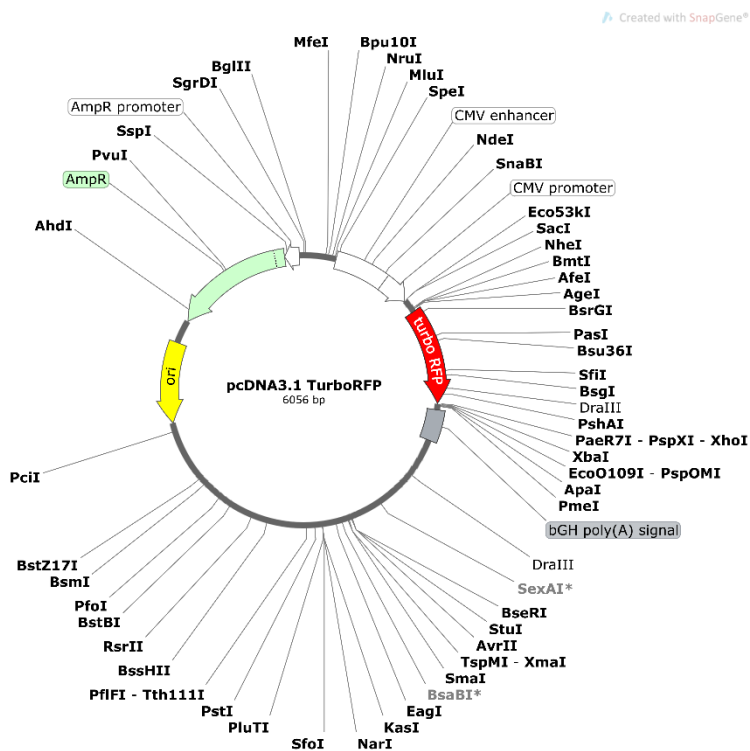
ANHANG

Plasmidkarten

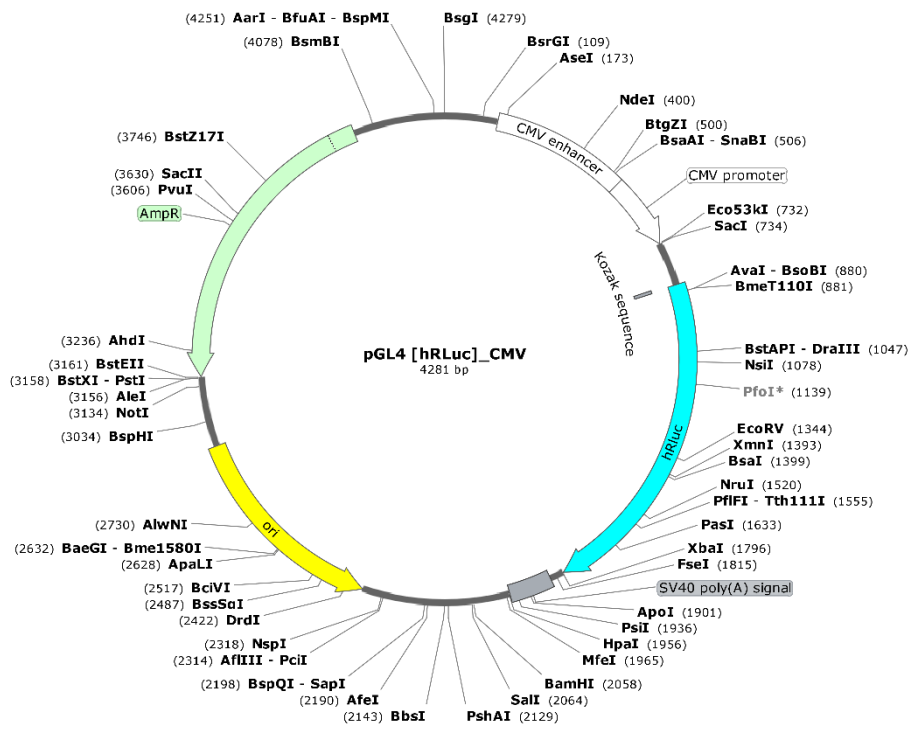
pcDNA3.1.MIR888



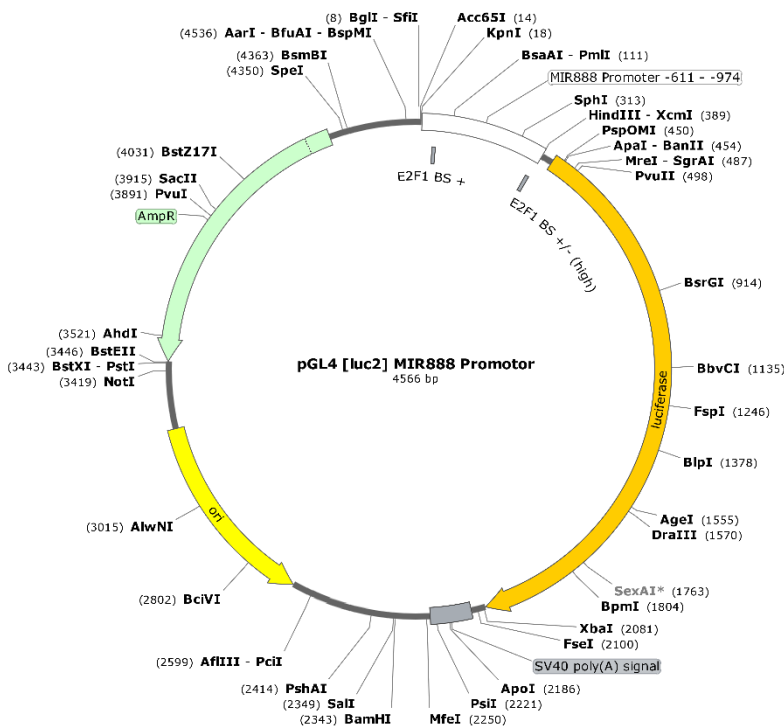
pcDNA3.1.TurboRed



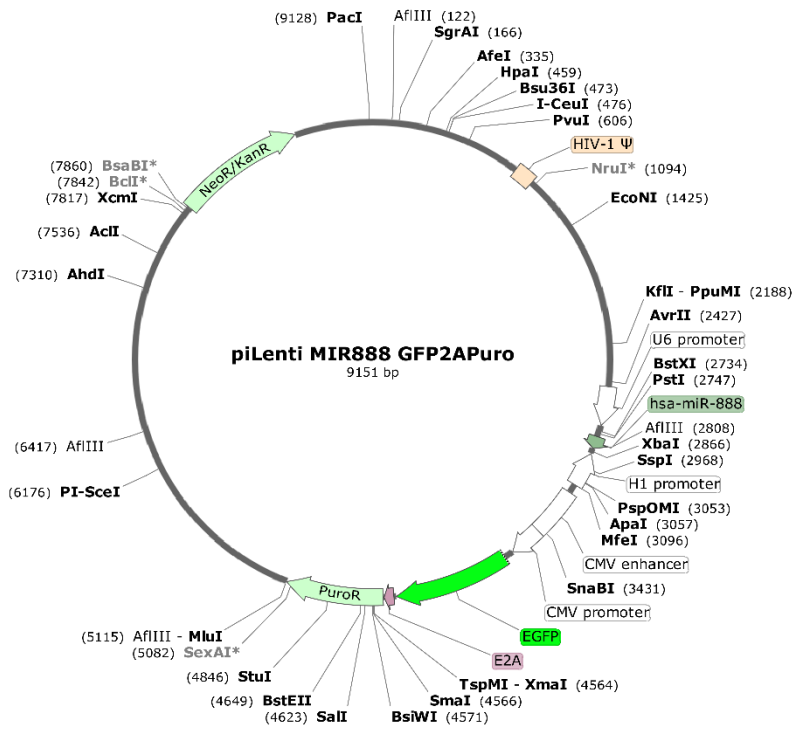
pGL4[hRLuc/CMV]



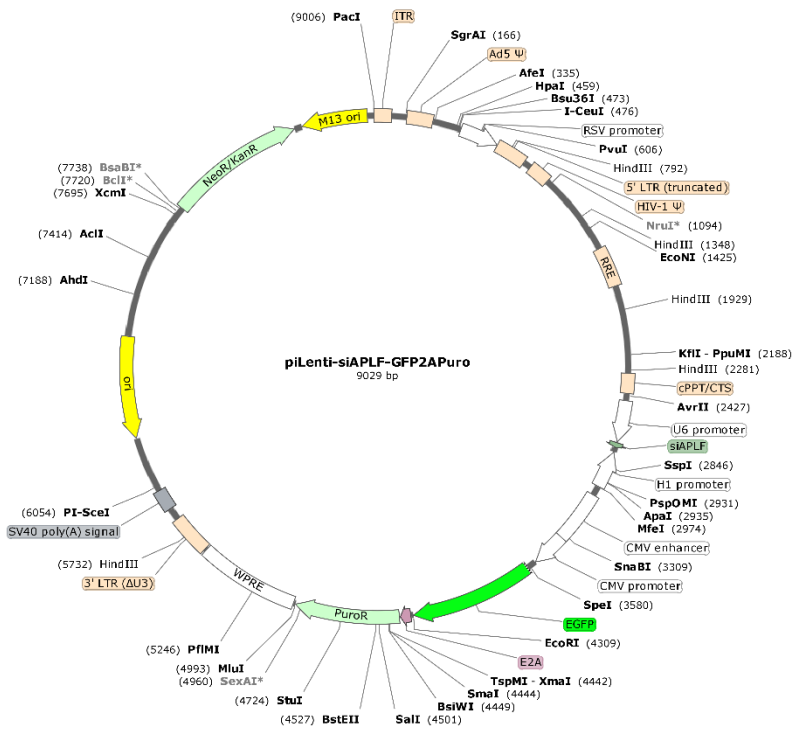
pGL4[luc2]-MIR888-Promotor



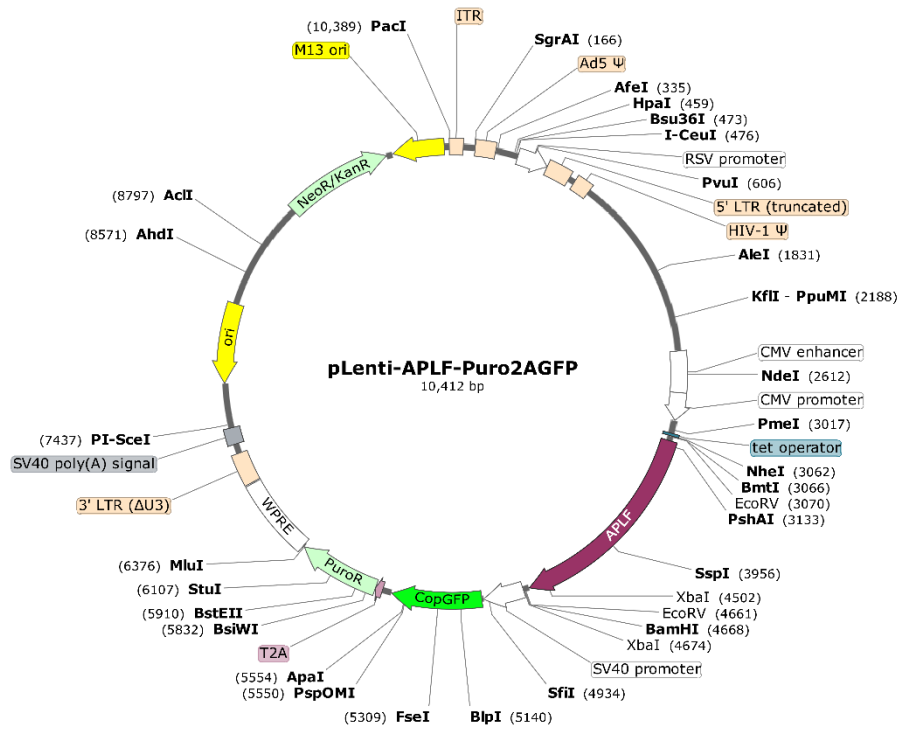
piLenti.MIR888



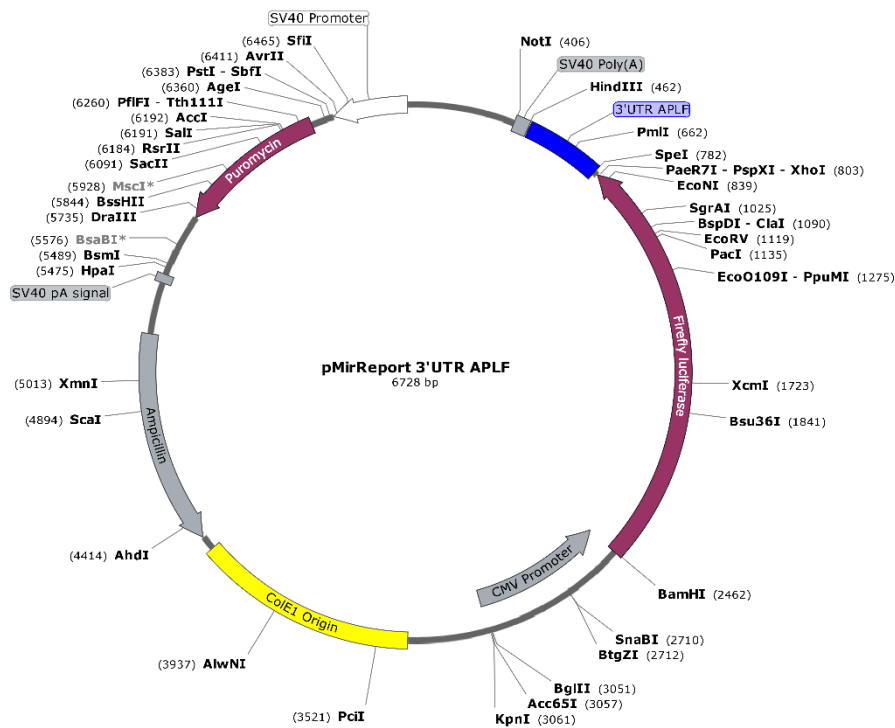
piLenti.siAPLF



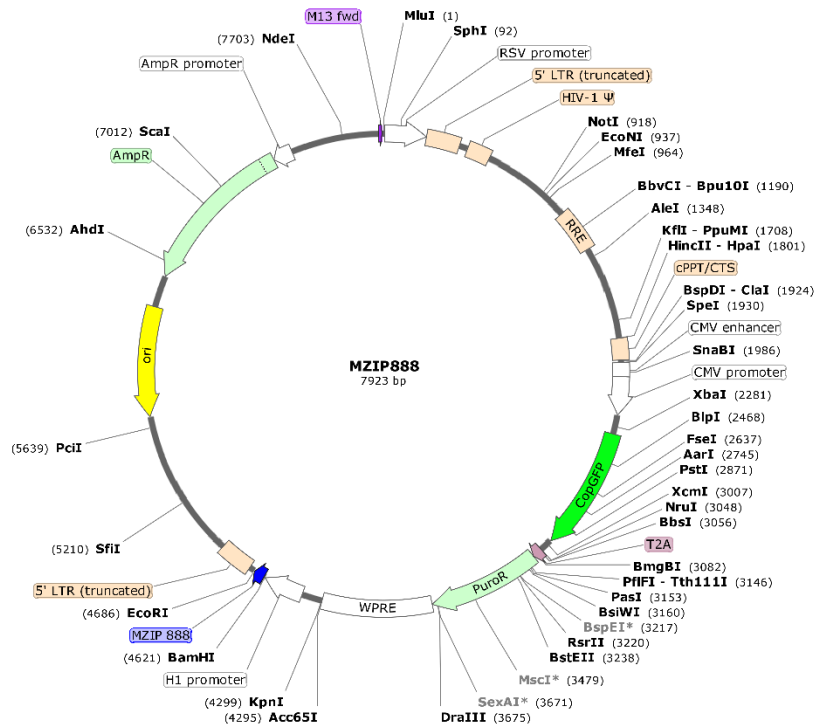
pLenti.APLF



pMIR-APLF 3'UTR



pmiR-ZIP888



RefSeq Transkripte der c-NHEJ-Gene

Gen	RefSeq Transkript	vorhanden in CSCan
XRCC6	NM_001288978	
	NM_001288977	
	NM_001288976	
	NM_001469	ja*
XRCC5	NM_021141	ja*
PRKDC	NM_001081640	ja*
	NM_006904	ja
DCLRE1C	NM_001350966	
	NM_001350965	
	NM_001350967	
	XM_024448135	
	XM_024448134	
	NM_001289078	
	NM_001289076	
	NM_022487	ja
	NM_001033855	ja*
	NM_001289077	
NM_001289079		

	NM_001033857	ja
	NM_001033858	ja
	XM_011519616	
	XM_011519617	
	XM_017016557	
	XM_017016558	
	XM_011519619	
	XM_006717491	
	XM_011519620	
	XM_011519621	
APLF	NM_173545	ja*
NHEJ1	NM_024782	ja*
	NM_001377499	
	NM_001377498	
XRCC4	XM_017009827	
	XM_017009828	
	XM_017009829	
	NM_001318012	
	NM_022550	ja
	NM_022406	ja
	NM_002312	ja*
	NM_001318013	
	XM_011543626	
LIG4	NM_001098268	ja*
	NM_001352600	
	NM_001352598	
	NM_001352599	
	NM_001330595	
	NM_206937	ja*
	NM_001379095	
	NM_001352602	
	NM_001352604	
<input type="checkbox"/>	NM_001352601	
	NM_001352603	
	NM_003401	ja*

Vorhergesagte miRs, die die 3'UTR von APLF binden

miRmap (score threshold 95)		TargetScan (score threshold 95)		Diana Tool MicroT-CDS miTG (score threshold 0,95)	
miR	score	miR	score	miR	score
hsa-miR-4491	99,0	hsa-miR-556-3p	99	hsa-miR-542-3p	99,6
hsa-miR-4657	98,7	hsa-miR-199b-3p	99	hsa-miR-6875-3p	98,7
hsa-miR-3177-5p	98,6	hsa-miR-199a-3p	99	hsa-miR-888-5p	98,2
hsa-miR-3714	98,3	hsa-miR-323a-3p	99	hsa-miR-4657	97,6
hsa-miR-556-3p	98,0	hsa-miR-3129-5p	99	hsa-miR-589-3p	96,8
hsa-miR-647	97,9	hsa-miR-1910-3p	99	hsa-miR-103a-2-5p	96,1
hsa-miR-3121-5p	97,9	hsa-miR-3714	99	hsa-miR-452-3p	96,1
hsa-miR-548a-3p	97,9	hsa-miR-3158-3p	99	hsa-miR-7845-5p	95,2
hsa-miR-30c-1-3p	97,7	hsa-miR-6868-3p	99	hsa-miR-4773	95,1
hsa-miR-19b-1-5p	97,4	hsa-miR-3682-3p	99		
hsa-miR-3689a-3p	97,3	hsa-miR-542-3p	98		
hsa-miR-19b-2-5p	97,2	hsa-miR-135b-5p	98		
hsa-miR-222-5p	97,1	hsa-miR-135a-5p	98		
hsa-miR-3689c	97,1	hsa-miR-337-3p	98		
hsa-miR-3689b-3p	97,1	hsa-miR-6511a-5p	98		
hsa-miR-30c-2-3p	97,0	hsa-miR-188-3p	98		
hsa-miR-30b-3p	97,0	hsa-miR-3180-5p	98		
hsa-miR-888-5p	96,9	hsa-miR-647	98		
hsa-miR-4763-3p	96,7	hsa-miR-8083	98		
hsa-miR-19a-5p	96,5	hsa-miR-34a-3p	98		
hsa-miR-548ar-3p	96,3	hsa-miR-452-3p	98		
hsa-miR-6514-3p	96,2	hsa-miR-4773	98		
hsa-miR-548e	96,2	hsa-miR-1976	98		
hsa-miR-98-3p	96,2	hsa-miR-8062	98		
hsa-miR-1207-5p	96,2	hsa-miR-6514-3p	98		
hsa-miR-6126	96,2	hsa-miR-4274	98		
hsa-miR-548u	96,2	hsa-miR-6890-3p	98		
hsa-miR-3128	96,1	hsa-miR-6767-3p	98		
hsa-miR-646	96,0	hsa-miR-4423-3p	98		

hsa-miR-2052	96,0	hsa-miR-4661-3p	98
hsa-miR-3192	96,0	hsa-miR-561-3p	98
hsa-miR-33b-5p	95,9	hsa-miR-758-3p	97
hsa-miR-4307	95,9	hsa-miR-5195-3p	97
hsa-miR-548az-3p	95,8	hsa-miR-145-5p	97
hsa-miR-33a-3p	95,7	hsa-miR-154-5p	97
hsa-miR-548f	95,6	hsa-miR-6773-3p	97
hsa-miR-4463	95,5	hsa-miR-5702	97
hsa-let-7g-3p	95,5	hsa-miR-4419b	97
hsa-miR-33a-5p	95,4	hsa-miR-3119	97
hsa-miR-5690	95,3	hsa-miR-3678-3p	97
hsa-miR-330-5p	95,3	hsa-miR-7162-3p	97
hsa-let-7f-1-3p	95,2	hsa-miR-3192-5p	97
hsa-let-7a-3p	95,2	hsa-miR-4763-3p	97
hsa-miR-6511a-5p	95,2	hsa-miR-1207-5p	97
hsa-let-7b-3p	95,2	hsa-miR-4657	97
hsa-miR-1254	95,1	hsa-miR-4491	97
hsa-miR-188-3p	95,1	hsa-miR-4687-3p	97
		hsa-miR-609	97
		hsa-miR-500b-3p	97
		hsa-miR-4666a-3p	97
		hsa-miR-5582-5p	97
		hsa-miR-6895-5p	97
		hsa-miR-6787-3p	97
		hsa-miR-7150	97
		hsa-miR-548at-5p	97
		hsa-miR-802	96
		hsa-miR-216a-5p	96
		hsa-miR-493-5p	96
		hsa-miR-660-5p	96
		hsa-miR-888-5p	96
		hsa-miR-3929	96
		hsa-miR-6126	96
		hsa-miR-4708-3p	96
		hsa-miR-6809-5p	96

hsa-miR-8054	96
hsa-miR-548k	96
hsa-miR-548av-5p	96
hsa-miR-122-3p	96
hsa-miR-10a-3p	96
hsa-miR-5089-3p	96
hsa-miR-3908	96
hsa-miR-7845-5p	96
hsa-miR-4475	96
hsa-miR-6861-5p	96
hsa-miR-6888-3p	96
hsa-miR-4797-5p	96
hsa-miR-3907	96
hsa-miR-1178-3p	96
hsa-miR-4464	96

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Frau Prof. Pützer, die meine Doktorarbeit betreut und begutachtet hat. Für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken. Vielen Dank für die Geduld und Mühen. Ich danke auch allen Gutachtern.

Danke an alle aktiven und ehemaligen Mitglieder des Instituts für experimentelle Gentherapie und Tumorforschung für eure Unterstützung. Insbesondere möchte ich hier Anja Stoll, Ingrid Winkler, Alf Sptischak und Stella Logotheti erwähnen, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Danke auch an meine beiden Lieblingsstudentinnen Stephanie Mothes und Renée Sophie Hain.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ein großer Dank gilt meinen Eltern Claudia und Uwe Richter, meinem Bruder Marcus Richter und meinem Großvater Herbert Riedel. Ihr wart immer für mich da und habt immer an mich geglaubt. Ich danke meinen Freunden Anne Buder und Juliane Wende, die stets ein offenes Ohr für mich hatten.

DOKTORANDINNEN/DOKTORANDEN-ERKLÄRUNG
gemäß § 4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Name

Richter, Christin

(Name, Vorname)

Anschrift



(Straße, PLZ, Wohnort)

Ich beabsichtige, eine Dissertation zum Thema

Der Einfluss des E2F1/miR-888/APLF-Signalweges auf die c-NHEJ-vermittelte DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und Tumorprogression im humanen Harnblasenkarzinom

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock
anzufertigen. Dabei werde ich von Frau/Herrn

Prof. Dr. Brigitte M. Pützer

betreut.

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

....., der

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Christin Richter

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit 2022: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologische Chemie der Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, TU Dresden
Forschungsthema: *Spatio-temporale Kontrolle der Initiation meiotischer Rekombination*

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Attila Tóth

2016- Doktorand am Institut für Experimentelle Gentherapie und
2021: Tumorforschung der Universitätsmedizin Rostock

Titel der Dissertation: *Der Einfluss des E2F1/miR-888/APLF-Signalweges auf die c-NHEJ-vermittelte DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und Tumor-progression im humanen Harnblasenkarzinom*

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer

2014- Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitsbereich Zellbiologie der
2015: Universitätsmedizin Rostock

Forschungsthema: *Effekte des M1-Proteins von Streptococcus pyogenes auf primäre humane Zellen*

Leitung: Prof. Dr. Kirsten Peters

2014: Masterstudent im Arbeitsbereich Zellbiologie der Universitätsmedizin
Rostock

Titel der Masterarbeit: *Effekte des M1-Proteins von Streptococcus pyogenes auf primäre humane Endothelzellen*

Betreuer: Prof. Dr. Kirsten Peters und Dr. Tomas Fiedler

2012: Bachelorstudent am Zentrum für Human- und Molekularbiologie der
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III und der Medizinischen
Fakultät der Universität des Saarlandes

Titel der Bachelorarbeit: *Charakterisierung der Long Terminal Repeats transkribierter Elemente der humanen endogenen Retrovirus Gruppe HERV-W*

Betreuer: PD Dr. Jens Mayer

Auszeichnungen

2019: Poster Preis, 9. Mildred Scheel Cancer Konferenz, Bonn

WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

- LOGOTHETI, S., **C. RICHTER**, N. MURR, A. SPITSCHAK, S. MARQUARDT und B.M. PÜTZER, 2021. Mechanisms of Functional Pleiotropy of p73 in Cancer and Beyond [online]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Verfügbar unter: doi:10.3389/fcell.2021.737735
- LOGOTHETI, S., S. MARQUARDT, S.K. GUPTA, **C. RICHTER**, B.A.H. EDELHÄUSER, D. ENGELMANN, J. BRENMOEHL, C. SÖHNCHEN, N. MURR, M. ALPERS, K.P. SINGH, O. WOLKENHAUER, D. HECKL, A. SPITSCHAK und B.M. PÜTZER, 2020. LncRNA-SLC16A1-AS1 induces metabolic reprogramming during Bladder Cancer progression as target and co-activator of E2F1 [online]. *Theranostics*, 10(21), 9620-9643. ISSN 1838-7640. Verfügbar unter: doi:10.7150/thno.44176
- LOGOTHETI, S., S. MARQUARDT, **C. RICHTER**, R. SOPHIE HAIN, N. MURR, I. TAKAN, A. PAVLOPOULOU und B.M. PÜTZER, 2020. Neural Networks Recapitulation by Cancer Cells Promotes Disease Progression: A Novel Role of p73 Isoforms in Cancer-Neuronal Crosstalk [online]. *Cancers*, 12(12), 3789. *Cancers*. Verfügbar unter: doi:10.3390/cancers12123789
- MARQUARDT, S., **C. RICHTER**, B.M. PÜTZER und S. LOGOTHETI, 2020. MiRNAs Targeting Double Strand DNA Repair Pathways Lurk in Genomically Unstable Rare Fragile Sites and Determine Cancer Outcomes [online]. *Cancers*, 12(4), 876. *Cancers*. Verfügbar unter: doi:10.3390/cancers12040876
- RICHTER, C.**, S. MARQUARDT, F. LI, A. SPITSCHAK, N. MURR, B.A.H. EDELHÄUSER, G. ILIAKIS, B.M. PÜTZER und S. LOGOTHETI, 2019. Rewiring E2F1 with classical NHEJ via APLF suppression promotes bladder cancer invasiveness [online]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 292. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. Verfügbar unter: doi:10.1186/s13046-019-1286-9
- FENNER, F., D. GOODY, C. PROTZEL, A. ERBERSDOBLER, **C. RICHTER**, J.M. HARTZ, C.M. NAUMANN, H. KALTHOFF, O. HERCHENRÖDER, O.W. HAKENBERG und B.M. PÜTZER, 2018. E2F1 Signalling is Predictive of Chemoresistance and Lymphogenic Metastasis in Penile Cancer: A Pilot Functional Study Reveals New Prognostic Biomarkers [online]. *European Urology Focus*, 4(4), 599-607. ISSN 24054569. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.euf.2017.02.009
- SCHMITT, K., **C. RICHTER**, C. BACKES, E. MEESE, K. RUPRECHT und J. MAYER, 2013. Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus group HERV-W locus transcription in multiple sclerosis brain lesions by high-throughput amplicon sequencing [online]. *Journal of Virology*, 87(24), 13837-13852. ISSN 0022-538X. Verfügbar unter: doi:10.1128/JVI.02388-13