

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

**Die anti-angiogene Wirkung und zugrundeliegenden
molekularen Mechanismen der microRNAs 370 und 186
sowie der Phytochemikalie Linalool**

Dissertation
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2021

vorgelegt von Vivien Becker
geboren am 17.10.1991 in St. Wendel

Datum: 29. März 2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias W. Laschke
Prof. Dr. Eckart Meese
Prof. Dr. Brigitte Vollmar

„Am Ende wird alles gut! Und wenn es noch nicht gut ist, dann ist es
noch nicht das Ende.“

(Oscar Wilde)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Angiogenese	5
3.2	MicroRNAs	8
3.3	Phytochemikalien	13
3.3.1	Linalool	14
4	Ziele der Arbeit	16
5	Material und Methoden	17
5.1	Humane Patientenproben	17
5.2	Zellbiologische Methoden	18
5.2.1	Zelllinien und Kultivierung	18
5.2.2	Zellzählung	18
5.2.3	Transiente Transfektion der microRNA	18
5.2.4	Co-Kultivierung von Endothelzellen mit NSCLC Zellen	19
5.2.5	Behandlung mit Linalool	19
5.2.6	Water soluble tetrazolium (WST)-1-Assay	20
5.2.7	Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay	20
5.2.8	Durchflusszytometrische Analysen	20
5.2.8.1	Zellzyklusanalyse	20
5.2.8.2	Bestimmung der Proliferationsrate	21
5.2.8.3	Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	21
5.2.8.4	β 1-Integrin-Messung	21
5.2.9	Migrationsanalyse	22
5.2.10	Zytoskelett-Färbung	22
5.2.11	Tube Formation-Assay	23
5.2.12	Sphäroid-Sprouting-Assay	23
5.3	Molekularbiologische Methoden	23
5.3.1	Lasermikrodissektion	23
5.3.2	RNA-Isolation	24
5.3.3	Reverse Transkription	24
5.3.4	RNA/cDNA-Konzentrationsbestimmung	24
5.3.5	Quantitative real time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	24
5.3.6	Plasmidkonstruktion	26
5.3.7	<i>In silico</i> Target-Analyse	27
5.3.8	ATP-Messung	27
5.3.9	Luciferase-Assay	27
5.3.10	Calcium-Messung	27
5.4	Proteinbiochemische Methoden	28

5.4.1	Proteinextraktion	28
5.4.2	Gesamtproteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test	28
5.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
5.4.4	Western Blot-Analyse	29
5.4.4.1	Semi-dry-Blotting	29
5.4.4.2	Immunodetektion	30
5.4.4.3	Strippen von Membranen.....	31
5.5	Versuchstiere und Haltung	32
5.6	Tierexperimentelle Modelle.....	32
5.6.1	Aorten-Ring-Assay.....	32
5.6.2	Matrigel-Plug-Assay.....	33
5.6.3	Tumor-Flankenmodell.....	33
5.7	Histologie und Immunhistochemie.....	34
5.8	Statistische Analysen.....	34
6	Ergebnisse	36
6.1	Effekte der miR-370 auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen	36
6.1.1	Expression der miR-370 in verschiedenen Zelllinien	36
6.1.2	Effekte der miR-370 auf die Viabilität und Migration von Endothelzellen	37
6.1.3	Bedeutung der miR-370 für die Bildung endothelialer Tubes und Aussprossungen aus HDMEC Sphäroiden.....	41
6.1.4	Funktion der miR-370 im Aorten-Ring-Assay und Matrigel-Plug-Assay	42
6.1.5	Effekte der miR-370 auf den AKT/mTOR Signalweg.....	44
6.1.6	Identifizierung von SMO als direktes Target der miR-370	46
6.1.7	Einfluss von SMO auf die Funktion der miR-370 bei der Angiogenese.....	49
6.1.8	Einfluss von BMP-2 auf die Effekte der miR-370 bei der Angiogenese.....	52
6.1.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	54
6.2	Regulation der miR-186 und deren Funktion auf die Angiogenese	55
6.2.1	Regulation der endothelialen miR-186 in humanen NSCLC Geweben	55
6.2.2	Funktion der miR-186 auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen.....	57
6.2.3	Effekte der endothelialen miR-186 auf Angiogenese und Tumorstadium <i>in vivo</i>	61
6.2.4	Identifizierung von PRKCA als direktes Target der miR-186.....	63
6.2.5	Einfluss von PRKCA auf die Funktion der miR-186 bei der Angiogenese...	66
6.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
6.3	Effekte von Linalool auf die Angiogenese.....	69
6.3.1	Effekte von Linalool auf die Viabilität, Proliferation und Migration von HDMEC.....	69
6.3.2	Effekte von Linalool auf die Tube Formation und das Sphäroid- Sprouting.....	72
6.3.3	Einfluss von Linalool auf die Angiogenese <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i>	73
6.3.4	Effekte von Linalool auf den AKT und ERK Signalweg.....	74
6.3.5	Einfluss von Linalool auf intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und ATP	76
6.3.6	Wirkung von Linalool auf die Aktivität des TRPM8 Kanals	77

6.3.7	Zusammenhang zwischen ERK-Phosphorylierung, Reduktion von intrazellulärem ATP und Aktivierung des TRPM8 Kanals.....	79
6.3.8	Anti-angiogene Mediatoren der Linalool-induzierten ERK-Phosphorylierung.....	80
6.3.9	Anti-angiogene Mediatoren der Linalool-induzierten TRPM8 Aktivierung ...	82
6.3.10	Zusammenfassung der Ergebnisse	83
7	Diskussion	85
7.1	Effekte der miR-370 auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen	85
7.2	Regulation der miR-186 und deren Funktion auf die Angiogenese	89
7.3	Effekte von Linalool auf die Angiogenese.....	93
7.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	97
8	Literaturverzeichnis	98
9	Danksagung	117
10	Lebenslauf.....	118
11	Publikationen und Abstracts.....	119
11.1	Originalarbeiten aus dieser Dissertation.....	119
11.2	Weitere Originalarbeiten	119
11.3	Zitierfähige Abstracts aus dieser Dissertation	120
11.4	Weitere zitierfähige Abstracts	120

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
3D	Dreidimensional
3'-UTR	3'-untranslatierte Region
AKT	Proteinkinase AKT, Proteinkinase B
AMTB	N-(3-aminopropyl)-2-((3-methylphenyl)methoxy)-N-(2-thienylmethyl)-benzamid hydrochlorid
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl ₂	Cobalt(II)-chlorid
Ct-Wert	Cycle threshold
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECGM MV	Endothelial cell growth medium MV
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (m), <i>et aliae</i> (f) <i>et alia</i> (n), und andere
FACS	Fluorescence-activated cell-sorting
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HaCaT	human adult low calcium temperature keratinocyte cells
HDMEC	Human dermal microvascular endothelial cells

HEK293T	Human embryonic kidney cells 293T
HIF1 α	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
HOB	Human osteoblasts
hPC-PL	Human pericytes from placenta
HRP	Horseradish peroxidase
hsa	Homo sapiens
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
miR, miRNA	MicroRNA
miRISC	MiRNA-induced silencing complex
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
NSCLC	Non-small cell lung cancer
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PECAM, CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	Potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PI	Propidiumiodid
PIC	Proteinase-Inhibitor Cocktail
PKC α	Proteinkinase C alpha
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative real time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standard error of mean
SMO	Smoothened

snRNA	Small nuclear ribonucleic acid
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline und Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPM8	Transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WST-1	Water soluble tetrazolium-1
x g	n-fache Fallbeschleunigung

1 Zusammenfassung

Angiogenese bezeichnet die Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen. Eine fehlgesteuerte Angiogenese kann mit verschiedenen Krankheiten assoziiert sein, wie z.B. dem Wachstum von Tumoren und deren Metastasierung sowie der Endometriose, Psoriasis oder diabetischen Retinopathie. Deshalb stellt die Inhibition der Angiogenese einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung solcher Erkrankungen dar. Bisher wurden bereits einige anti-angiogene Therapeutika zugelassen. Diese zeigen jedoch geringe Erfolgschancen, da starke Nebenwirkungen auftreten und Tumore Resistenzen dagegen entwickeln können. Daher ist es von großer Bedeutung, neue, effektive anti-angiogene Targets und Medikamente zu identifizieren.

In den letzten Jahren gerieten microRNAs (miRNAs) in den Fokus der Forschung und konnten als bedeutende Regulatoren der Angiogenese beschrieben werden. Daher stellen sie interessante potenzielle Targets für eine anti-angiogene Therapie dar. Andererseits besitzen Phytochemikalien sehr effiziente Eigenschaften und haben dadurch ein hohes Potenzial zur Vorbeugung und Behandlung von Krankheiten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zum einen, miRNAs zu identifizieren, welche die angiogene Aktivität von Endothelzellen regulieren und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu entschlüsseln. Zum anderen sollte die Wirkung der Phytochemikalie Linalool auf die Angiogenese und die zugrundeliegenden intrazellulären Signalwege genauer untersucht werden.

Im ersten Studienabschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die miRNA-370 ein wirksamer Inhibitor der Angiogenese ist. Eine Transfektion von human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) mit miR-370mimic führte zur Hemmung ihrer Proliferation, Migration, Tube Formation und ihrem Aussprossen aus Sphäroiden. Diese anti-angiogene Wirkung konnte in einem *ex vivo* Aorten-Ring-Assay und in einem *in vivo* Matrigel-Plug-Assay bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wurden pro-angiogene Effekte durch eine Transfektion mit miR-370inhibitor *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die miR-370 die angiogene Aktivität von Endothelzellen durch direkte Bindung von smoothened (SMO) und bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) hemmt.

Im zweiten Studienabschnitt dieser Arbeit konnte eine deutliche Verringerung der endothelialen miR-186 Expression in humanen, kleinzelligen Adenokarzinomen der Lunge nachgewiesen werden. Außerdem führten hypoxische Bedingungen zu einer Reduktion der miR-186 in Endothelzellen. In weiterführenden *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigten sich deutliche inhibitorische Effekte der miR-186 auf die Angiogenese. In Tumoren, die aus

H460 Zellen und miR-186m-transfizierten HDMEC bestanden, ließ sich zusätzlich ein vermindertes Wachstum und eine erhöhte Apoptoserate feststellen. Mechanistische Analysen konnten eine direkte Bindung der miR-186 an die humane Sequenz der Proteinkinase C alpha (PRKCA) nachweisen, was zu einer Inhibition der Angiogenese führte.

Im dritten Studienabschnitt dieser Arbeit wurde die Wirkung der Phytochemikalie Linalool auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen analysiert. Nicht-toxische Konzentrationen von Linalool zeigten hierbei eine deutliche Inhibition der endothelialen Proliferation, Migration und Tube Formation sowie der Aussprossung von HDMEC aus Sphäroiden. Außerdem reduzierte Linalool das Aussprossen aus Aorten-Ringen und die Gefäßdichte in Matrigel-Plugs. Bei den Untersuchungen der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen konnte nachgewiesen werden, dass Linalool einerseits die Phosphorylierung der extracellular-signal-regulated kinase (ERK) fördert und die intrazelluläre Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentration vermindert. Andererseits aktiviert Linalool den transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8 (TRPM8), was eine Hemmung der Angiogenese zur Folge hat.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die miR-370 und miR-186 anti-angiogene Funktion auf Endothelzellen haben. Mithilfe der gewonnenen Erkenntnisse über diese beiden intrazellulären Regulatoren könnten zukünftig erfolgsversprechende Therapieansätze zur Inhibition der Angiogenese entwickelt werden. Zusätzlich belegen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass Linalool ein vielversprechendes Therapeutikum zur Behandlung Angiogenese-assoziiierter Erkrankungen darstellt.

2 Summary

Angiogenesis, the development of new blood vessels from pre-existing ones, essentially contributes to the pathogenesis of various diseases, including cancer, endometriosis, psoriasis and diabetic retinopathy. Accordingly, inhibition of angiogenesis represents a promising approach for the treatment of these diseases. To date, several anti-angiogenic compounds have been approved for the treatment of solid tumors and angiogenesis-related diseases. However, the clinical benefits of these compounds are quite limited due to severe side effects and the onset of drug resistance. Thus, the discovery and development of novel, effective anti-angiogenic targets and drugs is of fundamental interest.

During the last years, microRNAs (miRNAs) have emerged as critical regulators of angiogenesis and are therefore considered as new potential anti-angiogenic targets. On the other hand, phytochemicals represent a rich source of safe and efficient natural compounds that have great potential in disease prevention and treatment. Therefore, the aim of the present thesis was to i) identify miRNAs that regulate the angiogenic activities of endothelial cells and elucidate their molecular mechanisms of function as well as to ii) analyze the effects of the phytochemical linalool on angiogenesis and clarify the underlying mechanisms.

In the first part of this thesis, miR-370 was identified as a potent angiogenesis inhibitor. It was found that overexpression of miR-370 significantly reduces the proliferation, migration, tube formation and spheroid sprouting of human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC). These *in vitro* findings were further confirmed in an *ex vivo* aortic ring assay and an *in vivo* Matrigel-Plug assay. In contrast, knockdown of miR-370 resulted in pro-angiogenic effects. Further mechanistic analyses revealed that miR-370 inhibits the angiogenic activity of endothelial cells through directly targeting smoothed (SMO) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2).

In the second part of this thesis, it was found that the expression of endothelial miR-186 is significantly down-regulated in human non-small cell lung cancer (NSCLC) tissue when compared to matched non-tumor lung tissue. Moreover, *in vitro* experiments have shown that hypoxia leads to a reduced expression of miR-186 in endothelial cells. A panel of *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays consistently demonstrated that endothelial miR-186 functions as an efficient angiogenesis inhibitor. Importantly, overexpression of miR-186 in endothelial cells significantly inhibited NSCLC growth and increased the number of apoptotic tumor cells. In addition, mechanistic studies showed that miR-186 inhibits angiogenesis by directly targeting protein kinase C alpha (PRKCA) in endothelial cells.

In the third part of this thesis, the anti-angiogenic effects of the phytochemical linalool on the angiogenic activity of endothelial cells were analyzed. Non-toxic doses of linalool markedly inhibited the proliferation, migration, tube formation and spheroid sprouting of HDMECs. Linalool also efficiently suppressed the sprouting out of rat aortic rings and the vascularization in Matrigel-Plugs. Additional mechanistic analyses revealed that on the one hand linalool inhibits angiogenesis through downregulating the intracellular level of adenosine triphosphate (ATP). On the other hand, linalool activates the transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8 (TRPM8).

In summary, the results of the present thesis demonstrate that miR-370 and miR-186 exert anti-angiogenic effects on endothelial cells. This may pave the way for the development of novel therapeutic strategies for angiogenesis inhibition based on these intracellular regulators. Moreover, the findings of the present studies indicate that linalool may represent a promising therapeutic agent for the treatment of angiogenesis-related diseases.

3 Einleitung

3.1 Angiogenese

Der Begriff Angiogenese bezeichnet die Ausbildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen [Carmeliet, 2000]. Dadurch wird eine Anpassung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im Gewebe gewährleistet. Die Entwicklung neuer Gefäße ist ein komplexer Prozess, an dem Endothelzellen, Perizyten, Fibroblasten und glatte Muskelzellen sowie humorale Faktoren beteiligt sind [Bouis *et al.*, 2006]. Bei der Angiogenese kommt es zu Beginn zu einer Stimulation der Endothelzellen, einer Vasodilatation, einer erhöhten Gefäßpermeabilität und einer vermehrten Extravasation von Plasmaproteinen. Dies wird über eine Nitritoxid-bedingte Hochregulation des Wachstumsfaktors vascular endothelial growth factor (VEGF) vermittelt [Murohara *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2008]. Außerdem zeigt sich eine veränderte endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen, wie platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) und vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin) und es werden verschiedene Kinasen in Endothelzellen aktiviert [Eliceiri *et al.*, 1999; Gale und Yancopoulos, 1999].

Eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität ist für die Angiogenese wichtig, da durch den Austritt von Plasmaproteinen eine provisorische Matrix für die migrierenden Endothelzellen entsteht. In einem nächsten Schritt wird die proteolytische Degradation der vaskulären Basalmembran und umgebenden extrazellulären Matrix durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) eingeleitet. Neben VEGF werden noch weitere Wachstumsfaktoren, wie basic fibroblast growth factor (bFGF) und insulin-like growth factor-1 (IGF-1), freigesetzt [Nelson *et al.*, 2000; Conway *et al.*, 2001]. Die aktivierten Endothelzellen proliferieren und migrieren im Anschluss in Richtung des angiogenen Stimulus, wobei die Interaktion von VEGF mit seinem Rezeptor vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) von großer Bedeutung ist [Ferrara, 1999; Hoeben *et al.*, 2004].

Die in die extrazelluläre Matrix migrierten Endothelzellen sind die Grundlage eines neuen Gefäßes und bilden solide Gefäßsprossen aus, die ein Lumen besitzen. Diese Gefäßsprossen fusionieren mit bestehenden Blutgefäßen, um größere Netzwerke auszubilden [Conway *et al.*, 2001]. Damit diese funktionsfähig sind, erfolgt anschließend noch die Gefäßreifung. Hierzu werden Perizyten und glatte Muskelzellen aus der umliegenden extrazellulären Matrix rekrutiert, um die neuen Gefäße von außen zu stabilisieren. Diese Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Angiopoietin-1, das an den Tie2-Rezeptor bindet, der sich auf der Oberfläche der Endothelzellen befindet [Chung und Ferrara, 2011]. Diese Interaktion führt zur Aktivierung von transforming growth factor beta (TGF- β), der die Produktion einer Basalmembran stimuliert, die für die strukturelle Unterstützung der neuen Gefäße wichtig ist (*Abbildung 1*) [Holderfield und Hughes, 2008].

thesis.pdf - Adobe Acrobat Reader DC

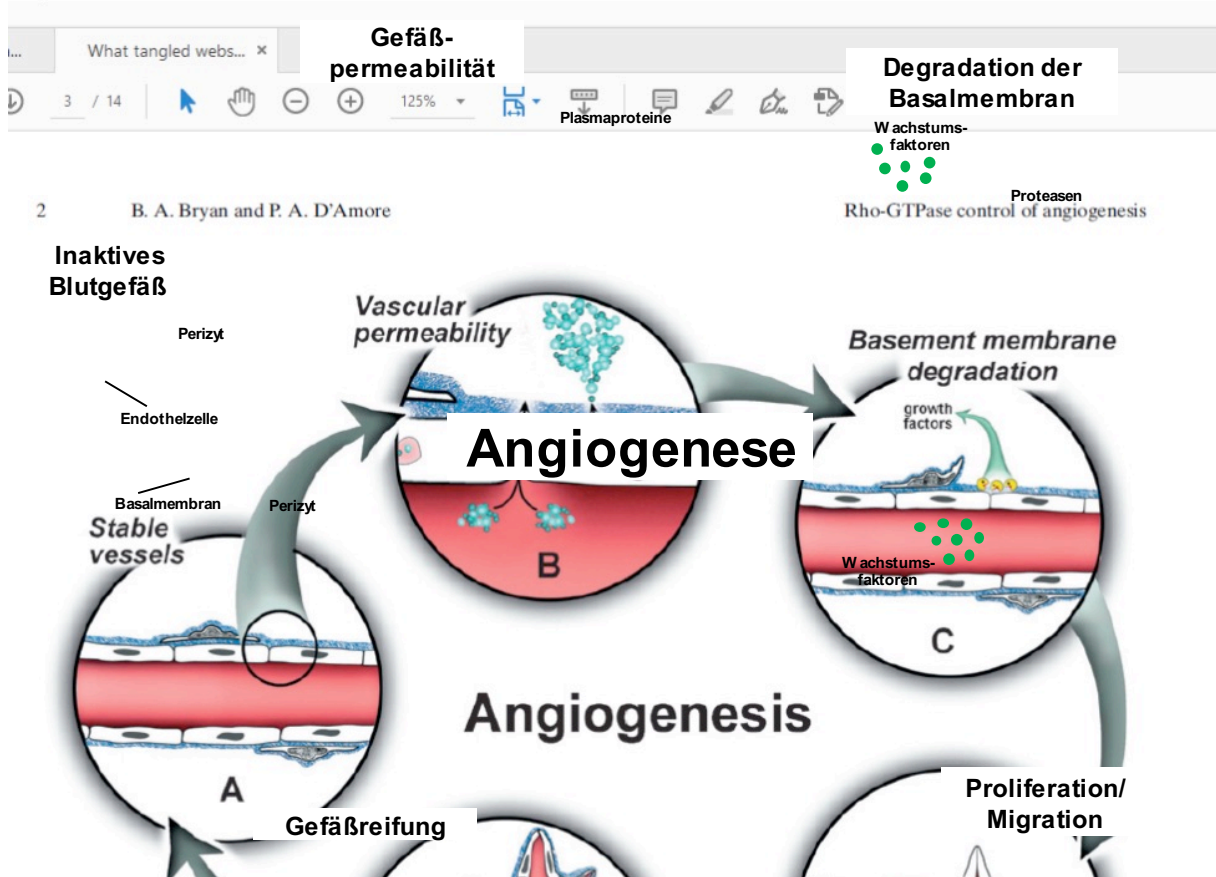


Abbildung 1: Ablauf der Angiogenese. Beim Prozess der Angiogenese werden neue Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen gebildet. **A, B:** Es kommt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, wobei Plasmaproteine aus dem Blutgefäß austreten. **C:** Zur Stimulation der Endothelzellen werden Wachstumsfaktoren ausgeschüttet und die Basalmembran wird proteolytisch degradiert. **D:** Die stimulierten Endothelzellen proliferieren und migrieren in Richtung des chemotaktischen Reizes. **E:** Es kommt zur Gefäßsprossung, wobei die migrierenden Endothelzellen mit bestehenden Gefäßen fusionieren, sodass ein vaskuläres Netzwerk entsteht. Zur Stabilisierung der neuen Gefäße werden Perizyten und glatte Muskelzellen rekrutiert und eine neue Basalmembran gebildet (modifiziert nach [Bryan und D'Amore, 2007]).

Die Angiogenese hat eine zentrale Bedeutung bei vielen Prozessen. Physiologisch ist sie an der Wundheilung, im weiblichen Reproduktionszyklus und an der Embryogenese beteiligt [Smith, 2001; Ema und Rossant, 2003; Bao *et al.*, 2009]. Ein Ungleichgewicht an pro- und anti-angiogenen Mediatoren führt zu einer fehlgesteuerten Angiogenese, die mit verschiedenen Krankheiten assoziiert ist, wie z.B. Psoriasis, Endometriose, diabetischer Retinopathie sowie Tumorwachstum und Metastasierung [Shifren *et al.*, 1996; Timar *et al.*, 2001; Chung und Ferrara, 2011].

Ein kleiner Tumor wächst zunächst unabhängig von neuen Blutgefäßen. Seine Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ist durch Diffusion gewährleistet [Folkman, 1971]. Ab einer Größe von 2-3 mm³ schüttet der Tumor pro-angiogene Wachstumsfaktoren aus, um die Entwicklung neuer Blutgefäße zu stimulieren [Halpern *et al.*, 1985]. Es kommt zum sogenannten angiogenen switch, d.h. es entsteht ein Ungleichgewicht positiver und negativer Regulatoren [Bouck *et al.*, 1996; Hanahan und Weinberg, 2000]. Verschiedene Faktoren wie metabolischer

oder mechanischer Stress, Immun- oder Entzündungsreaktionen und genetische Mutationen können dies noch weiter begünstigen [Carmeliet und Jain, 2000]. Die neu gebildeten Gefäße eines Tumors sind häufig funktionell und strukturell abnormal. Sie sind dilatiert, weisen unregelmäßige Durchmesser und viele Verzweigungen auf [Baish und Jain, 2000]. Außerdem sind sie nicht vollständig mit einer Endothelzellschicht ausgekleidet, was mit einer erhöhten Permeabilität einhergeht. Ein weiteres Merkmal dieser Gefäße ist eine diskontinuierliche oder fehlende Basalmembran [Hashizume *et al.*, 2000]. Ein unregelmäßiger Blutfluss in diesen Gefäßen führt häufig zu hypoxischen und sauren Bereichen in den Tumoren [Giaccia, 1996]. Neben der Versorgung des Primärtumors haben neugebildete Gefäße auch eine zentrale Bedeutung bei der Metastasierung von Tumoren [Bielenberg und Zetter, 2015]. In einem ersten Schritt verlassen hierbei die Tumorzellen ihren ursprünglichen Gewebeverband, um in benachbarte Blutgefäße einzuwandern. Dazu müssen die Tumorzellen ihre Zellkontakte lösen und die Basalmembran der Gefäße durchdringen. Nach Streuung der Tumorzellen über den Blutkreislauf können sie sich schließlich am Ort der Metastasierung vermehren und dort einen neuen Gewebeverband bilden. Beim Wachstum einer Metastase muss erneut eine Nährstoff- und Sauerstoffversorgung durch die Ausbildung neuer Blutgefäße sichergestellt werden [Chiang und Massague, 2008; Valastyan und Weinberg, 2011; Seyfried und Huysentruyt, 2013].

Neben Krebs wurden bereits mehr als 70 weitere Pathologien beschrieben, die mit einer abnormalen Angiogenese assoziiert sind. Eine effektive Therapie solcher Angiogenese-assoziiierter Erkrankungen könnte daher schätzungsweise über 500 Millionen Menschen zugutekommen [Carmeliet, 2005]. Um die Angiogenese bei Krebs, Augen-, Haut- oder Gelenkerkrankungen zu hemmen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Therapieansätze entwickelt [Ferrara und Alitalo, 1999]. Anti-angiogene Wirkstoffe haben vor allem das Ziel, eine Interaktion von angiogenen Liganden mit deren Rezeptoren oder dem nachfolgenden Signalweg zu blockieren sowie eine Hochregulierung von endogenen Angiogenese-Inhibitoren zu induzieren [Carmeliet und Jain, 2000]. Dazu werden unter anderem monoklonale Antikörper, wie Bevacizumab, Sorafenib und Sunitinib eingesetzt [Nelson *et al.*, 1991; Rock *et al.*, 2007; Lang, 2008; Gotink und Verheul, 2010]. Phytochemikalien, wie beispielsweise Resveratrol, Curcumin und Flavonoide finden ebenfalls Anwendung [Lu *et al.*, 2016; Shanmugam *et al.*, 2017]. Allerdings haben viele dieser Wirkstoffe starke Nebeneffekte, da sie auch gesunde Zellen beeinflussen und somit nicht spezifisch am Wirkungsort angreifen. Darüber hinaus sind häufig die Langzeiteffekte einer anti-angiogenen Therapie auf das Normalgewebe unklar [Sriraman *et al.*, 2014; Vasudev und Reynolds, 2014; Rajasekar *et al.*, 2019].

Aus diesen Gründen hat die Identifikation neuer therapeutischer Targets und anti-angiogener Substanzen eine große Relevanz für die klinische Forschung. Außerdem ist es wichtig, die

zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der pathologischen Angiogenese zu entschlüsseln. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse könnten zur Entwicklung neuer Strategien verwendet werden, um angiogene Erkrankungen zukünftig erfolgreicher therapieren zu können.

3.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, endogene, einzelsträngige RNA-Moleküle, die eine Länge von 19-23 Nukleotiden (nt) aufweisen. Sie gehören zur Gruppe der nicht-kodierenden RNAs und sind innerhalb der Vielzeller evolutionär hoch konserviert. Ungefähr 1-5 % des menschlichen Genoms kodieren für miRNAs [Westermarck *et al.*, 1990]. Diese haben unterschiedliche Expressionsmuster, d.h. sie werden gewebe- und entwicklungsabhängig exprimiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass jeder Zelltyp in jedem Entwicklungsstadium ein individuelles Expressionsprofil an miRNAs aufweist [Lau *et al.*, 2001; Houbaviv *et al.*, 2003; Krichevsky *et al.*, 2003]. Innerhalb der Zellen besitzen miRNAs eine regulatorische Funktion auf post-transkriptioneller Ebene. Es wird angenommen, dass sie 30-60 % der humanen Gene regulieren [Friedman *et al.*, 2009; Fabian *et al.*, 2010].

Ambros und seine Kollegen Lee und Feinbaum entdeckten 1993 erstmals, dass das *lin-4* Gen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) nicht für ein Protein kodiert, sondern in kleine RNAs transkribiert wird [Lee *et al.*, 1993]. Sie konnten zeigen, dass diese RNAs eine Komplementarität zu mehreren Stellen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des *lin-14* Gens haben, wodurch die Menge des LIN-14 Proteins reduziert wird [Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993]. Zunächst wurde angenommen, dass keine weiteren *lin-4*-ähnlichen RNAs in *C. elegans* oder anderen Spezies vorkommen. Sieben Jahre später wurde ein weiteres Gen, *let-7*, in *C. elegans* identifiziert, das in eine nicht-kodierende RNA transkribiert wird [Reinhart *et al.*, 2000]. Homologe des *let-7* Gens konnten im Menschen und zwölf anderen Spezies entdeckt werden [Pasquinelli *et al.*, 2000]. In den folgenden Jahren wurde die Erforschung der kleinen nicht-kodierenden RNAs und deren Funktionen weiter verstärkt. Die Identifikation der *lin-4* RNA hat dazu beigetragen, dass eine völlig neue Klasse an kleinen regulatorischen RNAs, sogenannte miRNAs, eingeführt wurde [Lee und Ambros, 2001].

MiRNAs können in den Introns von protein-kodierenden Genen liegen (intronische miRNAs), ihren eigenen Promotor besitzen (intergenische miRNAs) oder mit anderen miRNAs in einem Cluster mit einem gemeinsamen Promotor vorkommen [Rodriguez *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2008; Kabekkodu *et al.*, 2018].

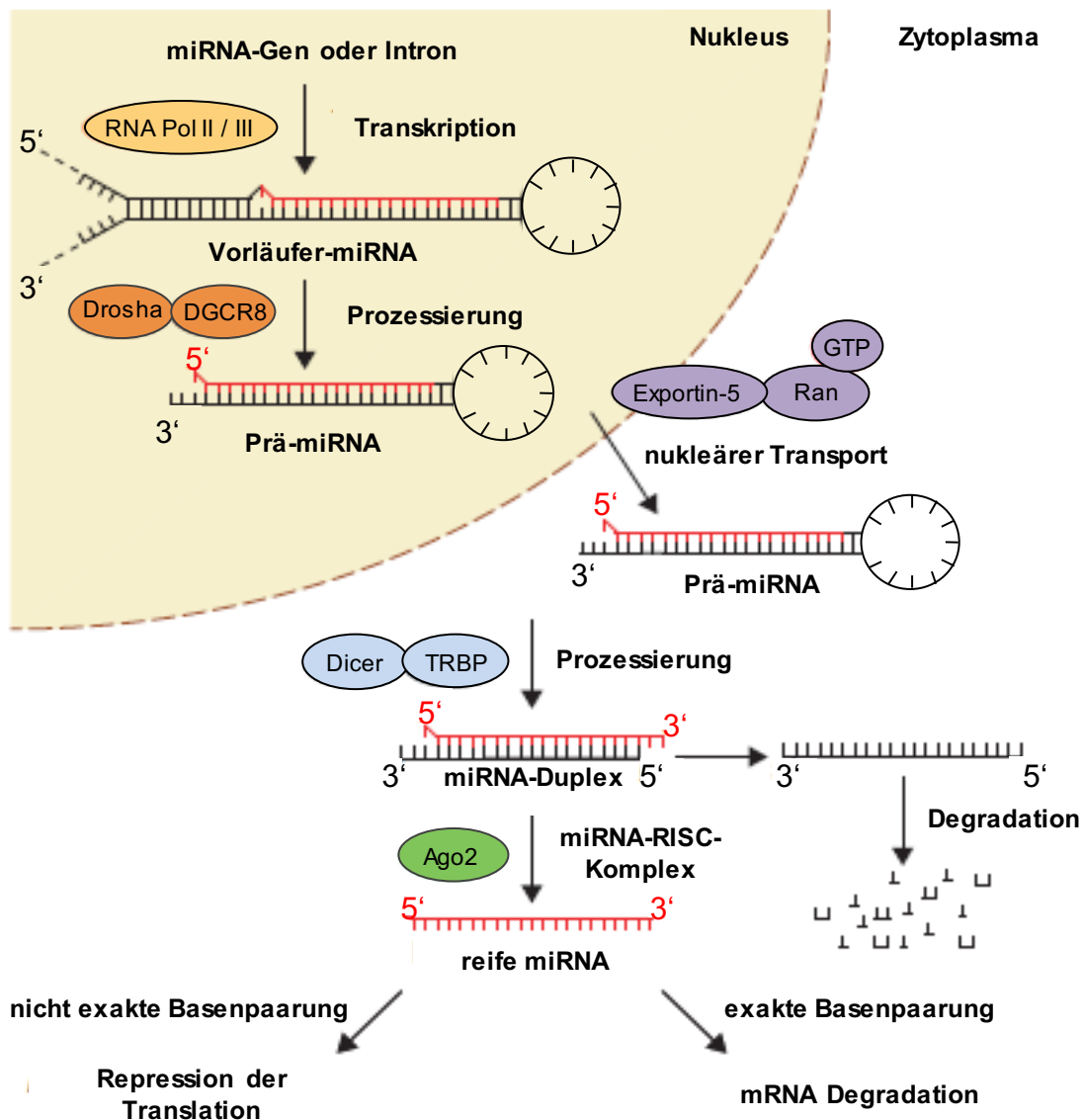


Abbildung 2: Biogenese von microRNAs. Im Nucleus erfolgt die Transkription der miRNA, sodass eine Vorläufer-miRNA gebildet wird. Diese wird durch das Enzym Drosha zur Prä-miRNA gespalten und mittels Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert. Dort erfolgt die Prozessierung der Prä-miRNA zu einem miRNA-Duplex durch das Enzym Dicer. Die Duplex-Struktur wird anschließend entwunden, um in den miRNA-induced silencing complex (miRISC) integriert zu werden. Der Grad der Komplementarität der miRNA und der Target-mRNA entscheidet, zu welcher Art von Inhibition es kommt. Bei einer nicht exakten Basenpaarung wird die Repression der Translation eingeleitet, wohingegen eine exakte Basenpaarung zur Degradation der Target-mRNA führt (modifiziert nach [Winter et al., 2009]).

Die Biogenese der miRNAs beginnt im Nucleus. Dort werden zunächst die DNA-Abschnitte, die für die miRNAs kodieren, durch die RNA-Polymerase II transkribiert. Es entsteht eine sogenannte Vorläufer-miRNA (Abbildung 2) [Davis und Ross, 2008]. Diese wird anschließend mithilfe der Endonuklease Drosha zu einem 60-70 nt langen Intermediat mit einer Haarnadelstruktur (prä-miRNA) prozessiert [Lee et al., 2002]. Es erfolgt ein aktiver Export der prä-miRNA durch einen Komplex aus Ran-GTP und Exportin-5 aus dem Nucleus in das Zytoplasma [Yi et al., 2003]. Dort wird die prä-miRNA von einer weiteren Endonuklease (Dicer) geschnitten und ein 21-24 nt-RNA-Duplex (miRNA-Duplex) entsteht, der aus einem Leit- und

einem Folgestrang besteht. Welcher der beiden Stränge im weiteren Verlauf verwendet wird, ist hochspezifisch und von verschiedenen Faktoren, wie thermodynamischer Stabilität, Purin-Gehalt (A/G-Gehalt), Proteinen und post-transkriptionellen Modifikationen abhängig [Meijer *et al.*, 2014]. Der Duplex wird aufgewunden und die einzelsträngige, reife miRNA wird in den RNA induced silencing complex (RISC) integriert, wohingegen der komplementäre Strang degradiert wird [Gibbons, 1991]. In dem entstandenen miRNA-RISC-Komplex sind Proteine der Argonaut-Familie (Ago-Proteine) als Kernkomponente enthalten, die hochkonserviert sind und in einigen Organismen vorkommen. Die 100 Kilodalton (kDa) großen Proteine bestehen aus den beiden Domänen PAZ und PIWI. Die PAZ-Domäne ist für die Bindung an das 3'-Ende der miRNA verantwortlich und die PIWI-Domäne ähnelt in ihrer Struktur der RNase H, wodurch Ago2 die Target-messenger RNA (mRNA) spalten kann [Carmell *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004]. Neben den Ago-Proteinen sind Dicer und weitere RNA-bindende Proteine enthalten [Chendrimada *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006]. Nachfolgend gibt es zwei Wege, über die der gebildete RISC-miRNA-Komplex die Expression der mRNA regulieren kann, wobei die miRNA an die 3'-UTR der korrespondierenden mRNA bindet. Eine exakte Komplementarität von miRNA und Target-mRNA hat eine irreversible Ago2-vermittelte Degradation der mRNA zur Folge. Bei nicht exakter Basenpaarung bewirkt die Bindung des Komplexes eine reversible Repression der Translation (*Abbildung 2*) [Carthew und Sontheimer, 2009].

Mittlerweile sind fast 2000 Einträge von humanen miRNA-Sequenzen in der „miRBase“ Datenbank vorhanden. Einige miRNAs wurden bereits analysiert, wobei ihre Lokalisation im Genom und ihre Effekte in der Zelle beschrieben werden konnten. Allerdings sind noch nicht alle miRNAs charakterisiert. Jede miRNA kann mehrere Target-mRNAs besitzen und diese modulieren. Darüber hinaus kann eine mRNA auch von verschiedenen miRNAs reguliert werden. Dies führt zu einer komplexen Regulation verschiedener biologischer Prozesse und Signalwege [Suarez *et al.*, 2007]. MiRNAs können unter anderem bei der Zellzyklusregulation, Entwicklung, Differenzierung, Apoptose und Zellproliferation von großer Bedeutung sein. Weiterhin sind sie auch an der Regulation der Angiogenese beteiligt [Landskroner-Eiger *et al.*, 2013]. So führt eine Inhibition von Dicer in Endothelzellen zu einer veränderten Expression von wichtigen Regulatoren der Angiogenese und einer reduzierten Proliferation und Ausbildung endothelialer Tubes [Kuehbacher *et al.*, 2007]. Dies weist darauf hin, dass eine Dicer-vermittelte Regulation durch miRNAs in Endothelzellen für die Genexpression und Funktion eine bedeutende Rolle spielt [Kuehbacher *et al.*, 2007; Suarez *et al.*, 2007; Suarez *et al.*, 2008]. Ein weiterer Beleg für die funktionelle Bedeutung von miRNAs bei der Entwicklung von Gefäßen in Säugern konnte in Mäusen gezeigt werden, bei denen die Aktivität des Dicer-Gens reduziert war, wodurch die Bildung und Erhaltung von Blutgefäßen stark beeinträchtigt wurde [Yang *et al.*, 2005]. Im Jahr 2006 konnten erstmals miRNAs über Array-Methoden in

Endothelzellen nachgewiesen werden. Es wurden 27 hochregulierte miRNAs in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) identifiziert, von denen 15 in die Angiogenese involviert sein könnten [Antebi *et al.*, 1991]. Weitere Analysen zeigten, dass insgesamt 200 miRNAs potenziell in Endothelzellen exprimiert werden [Landskroner-Eiger *et al.*, 2013]. Hierbei kann die Angiogenese positiv oder negativ durch miRNAs über verschiedene Mechanismen reguliert werden. Dies ist abhängig vom jeweiligen Gewebe oder dessen Entwicklungszustand.

Die Expression der miRNAs innerhalb der Zelle ist ebenfalls wichtig, da eine hoch- oder herunterregulierte Expression individueller miRNAs die Funktion der Endothelzellen beeinflussen kann. Eine Inhibition der miR-296 und miR-218 führt beispielsweise zu einer fehlgesteuerten Angiogenese [Wurdinger *et al.*, 2008; Small *et al.*, 2010], wohingegen eine Überexpression von miR-210 und miR-132 sowie eine Reduktion der Expression von miR-320 die angiogene Aktivität der Endothelzellen steigert [Fasanaro *et al.*, 2008; Pulkkinen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Anand *et al.*, 2010]. Neben der regulatorischen Funktion von miRNAs kann deren Vorkommen in der Zelle auf verschiedene Arten gesteuert werden. Eine Reduktion der Enzyme Drosha und Dicer kann zu einer veränderten Biosynthese führen. Aber auch unterschiedliche Faktoren, wie VEGF, bFGF, Lipopolysaccharid (LPS), Hypoxie und bestimmte Transkriptionsfaktoren, können die Expression und Stabilität vieler miRNAs je nach Gewebe und Entwicklungszustand regulieren [Suarez und Sessa, 2009; Winter *et al.*, 2009; Landskroner-Eiger *et al.*, 2013].

MiRNAs sind bei physiologischen Prozessen und verschiedenen Erkrankungen von großer Bedeutung. So konnten verschiedene Studien zeigen, dass eine Dysregulation der miRNA Expression und Funktion mit unterschiedlichen Krankheiten assoziiert ist [Lecellier *et al.*, 2005; van Rooij *et al.*, 2006; Mehler und Mattick, 2007]. So ist z.B. die miR-370 in mehrere pathologische Prozesse involviert, wie Krebs, Arteriosklerose oder Neurofibromatose [Sun *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2016]. Das Vorkommen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in den miRNA-Sequenzen oder in den Bindestellen für die Ziel-mRNA kann das Risiko einer Erkrankung erhöhen [Chen *et al.*, 2013]. MiRNAs können unter anderem bei Hepatitis B und C sowie HIV die virale Infektion und Replikation kontrollieren [Scaria *et al.*, 2006; Murakami *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014]. Des Weiteren werden ca. 70 % der miRNAs im Gehirn exprimiert, wobei viele spezifisch in Neuronen zu finden sind. Daher kommt es oftmals zu einer abnormalen Expression spezifischer miRNAs bei neurologischen Erkrankungen, wie Alzheimer, Parkinson, Tourette-Syndrom oder Schizophrenie [Abelson *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006; Perkins *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2014; Femminella *et al.*, 2015]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass miRNAs bei der Entwicklung des Herzens und dessen Funktion von Bedeutung sind, und ein verändertes Expressionsmuster bei Arteriosklerose, Hypertrophie, Fibrose und Herzversagen vorzufinden ist [van Rooij *et al.*, 2006; Fichtlscherer

et al., 2010; Philippen *et al.*, 2015]. Bestimmte miRNAs können auch bei Autoimmunerkrankungen wichtig sein [Chen *et al.*, 2016]. Am häufigsten tritt eine Dysregulation von miRNAs bei Krebs auf [Calin *et al.*, 2004; Iorio *et al.*, 2005; Iorio *et al.*, 2007; Porkka *et al.*, 2007; Wang und Sen, 2011]. Aufgrund der Tatsache, dass eine miRNA mehrere mRNAs regulieren kann, können einzelne miRNAs als Tumorsuppressor und als Onkogen fungieren [Esquela-Kerscher und Slack, 2006; Svoronos *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017]. Je nach Krebsart wird die Expression der miR-186 hoch- oder herunterreguliert, weshalb sie eine Tumorsuppressor miRNA oder OncomiR sein kann [Xiang *et al.*, 2020]. Bei Lungen-, Leber-, Brust- und Pankreaskrebs konnte eine erhöhte Expression der miR-21 nachgewiesen werden [Volinia *et al.*, 2006; Dillhoff *et al.*, 2008]. Weitere Analysen zeigten, dass diese miRNA unter anderem den Tumorsuppressor PTEN inhibiert, wodurch die Tumorgenese gefördert wird [Meng *et al.*, 2007; Asangani *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008]. Die Expression der miR-96 hingegen reduziert die Invasion und Migration von Krebszellen und verlangsamt dadurch das Tumorstadium, weshalb die Expression dieser Tumorsuppressor miRNA in Tumorzellen oftmals gehemmt wird [Yu *et al.*, 2010].

Viele weitere miRNAs weisen eine fehlgesteuerte Expression in Krebs und anderen Erkrankungen auf. Deshalb bieten miRNAs einen interessanten Ansatzpunkt zur Bekämpfung Angiogenese-assoziiierter Erkrankungen [Trang *et al.*, 2008; Christopher *et al.*, 2016]. Die Sequenzen der miRNAs sind kurz, bekannt und hoch konserviert, was sie für die Entwicklung und die Anwendung als Therapeutikum attraktiv macht. Je nachdem, ob die Expression der Ziel-miRNA hoch- oder runterreguliert werden soll, kommen zwei verschiedene Strategien in Frage. Zum einen der Einsatz von anti-miRNAs, die eine komplementäre Sequenz zur endogenen miRNA besitzen, um diese so zu inhibieren [Krutzfeldt *et al.*, 2005; Fabani *et al.*, 2010; Stenvang *et al.*, 2012]. Andererseits kann die Ziel-miRNA über einen Vektor oder durch Transfektion der miRNA-Sequenz in der Zelle überexprimiert werden, um so eine reduzierte Expression auszugleichen [Trang *et al.*, 2008; Bader *et al.*, 2010; Bader, 2012]. Studien konnten zeigen, dass die Verwendung von anti-miRNAs *in vitro* zu einer Inhibition der Zellproliferation führt und *in vivo* das Tumorstadium reduziert [Chan *et al.*, 2005; Si *et al.*, 2007]. Die systemische Gabe einer anti-miRNA zur Inhibition der endogenen miR-122, die eine Funktion bei der Cholesterolsynthese hat, führte zu einem deutlich reduzierten Cholesterolspiegel bei Mäusen und Primaten [Esau *et al.*, 2006; Elmen *et al.*, 2008]. Neben der Inhibition konnten auch Erfolge bei der Überexpression spezifischer miRNAs bei Lungen-, Prostata- und Leberkarzinomen gezeigt werden [Bonci *et al.*, 2008; Esquela-Kerscher *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Kota *et al.*, 2009]. Eine miRNA-Therapie kann sich positiv auf Tumore auswirken, die eine Resistenz gegenüber konventionellen Behandlungsmethoden, wie Chemotherapie und Strahlentherapie aufweisen [Meng *et al.*, 2006; Weidhaas *et al.*, 2007; Cochrane *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2009]. Da das Interesse an miRNAs als Therapeutika in den

letzten Jahren deutlich angestiegen ist, befinden sich mittlerweile einige miRNAs in klinischen Studien [Lindow und Kauppinen, 2012; Li und Rana, 2014]. Neben dem potenziellen Einsatz als Therapeutikum haben miRNAs eine relevante Bedeutung als Biomarker erlangt. Da miRNAs in fixierten Gewebeproben, Blut, Urin oder Plasma eine hohe Stabilität aufweisen, können sie zur Charakterisierung verschiedener Erkrankungen und deren Stadieneinteilung verwendet werden [Lu *et al.*, 2005; Yanaihara *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2008]. So wurden beispielsweise die miR-1 und miR-133 als mögliche Biomarker für Nierenerkrankungen identifiziert [Ben-Dov *et al.*, 2014]. Die bisherigen Erkenntnisse über die Funktionen verschiedener miRNAs sind jedoch nicht ausreichend und es bedarf daher zusätzlicher Forschung, um weitere miRNAs als potenzielle therapeutische Targets zu identifizieren. Dies ist Gegenstand der ersten beiden Studienabschnitte der vorliegenden Arbeit.

3.3 Phytochemikalien

Phytochemikalien sind sekundäre Pflanzenstoffe, die den Pflanzen als Abwehr-, Farb- oder Aromastoffe dienen. Im Gegensatz zu den primären Pflanzenstoffen sind sie nicht essentiell für die Pflanzen, aber dennoch von Bedeutung, da sie ihre Überlebenschancen steigern können. Die sekundären Pflanzenstoffe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und Eigenschaften. Daher werden sie in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Hauptgruppen sind Carotinoide, Phytosterole, Saponine, Glucosinolate, Polyphenole, Protease-Inhibitoren, Terpene, Phytoöstrogene und Sulfide [Leitzmann, 2016].

Diese Phytochemikalien werden im Sekundärstoffwechsel der Pflanzen oftmals als Reaktion auf verschiedene Umwelteinflüsse gebildet. Sie können spezifisch in verschiedenen Pflanzenarten oder -gattungen vorkommen [Kennedy und Wightman, 2011]. Sie schützen die Pflanzen vor Herbivoren und Pathogenen, helfen bei der innerartlichen Kommunikation oder sind zur Anpassung an die Umgebung wichtig [Harborne, 1990; Reymond *et al.*, 2000; Hermsmeier *et al.*, 2001]. Neben ihrem Nutzen für die Pflanzenwelt werden sie auch vom Menschen eingesetzt, wie z.B. in der Industrie als Geruchs- und Geschmacksstoffe oder in der Pharmakologie zur Herstellung von Medikamenten [Newman und Cragg, 2007]. Phytochemikalien werden seit Jahrhunderten zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen und zur Erhaltung der Gesundheit angewendet. Außerdem dienen sie noch heute als bedeutende Quelle zur Entwicklung neuer Arzneimittel. Viele der derzeit eingesetzten Medikamente enthalten Phytochemikalien oder synthetisch hergestellte Formen eines pflanzlichen Wirkstoffes [Cragg *et al.*, 1997]. Studien konnten belegen, dass ein Langzeitkonsum von Nahrungsmitteln, wie Obst und Gemüse, die reich an bioaktiven Sekundärmetaboliten sind, das Auftreten von z.B. Krebs oder kardiovaskulären Erkrankungen verringert [van't Veer *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2012; Weng und Yen, 2012]. Durch ihren

unterschiedlichen chemischen Aufbau besitzen die sekundären Pflanzenstoffe verschiedene biologische Aktivitäten. Zum einen zeigen sie anti-karzinogene, anti-mikrobielle, anti-oxidative oder anti-inflammatorische Wirkungen. Zum anderen können sie auch Einfluss auf das Immunsystem, den Blutzuckerspiegel und den Blutdruck nehmen [Zhang *et al.*, 2015; Kotecha *et al.*, 2016; Barbieri *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2018b]. Neben den oben genannten Eigenschaften konnte gezeigt werden, dass ein breites Spektrum an Phytochemikalien anti-angiogene Aktivitäten aufweist, die über verschiedene molekulare Signalwege vermittelt werden [Lu *et al.*, 2016; Rajasekar *et al.*, 2019]. Trotz der bekannten Effekte einiger Phytochemikalien auf die Angiogenese sind die Auswirkungen vieler Naturstoffe auf die Ausbildung neuer Blutgefäße noch nicht genauer untersucht.

3.3.1 Linalool

Die phytochemische Substanz Linalool (*Abbildung 3*) ist ein tertiärer Alkohol und gehört zur Gruppe der acyclischen Monoterpene. In Pflanzen treten aufgrund der chemischen Struktur zwei enantiomere Formen des Linalools auf: 3R-(-)-Linalool, auch Licareol genannt, und 3S-(+)-Linalool oder Coriandrol. Diese beiden Formen weisen ein individuelles Duft- und Wirkungsprofil auf.

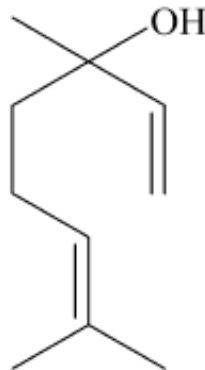


Abbildung 3: Strukturformel von Linalool [Letizia *et al.*, 2003].

Linalool ist Bestandteil ätherischer Öle von über 200 Pflanzenarten, wobei 3R-(-)-Linalool am häufigsten vertreten ist. In der Industrie findet es vor allem Einsatz als Inhaltsstoff bei vielen kosmetischen Produkten, wie Bodylotion, Shampoo, Duschgel und Creme. Außerdem wird es zu Reinigungs- und Lebensmitteln sowie Getränken als Geruchs- und Geschmacksstoff zugegeben. Aufgrund seiner vielfältigen Anwendung wird Linalool neben der Isolierung aus natürlichen Quellen auch synthetisch hergestellt [Aprotosoiaie *et al.*, 2014]. Zahlreiche Studien konnten bereits verschiedene biologische Aktivitäten des Linalools nachweisen. Hierzu zählen eine sedative, anxiolytische, anti-krampflösende, lokalanästhetische, analgetische, anti-inflammatorische, cholesterolsenkende, anti-bakterielle und anti-oxidative Wirkung [Perrins

und Weiss, 1996; Elisabetsky *et al.*, 1999; Peana *et al.*, 2002; Narusuye *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2010; Linck *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2011]. In verschiedenen Studien wurde außerdem gezeigt, dass Linalool eine hohe Toxizität gegenüber malignen hämatologischen Zelllinien aufweist, ohne das Normalgewebe zu schädigen [Paik *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2010; Jana *et al.*, 2014]. Als anti-kanzerogener Wirkstoff aktiviert Linalool das Tumorsuppressorprotein p53 sowie verschiedene Inhibitoren von cyclin-abhängigen Kinasen oder inhibiert die mitochondrialen Komplexe [Usta *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2010]. Linalool verbessert außerdem die Wirkung bestimmter Chemotherapeutika, wie Doxorubicin [Ravizza *et al.*, 2008; Miyashita und Sadzuka, 2013]. Potenzielle Effekte von Linalool auf die Angiogenese wurden bisher jedoch noch nicht untersucht und sind daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

4 Ziele der Arbeit

Viele Krankheiten, wie z.B. Krebs, Psoriasis, Endometriose oder diabetische Retinopathie, sind mit einer pathologischen Angiogenese assoziiert. Daher ist es notwendig, Wirkstoffe zu entwickeln, welche die Angiogenese inhibieren. Die bisher eingesetzten Therapeutika zeigen erste Erfolge, aber auch unerwünschte Wirkungen. Die Identifikation neuer anti-angiogener Wirkstoffe ist daher weiterhin von großer Bedeutung. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, die Funktion der miR-370 und miR-186 sowie von Linalool auf die Angiogenese zu untersuchen. Die vorliegende Dissertation wurde dazu in drei Studienabschnitte gegliedert.

Im **ersten Studienabschnitt** wurden die Effekte der miR-370 auf die Angiogenese untersucht. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welche Funktion hat die miR-370 bei der Regulation der Angiogenese?
2. Welche Signalwege unterliegen den anti-angiogenen Effekten der miR-370?
3. Werden die anti-angiogenen Effekte der miR-370 über direkte Bindung von smoothed (SMO) und bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) vermittelt?

Im **zweiten Studienabschnitt** wurde die Funktion der miR-186 im Prozess der Tumorangio-genese genauer analysiert. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welches Expressionsverhalten zeigt die miR-186 im humanen Adenokarzinom der Lunge im Vergleich zu normalem Lungengewebe und wie wird dies reguliert?
2. Wie wirken sich die anti-angiogenen Effekte der miR-186 auf das Tumorwachstum aus?
3. Wird die Hemmung der Tumorangio-genese durch die miR-186 über Bindung der Proteinkinase C alpha (PKC α /PRKCA) vermittelt?

Im **dritten Studienabschnitt** wurden die Wirkungen von Linalool auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen untersucht. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welche Effekte zeigt Linalool auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen?
2. Wird die Inhibition der Angiogenese durch Linalool über eine erhöhte Phosphorylierung von extracellular-signal-regulated kinase (ERK) und Aktivierung des transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8 (TRPM8) gesteuert?

5 Material und Methoden

5.1 Humane Patientenproben

In dieser Arbeit wurden Adenokarzinome und dazugehöriges Normalgewebe der Lunge von elf Patienten entnommen und analysiert. Die verwendeten Patientenproben wurden am Universitätsklinikum des Saarlandes gewonnen, in 4 % Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Analysen wurden von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Nr.: 01/08). Die Patienten gaben vor der Entnahme eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Daten der Patienten und Merkmale der Tumore sind in *Tabelle 1* aufgelistet.

Tabelle 1: Daten und pathologische Charakteristika der Patienten.

Patient	Geschlecht	Alter	Tumor- stadium	Differenzier- ungsgrad	Lymphknoten -metastasen	Lymphknoten -Invasion	Vaskuläre Invasion
1	Weiblich	52	pT2a	G2	pN0	Nein	Ja
2	Männlich	65	pT2a	G3	pN2	Ja	Ja
3	Männlich	86	pT2a	G3	pN0	Ja	Nein
4	Weiblich	66	pT3	G3	pN1	Ja	Ja
5	Männlich	73	pT2b	G3	pN2	Ja	Ja
6	Männlich	52	pT1a	G3	pN2	Nein	Ja
7	Männlich	70	pT2a	G2	pN0	Ja	Ja
8	Männlich	70	pT3	G2	pN0	Nein	Nein
9	Männlich	73	pT1b	G3	pN0	Nein	Nein
10	Männlich	71	pT2a	G3	pNX	k.A.	k.A.
11	Männlich	75	pT3	G2	pN2	Nein	Nein

Tumorstadium: pT0 = Kein Primärtumor nachweisbar; pT1 = Primärtumor kleiner als 2 cm; pT2 = Primärtumor 2-5 cm groß; pT3 = Primärtumor größer als 5 cm; pT4 = Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung in das Nachbargewebe

Differenzierungsgrad: G1 = gut differenziert; G2 = mäßig differenziert; G3 = schlecht differenziert; G4 = nicht differenziert

Lymphknotenmetastasen: pNX = Lymphknoten lassen sich auf Krebsbefall nicht beurteilen; pN0 = Kein Lymphknotenbefall nachweisbar; pN1 = Metastasen in Lymphknoten der Achselhöhle; pN2 = Wie N1, aber untereinander oder in Nachbarschaft noch verbunden

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Zelllinien und Kultivierung

Die verwendeten human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) wurden aus der Dermis juveniler Vorhaut isoliert (C-12210; PromoCell, Heidelberg, Deutschland) und in endothelial cell growth medium MV (ECGM MV; PromoCell) kultiviert. Die Kultivierung von HUVEC (C-12200; PromoCell) erfolgte in endothelial cell growth medium (ECGM; PromoCell). Die non-small cell lung cancer (NSCLC) Zellen NCI-H460 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA), human embryonic kidney cells 293T (HEK293T; ATCC), human adult low calcium temperature keratinocyte cells (HaCaT; CLS Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland) und primäre normal human dermal fibroblasts (NHDF; Dr. Wolfgang Metzger, Universität des Saarlandes) wurden in dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; GE Healthcare, Solingen, Deutschland), das mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS; Merck, Darmstadt, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep; Biochrom, Berlin, Deutschland) supplementiert war, kultiviert. Zur Kultivierung von primären human osteoblasts (HOB; Dr. Wolfgang Metzger) wurde osteoblast growth medium (PromoCell) verwendet. Human pericytes from placenta (hPC-PL; PromoCell) wurden in pericyte growth medium (PromoCell) kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C in 5 % CO₂ und 20 % O₂ inkubiert (Binder, Tuttlingen, Deutschland). Eine Kultivierung unter diesen Bedingungen wird Normoxie genannt. Im Gegensatz dazu wurden hypoxische Bedingungen erzielt, in dem die Zellen je nach Versuchsablauf für 24 h oder 72 h bei 37 °C in 5 % CO₂ und 1 % O₂ inkubiert wurden (Binder).

5.2.2 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde Trypanblau (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) verwendet, welches von abgestorbenen oder perforierten Zellen aufgenommen werden kann und diese dunkelblau anfärbt. Die nicht gefärbten Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Auf diese Weise konnte die Lebendzellzahl ermittelt werden und eine Aussaat der Zellen für die jeweiligen Experimente erfolgen.

5.2.3 Transiente Transfektion der microRNA

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Es kann zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden werden. Transient bedeutet eine vorübergehende Expression der eingebrachten DNA, wohingegen bei stabiler Transfektion die DNA in das Genom des Organismus integriert wird.

Die transiente Transfektion wurde in dieser Arbeit mithilfe des HiPerFect Transfektions-Reagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Hoch- oder

Herunterregulierung der intrazellulären miR-370-3p (miR-370) oder miR-186-5p (miR-186) wurden die Endothelzellen für 48 h mit 5 nM miR-370/-186mimic (miR-370m/-186m; Qiagen), 5 nM Dy547-markierter miR-370m (GE Healthcare) oder 100 nM miR-370/-186inhibitor (miR-370i/-186i; Qiagen) transfiziert. Als Kontrolle dienten HDMEC, die mit einer Negativkontrolle der miRNA-mimic (NCm; Qiagen) oder Negativkontrolle des miRNA-Inhibitors (NCi; Qiagen) transfiziert wurden. Zur Herunterregulierung der Expression von ERK, TRPM8 und SMO wurden HDMEC für 48 h mit 20 nM small interfering RNAs (siRNAs) gegen ERK1/2 (si-ERK; Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland), 120 nM siRNA gegen TRPM8 (si-TRPM8; ON-TARGETplus siRNA SMARTpool, Dharmacon, Colorado, USA) oder 100 nM siRNA gegen SMO (si-SMO; ON-TARGETplus siRNA SMARTpool, GE Healthcare) transfiziert. Zur Kontrolle wurde eine Negativkontrolle der siRNA (si-NC; Qiagen) verwendet. Die transfizierten Zellen wurden für verschiedene experimentelle Analysen weiterverwendet. Zur Inhibition von SMO wurden die Zellen 18 h nach der Transfektion für weitere 30 h mit dem SMO-Inhibitor Cyclopamin (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) behandelt. Zur Aktivierung der PKC α wurden die transfizierten HDMEC 24 h danach für weitere 24 h mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Tocris Bioscience, Bristol, UK) behandelt.

5.2.4 Co-Kultivierung von Endothelzellen mit NSCLC Zellen

Die Effekte von NSCLC Zellen auf die Expression der miR-186 in HDMEC wurde mittels einer Co-Kultivierung beider Zelllinien mit direktem Kontakt genauer untersucht. Dazu wurden 1×10^6 HDMEC alleine oder zusammen mit 5×10^6 H460 Zellen in ECGM MV ohne Zusätze kultiviert. Nach 24 h wurden die HDMEC mithilfe eines humanen CD31 MicroBeadKit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) isoliert. Die Zellen wurden trypsiniert und in 100 μ l ECGM MV ohne Zusätze mit 30 μ l FcR Blocklösung sowie 30 μ l CD31 MicroBeads aufgenommen. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 4 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt, in 1 ml ECGM MV ohne Zusätze resuspendiert und anschließend auf die LS Säule in einem magnetischen Feld eines MidiMACS Separators gegeben. Nach 10-maligem Waschen in 3 ml ECGM MV ohne Zusätze wurde die Säule vom Separator entfernt. Die Endothelzellen wurden aus der Säule herausgewaschen und für die weitere RNA-Isolation verwendet.

5.2.5 Behandlung mit Linalool

Zur Analyse der Effekte von (-) – Linalool (Sigma-Aldrich) wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl, abhängig von der Art des Experiments, ausgesät und für 24 h bei normalen Kulturbedingungen inkubiert. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Zellen für weitere 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (Kontrolle (0,1 % Dimethylsulfoxid, DMSO), 10 μ M,

25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM , 2000 μM , 4000 μM und 5000 μM) von Linalool behandelt. Im Anschluss wurden unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt.

5.2.6 Water soluble tetrazolium (WST)-1-Assay

Zur Untersuchung der Zellviabilität wurde ein WST-1-Assay durchgeführt. Dabei wird das zugegebene Tetrazolium-Salz durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System, das zu der respiratorischen Kette der Mitochondrien gehört, von den Zellen in lösliches Formazan gespalten. Es zeigt sich ein Farbumschlag von rosa zu dunkelrot.

Zur Durchführung dieses Assays wurden 5×10^3 Zellen pro Vertiefung in eine 96-Lochplatte ausgesät. Nach 24 h, 48 h oder 72 h wurde das WST-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) für 30 min bei 37 °C im Verhältnis 1:10 zu den Zellen gegeben. Die Absorption wurde anschließend mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (PHOMo; Anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe, Deutschland) detektiert.

5.2.7 Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay

Um den Einfluss von Linalool oder der beiden miRNAs auf die Zytotoxizität zu überprüfen, wurde ein LDH-Assay durchgeführt. Die LDH ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das in allen Zellen vorkommt und bei Beschädigung der Plasmamembran freigesetzt wird. Dieses Assay beruht auf der Fähigkeit der LDH, Lactat unter Reduktion von NAD^+ zu Pyruvat umzuwandeln. In einem weiteren Schritt wird das zugegebene Tetrazoliumsalz zu Formazan umgesetzt und die Absorption mit einem Photometer (PHOMo) bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.

Für die Durchführung dieses Assays wurden 5×10^3 Zellen in eine 96-Lochplatte ausgesät und nach einer Inkubationszeit von 24 h erfolgte die Analyse nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics).

5.2.8 Durchflusszytometrische Analysen

5.2.8.1 Zellzyklusanalyse

Zur Untersuchung der Verteilung von HDMEC in den einzelnen Phasen des Zellzyklus wurden diese trypsiniert und für 30 min in 70 % Ethanol fixiert. Im Anschluss wurden die fixierten Zellen in einer Lösung aus 50 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid (MilliporeSigma, Darmstadt, Deutschland) und 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (MilliporeSigma) inkubiert und mit einem FACScan Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gemessen und analysiert.

5.2.8.2 Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Analyse der Zellproliferation wurde ein Bromodeoxyuridin (BrdU)-Assay durchgeführt. Dabei wird das Nukleosidanalogen 5-Bromuracil während der DNA-Replikationsphase anstelle des Thymidins eingebaut und ermöglicht somit die Markierung proliferierender Zellen. Diese können mithilfe spezifischer Antikörper gegen BrdU nachgewiesen werden.

Zur Durchführung dieses Assays wurden HDMEC für 18 h mit 10 μ M BrdU (Roche Diagnostics) behandelt und anschließend für 30 min mit 70 % Ethanol auf Eis fixiert. Danach wurde die DNA mit 2 M Salzsäure, die in 0,5 % Triton-X-100 gelöst war (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 30 min bei Raumtemperatur denaturiert. Nach erfolgter Inkubationszeit wurde ein BrdU-Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) Antikörper (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe Deutschland) im Verhältnis 1:50 für 30 min zugegeben und die gefärbten Zellen im FACScan Durchflusszytometer (BD Biosciences) gemessen und analysiert.

5.2.8.3 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Analyse der Wirkung von Linalool auf den zellulären oxidativen Stress wurde mittels 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) untersucht. Das DCFH-DA diffundiert in die Zelle, in der durch Esterasen 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH) gebildet wird. Durch Anwesenheit von ROS wird das fluoreszierende DCF gebildet, welches mithilfe eines Durchflusszytometers gemessen werden kann.

Zur Durchführung dieses Assays wurden HDMEC für 2 h mit 1,4-Dithiothreitol (DTT; Sigma-Aldrich) vorbehandelt und anschließend für 24 h mit Linalool inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 μ M DCFH-DA (Sigma-Aldrich) für 30 min bei 37 °C inkubiert, danach mit einem Gummischaber gesammelt und mit einem FACScan Durchflusszytometer (BD Biosciences) analysiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 0,5 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt wurden.

5.2.8.4 β 1-Integrin-Messung

Zur Untersuchung der Wirkung von Linalool auf aktives β 1-Integrin wurden 3×10^5 Zellen für 2 h mit dem spezifischen Inhibitor des TRPM8 Kanals N-(3-aminopropyl)-2-((3-methylphenyl)methoxy)-N-(2-thienylmethyl)-benzamid hydrochlorid (AMTB; Sigma-Aldrich) vorbehandelt und anschließend für 30 min mit Linalool inkubiert. Danach wurden sie mit HEPES Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mg/ml D-Glucose, pH 7,4) versetzt mit 1 mM Mn^{2+} gewaschen und für 30 min bei 37 °C mit PE-konjugiertem anti- β 1-Integrin Antikörper (Klon HUTS-21, 1:20; BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber abgelöst und mit einem FACScan Durchflusszytometer (BD Biosciences) analysiert.

5.2.9 Migrationsanalyse

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens transfizierter oder behandelter Endothelzellen wurden zwei verschiedene Analysen durchgeführt. Zum einen wurde ein Scratch-Assay durchgeführt, bei dem HDMEC aus einer konfluenten Zellschicht abgekratzt werden, so dass eine Lücke im Zellrasen entsteht. Im Anschluss wurden mikroskopische Aufnahmen zum Zeitpunkt 0 h und 6 h dokumentiert (Leica DFC450C; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und die zellfreien Flächen mit der Software LASV4.8 Ink. (Leica Microsystems) ausgemessen.

Zum anderen wurde ein Transwell-Assay durchgeführt. Die Zellen werden hierbei durch einen chemotaktischen Reiz angeregt und migrieren durch eine Membran mit definierter Porengröße. Für dieses Assay wurden $2,5 \times 10^5$ vorbehandelte HDMEC in ECGM MV ohne Zusätze in das obere Kompartiment einer Transwellplatte (Porengröße 8 μm ; Corning Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. In das untere Kompartiment wurde ECGM MV ohne Zusätze, das mit 1 % FCS supplementiert war, zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurden die nicht migrierten Zellen mit einem Wattestäbchen entfernt und mittels Diff-Quick (LT-SYS, Berlin, Deutschland) angefärbt. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem BZ-8000K Mikroskop (Keyence, Osaka, Japan) in 20-facher Vergrößerung aufgenommen und die Zellzahl in 20 Gesichtsfeldern bestimmt.

5.2.10 Zytoskelett-Färbung

Die Analyse der Effekte der miR-370 und Linalool auf die Organisation der Aktinfilamente des Zytoskeletts von HDMEC erfolgte mithilfe einer Phalloidin-Färbung. Dazu wurden 2×10^4 transfizierte oder 8×10^3 Linalool-behandelte Zellen auf Glasplättchen in einer 24-Lochplatte ausgesät und für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 4 % Formalin (Carl Roth) fixiert, mit 0,2 % Triton-X-100 (Carl Roth) permeabilisiert und mit 1 % bovine serum albumin (BSA; Santa Cruz Biotechnology) geblockt. Im Anschluss wurden die HDMEC mit einem Alexa Fluor 568 Antikörper, der mit Phalloidin gekoppelt war (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), inkubiert und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich) gefärbt. Die Glasplättchen wurden auf einem Objektträger mit Kaiser's Glycerin Gelatine (Merck) versiegelt und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung erstellt (BX60; Olympus, Hamburg, Deutschland). Die Anzahl der Lamellipodien bzw. Stressfasern in den Zellen wurde bestimmt und prozentual zur Gesamtzellzahl angegeben.

5.2.11 Tube Formation-Assay

Beim Tube Formation-Assay wird getestet, ob Zellen in der Lage sind, endotheliale Tubes auszubilden. Dazu werden die Zellen auf eine gelartige Matrix, die der zellulären Basalmatrix ähnelt, ausgesät. Diese regt die Zellen zur Migration und Differenzierung an.

Zur Durchführung dieses Assays wurden $1,7 \times 10^4$ HDMEC auf polymerisiertes Matrigel (Basement Matrix; Corning) in eine 96-Lochplatte ausgesät und für 24 h inkubiert. Danach wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der neu gebildeten Tubes aufgenommen (BZ-8000; Keyence) und mit dem „Angiogenesis Analyzer“ Plugin der Software Image J (U.S. National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA) analysiert. Die Anzahl der Maschen (Tube Formation) wurde graphisch dargestellt.

5.2.12 Sphäroid-Sprouting-Assay

Zur Untersuchung des Aussprossungsverhalten von Endothelzellen in einem 3D Zellkulturmodell wurde ein Sphäroid-Assay durchgeführt. Hierzu wurden HDMEC oder HUVEC mit ECGM MV, das mit 20 % Methylcellulose (w/v) (Thermo Fisher Scientific) supplementiert war, vermischt und 500 Zellen pro Vertiefung in eine Rundboden 96-Lochplatte ausgesät. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Sphäroide gesammelt und in einem Kollagenmix resuspendiert [Heiss *et al.*, 2015]. Der Mix aus Sphäroiden und Kollagen wurde in eine vorgewärmte 24-Lochplatte transferiert und für 45 min inkubiert. Im Folgenden wurde ECGM MV, das mit 5 ng/ml VEGF supplementiert war, zugegeben. Für die Behandlung mit Linalool, dem AKT-Inhibitor MK-2206 (SelleckChem, München, Deutschland) dem MEK-Inhibitor PD0325901 (SelleckChem), DTT, Adenosintriphosphat (ATP; Sigma-Aldrich) und AMTB wurde das Medium mit den angegebenen Konzentrationen versetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Aussprossungsverhalten der einzelnen Sphäroide dokumentiert (Leica DFC450C) und die Gesamtsprosslänge jedes Sphäroids mit der Software LASV4.8 Ink. (Leica Microsystems) gemessen.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Lasermikrodissektion

Mit der Lasermikrodissektion können Gewebe, Einzelzellen oder Zellbestandteile innerhalb eines Gewebeschnittes isoliert werden. Die ausgewählten Bereiche werden mithilfe eines Laserstrahls ausgeschnitten und in weiterführenden Analysen untersucht [Emmert-Buck *et al.*, 1996].

Zur Analyse der miRNA Expression in Endothelzellen von humanen Adenokarzinomen und entsprechendem Normalgewebe der Lunge wurde eine Lasermikrodissektion durchgeführt.

Dazu wurden 5 µm Schnitte des in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumor- oder Normalgewebes angefertigt. Diese wurden auf membranbeschichtete Objektträger (Leica Microsystems) übertragen und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Die Endothelzellen innerhalb des Tumor- und dazugehörigen Normalgewebes wurden unter Verwendung eines Lasermikrodissektionssystems (Leica AS LMD; Leica Microsystems) ausgeschnitten. Die Dissektate wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß (Leica Microsystems) aufgefangen. Von jeder Probe konnten ungefähr 2000 Endothelzellen entnommen werden, die sofort einer RNA-Isolation unterzogen wurden.

5.3.2 RNA-Isolation

Ein miRNeasy Mini Kit bzw. ein RNeasy Mini Kit (Qiagen) wurde für die Extraktion von RNA aus Zellen oder Gewebe verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die eluierte miRNA/RNA wurde im Anschluss bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.3.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA durch das Enzym reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Für die cDNA Synthese wurde 1 µg isolierte RNA eingesetzt und ein Mispript II RT Kit (Qiagen) bzw. ein QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die hergestellte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.3.4 RNA/cDNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration der isolierten RNA/cDNA erfolgte mithilfe des DeNovix DS-11 Spektrophotometers der Firma Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland).

5.3.5 Quantitative real time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die Standardmethode zur Vervielfältigung geringer Mengen DNA ist bis heute die Polymerasekettenreaktion (PCR). Die doppelsträngige DNA-Helix wird hierbei bei 95 °C denaturiert, wodurch eine Anlagerung spezifischer Oligonukleotidsequenzen (Primer) an die einzelsträngige DNA ermöglicht wird. Dabei flankieren die Primer die zu vervielfältigende DNA-Sequenz in der Annealing Phase und dienen als Initiationssequenz für die Synthese eines neuen DNA-Stranges. Zur Elongation wird eine hitzestabile Polymerase mit Proof-Reading-Funktion eingesetzt, die komplementär zum Template Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP

und dTTP) an die Primer anfügt. Diese drei Schritte, Denaturierung, Annealing und Elongation, werden so oft wiederholt, bis genügend DNA amplifiziert wurde. Zusätzlich ist es bei einer qRT-PCR möglich, die amplifizierte DNA mittels Fluoreszenzmessungen zu quantifizieren, wobei die Menge der PCR-Produkte proportional zum Fluoreszenzsignal zunimmt.

Für die Durchführung dieses Assays wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser interkaliert unspezifisch mit doppelsträngiger DNA, kann durch Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt werden und emittiert Licht bei 521 nm. Zur Quantifizierung wird der cycle threshold (Ct-Wert) bestimmt, der am Anfang der exponentiellen Phase gemessen wird, an dem die Fluoreszenz über die der Hintergrund-Fluoreszenz steigt.

Für die qRT-PCR zur Untersuchung des miRNA-Gehaltes bzw. mRNA-Gehaltes wurde ein MiScript bzw. ein QuantiNova SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet und im MiniOpticon™ Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) analysiert. Die relative Quantifizierung der Expression von miRNA oder mRNA wurde nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Zur Bestimmung des miRNA- bzw. mRNA-Gehalts wurde die small nuclear ribonucleic acid (snRNA) *RNU6B* bzw. die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) als Referenzgen herangezogen. Die MiScript Primer Assays für Hs_miR-186, Hs_miR-370 und Hs_RNU6-2_11 wurden von Qiagen bezogen. Die genspezifischen Oligonukleotide wurden von Thermo Fisher Scientific synthetisiert und sind in *Tabelle 2* gelistet.

Tabelle 2: Oligonukleotid-Sequenzen für die qRT-PCR (angegeben in 5'-3' Orientierung)

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
BMP2	ACCCGCTGTCTTCTAGCGT	CTCAGGACCTCGTCAGAGGG
CDC42	CCATCGGAATATGTACCGACTG	CTCAGCGGTCGTAATCTGTCA
CDK6	CCAGATGGCTCTAACCTCAGT	AACTTCCACGAAAAAGAGGCTT
ENG	TGCACTTGGCCTACAATTCCA	AGCTGCCCACTCAAGGATCT
FOXO1	TCGTCATAATCTGTCCCTACACA	CGGCTTCGGCTCTTAGCAAA
FZD3	GTTTCATGGGGCATATAGGTGG	GCTGCTGTCTGTTGGTCATAA
GAPDH	GCTGCTGTCTGTTGGTCATAA	GGCAGTGATGGCATGGAC
HDAC4	AGCGTCCGTTGGATGTCAC	CCTTCTCGTGCCACAAGTCT
HIF1A	GAACGTGCGAAAAGAAAAGTCTCG	CCTTATCAAGATGCCAACTCACA
HMGB1	GCGGACAAGGCCCGTTA	AGAGGAAGAAGGCCGAAGGA
JAG1	GTCCATGCAGAACGTGAACG	GCGGGACTGATACTCCTTGA
IGF2BP1	GCGGCCAGTTCCTTGGTCAA	TTGGGCACCGAATGTTCAATC
MAP3K2	CCCCAGTTACATTCCAGATGA	GCATTCGTGATTTTGGATAGCTC
MAP3K4	GCAAAGCCATCCCAAGTT	GTGCCTCTATGTTCACTTCTGTT
MAP3K8	CAAGTGAAGAGCCAGCAGTTT	GCAAGCAAATCCTCCACAGTTC
MTDH	CTCGGGCTGCTGCTGCTGTT	CAGCAAGGCCAGGTCGTCGG
PRKCA	GTCCACAAGAGGTGCCATGAA	AAGGTGGGGCTTCCGTAAGT
RELA	ATGTGGAGATCATTGAGCAGC	CCTGGTCCTGTGTAGCCATT

ROCK1	AACATGCTGCTGGATAAATCTGG	TGTATCACATCGTACCATGCCT
RPS6KA3	GTGGCAGAAGATGGCTGTG	TGGGTTAATCTCCTCCTCTCC
SATB1	CCAGGTTGGAAAGTGGAATCC	GGGGCAACTGTGTAAGTGAAT
SIRT1	TAGCCTTGTCAGATAAGGAAGGA	ACAGCTTCACAGTCAACTTTGT
Shh	GAAAGCAGAGAACTCGGTGG	GGAAAGTGAGGAAGTCGCTG
SMAD6	CCTCCCTACTCTCGGCTGTC	GGTAGCCTCCGTTTCAGTGTA
SMO	GTCATTCTCACACTTGGGCA	AAGCTCGTGCTCTGGTCG
STK35	AGTTTGAGGAGTGCGTCTCTG	CCTTTCTCCTTTTCAGCGAGGT
SMURF1	GTCCAGAAGCTGAAAGTCTCAGA	CACGGAATTCACCATCAGCC
TGFBR2	AAGATGACCGCTCTGACATCA	CTTATAGACCTCAGCAAAGCGAC
WNT10B	GCACGAATGCGAATCCACAA	GCATGTCTTGAAGTGGCAGC
YAG1	TAGCCCTGCGTAGCCAGTTA	TCATGCTTAGTCCACTGTCTGT

5.3.6 Plasmidkonstruktion

Entsprechend der TargetScan 7.1 Datenbank gibt es vier potenzielle Bindestellen für die miR-186 innerhalb der 3'-UTR der humanen *PRKCA* mRNA Sequenz. Diese Bindestellen liegen in weiter Entfernung zueinander, weshalb zwei gesonderte Teile der 3'-UTR von *PRKCA* direkt hinter das Stopcodon des Luciferasegens in einem Firefly-Luciferasereportervektor kloniert wurden. Ein Teil beinhaltet eine potenzielle Bindestelle für die miR-186, wohingegen der andere Teil drei potenzielle Bindestellen besitzt. Die Mutanten der 3'-UTR wurden durch Verwendung der klonierten *PRKCA*-3'UTR und des Quickchange lightning site-directed mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Shanghai, China) hergestellt. Die Sequenzen des Wildtyps und der Mutanten 3'UTR wurden durch Sequenzierung (Thermo Fisher Scientific) überprüft und bestätigt. Die verwendeten Sequenzen zur Plasmidkonstruktion sind in *Tabelle 3* gelistet.

Tabelle 3: Sequenzen für die Plasmidkonstruktion (angegeben in 5'-3' Orientierung)

Plasmid	Forward Primer	Reverse Primer
PRKCA-3'-UTR WT1	GGGGTACCAAGCCAAGAGAGTGAGCA GG	CCGCTCGAGAGGGAAAGCACAGAAGC AAG
PRKCA-3'-UTR WT2	GGGGTACCCTGAGGATGAATGGAGAA GT	CCGCTCGAGACAGAAGGGATGTGAGG TTA
PRKCA-3'-UTR WT2 MT1	CACCATTTCTGTCTAGAGTAACCCG ACAAGGGTAGGAGT	CCTTGTCGGGTTACTCTAGGACAGGAA ATGGTGTGATGTGCA
PRKCA-3'-UTR WT2 MT2	ACTTTAATAATACCTAGAGCAAAATGAG TTTTTAGAACAAAGCAA	AAAACCTCATTTTGTCTAGGTATTATTAA AGTTCTCTATAAAAAA
PRKCA-3'-UTR WT2 MT3	CTGGAAGAATATCCCTAGAGTCTTGAA GGGTTGGTTTACTAGAA	CAACCCCTCAAGACTCTAGGGATATTCT TCCAGGAAGAATATCAA

5.3.7 *In silico* Target-Analyse

Zur Identifizierung möglicher humaner Targets der miR-370/-186 wurden die beiden Datenbanken TargetScan und miRDB verwendet. Die Zielgene, die in beiden Datenbanken als potenzielle Targets gelistet wurden und die eine Funktion bei der Angiogenese aufweisen, wurden ermittelt. Anschließend wurde die Expression der mRNA dieser Zielgene in transfizierten Zellen mittels qRT-PCR bestimmt.

5.3.8 ATP-Messung

Zur Messung der intrazellulären ATP-Konzentration wurde das ATP Determination Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dabei wird D-Luciferin mittels ATP und Luciferase zu Licht umgesetzt. Die gemessene Lumineszenz ist proportional zur Menge an ATP in der Zelle.

Für die Durchführung dieses Assays wurden 5×10^3 HDMEC ausgesät und für 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Lysepuffer (Promega, Walldorf, Germany) für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler lysiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand gesammelt und mit Reaktionslösung bestehend aus Reaktionspuffer, 0,1 M DTT, 10 mM D-Luciferin und Firefly Luciferase gemischt. Die Lumineszenz wurde mithilfe des Infinite M1000 Pro Luminometers (Tecan, Männedorf, Switzerland) gemessen.

5.3.9 Luciferase-Assay

Um zu überprüfen, ob eine direkte Interaktion zwischen Target und miRNA besteht, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Hierfür wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay Kit 2.0 (GeneCopoeia, Rockville, USA) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für dieses Assay wurden HEK293T Zellen mittels Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) mit 100 nM miRNA mimic oder NcM, einem Renilla-Luciferaseplasmid und einem Firefly-Luciferaseplasmid mit oder ohne der 3'UTR des zu analysierenden Zielgens co-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Firefly und Renilla Luciferase mit dem Infinite M1000 Pro Luminometer (Tecan) gemessen.

5.3.10 Calcium-Messung

Die Messung der Ca^{2+} -Konzentration in HDMEC wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Xin Hui aus dem Institut für Zellbiologie durchgeführt. Dazu wurden 1×10^5 Zellen auf Glasplättchen in eine 12-Lochplatte ausgesät und für 2 h mit 5 μM AMTB, 1 μM PD0325901 oder mit 2,5 μM des Calcium Chelators BAPTA-AM (Abcam, Cambridge, UK) vorbehandelt. Nach Zugabe von Fluo-4 AM (Life Technologies) wurden die Zellen bei 26 °C in Tyrode-Lösung (135 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl_2 , 10 mM Glukose, 2 mM MgCl_2 and 10 mM HEPES; pH 7,35)

inkubiert und unter einem Mikroskop (Eclipse TE; Nikon, Düsseldorf, Deutschland) mit 20x Vergrößerung (Plan Fluor; 20x 0.75) visualisiert. Die Anregung erfolgte durch LED (pE-100; CoolLED Ltd., Andover, USA) bei einer Wellenlänge von 470 nm und die Emission von Fluor-4 wurde durch eine COMS Kamera (Orca Flash 4.0; Hamamatsu, Japan) detektiert. Die Stimulation mit den chemischen Substanzen wurde mit einem Gravitations-gesteuerten Perfusionssystem durchgeführt. Die Hintergrundkorrektur und Fluoreszenzintensität der erzeugten Aufnahmen wurden mit Image J (U.S. National Institutes of Health (NIH)) analysiert. Die Daten wurden anschließend mit IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) weiterbearbeitet. Die Fluoreszenz wurde zu einem bestimmten Zeitpunkt (F) auf die basale Fluoreszenz (F_0) normiert [Hui *et al.*, 2014].

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 Proteinextraktion

Um Proteine aus Zellen zu analysieren, müssen diese extrahiert werden. Dazu wurden HDMEC mit 150 μ l RIPA-Puffer (Thermo Fisher Scientific) lysiert. Dieser wurde im Verhältnis 1:100 mit Phosphatase-Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich), 1:500 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 100 mM, Carl Roth) und 1:100 Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) supplementiert. Nach Zugabe des Lyse-Puffers wurden die Zellen für 10 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wurden sie mithilfe eines Gummischabers in ein Reaktionsgefäß überführt und die nachfolgende Zentrifugation bei 14.800 xg für 30 min bei 4 °C durchgeführt, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand, in dem sich die Proteine befanden, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Proteinbestimmung unterzogen.

5.4.2 Gesamtproteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Zur Bestimmung der Proteinmenge in den Proben wurde ein BCA-Test durchgeführt. Dieses Assay beruht auf der Reduktion von Kupfer²⁺-Ionen zu Kupfer⁺-Ionen durch Proteine unter basischen Bedingungen. Die reduzierten Kupfer-Ionen bilden mit jeweils zwei Bicinchoninsäure-Molekülen einen violetten Komplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen und quantifiziert werden kann. Die gemessene Absorption ist von der Menge an Proteinen abhängig, die sich in der Lösung befinden [Kralj *et al.*, 2014]. Für den hier durchgeführten BCA-Test wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Um Vergleichswerte zu erhalten, wurde eine BSA-Verdünnungsreihe erstellt. Anschließend wurden 25 μ l der Lysat-Proben und der BSA-Reihe in eine 96-Lochplatte pipettiert und je Probe 200 μ l der BCA-Lösung zugegeben. Diese bestand zu 50 Teilen aus Bicinchoninsäure und zu einem Teil aus Kupfer(II)sulfat. Nach der

Zugabe erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Die Absorption wurde im Photometer (PHOMo) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde aus der BSA-Verdünnungsreihe eine Eichgerade erstellt und mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen ermittelt.

Nach Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine adäquate Menge (ca. 10 µg / 15 µl) an Lysat mit 6 x Lämmli-sodium dodecyl sulfate (SDS)-Probenpuffer (AlfaAeser, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend konnten die Proben auf ein 10 % Tris/Glycin-Polyacrylamid-Gel aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

5.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteingemische hinsichtlich ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, wurden 10 % Tris/Glycin-Polyacrylamid-Gele nach Ulrich Lämmli verwendet [Schagger und von Jagow, 1987]. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern zur Anode, wobei kleinere Proteine schneller als größere durch das Gel wandern. Dafür wurde ein 5x Laufpuffer (125 mM Tris, 960 mM Glycin, 17 mM SDS) verwendet.

Tris-Glycin Polyacrylamidgele:

10 % Trenngel:

4 ml H₂O
 100 µl SDS (Carl Roth) (10 %)
 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
 3,3 ml Acrylamid (BioRad) (30 %)
 10 µl TEMED (Carl Roth) (10 %)
 100 µl APS (Sigma) (10 %)

Sammelgel:

2,7 ml H₂O
 40 µl SDS (10 %)
 500 µl 1 M Tris (pH 6,8)
 670 µl Acrylamid (30 %)
 10 µl TEMED (10 %)
 40 µl APS (10 %)

Als Größenstandard wurde der Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V gestartet. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

5.4.4 Western Blot-Analyse

5.4.4.1 Semi-dry-Blotting

Nachdem die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte, wurden diese mithilfe des Western-Blot-Verfahrens (semi-dry-blotting) auf eine PVDF-Membran (BioRad) übertragen [Towbin *et al.*, 1979]. Die Membran wurde vor der Verwendung für 20 s in 100 % Methanol

äquiliert und anschließend in Bjerrum-Schäfer Nilson Puffer (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 10 % Methanol) überführt. Das SDS-Gel wurde ebenfalls in Bjerrum-Schäfer Nilson Puffer inkubiert, um Reste vorherig verwendeter Puffer zu entfernen. Weiterhin wurden Filterpapiere (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) in Bjerrum-Schäfer Nilson Puffer getränkt. Zum Transfer wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad) verwendet. Der Blot wurde wie folgt auf der Anode der Apparatur aufgebaut: Filterpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Filterpapier. Der Transfer erfolgte für 7 min bei 600 mA. Die übertragenen Proteine konnten im Anschluss immunologisch detektiert werden.

5.4.4.2 Immunodetektion

Für die Immunodetektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

10x TBS:

Tris (Carl Roth)	200 mM
Natriumchlorid (Carl Roth)	1,37 M

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,5 eingestellt.

TBS-T:

10x TBS	10 % (v/v)
Tween 20 (Carl Roth)	0,1 %

Blocking-Lösung:

10 x TBS	10 % (v/v)
Tween 20	0,1 % (w/v)
Magermilchpulver (BioRad)	5 % (w/v)

Zum Blocken der freien Bindestellen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blocking-Lösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte der immunologische Nachweis der Proteine mithilfe von Primär- und Sekundärantikörpern (*Tabelle 4*), die in Blocking-Lösung gelöst und mit der Membran inkubiert wurden. Zur Detektion von phosphorylierten Proteinen wurde BSA (Santa Cruz Biotechnology) anstelle des Magermilchpulvers zum Blocken und Verdünnen der Antikörper verwendet. Nach jedem Hybridisierungsschritt wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zur Detektion wurde die Membran schließlich mit zwei verschiedenen Lösungen (western blotting detection reagents; GE Healthcare) benetzt, die im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte horseradish peroxidase (HRP) kann Luminol unter

Anwesenheit von H_2O_2 oxidieren, wodurch ein Chemilumineszenzsignal entsteht. Dieses wurde mit dem ECL Chemocam Imager (Intas, Göttingen, Deutschland) detektiert. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mittels Image J Software (U.S. National Institutes of Health (NIH)).

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper für die Immundetektion

Name	Firma	Verdünnung
Anti-AKT	Cell Signaling	1:250
Anti-BMP-2	Proteintech, Manchester, UK	1:30
Anti-CDK4	Santa Cruz Biotechnology	1:10
Anti-CDK6	Santa Cruz Biotechnology	1:30
Anti-CDK9	Santa Cruz Biotechnology	1:150
Anti-COX-2	Abcam	1:50
Anti-eNOS	BD Bioscience	1:100
Anti-ERK	Abcam	1:250
Anti-FAK	Cell Signaling	1:100
HRP anti-mouse	Dako, Hamburg, Deutschland	1:1500
HRP anti-rabbit	R&D Systems	1:1000
Anti-ICAM-1	Santa Cruz Biotechnology	1:30
Anti-mTOR	Cell Signaling	1:500
Anti-p-AKT 1/2/3	Cell Signaling	1:100
Anti-p-ERK	Abcam	1:250
Anti-p-FAK	Cell Signaling	1:250
Anti-PKC α	Cell Signaling	1:250
Anti-p-mTOR	Cell Signaling	1:500
Anti-p-p38	Cell Signaling	1:250
Anti-p21	Abcam	1:250
Anti-p38	Cell Signaling	1:250
Anti-RhoA	Cell Signaling	1:250
Anti-Shh	Cell Signaling	1:25
Anti-SIRT1	Abcam	1:100
Anti-SMO	Abcam	1:50
Anti-TRPM8	Abcam	1:25
Anti-VEGFA	Abcam	1:50
Anti- β -Aktin	Sigma-Aldrich	1:5000

5.4.4.3 Strippen von Membranen

Damit die Membranen mit weiteren Primärantikörpern gleicher Spezies inkubiert werden konnten, mussten vorherige gebundene Antikörper entfernt werden. Dafür wurden die Membranen für 15 min bei Raumtemperatur mit Restore™ Western Blot Stripping Buffer

(Thermo Fisher Scientific) auf einem Kippschüttler inkubiert und für 10 min mit TBS-T gewaschen. Nach erneuter Sättigung der unspezifischen Bindestellen mit der Blocking-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur konnten die Membranen schließlich mit weiteren Antikörpern inkubiert werden.

5.5 Versuchstiere und Haltung

Die tierexperimentellen Studien dieser Arbeit wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und den Leitlinien der National Institutes of Health zur Pflege und Verwendung von Labortieren durchgeführt. Außerdem wurden sie von der lokalen Tierschutzbehörde (Landesamt für Verbraucherschutz, Geschäftsbereich 4, Amtstierärztlicher Dienst, Fachbereich 4.2, Saarbrücken, Nr.: 01/2019) genehmigt.

Alle Versuchstiere wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes entweder einzeln oder in Gruppen gehalten. Dabei wurden sie einem 12/12 h Tages-/Nachtzyklus ausgesetzt und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Futter (Altromin, Lage, Deutschland). Am Ende der Experimente wurden die Versuchstiere in Narkose mittels zervikaler Dislokation getötet.

5.6 Tierexperimentelle Modelle

5.6.1 Aorten-Ring-Assay

Zur Untersuchung der Wirkung von Linalool auf das Aussprossungsverhalten von Aorten-Ringen wurden fünf Wistar Albino Glaxo Ratten (Alter: >1 Jahr, Gewicht: 330 g) benutzt. Zur Entnahme der thorakalen Aorten wurden die Ratten zunächst durch eine CO₂-Inhalation getötet. Nach Isolierung der thorakalen Aorten wurden diese in einer Schale mit DMEM von Geweberesten befreit und mit Medium gespült, um Blutreste zu entfernen. Die gesäuberten Aorten konnten anschließend mit einer Mikroschere in gleichgroße Ringe (Breite: ≈ 2 mm) geschnitten werden. Die Aorten-Ringe wurden mit 200 µl Matrigel (Basement Matrix, Corning) in eine 48-Lochplatte eingebettet. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde 800 µl DMEM mit den angegebenen Linalool-Konzentrationen zugegeben.

Die Effekte der miR-370 in einem Aorten-Ring-Assay wurden unter Verwendung von vier BALB/c Mäusen (Alter: 8 Wochen, Gewicht: 20-25 g) analysiert. Zur Isolierung der thorakalen Aorten wurden die Mäuse narkotisiert (Ketamin 100 mg/kg und Xylazin 12 mg/kg intraperitoneal (i.p)). Die entnommenen Aorten wurden in einer Schale mit Medium frei präpariert, gespült und in gleichgroße Ringe (Breite: ≈ 0,5 mm) geschnitten. Die Aorten-Ringe wurden mittels Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) für 24 h mit miR-370m oder miR-370i transfiziert. Anschließend wurden diese in eine 96-Lochplatte mit 100 µl Matrigel

(Basement Matrix; Corning) eingebettet. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit wurden 100 µl DMEM mit 10 % FCS auf das Matrigel gegeben.

Nach sechs Tagen, mit einem Mediumwechsel am dritten Tag, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (BZ-8000 Keyence) der Aorten-Ringe der Ratte und Maus erstellt. Die Fläche der Aussprossungen aus den Aorten-Ringen konnte mittels der Keyence Analyse Software gemessen werden.

5.6.2 Matrigel-Plug-Assay

Die Effekte von Linalool auf die Angiogenese wurden mittels eines *in vivo* Matrigel-Plug-Assays analysiert. Dafür wurden 200 µl Matrigel (Basement Matrix; Corning) mit 30 IU/ml Heparin (Braun, Melsungen, Deutschland) und 1 µg/ml VEGF (PAN Biotech, Bayern, Deutschland) vermischt. Zu dem Matrigel-Gemisch wurde 2 mM DMSO oder Linalool zugegeben und subkutan in die linke bzw. rechte Flanke von neun männlichen BALB/c Mäusen (Alter: 20-28 Wochen, Gewicht: 22-28 g) injiziert. Zur Injektion des Matrigel-Gemisches wurden die Tiere mit Isofluran (Einleitung 4%, Erhaltung 2%) narkotisiert.

Zur Untersuchung der Funktion von miR-370m/-186m oder miR-370i wurden 5×10^6 transfizierte HDMEC pro Milliliter (5.2.3) in Kulturmedium mit Matrigel (Basement Matrix, Corning), 1 µg/ml VEGF (PAN Biotech), 1 µg/ml bFGF (R&D Systems) und 50 IU/ml Heparin (Braun) vermischt. Es wurden 300 µl Matrigel-Gemisch mit Kontrollzellen bzw. mit miRNA-transfizierten Zellen subkutan in die linke bzw. rechte Flanke von acht männlichen CD-1 nu/nu Mäusen (Alter: 8-12 Wochen, Gewicht: 20-25 g) pro miRNA appliziert. Zur Injektion des Matrigel-Gemisches wurden die Tiere mit Isofluran (Einleitung 4%, Erhaltung 2%) narkotisiert.

Nach sieben Tagen wurden die Matrigel-Plugs für weitere immunhistochemische Analysen entnommen.

5.6.3 Tumor-Flankenmodell

Die Effekte der miR-186 auf die Tumorangiogenese wurden im Tumor-Flankenmodell untersucht. Hierfür wurden HDMEC mit NCm oder miR-186m transfiziert (siehe 5.2.3). Nach 48 h Inkubationszeit wurden $1,8 \times 10^6$ transfizierte HDMEC mit $1,5 \times 10^5$ H460 vermischt und in einem Volumen von 75 µl in ECGM MV subkutan in die linke Flanke von NOD SCID Mäusen (Alter: 8-12 Wochen, Gewicht: 20-28 g) injiziert. Dabei wurden neun Mäusen NCm-transfizierte HDMEC und neun Mäusen miR-186 transfizierte HDEMC appliziert. Die Größe der wachsenden Tumore wurde an Tag 3, 7, 10 und 14 mittels einer Schieblehre ausgemessen. Zur Injektion der Zellsuspensionen und Messung der Tumore wurden die Tiere mit Isofluran (Einleitung 4%, Erhaltung 2%) narkotisiert. Das Volumen der Tumore wurde mithilfe der Formel $V = 1/2 (L \times W^2)$ berechnet, wobei L dem größeren und W dem kleineren Durchmesser

der Tumore entsprach. Nach 14 Tagen wurden die Tumore für histologische und immunhistochemische Untersuchungen exzidiert.

5.7 Histologie und Immunhistochemie

Nach Beendigung der Tierversuche wurden die Matrigel-Plugs und die Tumore aus den Flanken der Mäuse entnommen und für 24 h in 4 % Formalin (Carl Roth) fixiert. Anschließend wurden diese in Paraffin eingebettet und 3- μ m Schnitte angefertigt.

Zur Detektion der murinen GefäÙe innerhalb der Matrigel-Plugs und der Tumore wurden die Schnitte mit einem Ratte-anti-Maus CD31 Primärantikörper angefärbt (1:100; Dianova, Hamburg, Deutschland). Zur Detektion der humanen GefäÙe wurde ein Kaninchen-anti-Human CD31 Primärantikörper (1:100; Abcam) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde entweder ein Ziege-anti-Ratte Alexa Fluor-555 oder ein Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor-488 markierter Antikörper (1:100; Life Technologies) eingesetzt. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst 33342 (2 μ g/ml, Sigma-Aldrich) visualisiert. Von den gefärbten Schnitten wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung (BX60; Olympus) erstellt und die Anzahl der CD31-positiven GefäÙe aus 6-10 Gesichtsfeldern pro Schnitt ermittelt.

Zur Bestimmung der apoptotischen Zellen in den Tumoren wurden die Schnitte mit einem Kaninchen-anti-cleaved-Caspase-3 Primärantikörper (1:100; Cell Signaling) angefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein Biotin-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (ready to use; Abcam) eingesetzt. Die Gegenfärbung erfolgte mit der Hämalaunlösung nach Mayer und als Chromogen wurde 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC; Bio SB, Santa Barbara, USA) verwendet. Es wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Schnitte in 20-facher Vergrößerung angefertigt (BX60; Olympus). Pro Schnitt wurden acht Bilder im Randbereich und vier Bilder im Zentrum des Tumors aufgenommen. Die Analyse erfolgte mittels Image J Software (U.S. National Institutes of Health (NIH)), wobei die Anzahl der Caspase-3-positiven Zellen in den mikroskopischen Aufnahmen bestimmt und prozentual zur Gesamtzellzahl dargestellt wurde.

5.8 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mithilfe der SigmaPlot Software (SigmaPlot 11.0; Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Zunächst wurden die Daten hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Für die Analyse der Patientendaten wurde der gepaarte Student's t-Test verwendet. Die Unterschiede zwischen zwei experimentellen Gruppen mit normalverteilten Daten wurden mit dem ungepaarten Student's t-Test analysiert, wohingegen bei nicht-parametrischen Daten der Mann-Whitney-U-Test verwendet wurde. Die Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurden mittels einer einfachen Varianzanalyse getestet. Bei einer Normalverteilung der Daten wurde eine One-Way ANOVA bzw. bei nicht

normalverteilten Daten eine ANOVA on ranks gefolgt von einem Student-Newman-Keuls post-hoc Test zur Korrektur des Alphafehlers nach Bonferroni angewendet. Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Eine statistische Signifikanz wurde für einen p-Wert $< 0,05$ angenommen.

6 Ergebnisse

6.1 Effekte der miR-370 auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die miR-370 in unterschiedlichen Typen von Endothelzellen exprimiert wird [Heusschen *et al.*, 2010; Wang und Chen, 2017]. Allerdings ist nicht bekannt, wie die miR-370 die angiogene Aktivität von Endothelzellen reguliert. Daher wurden im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit erstmalig die Funktion der miR-370 auf die Angiogenese untersucht. Dazu wurde zunächst verschiedene *in vitro* und *in vivo* Assays durchgeführt. Außerdem sollten die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen einer potentiellen anti-angiogenen Funktion der miR-370 analysiert werden.

6.1.1 Expression der miR-370 in verschiedenen Zelllinien

Zunächst wurde die Expression der miR-370 in den beiden Endothelzelltypen HDMEC und HUVEC mit der Expression in anderen humanen Primärzellen, einschließlich Fibroblasten (NHDF), Perizyten (hPC-PL), Osteoblasten (HOB), Keratinozyten (HaCaT) und embryonalen Nierenzellen (HEK293T), verglichen. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten, dass die miR-370 in den beiden primären Endothelzelltypen deutlich stärker exprimiert wird als in den anderen Zelltypen (*Abbildung 4A*). Dies deutet auf eine wichtige Funktion dieser miRNA in Endothelzellen hin. Um die intrazelluläre Expression der miR-370 zu erhöhen oder zu reduzieren, wurden die Endothelzellen entweder mit miR-370m oder miR-370i transfiziert. Außerdem wurde eine Transfektion mit fluoreszierender miR-370m durchgeführt, um die Transfektionseffizienz zu untersuchen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass 90 % aller HDMEC und HUVEC erfolgreich mit der miR-370 transfiziert wurden (*Abbildung 4B und C*). In zusätzlichen qRT-PCR Analysen konnte durch Transfektion mit miR-370m eine 1986-fach und 5054-fach höhere Expression der miR-370 in HDMEC bzw. HUVEC detektiert werden (*Abbildung 4D*). Im Gegensatz dazu führte eine Transfektion mit miR-370i im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikant reduzierten Expression um 92 % in HDMEC und 77 % in HUVEC (*Abbildung 4E*). Da die Angiogenese üblicherweise in der Mikrozirkulation stattfindet, wurden für alle weiteren experimentellen Analysen nur noch HDMEC verwendet.

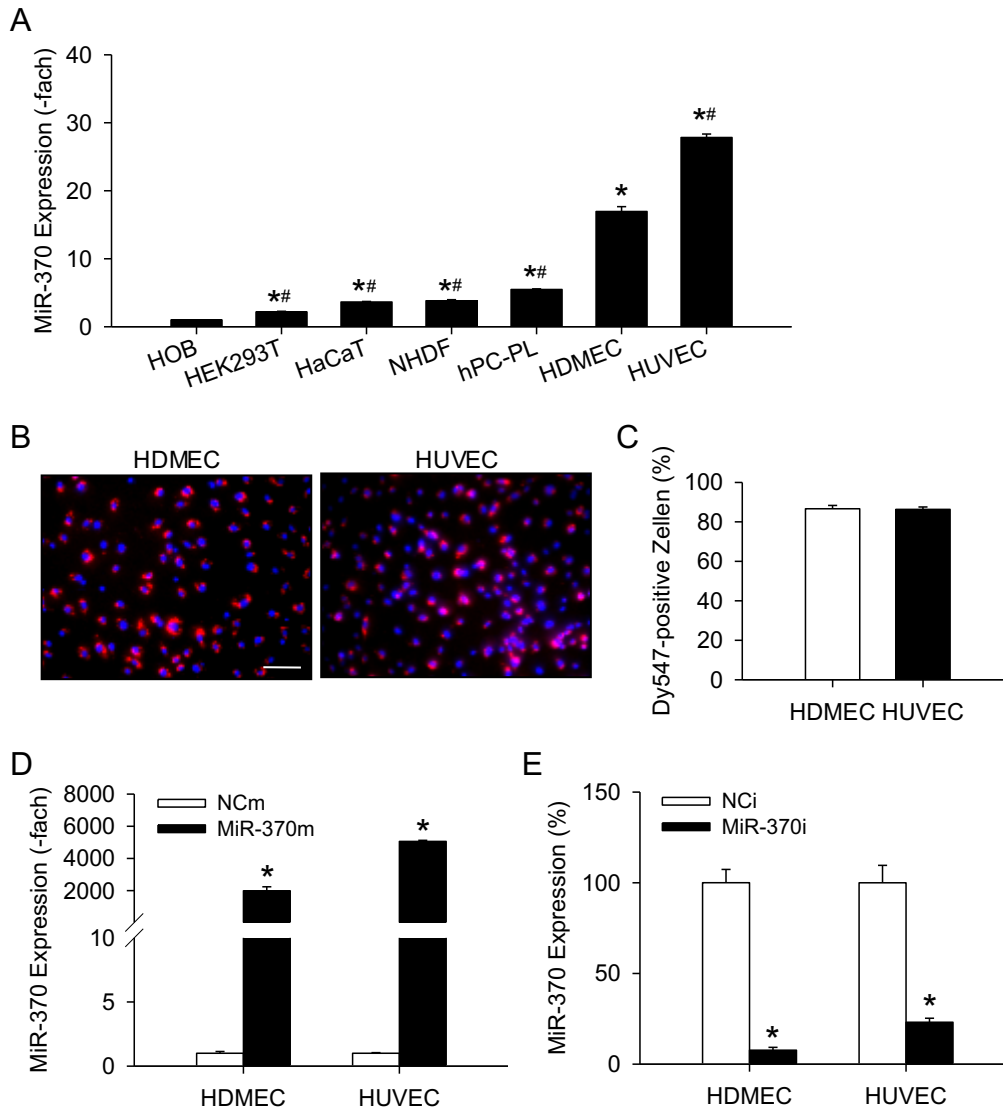


Abbildung 4: Die Expression der miR-370 ist in Endothelzellen erhöht. **A:** Expression der miR-370 in den verschiedenen Zelltypen HOB, HEK293T, HaCaT, NHDF, hPC-PL, HDMEC und HUVEC. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). Die Expression in HOB diente als Kontrolle. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HDMEC und HUVEC, die mit Dy547-markierter miR-370m (rot) transfiziert wurden. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Maßstab: 90 μm . **C:** Anzahl der Dy547-positiven Zellen (in % zur Gesamtzellzahl) ($n = 3$). **D, E:** Expression der miR-370 (als -fach von NCm oder in % von NCi) in HDMEC und HUVEC, die mit NCm und miR-370m (**D**) oder NCi und miR-370i (**E**) transfiziert wurden. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. HOB, NCm oder NCi. # $P < 0,05$ vs. HDMEC.

6.1.2 Effekte der miR-370 auf die Viabilität und Migration von Endothelzellen

Im Folgenden wurde die Funktion der miR-370 auf die Viabilität von HDMEC mithilfe eines WST-1-Assays untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Viabilität durch Transfektion mit miR-370m in Abhängigkeit von der Zeit abnahm (Abbildung 5A). Im Gegensatz dazu führte eine Transfektion mit miR-370i zu einer deutlich gesteigerten Viabilität der HDMEC nach 48 h und 72 h (Abbildung 5B).

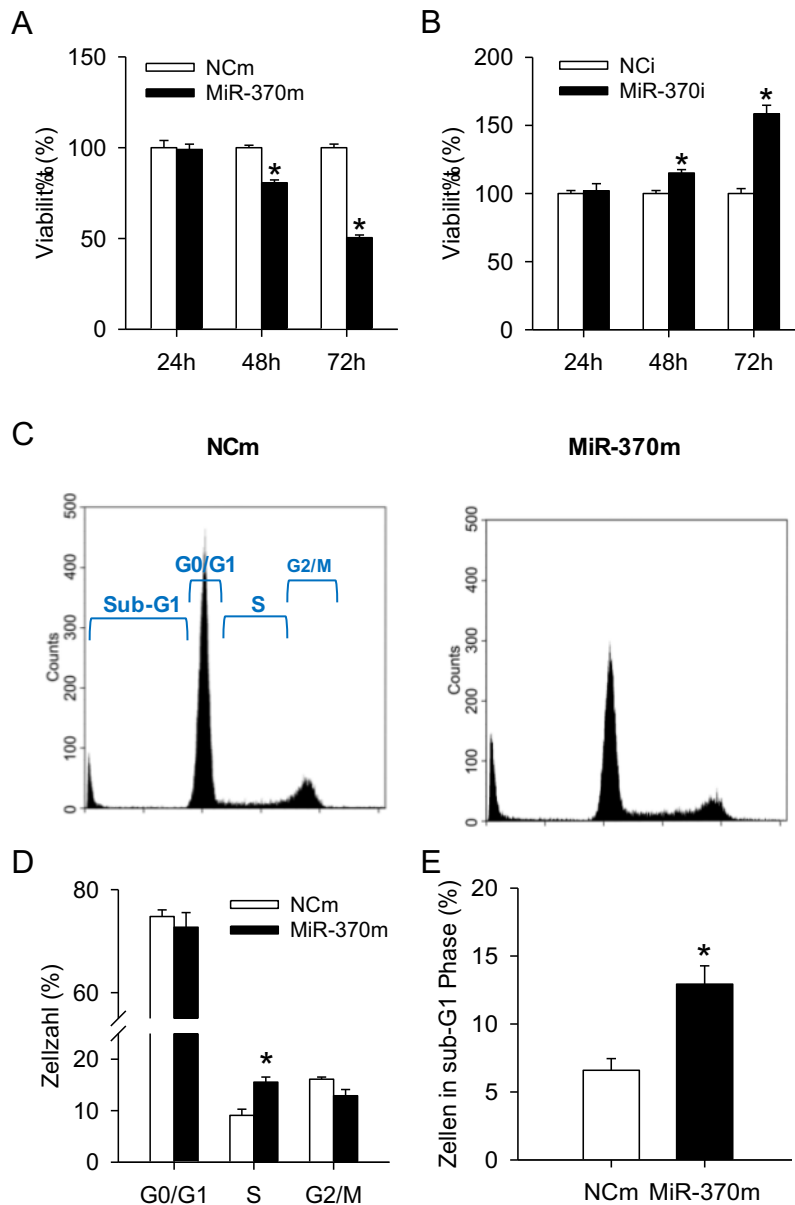


Abbildung 5: MiR-370 reduziert die Zellviabilität und induziert einen Zellzyklusarrest in HDMEC in der S-Phase. **A, B:** Viabilität (in % von NCm oder NCi) von NCm- und miR-370m- (**A**) oder NCi- und miR-370i- (**B**) transfizierten HDMEC, die mittels eines WST-1-Assays nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt wurde (n = 4). **C:** Zellzyklusanalyse von NCm- und miR-370m-transfizierten HDMEC. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. **D:** Anzahl der Zellen (in %) in der Gap (G)0/G1-, Synthese (S)- und G2/Mitose (M)-Phase des Zellzyklus von NCm- und miR-370m-transfizierten Zellen (n = 3). **E:** Zellen, die sich in der sub-G1-Phase befanden (in % zur Gesamtzellzahl). Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (n = 3). Mittelwerte \pm SEM. *P < 0,05 vs. NCm oder NCi.

Um die Effekte der miR-370 auf die Viabilität detaillierter zu analysieren, wurde zusätzlich die Wirkung der miR-370 auf den Zellzyklus untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass eine Transfektion von HDMEC mit miR-370m die Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen reduziert, was durch einen Zellzyklusarrest in der Synthese (S)-Phase bedingt ist (*Abbildung 5C und D*). Dies ging mit einer signifikant erhöhten Anzahl an Zellen, die sich in der sub-G1-Phase befanden, einher (*Abbildung 5C und E*). Daher kann auf einen pro-apoptischen Effekt der miR-370 geschlossen werden.

Der Einfluss der miR-370 auf das Migrationsverhalten von HDMEC wurde mithilfe von zwei verschiedenen Assays untersucht. Zum einen wurde ein Scratch-Assay durchgeführt, bei dem die freie Fläche des generierten Spalts in der Zellkultur in Abhängigkeit von der Zeit gemessen wird. Die mit miR-370m-transfizierten Zellen zeigten dabei einen geringeren Verschluss der freien Fläche nach 24 h (*Abbildung 6A und C*). Im Gegensatz dazu bewirkte eine Transfektion mit miR-370i einen gegenteiligen Effekt und beschleunigte den Verschluss der freien Fläche (*Abbildung 6B und D*).

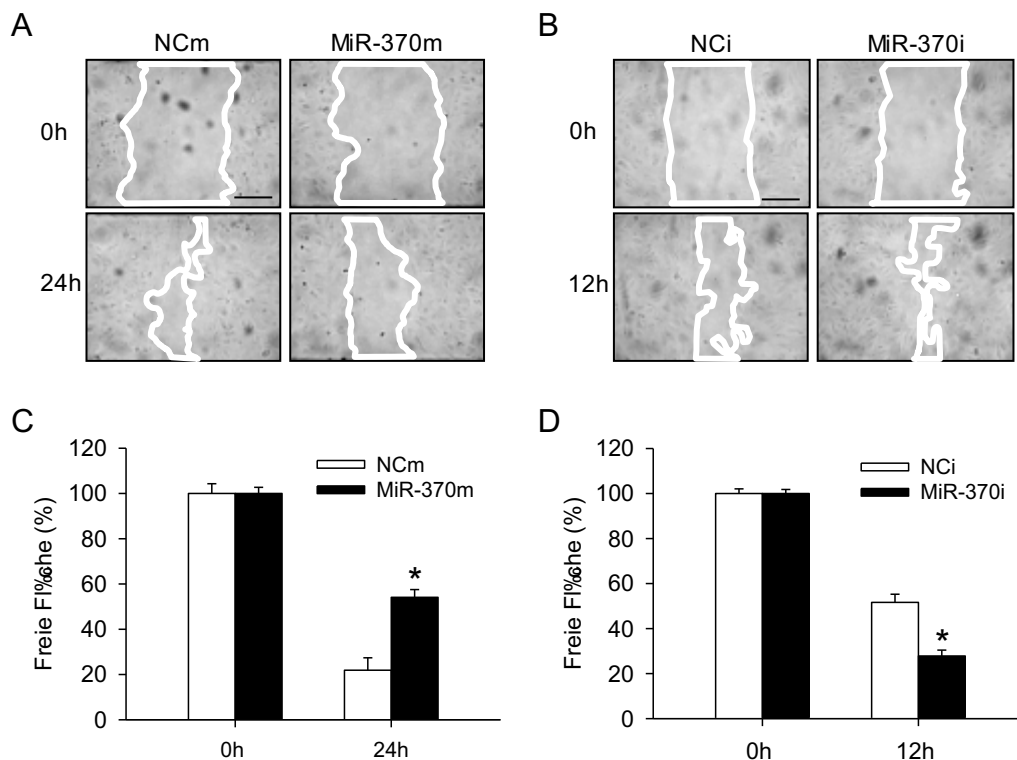


Abbildung 6: MiR-370 verzögert den Verschluss der freien Flächen im Scratch-Assay. **A, B:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von HDMEC nach Generierung der freien Fläche (weiße Linien) zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h und 24 h. Die Zellen wurden entweder mit NCM und miR-370m (**A**) oder mit NCI und miR-370i (**B**) transfiziert. Maßstab: 170 μ m. **C, D:** Freie Fläche (in % zu 0 h) der mit NCM- und miR-370m- (**C**) oder NCI- und miR-370i- (**D**) transfizierten Zellen im Scratch-Assay (n = 7-8). Mittelwerte \pm SEM. *P < 0,05 vs. NCM oder NCI.

Weiterhin wurde ein Transwell-Assay, bei dem die transfizierten HDMEC durch eine Membran migrierten, durchgeführt und im Anschluss die Anzahl migrierter Zellen bestimmt. Nach Transfektion mit miR-370m konnte in diesem Assay ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Migration von HDMEC nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine um 51 % verringerte Migrationsrate im Vergleich zu NCM-transfizierten Kontrollzellen (*Abbildung 7A und B*). Dagegen führte eine Transfektion mit miR-370i zu einer deutlich erhöhten Anzahl migrierter HDMEC (*Abbildung 7C und D*).

Die Migration von Endothelzellen ist von der ständigen Umgestaltung der Aktinfilamente des Zytoskeletts in Filopodien, Lamellipodien und Stressfasern abhängig [Lamalice *et al.*, 2007].

Daher wurde zusätzlich eine Phalloidin-Färbung der transfizierten HDMEC durchgeführt. Die Zellen werden hierzu mit Phalloidin, das mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, angefärbt. Dieses bindet mit hoher Affinität an Aktin, wodurch die Aktinfilamente des Zytoskeletts visualisiert werden können. Diese Färbung zeigte, dass eine Transfektion von HDMEC mit miR-370m eine deutliche Reduktion der Lamellipodien zur Folge hat (*Abbildung 7E und F*). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die miR-370 die Migration von HDMEC durch Abbau der Aktinfilamente hemmt.

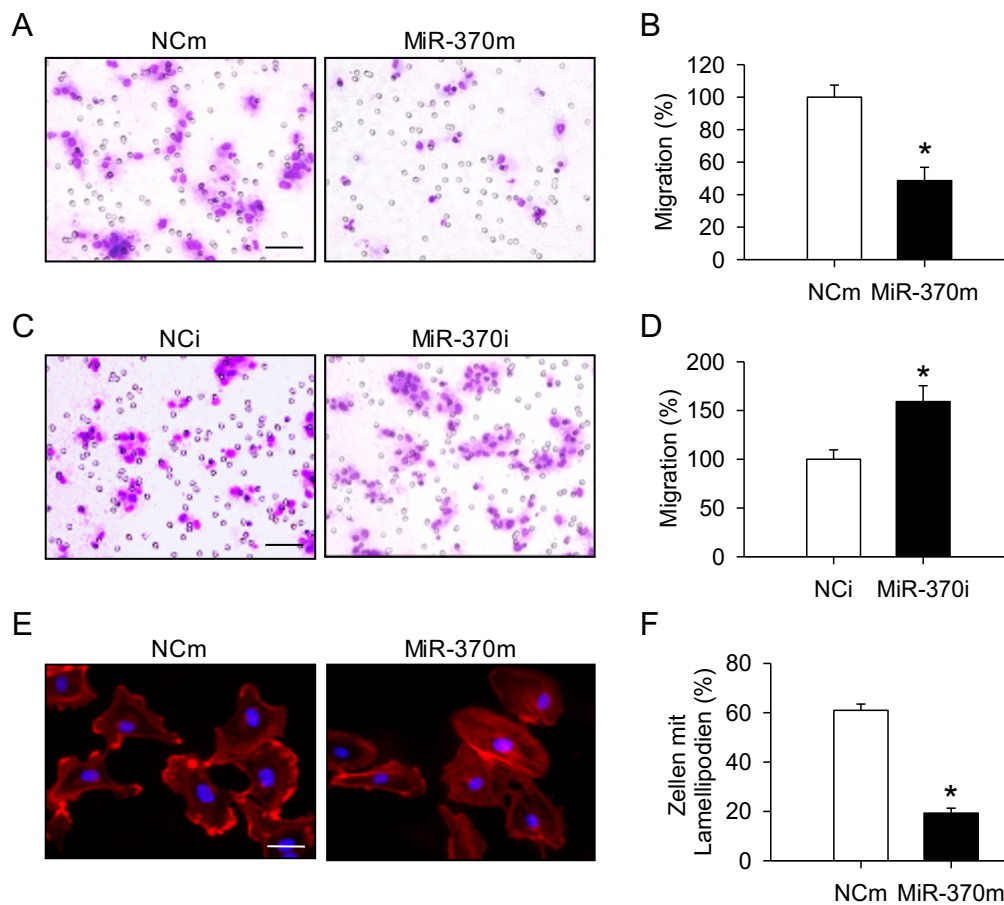


Abbildung 7: MiR-370 inhibiert die Migration von HDMEC. **A, C:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der migrierten Zellen im Transwell-Assay, die mit miR-370m (**A**) oder miR-370i (**C**) transfiziert wurden. Maßstab: 60 μ m. **B, D:** Quantitative Auswertung der migrierten HDMEC (in % zu NCm oder NCi). Die Zellen wurden mit NCm und miR-370m (**B**) oder NCi und miR-370i (**D**) transfiziert ($n = 3$). **E:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NCm- und miR-370m-transfizierten HDMEC. Zur Detektion der intrazellulären Aktinfilamente (rot) wurden die Zellen mit einem Alexa Fluor 568 Antikörper, der mit Phalloidin gekoppelt war, angefärbt. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 25 μ m. **F:** Quantitative Auswertung der HDMEC mit Lamellipodien (in % zur Gesamtzellzahl). Die Zellen wurden mit NCm- und miR-370m transfiziert ($n = 3$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm oder NCi.

6.1.3 Bedeutung der miR-370 für die Bildung endothelialer Tubes und Aussprossungen aus HDMEC Sphäroiden

Um zu untersuchen, wie sich die miR-370 auf die Bildung endothelialer Tubes von HDMEC auswirkt, wurde ein Tube Formation-Assay durchgeführt. Dabei wurden miR-370m- oder miR-370i-transfizierte HDMEC auf Matrigel ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auswertung der neu gebildeten Tubes mithilfe der Image J Software.

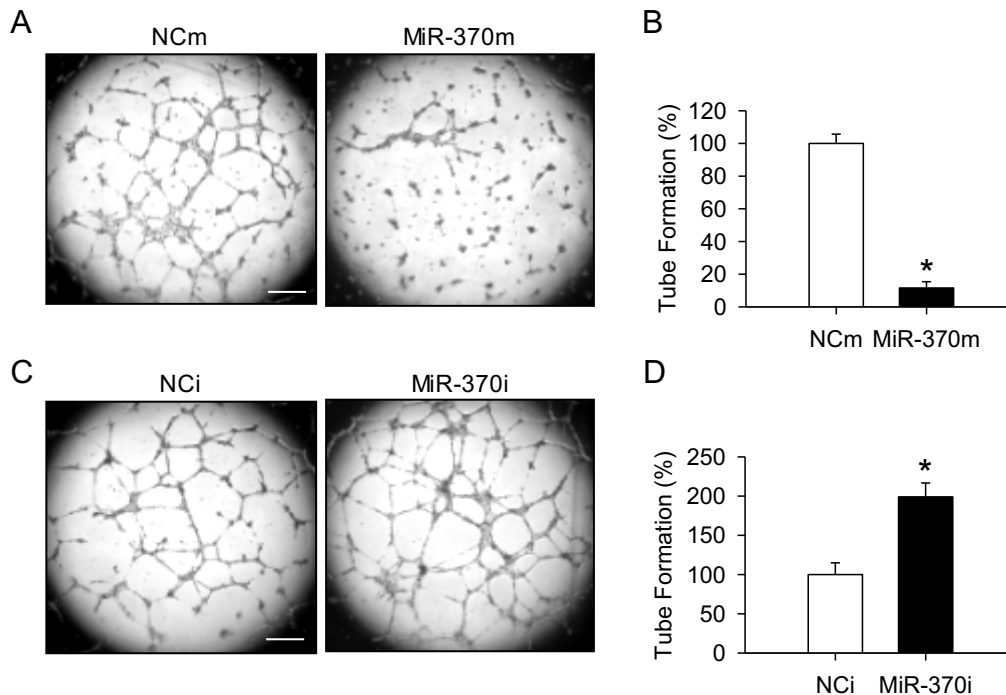


Abbildung 8: MiR-370 reduziert die Ausbildung endothelialer Tubes von HDMEC. A, C: Phasekontrastmikroskopische Aufnahmen von HDMEC im Tube Formation-Assay, die mit NCm und miR-370m (A) oder NCi und miR-370i (C) transfiziert wurden. Maßstab: 470 μ m. B, D: Quantitative Auswertung der neugebildeten endothelialen Tubes (Tube Formation in % zu NCm oder NCi) von NCm- und miR-370m- (B) oder NCi- und miR-370i- (D) transfizierten Zellen (n = 5). Mittelwerte \pm SEM. *P < 0,05 vs. NCm oder NCi.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der miR-370 die Tube Formation im Vergleich zu NCm-transfizierten Kontrollzellen um 90 % reduziert (Abbildung 8A und B). Im Gegensatz dazu führte eine Transfektion mit miR-370i zu einer vermehrten Ausbildung endothelialer Tubes (Abbildung 8C und D).

Des Weiteren wurde der Einfluss der miR-370 auf das Aussprossungsverhalten von Endothelzell-Sphäroiden untersucht. Dazu wurden aus miR-370m- oder miR-370i-transfizierten HDMEC Sphäroide generiert und in eine Kollagen-Matrix eingebettet. Nach 24 h Inkubationszeit konnte die Länge aller Sprossen der Sphäroide ausgemessen und als kumulative Sprosslänge graphisch dargestellt werden. Sphäroide aus miR-370m-transfizierten Zellen wiesen im Vergleich zur Kontrolle ein stark reduziertes Aussprossungsverhalten auf (Abbildung 9A und B). Dagegen konnte eine Erhöhung der kumulativen Sprosslänge um ca.

70 % beobachtet werden, wenn die Sphäroide aus miR-370i-transfizierten Zellen generiert wurden (Abbildung 9C und D).

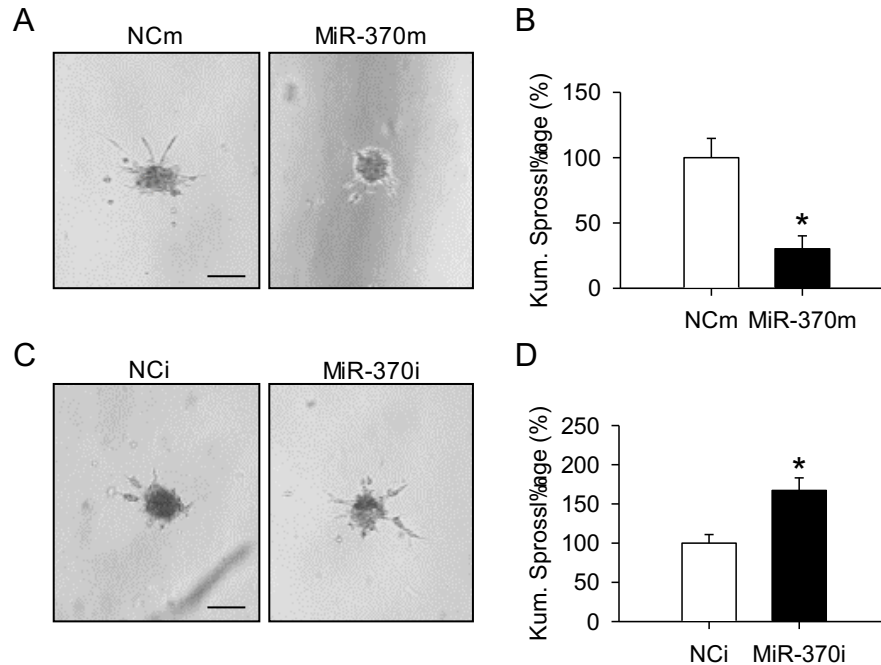


Abbildung 9: MiR-370 verringert das Aussprossen von Endothelzell-Sphäroiden. A, C: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von HDMEC Sphäroiden, die aus NCm- und miR-370m- (A) oder NCi- und miR-370i- (C) transfizierten Zellen generiert wurden. Maßstab: 220 μ m. B, D: Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu NCm oder NCi) von HDMEC Sphäroiden, die mit NCm und miR-370m (B) oder NCi und miR-370i (D) transfiziert wurden (n = 10). Mittelwerte \pm SEM. *P < 0,05 vs. NCm oder NCi.

6.1.4 Funktion der miR-370 im Aorten-Ring-Assay und Matrigel-Plug-Assay

Zur Validierung der *in vitro* Ergebnisse wurde der anti-angiogene Effekt der miR-370 in einem *ex vivo* Aorten-Ring-Assay und in einem *in vivo* Matrigel-Plug-Assay analysiert. Für den Aorten-Ring-Assay wurden murine Aorten in Ringe zerteilt, über Nacht mit miR-370m, miR-370i oder den entsprechenden Kontrollen transfiziert und für sechs Tage in Matrigel eingebettet. Im Anschluss wurde die Fläche der Aussprossungen aus den Aorten-Ringen gemessen. Die Transfektionseffizienz der miR-370 in den Aorten-Ringen konnte mithilfe einer RNA-Isolation mit anschließender qRT-PCR ermittelt werden. Die Analysen zeigten, dass in miR-370m-transfizierten Aorten-Ringen das Auswachsen von Gefäßsprossen in Abhängigkeit von der miR-370-Konzentration verringert ist (Abbildung 10A und E). Dagegen führte die Transfektion mit miR-370i zu einer signifikant größeren Fläche der Gefäßsprossen (Abbildung 10C und F). Die Aorten-Ringe, die mit 100 nM miR-370m transfiziert wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche erhöhte miR-370 Expression auf (Abbildung 10B). Eine Transfektion mit miR-370i führte hingegen zu einer signifikant verminderten miR-370 Expression in den Aorten-Ringen (Abbildung 10D).

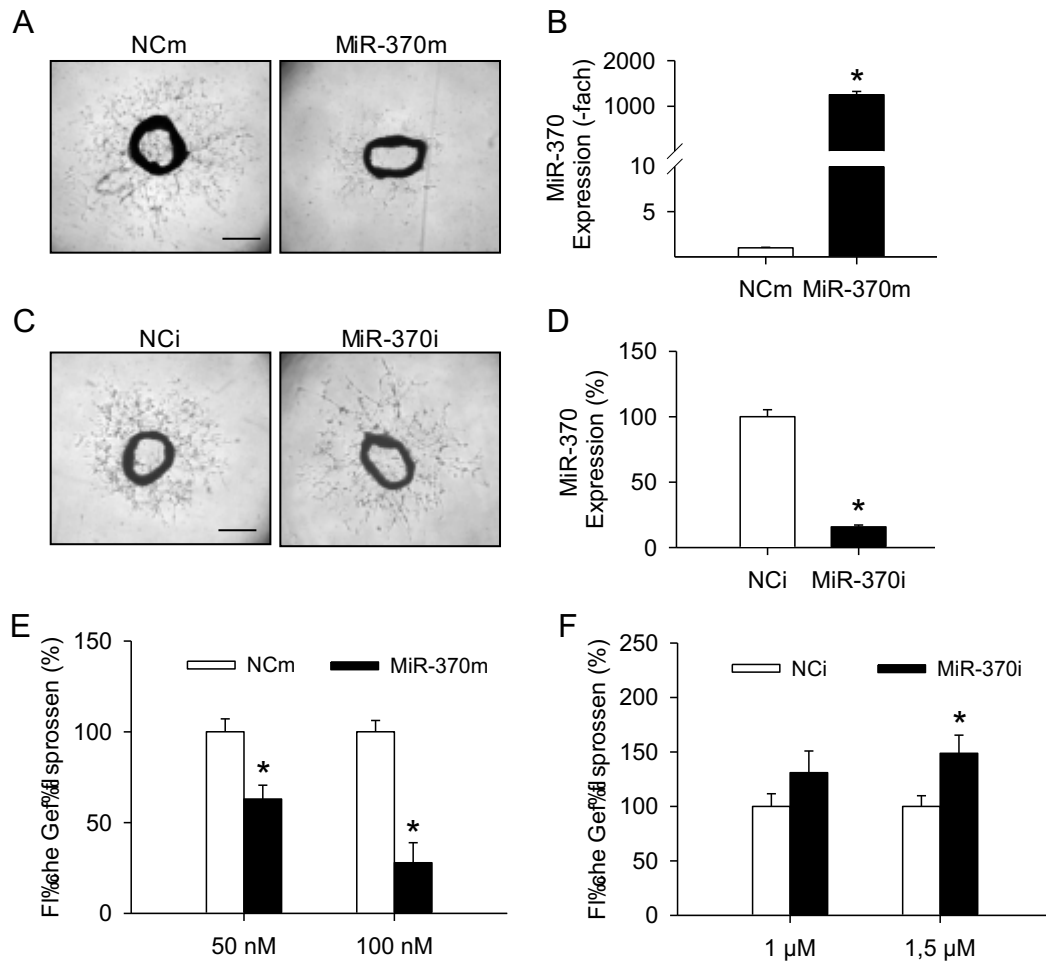


Abbildung 10: MiR-370 hemmt das Aussprossen von Aorten-Ringen der Maus. A, C: Phasekontrastmikroskopische Aufnahmen von Aorten-Ringen der Maus, die für 18 h mit 100 nM NCm und miR-370m (A) oder 1,5 µM NCi und miR-370i (C) transfiziert wurden. Die Kultivierung erfolgte anschließend für 6 Tage in Matrigel. Maßstab: 450 µm. B, D: Expression der miR-370 (als -fach von NCm oder in % von NCi) in Aorten-Ringen der Maus, die mit 100 nM NCm und miR-370m (B) oder 1,5 µM NCi und miR-370i (D) transfiziert wurden. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR (n = 3). E, F: Quantitative Analyse der Fläche der Gefäßsprossen (in % zu NCm oder NCi) der Aorten-Ringe, die mit verschiedenen Konzentrationen NCm/miR-370m (50 nM und 100 nM) (E) oder NCi/miR-370i (1 µM und 1,5 µM) (F) transfiziert wurden (n = 8). Mittelwerte ± SEM. *P < 0,05 vs. NCm oder NCi.

Des Weiteren wurden die Effekte der miR-370 auf die Angiogenese mittels eines *in vivo* Matrigel-Plug-Assays untersucht (Abbildung 11). Dafür wurden transfizierte HDMEC in Matrigel resuspendiert und in die Flanken von männlichen CD-1 nu/nu Mäusen injiziert. Nach sieben Tagen wurden die Plugs entfernt und die CD31-positiven humanen Gefäße immunhistochemisch analysiert.

Hierbei zeigte sich, dass die Matrigel-Plugs, in denen sich miR-370m-transfizierte Zellen befanden, eine deutlich verringerte Dichte humaner CD31-positiver Gefäße im Vergleich zur Kontrolle aufwies (Abbildung 11A und B). Dagegen konnte in Plugs, die miR-370i-transfizierte Zellen enthielten, eine signifikant erhöhte Gefäßdichte detektiert werden (Abbildung 11C und D).

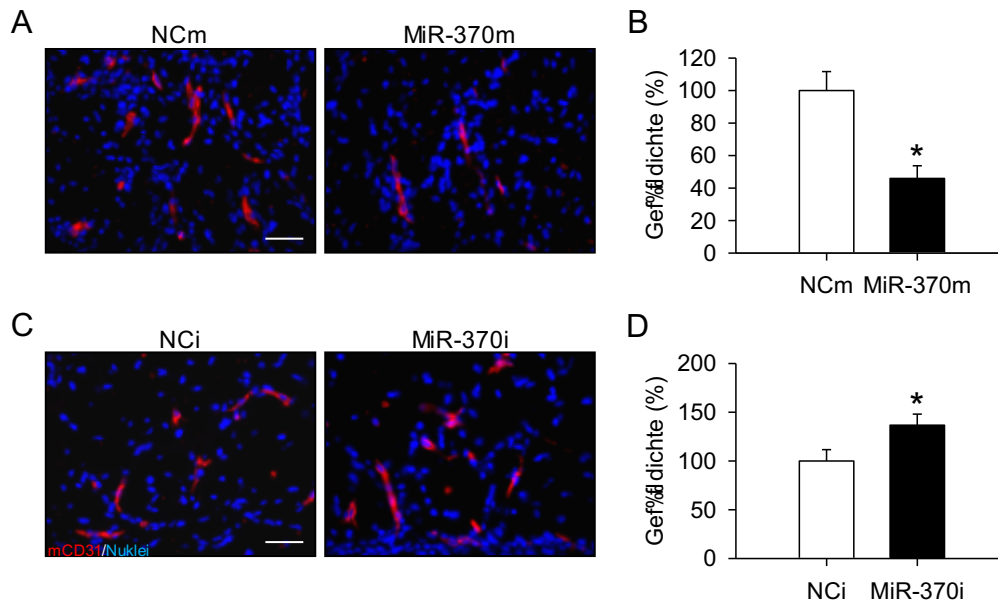


Abbildung 11: MiR-370 verringert die Gefäßdichte in Matrigel-Plugs. **A, C:** Immunhistochemische Detektion humaner CD31-positiver Gefäße (rot) in Matrigel-Plugs, die NCm- und miR-370m- (**A**) oder NCi- und miR-370i- (**C**) transfizierte Zellen enthielten. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 45 μ m. **B, D:** Gefäßdichte (in % zu NCm oder NCi) in Matrigel-Plugs, die NCm- und miR-370m- (**B**) oder NCi- und miR-370i- (**D**) transfizierte Zellen enthielten (n = 6-7). Mittelwerte \pm SEM. *P < 0,05 vs. NCm oder NCi.

6.1.5 Effekte der miR-370 auf den AKT/mTOR Signalweg

Die vorherigen *in vitro* und *in vivo* Experimente zeigten, dass die miR-370 eine inhibitorische Wirkung auf die Angiogenese hat. Daher wurde im nächsten Schritt der zugrundeliegende molekulare Mechanismus genauer untersucht.

Der Prozess der Angiogenese ist durch ein komplexes Netzwerk von Signalwegen reguliert. Hierzu zählen insbesondere der PI3K/AKT/mTOR- und Raf/MEK/ERK-Signalweg [Hoeben *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2010]. Deshalb wurde die Funktion der miR-370 auf diese zentralen Signalwege analysiert. Dazu wurden HDMEC mit NCm oder miR-370m transfiziert und die Proteinextrakte mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Phosphorylierung von AKT und mTOR in miR-370m-transfizierten HDMEC deutlich reduziert ist. Im Gegensatz dazu führte die Transfektion mit miR-370m zu keiner veränderten Expression von phosphorylierter focal adhesion kinase (FAK), während die Phosphorylierung von ERK und p38 gefördert wurde (*Abbildung 12A und B*).

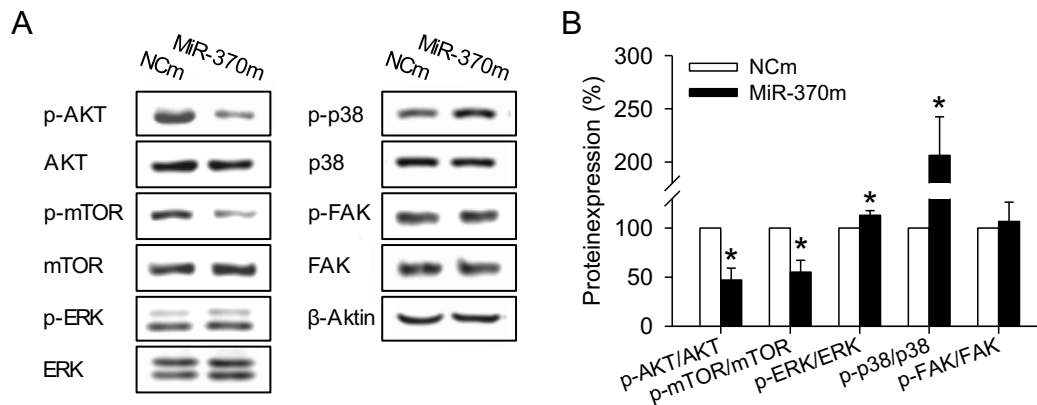


Abbildung 12: MiR-370 reduziert die Expression von AKT/mTOR und steigert die Expression von phosphoryliertem ERK und p38. **A:** Western Blot-Analyse der Expression von p-AKT/AKT, p-mTOR/mTOR, p-ERK/ERK, p-p38/p38, p-FAK/FAK und β -Aktin in NCm- und miR-370m-transfizierten HDMEC. **B:** Quantitative Analyse der Expression von p-AKT/AKT, p-mTOR/mTOR, p-ERK/ERK, p-p38/p38, p-FAK/FAK normiert auf β -Aktin (in % zu NCm) ($n = 3$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm.

Um herauszufinden, ob der inhibierende Effekt der miR-370 auf die Angiogenese durch eine Hemmung des AKT/mTOR Signalweges vermittelt wird, wurde dieser mit einem selektiven Inhibitor (MK-2206) von AKT1/2/3 geblockt. Zunächst wurde die Wirkung von MK-2206 auf die Viabilität der Endothelzellen mithilfe eines WST-1-Assays untersucht. Dabei führten Konzentrationen im Bereich von 5-40 μ M MK-2206 zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 13A). Dementsprechend wurden miR-370i-transfizierte HDMEC in einem Sphäroid-Sprouting-Assay mit den nicht zytotoxischen Konzentrationen von 2,5 μ M und 10 μ M MK-2206 behandelt. Die Transfektion mit miR-370i erhöhte die Sprosslänge der Sphäroide im Vergleich zur Kontrolle. Eine Behandlung mit dem AKT-Inhibitor führte zu einer Reduktion der erhöhten Sprosslänge (Abbildung 13B).

Um die Möglichkeit ausschließen zu können, dass die miR-370 die Angiogenese durch zusätzliche Aktivierung von ERK oder p38 inhibiert, wurde der spezifische Inhibitor U0126 gegen MEK-ERK und der p38-Inhibitor SB203580 eingesetzt. Auch hier wurden zunächst WST-1-Assays zur Dosisfindung durchgeführt (Abbildung 13C und E). Aufgrund der Ergebnisse wurden für U0126 die nicht zytotoxischen Konzentrationen 0,1 μ M und 1 μ M und für SB203580 die nicht zytotoxischen Konzentrationen 10 μ M und 50 μ M für die nachfolgenden Analysen ausgewählt (Abbildung 13C und E). Im Sphäroid-Sprouting-Assay zeigte sich, dass weder U0126 noch SB203580 den hemmenden Effekt der miR-370m auf die Sprosslänge von HDMEC Sphäroiden aufheben kann (Abbildung 13D und F). Daraus kann geschlossen werden, dass die miR-370 die angiogene Aktivität von Endothelzellen durch Herunterregulierung des AKT/mTOR Signalweges inhibiert.

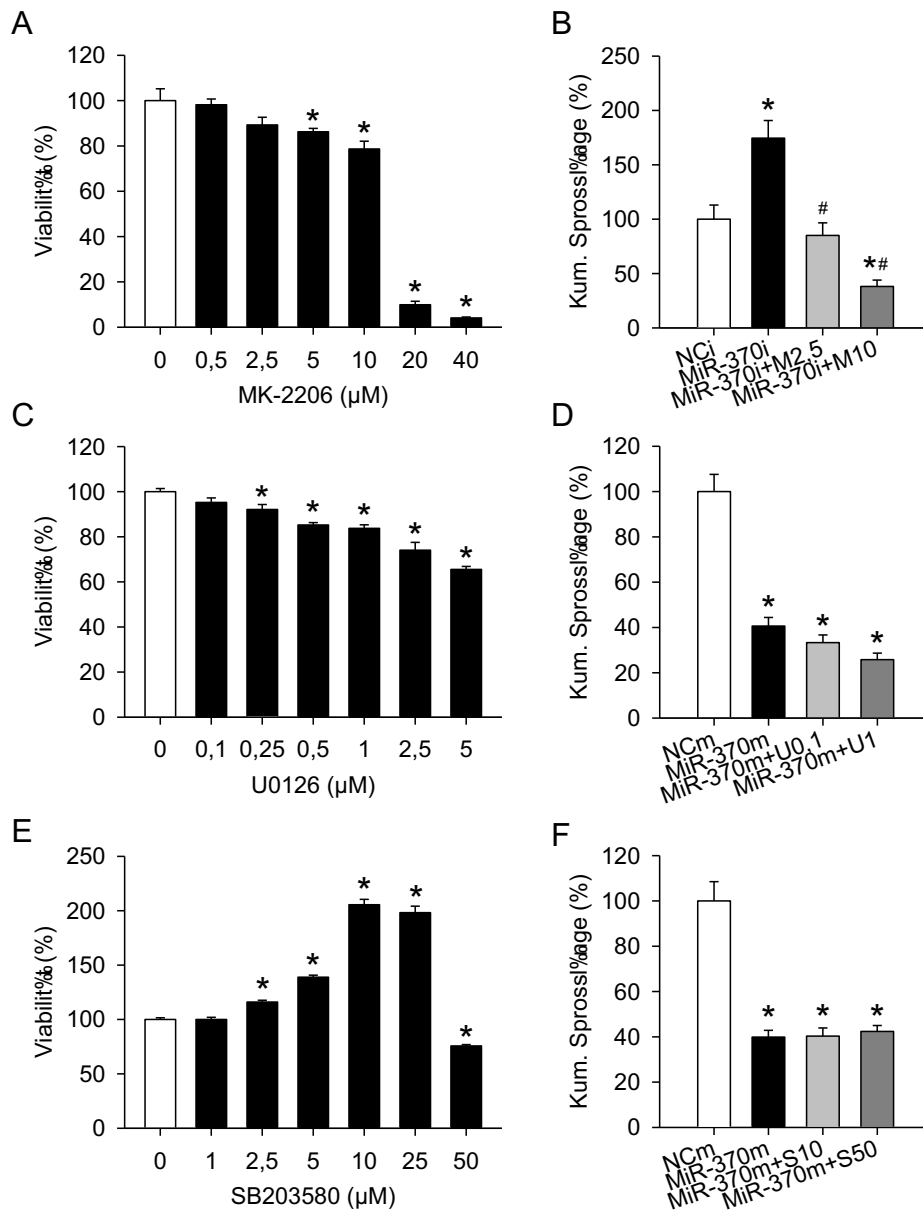


Abbildung 13: MiR-370 hemmt die angiogene Aktivität von Endothelzellen durch Inhibition des AKT-Signalweges. A, C, E: Viabilität (in % zu 0 µM) von HDMEC, die für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von MK-2206 (0-40 µM) (A), U0126 (0-5 µM) (C) und SB203580 (0-50 µM) (E) behandelt wurden. Die Messung erfolgte mittels WST-1-Assay (n = 4). **B:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu NCi) von Endothelzell-Sphäroiden, die sich aus NCi- oder miR-370i-transfizierten HDMEC zusammensetzten und mit 2,5 µM (M2,5) und 10 µM (M10) MK-2206 behandelt wurden (n = 10). **D:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu NCm) von Endothelzell-Sphäroiden, die sich aus NCm- oder miR-370m-transfizierten HDMEC zusammensetzten und mit 0,1 µM (U0,1) und 1 µM (U1) U0126 behandelt wurden (n = 10). **F:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu NCm) von Endothelzell-Sphäroiden, die sich aus NCm- oder miR-370m-transfizierten HDMEC zusammensetzten und mit 10 µM (S10) und 50 µM (S50) SB203580 behandelt wurden (n = 10). Mittelwerte ± SEM. *P < 0,05 vs. NCm, NCi oder 0 µM. #P < 0,05 vs. miR-370i.

6.1.6 Identifizierung von SMO als direktes Target der miR-370

Neben den Effekten der miR-370 auf relevante Signalwege der Angiogenese sollte ein direktes Target der miR-370 identifiziert werden. Dazu wurde ein Screening mithilfe der beiden Datenbanken „TargetScan“ und „miRDB“ durchgeführt. Hierbei wurden die Gene ermittelt, die

Bindestellen für die miR-370 aufweisen und gleichzeitig eine Funktion bei der Angiogenese besitzen. Dabei konnten fünf potenzielle Targets identifiziert werden: *serin/threonin kinase 35* (STK35), *SMO*, *histon deacetylase 4* (HDAC4), *SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1* (SMURF1) und *IGF2 mRNA binding protein 1* (IGF2BP1) (Abbildung 14A). Die mRNA Expression dieser Gene wurden in NCm- und miR-370m-transfizierten HDMEC mittels qRT-PCR analysiert.

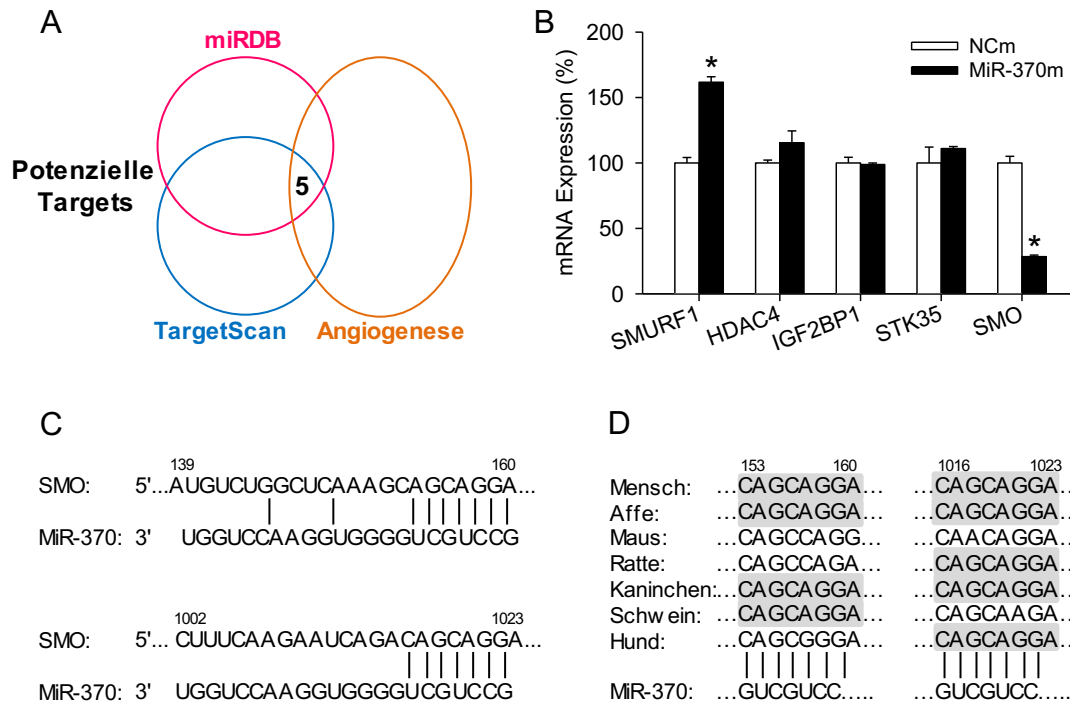


Abbildung 14: Die miR-370 verringert die mRNA Expression von SMO in HDMEC. **A:** Mengendiagramm zur Veranschaulichung der fünf potenziellen humanen Targets der miR-370, die in die Angiogenese involviert sind. Die Analyse erfolgte mithilfe der beiden bioinformatischen Webservern miRDB und TargetScan. **B:** Expression (in % zu NCm) der potenziellen Targets in NCm- und miR-370m-transfizierten HDMEC. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). **C:** Potenzielle Bindestellen der miR-370 innerhalb der 3'-UTR der humanen SMO mRNA Sequenz. **D:** Potenzielle Bindestelle der miR-370 innerhalb der 3'-UTR der SMO mRNA und deren hohe Konservierung in verschiedenen Spezies. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm.

Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass lediglich die Expression der mRNA von SMO um 78 % in miR-370m-transfizierten HDMEC im Vergleich zur Kontrolle reduziert ist (Abbildung 14B und Abbildung 15A).

In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass SMO in fibrotischen Leberzellen und in hepatischen Sternzellen der Ratte ein direktes Target der miR-370 ist [Lu *et al.*, 2015]. Im Vergleich zwischen den beiden Spezies Mensch und Ratte besitzt die miR-370 zwei potenzielle Bindestellen in der 3'-UTR der humanen SMO mRNA Sequenz (Abbildung 14C und D). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA Expression von SMO in HDMEC untersucht. Die Transfektion mit miR-370i führte zu einer signifikanten

Erhöhung der Expression von SMO um 133 % (Abbildung 15B). Zusätzlich zeigten sich in Western Blot-Analysen deutliche Effekte der miR-370 auf die Proteinexpression von SMO. Durch eine Überexpression der miR-370 in HDMEC ließ sich eine Reduktion der SMO Expression feststellen. Im Gegensatz dazu führte eine Transfektion mit miR-370i zu einer deutlich erhöhten Proteinexpression (Abbildung 15C-E). Mithilfe eines Luciferase-Assays wurde analysiert, ob SMO ein direktes Target der miR-370 in humanen Endothelzellen ist. Dazu wurden HEK293T Zellen mit miR-370m und einem Luciferase-Reporterplasmid ohne die 3'-UTR der humanen SMO mRNA Sequenz (Mutante) oder mit der 3'-UTR der humanen SMO mRNA Sequenz (Wildtyp) co-transfiziert. Durch Transfektion mit miR-370m konnte die Luciferaseaktivität im Wildtyp um 33 % reduziert werden. Im Gegensatz dazu ließ sich kein Unterschied der Luciferaseaktivität in der Mutante feststellen (Abbildung 15F). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass SMO auch in humanen Zellen ein direktes Target der miR-370 ist.

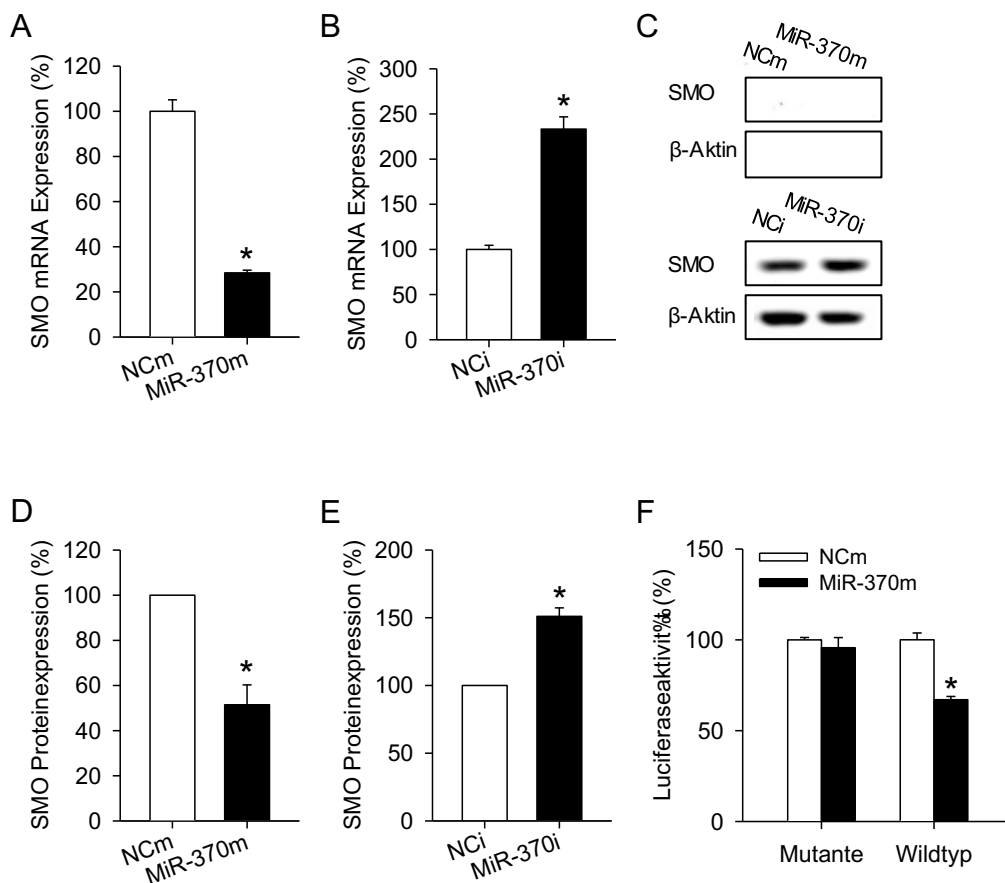


Abbildung 15: SMO ist ein direktes Target der miR-370. **A, B:** Expression von SMO (in % zu NCm oder NCI) in NCm- und miR-370m- (**A**) oder NCI- und miR-370i- (**B**) transfizierten HDMEC. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). **C:** Western Blot-Analyse der Expression von SMO und β -Aktin in NCm- und miR-370m- oder NCI- und miR-370i-transfizierten HDMEC. **D, E:** Quantitative Analyse der SMO Expression normiert auf β -Aktin (in % zu NCm oder NCI) in NCm- und miR-370m- (**D**) oder NCI- und miR-370i- (**E**) transfizierten HDMEC ($n = 3$). **F:** Luciferaseaktivität (in % zu NCm) in HEK293T Zellen. Diese wurden mit NCm oder miR-370m und einem Plasmid, das eine wildtypische oder mutierte Sequenz der 3'-UTR von SMO enthielt, co-transfiziert. ($n = 4$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm oder NCI.

Es wurde bereits gezeigt, dass der PI3K/AKT/mTOR Signalweg in murinen Endothelzellen des Gehirns durch Sonic hedgehog (Shh) aktiviert werden kann [Kanda *et al.*, 2003]. Shh gehört zur Familie der sekretierten hedgehog Proteine, welche die Morphologie von verschiedenen Geweben in der Embryonalentwicklung regulieren. Nach der Bindung von Shh an seinen Rezeptor patched 1 (PTCH1) kommt es zur Aktivierung des membranständigen Proteins SMO. Dadurch wird über eine Signalkaskade im Zellkern die Genexpression reguliert [Wilson und Chuang, 2010]. Außerdem fördert Shh in Abhängigkeit von SMO die Bildung neuer endothelialer Tubes, ohne Auswirkungen auf die Zellproliferation zu haben [Chinchilla *et al.*, 2010]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von miR-370m und miR-370i auf die mRNA- und Proteinexpression von Shh untersucht. Dabei konnten keine Effekte auf die Expression von Shh durch Hoch- oder Herunterregulation der miR-370 in HDMEC beobachtet werden (Abbildung 16A-E).

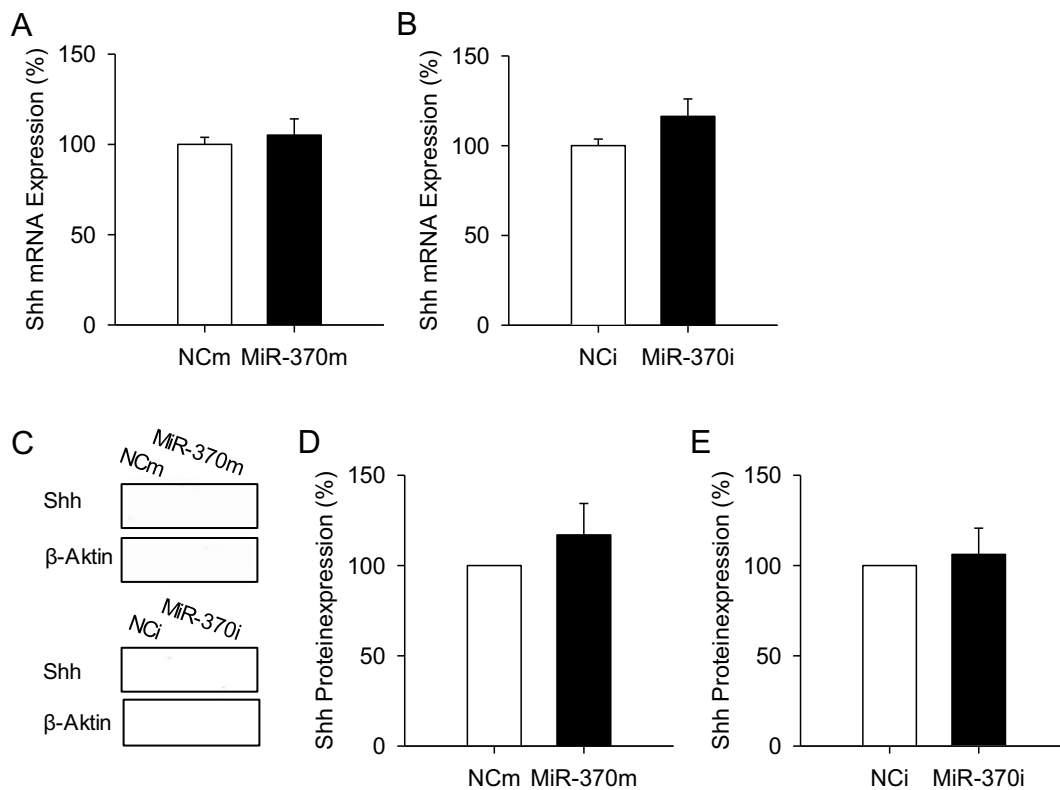


Abbildung 16: Die miR-370 zeigt keinen Einfluss auf die Expression von Shh in HDMEC. **A, B:** Expression von Shh (in % zu NCm oder NCi) in NCm- und miR-370m- (A) oder NCi- und miR-370i- (B) transfizierten HDMEC. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR (n = 3). **C:** Western Blot-Analyse der Expression von Shh und β -Aktin in mit NCm- und miR-370m- oder NCi- und miR-370i- transfizierten HDMEC. **D, E:** Quantitative Analyse der Expression von Shh in NCm- und miR-370m- (D) oder NCi- und miR-370i- (E) transfizierten HDMEC normiert auf β -Aktin (in % zu NCm oder NCi) (n = 3). Mittelwerte \pm SEM.

6.1.7 Einfluss von SMO auf die Funktion der miR-370 bei der Angiogenese

In Abschnitt 6.1.6 wurde SMO als direktes Target der miR-370 in HDMEC identifiziert. Um zu untersuchen, ob die miR-370-vermittelte Hemmung von SMO zur anti-angiogenen Funktion

beiträgt, wurde SMO zunächst mithilfe einer siRNA inhibiert. Anschließend wurden Analysen zur Viabilität, Migration und Tube Formation von HDMEC durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Transfektionseffizienz der siRNA mittels qRT-PCR überprüft. Im Vergleich zu si-NC-transfizierten Kontrollzellen ließ sich eine Reduktion der mRNA Expression um 85 % feststellen. Eine Inhibition von SMO reduzierte die Viabilität und führte zu einer geringeren Migrationsrate in HDMEC (Abbildung 17A-C). Es zeigte sich eine verbesserte Bildung endothelialer Tubes durch Transfektion mit si-SMO (Abbildung 17D). Außerdem wurden mittels Western Blot-Analysen die Effekte von si-NC- und si-SMO-transfizierten HDMEC auf den AKT/mTOR Signalweg untersucht. Die Analysen zeigten eine deutliche Hemmung von phosphoryliertem AKT und mTOR (Abbildung 17E und F).

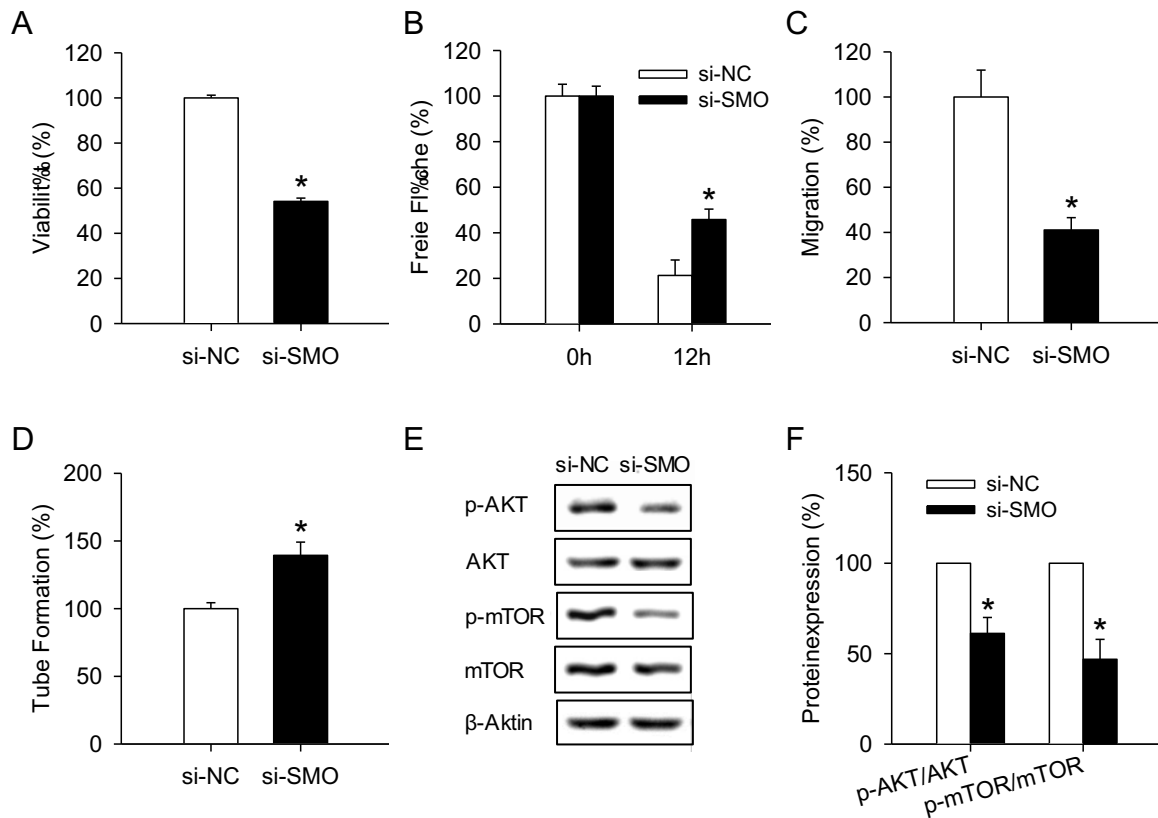


Abbildung 17: Die anti-angiogene Funktion der miR-370 wird über die Inhibition von SMO vermittelt. **A:** Viabilität (in % zu si-NC) von si-NC- oder si-SMO-transfizierten HDMEC. Die Zellen wurden nach der Transfektion ausgesät und nach 72 h ein WST-1-Assay durchgeführt (n = 4). **B:** Freie Fläche (in % zu 0 h) von si-NC- oder si-SMO-transfizierten HDMEC in einem Scratch-Assay (n = 6). **C:** Migration von si-NC- oder si-SMO-transfizierten HDMEC (in % zu si-NC) in einem Transwell-Assay (n = 3). **D:** Quantitative Auswertung der neugebildeten endothelialen Tubes (Tube Formation in % zu si-NC) von si-NC- oder si-SMO-transfizierten Zellen (n = 5). **E:** Western Blot-Analyse der Expression von p-AKT/AKT, p-mTOR/mTOR und β-Aktin in si-NC- oder si-SMO-transfizierten HDMEC. **F:** Expression von p-AKT/AKT und p-mTOR/mTOR normiert auf β-Aktin (in % zu si-NC) (n = 3). Mittelwerte ± SEM. *P < 0,05 vs. si-NC.

In weiteren Analysen wurde die angiogene Aktivität von miR-370i-transfizierten HDMEC untersucht. Diese wurden gleichzeitig mit dem spezifischen SMO Inhibitor Cyclopamin behandelt. Zur Dosisfindung wurde zunächst in einem WST-1-Assay die Wirkung

verschiedener Cyclopamin-Konzentrationen auf die Viabilität der HDMEC getestet. Dabei führte lediglich eine Konzentration von 20 μM Cyclopamin zu einer Reduktion der Zellviabilität um 49 % (Abbildung 18A).

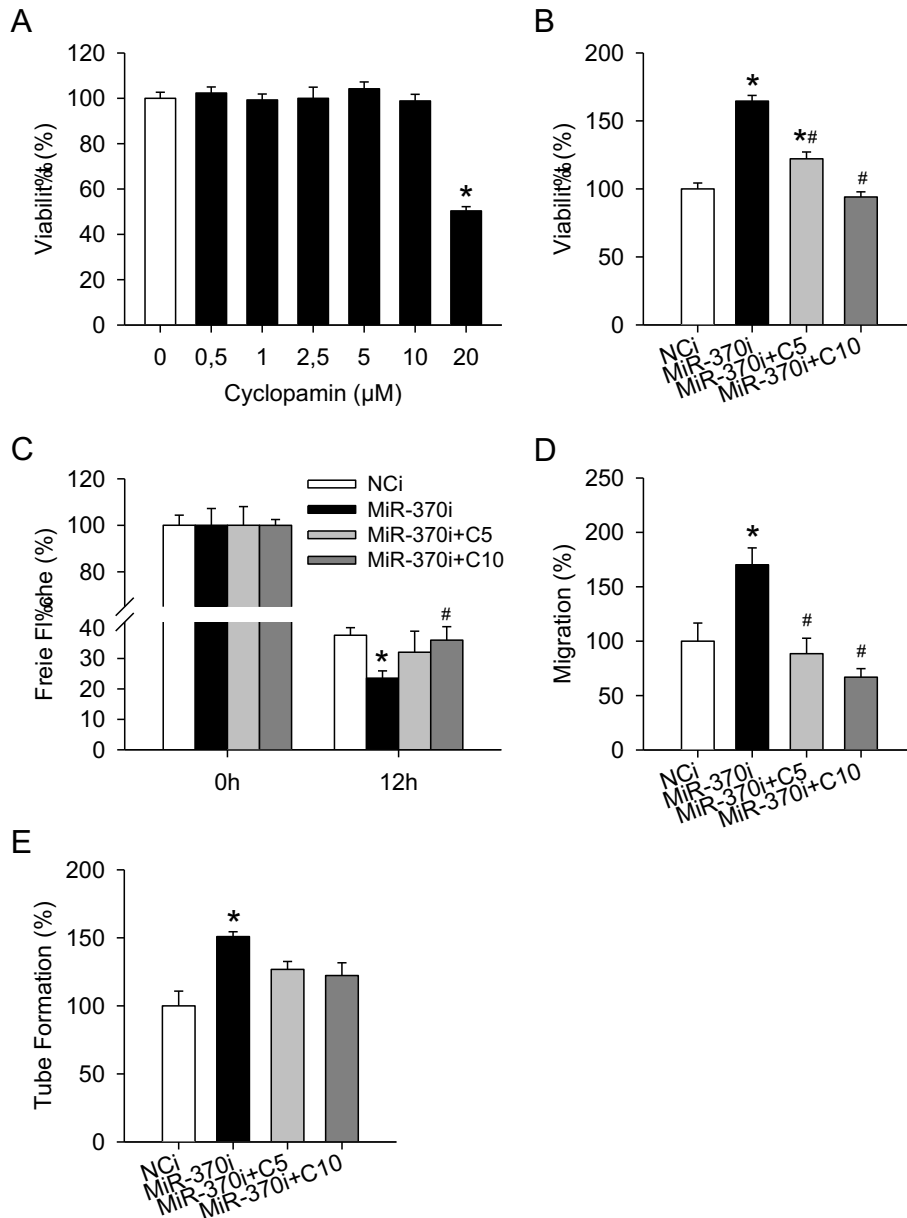


Abbildung 18: Die gesteigerte Viabilität und Migration von miR-370i transfizierten HDMEC wird durch eine Inhibition von SMO aufgehoben. **A:** Viabilität (in % zu 0 μM) von HDMEC, die mit verschiedenen Konzentrationen von Cyclopamin (0-20 μM) für 72 h behandelt wurden. Die Messung erfolgte mittels WST-1-Assay ($n = 4$). **B:** Viabilität (in % zu NCI) von NCI- oder miR-370i-transfizierten HDMEC, die mit 5 μM (C5) und 10 μM (C10) Cyclopamin behandelt wurden. Die Messung erfolgte mittels WST-1-Assay ($n = 4$). **C:** Freie Fläche (in % zu NCI) von NCI- oder miR-370i-transfizierten HDMEC in einem Scratch-Assay, die mit 5 μM (C5) und 10 μM (C10) Cyclopamin behandelt wurden ($n = 6$). **D:** Migration (in % zu NCI) von NCI- oder miR-370i-transfizierten HDMEC in einem Transwell-Assay, die mit 5 μM (C5) und 10 μM (C10) Cyclopamin behandelt wurden ($n = 3$). **E:** Quantitative Auswertung der endothelialen Tubes (Tube Formation in % zu NCI) von NCI- oder miR-370i-transfizierten HDMEC, die mit 5 μM (C5) und 10 μM (C10) Cyclopamin behandelt wurden ($n = 5$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCI oder 0 μM . # $P < 0,05$ vs. miR-370i.

Infolgedessen wurden für die nachfolgenden Experimente geringere Konzentrationen von 5 μ M und 10 μ M Cyclopamin verwendet. In den funktionellen Analysen verbesserte sich die Viabilität von HDMEC durch Transfektion mit miR-370i. Dies konnte durch eine Behandlung mit Cyclopamin aufgehoben werden (*Abbildung 18B*). In einem Scratch- und Transwell-Assay zeigte sich durch Transfektion mit miR-370i eine erhöhte Migration von HDMEC. Die Inhibition von SMO wirkte diesem Effekt entgegen (*Abbildung 18C und D*). In miR-370i-transfizierten HDMEC ließ sich eine gesteigerte Ausbildung endothelialer Tubes nachweisen. Jedoch konnte dies durch eine Cyclopamin-vermittelte Hemmung von SMO nicht unterbunden werden. (*Abbildung 18E*). Daraus kann geschlossen werden, dass die miR-370 die Viabilität und Migration von Endothelzellen durch eine direkte Bindung an SMO inhibiert.

6.1.8 Einfluss von BMP-2 auf die Effekte der miR-370 bei der Angiogenese

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass die Tube Formation von HDMEC nicht durch direkte Bindung der miR-370 an SMO inhibiert wird. Daher wurden zur weiteren Aufklärung des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus validierte Targets aus der Literatur analysiert. Dabei konnten sechs humane Gene ermittelt werden, die mit der Angiogenese assoziiert sind: *BMP-2*, *TGF- β receptor type 2 (TGFB2)*, *Wnt family member 10B (WNT10B)*, *endoglin (ENG)*, *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 (MAP3K8)* und *forkhead box protein O1 (FOXO1)* (*Abbildung 19A*). In qRT-PCR-Analysen ließ sich lediglich eine Reduktion der BMP-2 Expression in miR-370m-transfizierten HDMEC nachweisen (*Abbildung 19B*). In miR-370i-transfizierten Zellen hingegen wurde eine gesteigerte mRNA Expression von BMP-2 detektiert (*Abbildung 19C*).

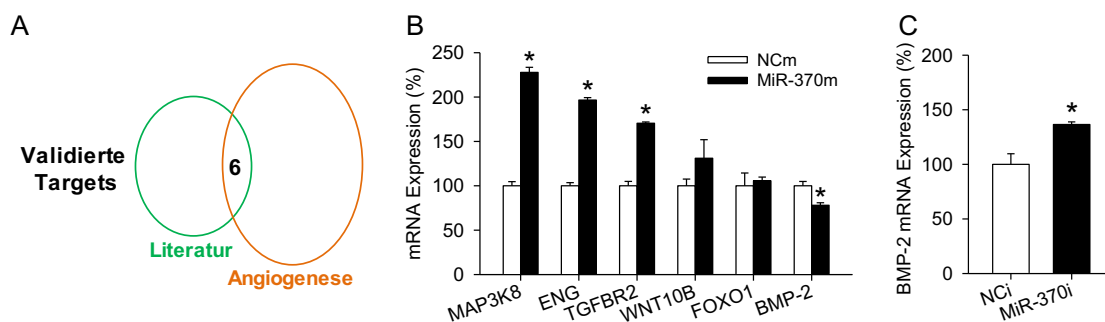


Abbildung 19: Die miR-370 reduziert die Expression von BMP-2 in HDMEC. A: Mengendiagramm zur Veranschaulichung der sechs validierten humanen Targets der miR-370, die in die Angiogenese involviert sind. **B:** Expression (in % zu NCm) der validierten Targets in NCm- oder miR-370m-transfizierten HDMEC. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR (n = 3). **C:** Expression von BMP-2 (in % zu NCi) in NCi- oder miR-370i-transfizierten HDMEC. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR (n = 3). Mittelwerte \pm SEM. *P < 0,05 vs. NCm oder NCi.

Studien belegen bereits, dass BMP-2 die Vaskularisierung *in vivo* stimuliert und die Bildung von Gefäßen in Tumoren steigert [Langenfeld und Langenfeld, 2004; Raida *et al.*, 2005].

Neben dieser pro-angiogenen Wirkung von BMP-2 konnte auch die Tube Formation in verschiedenen Endothelzellen wie HDMEC, HUVEC und human aortic endothelial cells (HAEC) durch BMP-2 gesteigert werden [Langenfeld und Langenfeld, 2004; Raida *et al.*, 2005; Finkenzeller *et al.*, 2012]. Außerdem wurde gezeigt, dass BMP-2 die Proliferation von HAEC und human pulmonary aortic endothelial cells (HPAEC), jedoch nicht von HDMEC und HUVEC erhöht [Langenfeld und Langenfeld, 2004; Raida *et al.*, 2005; de Jesus Perez *et al.*, 2009; Finkenzeller *et al.*, 2012]. Zusätzlich fördert BMP-2 die Migration von HUVEC, aber nicht von HAEC [Langenfeld und Langenfeld, 2004; Finkenzeller *et al.*, 2012]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden im Folgenden die Effekte von BMP-2 auf die angiogene Aktivität von HDMEC untersucht.

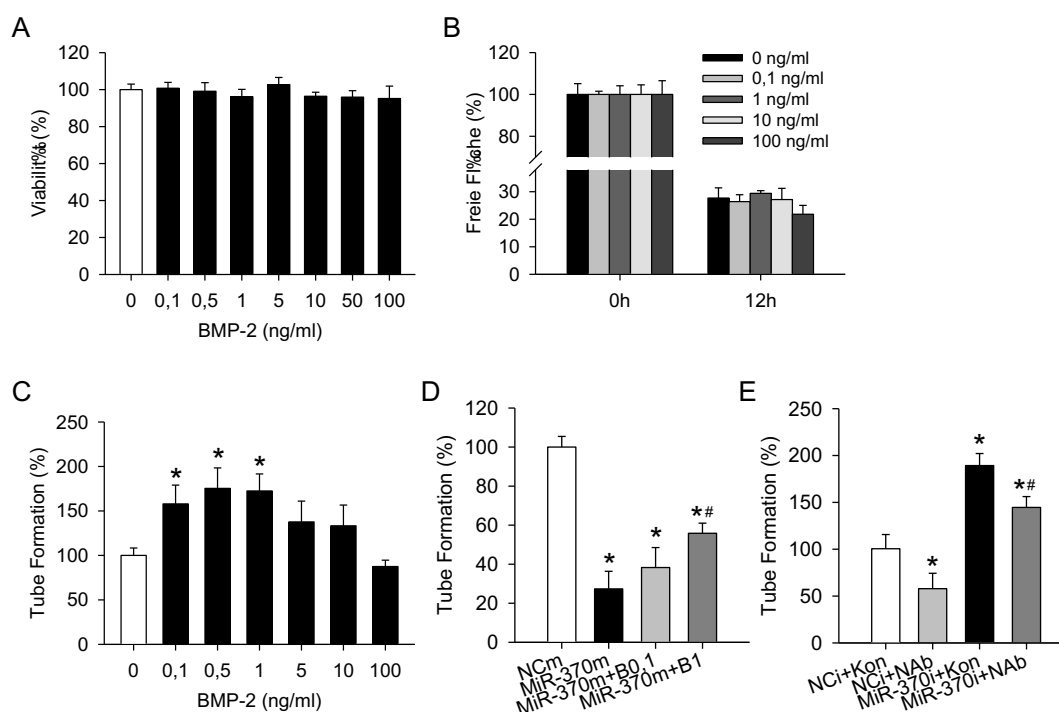


Abbildung 20: BMP-2 wirkt der hemmenden Wirkung der miR-370m auf die Tube Formation von HDMEC entgegen. **A:** Viabilität (in % zu 0 ng/ml) von HDMEC, die für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von BMP-2 (0-100 ng/ml) behandelt wurden. Die Messung erfolgte mittels WST-1-Assay ($n = 4$). **B:** Freie Fläche (in % zu 0 h) von HDMEC in einem Scratch-Assay, die mit verschiedenen Konzentrationen (0-100 ng/ml) von BMP-2 behandelt wurden ($n = 6-7$). **C:** Tube Formation (in % zu 0 ng/ml) von Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen (0-100 ng/ml) von BMP-2 behandelt wurden ($n = 4$). **D:** Tube Formation (in % zu NCm) von NCm- oder miR-370m-transfizierten HDMEC, die mit 0,1 ng/ml (B0,1) oder 1 ng/ml (B1) BMP-2 behandelt wurden ($n = 5$). **E:** Tube Formation (in % zu NCi+Kon) von NCi- oder miR-370i-transfizierten HDMEC, die mit 20 μ g/ml BMP-2 neutralisierendem Antikörper (NAb) oder IgG (Kon) inkubiert wurden ($n = 7-8$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm, NCi, 0 ng/ml oder NCi+Kon. ** $P < 0,05$ vs. miR-370m oder miR-370i+Kon.

In einem WST-1-Assay und einem Scratch-Assay zeigten Konzentrationen von BMP-2 in einem Bereich von 0,1-100 ng/ml weder einen Effekt auf die Viabilität noch auf die Migration von HDMEC (Abbildung 20A und B). Jedoch steigerten Konzentrationen von 0,1-1 ng/ml BMP-2 signifikant die Ausbildung endothelialer Tubes (Abbildung 20C). Eine Behandlung von miR-

370m-transfizierten HDMEC mit 1 ng/ml BMP-2 führte zu einer verbesserten Ausbildung endothelialer Tubes im Vergleich zu transfizierten Zellen, die nicht mit BMP-2 behandelt wurden (*Abbildung 20D*). Um festzustellen, ob die miR-370 die Tube Formation über eine direkte Bindung an BMP-2 induziert, wurde BMP-2 mit einem spezifischen neutralisierenden Antikörper (NAb) geblockt. Dies führte dazu, dass die Tube Formation von NCI- und miR-370i-transfizierten HDMEC signifikant verringert wurde (*Abbildung 20E*).

6.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der miR-370 auf die Angiogenese genauer analysiert. Dabei zeigte sich in verschiedenen *in vitro* Untersuchungen eine anti-angiogene Wirkung auf die Proliferation, Migration, Tube Formation und das Aussprossungsverhalten von HDMEC. Diese Ergebnisse konnten in einem *ex vivo* Aorten-Ring-Assay und in einem *in vivo* Matrigel-Plug-Assay validiert werden. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die miR-370 ein wirksamer Inhibitor der Angiogenese ist. Die anti-angiogenen Effekte werden über eine miR-370-vermittelte Hemmung von SMO gesteuert. Der nachgeschaltete AKT/mTOR Signalweg wird dabei inhibiert. Folglich werden sowohl die Proliferation als auch die Migration mikrovaskulärer Endothelzellen gehemmt. Zusätzlich reduziert die miR-370 die Expression von BMP-2, was wiederum die Ausbildung endothelialer Tubes blockiert (*Abbildung 21*).

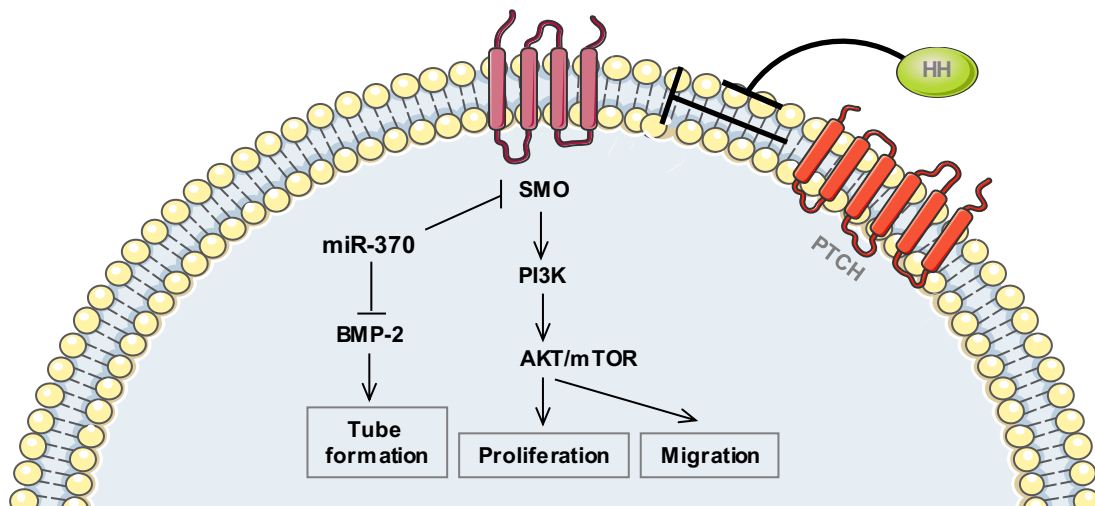


Abbildung 21: Regulatorische Funktion der miR-370 bei der Angiogenese. Die miR-370 inhibiert SMO, wodurch der nachgeschaltete PI3K/AKT/mTOR-Signalweg gehemmt wird. Dies führt letztendlich zu einer Reduktion der Proliferation und Migration von Endothelzellen. Zusätzlich inhibiert die miR-370 die Expression von BMP-2, was mit einer verminderten Tube Formation einhergeht (erstellt mithilfe von Servier Medical Art).

6.2 Regulation der miR-186 und deren Funktion auf die Angiogenese

Die miR-186 ist hochkonserviert und wird in verschiedenen Typen von Endothelzellen exprimiert [Heusschen *et al.*, 2010; Xiang *et al.*, 2020]. Interessanterweise können Veränderungen in der Expression der miR-186 in humanen Körperflüssigkeiten und in Tumorgewebe zur Diagnose und Einschätzung der Prognose von verschiedenen Krebsarten wie beispielsweise NSCLC genutzt werden [Wang *et al.*, 2019]. Jedoch ist die Funktion der endothelialen miR-186 bei der Tumorangio-genese noch nicht bekannt. Daher wurde im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit die Expression der miR-186 in Endothelzellen aus humanem NSCLC Gewebe genauer analysiert. Außerdem wurde die Regulation der miR-186 und ihre Wirkung auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen mithilfe verschiedener *in vitro* Assays untersucht. Die gewonnenen *in vitro* Ergebnisse wurden mittels *in vivo* Untersuchungen in einem Matrigel-Plug-Assay und einem Tumorflankenmodell validiert. Abschließend wurde der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der anti-angiogenen Wirkung der miR-186 untersucht.

6.2.1 Regulation der endothelialen miR-186 in humanen NSCLC Geweben

Zunächst wurde die Expression der endothelialen miR-186 in humanen Adenokarzinomen der Lunge mit der Expression in Endothelzellen des benachbarten Normalgewebes verglichen. Dazu wurden von elf Patientenproben Endothelzellen mittels LCM exzidiert und deren RNA isoliert. Bei der anschließenden qRT-PCR Analyse zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (Endothelzellen aus Normalgewebe, NEC) eine signifikant verringerte Expression der miR-186 in den Endothelzellen des Tumorgewebes (Tumor-assoziierte Endothelzellen, TEC) (*Abbildung 22A*).

Tumorzellen können direkt mit Endothelzellen über Adhäsionsrezeptoren oder über sogenannte „Gap Junctions“ interagieren. Außerdem beeinflussen sie die Endothelzellen auch indirekt durch Sekretion verschiedener Faktoren in den extrazellulären Raum, um so den pH-Wert, Sauerstoffgehalt oder die Nährstoffe in ihrem umgebenden Mikromilieu zu verändern [Lopes-Bastos *et al.*, 2016]. Um zu untersuchen, welche Faktoren die endotheliale miR-186 in NSCLC Gewebe herunterregulieren, wurden HDMEC und NCI-H460 co-kultiviert. Nach 24 h Inkubationszeit konnten die HDMEC mittels CD31-MicroBeads isoliert und mithilfe qRT-PCR genauer analysiert werden. Dabei zeigten sich keine Veränderungen der endothelialen miR-186 Expression (*Abbildung 22B*).

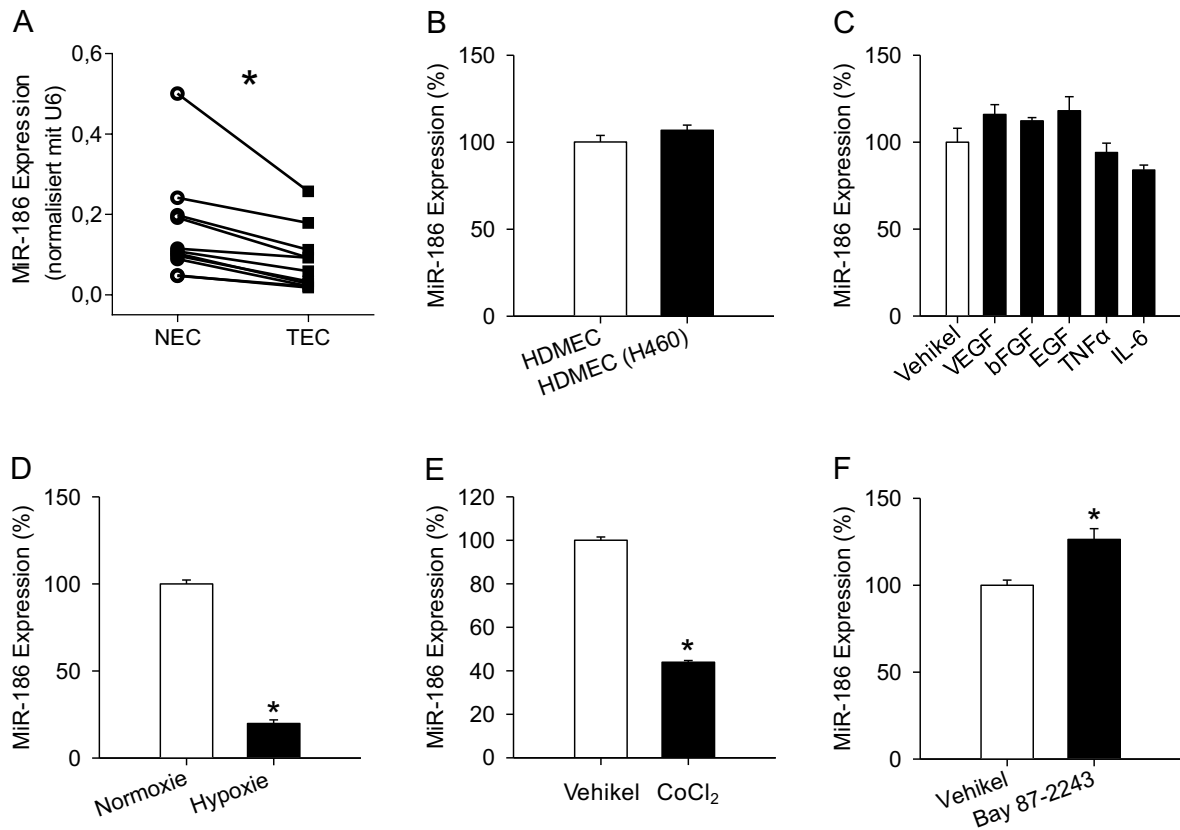


Abbildung 22: Hypoxie reduziert die Expression der miR-186 in Endothelzellen. **A:** Expression der miR-186 in Endothelzellen, die aus Normalgewebe (NEC) oder Tumorgewebe (TEC) von NSCLC Patienten mittels Lasermikrodissektion isoliert und mithilfe von qRT-PCR ($n = 11$) analysiert wurden. **B:** Expression der miR-186 (in % von HDMEC) in isolierten HDMEC, die alleine (HDMEC) oder zusammen mit NCI-H460 Zellen (HDMEC (H460)) kultiviert wurden. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). **C:** Expression der miR-186 (in % von Vehikel) in HDMEC, die für 24 h mit Vehikel, 50 ng/ml VEGF, 50 ng/ml bFGF, 100 ng/ml EGF, 10 ng/ml Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder 100 ng/ml IL-6 in ECGM MV ohne Zusätze inkubiert wurden. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). **D:** Expression der miR-186 (in % von Normoxie) in HDMEC, die für 24 h unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). **E, F:** Expression der miR-186 (in % von Vehikel) in HDMEC, die für 24 h mit Vehikel, 400 μ M CoCl₂ (**E**) oder 5 μ M hypoxia-inducible factor α (HIF1 α) Inhibitor Bay 87-2243 (**F**) behandelt wurden. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NEC, Vehikel oder Normoxie.

Daraus kann geschlossen werden, dass weder der direkte Kontakt zwischen Tumor- und Endothelzellen noch sekretierte Faktoren der Tumorzellen eine Hemmung der miR-186 in Endothelzellen verursachen. Zur Validierung dieser Ergebnisse wurden HDMEC mit den Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und epidermal growth factor (EGF) sowie mit den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF α und Interleukin (IL)-6 stimuliert. Erwartungsgemäß führte die Stimulation mit diesen pro-angiogenen Faktoren zu keiner veränderten Expression der endothelialen miR-186 (Abbildung 22C). Interessanterweise konnte jedoch die Expression der miR-186 in HDMEC, die für 24 h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert werden (Abbildung 22D). Hypoxia-inducible factor α (HIF1 α) ist einer der bedeutendsten Transkriptionsfaktoren bei Hypoxie und vermittelt die Regulation vieler unterschiedlicher Gene und nicht-kodierender RNAs [Krock *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2020]. Deshalb wurde überprüft, ob HIF1 α die Transkription der miR-186 in

Endothelzellen hemmt. Dazu wurden HDMEC für 24 h mit Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂), einem spezifischen HIF1 α Aktivator, oder mit dem HIF1 α Inhibitor Bay 87-2243 behandelt und die isolierte RNA einer qRT-PCR-Analyse unterzogen. Dabei zeigte sich, dass CoCl₂ die Expression der miR-186 in HDMEC signifikant um 54 % reduziert (*Abbildung 22E*). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit Bay 87-2243 zu einer erhöhten Expression der miR-186 um 26 % (*Abbildung 22F*). Zusätzlich wurde analysiert, ob die Transkription der miR-186 durch NF- κ B vermittelt wird, da dieser Transkriptionsfaktor ebenfalls durch Hypoxie aktiviert werden kann [D'Ignazio und Rocha, 2016]. Dazu wurde NF- κ B mithilfe des spezifischen Inhibitors Bay 11-7082 geblockt. Vorherige Studien demonstrierten bereits eine effektive Hemmung von NF- κ B in HDMEC durch Verwendung von 5 μ M Bay 11-7082 [Gu *et al.*, 2017]. Durch eine Inhibition von NF- κ B zeigten sich keine Effekte auf die Expression der miR186 in Endothelzellen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Expression der endothelialen miR-186 durch Hypoxie und Aktivierung von HIF1 α nicht aber von NF- κ B inhibiert wird.

6.2.2 Funktion der miR-186 auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen

Im Folgenden wurden die Effekte der miR-186 auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen genauer analysiert. Zur Hoch- oder Herunterregulierung intrazellulärer miR-186 wurden HDMEC entweder mit 5 nM und 10 nM miR-186 mimic (miR-186m) oder mit 50 nM und 100 nM miR-186 Inhibitor (miR-186i) transfiziert. NCM- oder NCI-transfizierte Zellen dienten dabei als Kontrolle. Die Transfektionseffizienzen von miR-186m und miR-186i wurden mithilfe von qRT-PCR-Analysen ermittelt (*Abbildung 23A und B*). Basierend auf diesen Analysen wurden für alle weiteren *in vitro* Experimente 5 nM miR-186m und 100 nM miR-186i eingesetzt.

Zunächst wurde die Wirkung der miR-186 auf die Viabilität von Endothelzellen mittels WST-1-Assay untersucht. Eine Transfektion von HDMEC mit miR-186m führte nach 48 h und 72 h zu einer signifikant verminderten Zellviabilität im Vergleich zu NCM-transfizierten Kontrollzellen (*Abbildung 23C*). Im Gegensatz dazu zeigten miR-186i-transfizierte HDMEC eine gesteigerte Viabilität (*Abbildung 23D*).

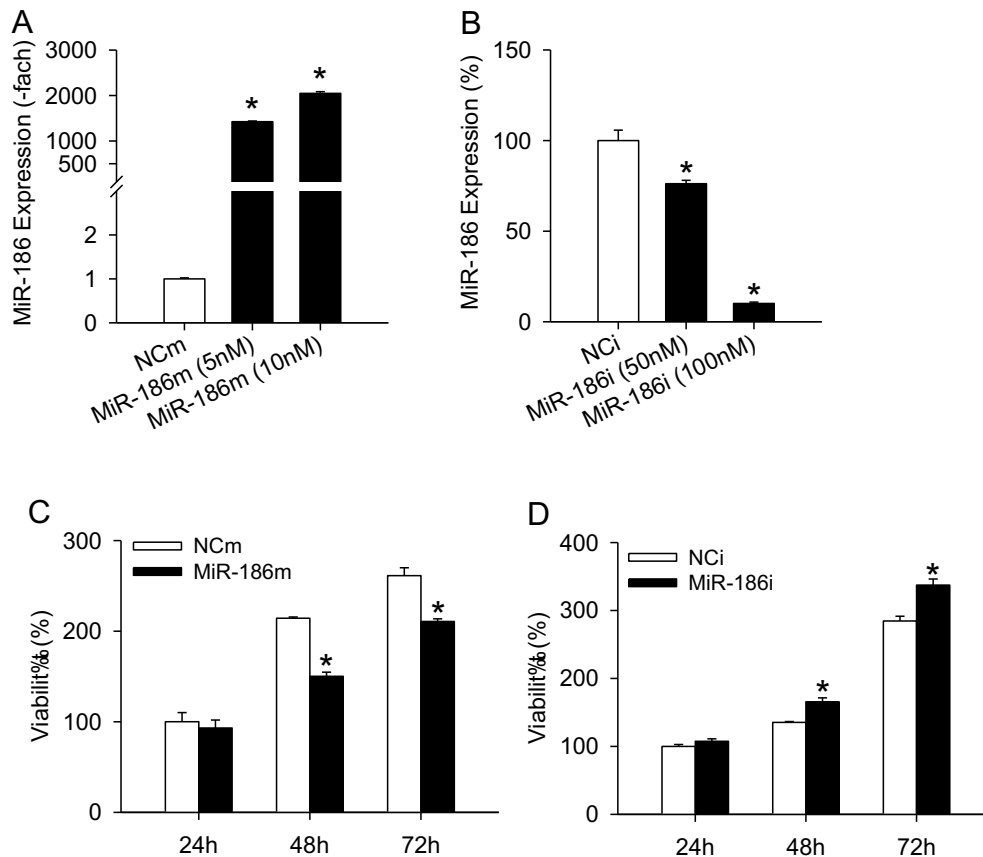


Abbildung 23: MiR-186 reduziert die Viabilität von Endothelzellen. A, B: Expression der miR-186 (als -fach von NCm oder in % von NCi) in HDMEC, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von NCm und miR-186m (A) oder NCi und miR-186i (B) transfiziert wurden. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). **C, D:** Viabilität (in % von NCm oder NCi) von NCm- und miR-186m- (C) oder NCi- und miR-186i- (D) transfizierten HDMEC, die mittels eines WST-1-Assays nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt wurde ($n = 4$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm oder NCi.

Weiterhin wurden die Effekte der miR-186 auf die Migration von Endothelzellen in einem Transwell-Assay untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine Transfektion mit miR-186m die Anzahl der migrierten HDMEC um 85 % reduzieren kann (Abbildung 24A und B). Dagegen zeigten miR-186i-transfizierte Zellen eine signifikante Steigerung ihrer Migration um 51 % (Abbildung 24C und D). Um zu klären, ob die Endothelzellen in der Lage sind, endotheliale Tubes auszubilden, wurde ein Tube Formation-Assay durchgeführt. Bei den miR-186m-transfizierten HDMEC zeigte sich dabei eine deutliche Reduktion der Tube Formation im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 24E und F). Im Gegensatz dazu konnten bei einer Transfektion mit miR-186i keine Effekte auf die Tube Formation nachgewiesen werden (Abbildung 24G und H).

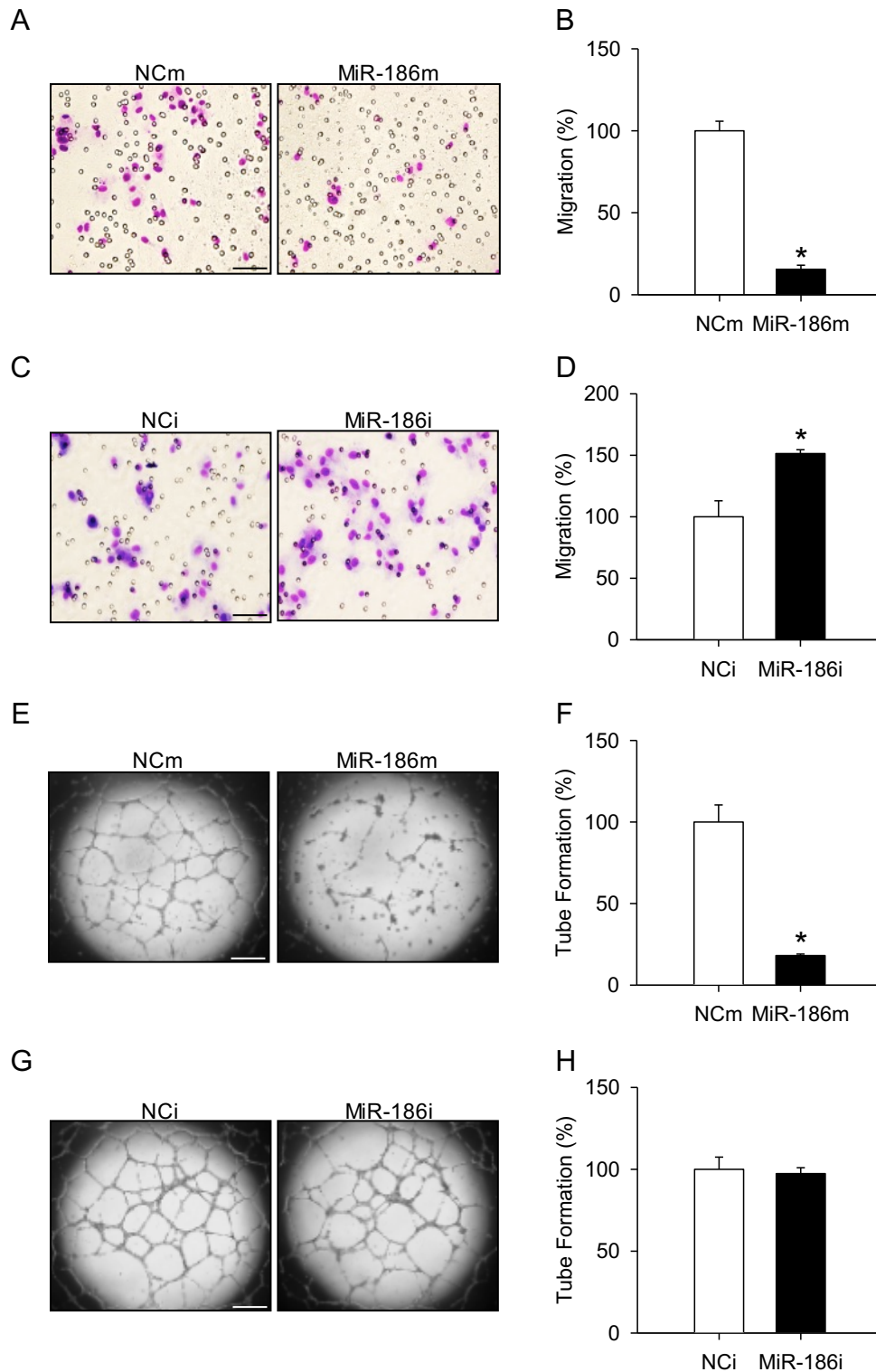


Abbildung 24: MiR-186 reduziert die Migration und Tube Formation von Endothelzellen. **A, C:** Lichtmikroskopische Aufnahmen migrierter Zellen, die mit NCm und miR-186m (**A**) oder NCi und miR-186i (**C**) transfiziert wurden. Maßstab: 70 μ m. **B, D:** Anzahl migrierter HDMEC (in % zu NCm oder NCi) in einem Transwell-Assay. Die Zellen wurden für 48 h mit NCm und miR-186m (**B**) oder NCi und miR-186i (**D**) transfiziert ($n = 3-4$). **E, G:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von HDMEC, die mit NCm und miR-186m (**E**) oder NCi und miR-186i (**G**) transfiziert wurden. Maßstab: 750 μ m. **F, H:** Tube Formation (in % von NCm oder NCi) von NCm- und miR-186m- (**F**) oder NCi- und miR-186i- (**H**) transfizierten HDMEC ($n = 4$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm oder NCi.

Außerdem wurde das Aussprossungsverhalten transfizierter HDMEC in einem dreidimensionalen Sphäroid-Sprouting-Assay untersucht. Sphäroide, die aus miR-186m-transfizierten HDMEC bestanden, zeigten eine deutlich geringere Aussprossung als die Kontrollgruppe (*Abbildung 25A und B*). Dagegen führte eine Transfektion mit miR-186i zu einem merklichen Anstieg der kumulativen Sprosslänge von HDMEC Sphäroiden (*Abbildung 25C und D*).

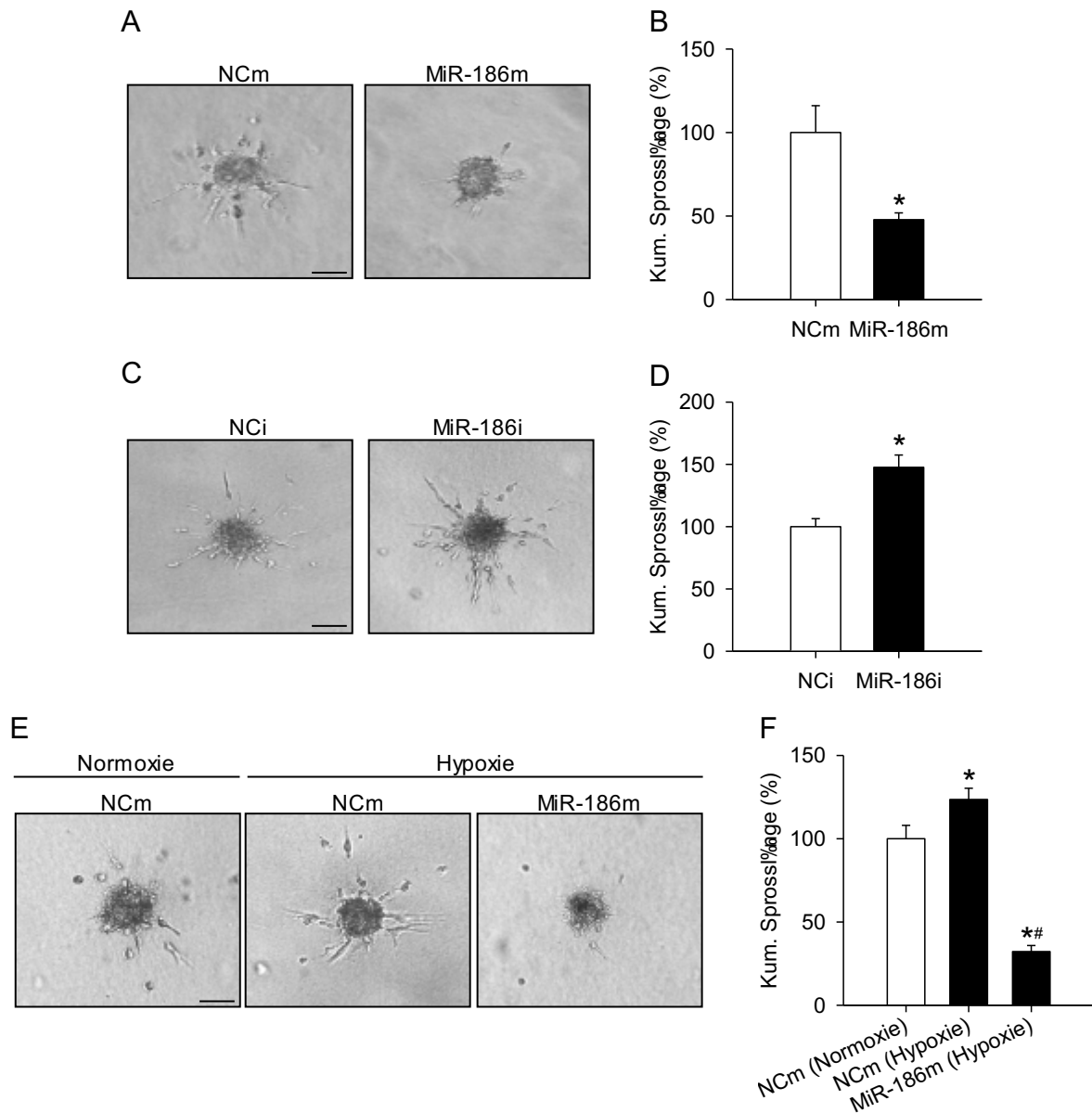


Abbildung 25: MiR-186 hemmt das Aussprossen von Endothelzell-Sphäroiden. **A, C:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von HDMEC Sphäroiden. Die Zellen wurden für 48 h entweder mit NCm und miR-186m (**A**) oder NCi und miR-186i (**C**) transfiziert. Maßstab: 80 µm. **B, D:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu NCm oder NCi) von NCm- und miR-186m- (**B**) oder NCi- und miR-186i- (**D**) transfizierten HDMEC (n = 10-20). **E:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von HDMEC Sphäroiden. Die HDMEC Sphäroide wurden mit NCm oder miR-186m transfiziert und für 24 h unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Maßstab: 30 µm. **F:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu NCm (Normoxie)) von NCm- oder miR-186m-transfizierten HDMEC Sphäroiden mit anschließender Kultivierung unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen (n = 16). Mittelwerte ± SEM. *P < 0,05 vs. NCm, NCi oder NCm (Normoxie). #P < 0,05 vs. NCm (Hypoxie).

Um zu untersuchen, ob eine Inhibition der endothelialen miR-186 zur Hypoxie-stimulierten Angiogenese von Endothelzellen beiträgt, wurden NCm- oder miR-186m-transfizierte HDMEC unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Die Aussprossung der NCm-transfizierten Kontrollgruppe konnte dabei durch Inkubation unter hypoxischen Bedingungen gesteigert werden (*Abbildung 25E und F*). Eine Transfektion von HDMEC mit miR-186m wirkte dagegen der Hypoxie-induzierten Erhöhung der Sprosslänge entgegen (*Abbildung 25E und F*).

6.2.3 Effekte der endothelialen miR-186 auf Angiogenese und Tumorwachstum *in vivo*

Um die Funktion der miR-186 auf die Angiogenese *in vivo* zu analysieren, wurde ein Matrigel-Plug-Assay durchgeführt. Dazu wurden NCm- oder miR-186m-transfizierte HDMEC in Matrigel resuspendiert und in die Flanken von immundefizienten Mäusen injiziert. Sieben Tage nach der Implantation wurden die Matrigel-Plugs entfernt und immunhistochemischen Analysen unterzogen.

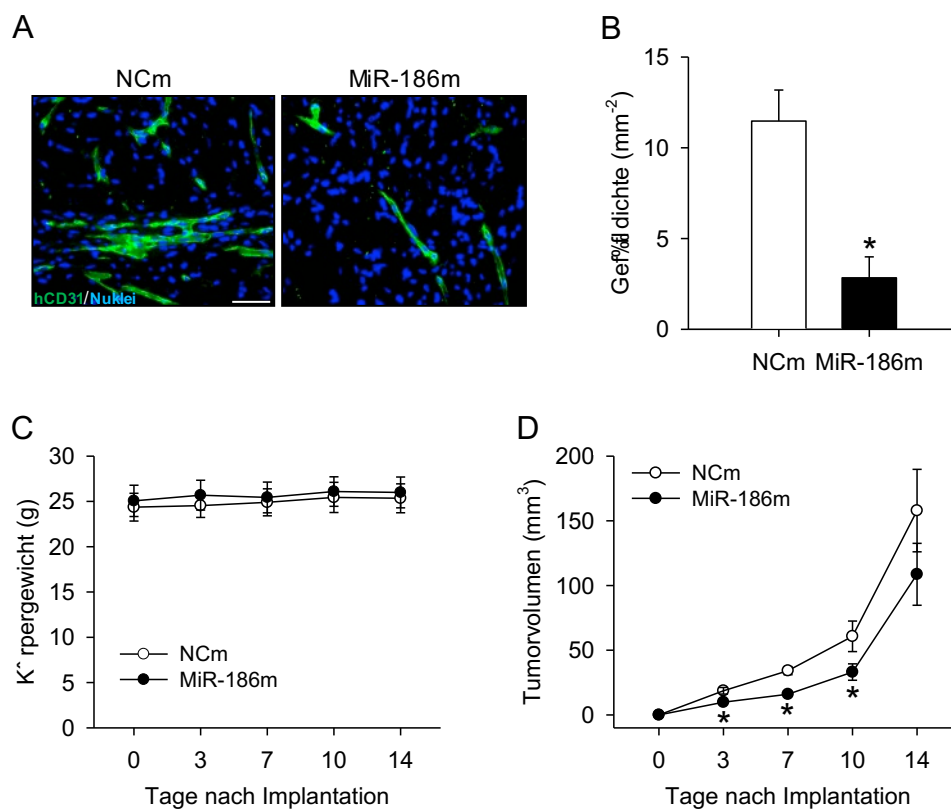


Abbildung 26: MiR-186 inhibiert die Angiogenese und das Tumorwachstum *in vivo*. **A:** Immunhistochemische Detektion humaner CD31-positiver Gefäße (grün) in Matrigel-Plugs, die NCm- oder miR-186m-transfizierte HDMEC enthielten. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Maßstab: 55 μm . **B:** Gefäßdichte (in mm^{-2}) von Matrigel-Plugs, die NCm- oder miR-186m-transfizierte Zellen enthielten ($n = 5$). **C:** Körpergewicht (g) von NOD-SCID Mäusen an den Tagen 0, 3, 7, 10 und 14 nach Tumorimplantation ($n = 9$). **D:** Volumen (in mm^3) der NCI-H460 Flankentumore, die NCm- oder miR-186m-transfizierte HDMEC enthielten. Die Messung erfolgte mittels Schieblehre an den Tagen 0, 3, 7, 10 und 14 nach Tumorimplantation ($n = 9$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm.

Dabei zeigte sich, dass die Matrigel-Plugs, die miR-186m-transfizierte HDMEC enthielten, eine signifikant erniedrigte Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen (*Abbildung 26A und B*).

Um zu untersuchen, ob die endotheliale miR-186 die Tumorangio-genese inhibiert, wurde ein Tumor-Flankenmodell verwendet. Hierfür wurden NCm- oder miR-186m-transfizierte HDMEC mit NCI-H460 Zellen vermischt und in die Flanken von NOD-SCID Mäusen injiziert. Erwartungsgemäß konnten für die Dauer des Versuches weder Auswirkungen auf das Körpergewicht der Mäuse noch auf deren Verhalten festgestellt werden (*Abbildung 26C*). Die Messung des Tumorgewichtes erfolgte mittels Schieblehre. Dabei zeigte sich, dass eine Transfektion der HDMEC mit miR-186m das initiale Tumorgewicht an den Tagen 3, 7 und 10 im Vergleich zur Kontrolle deutlich hemmt (*Abbildung 26D*). Nach 14 Tagen konnten allerdings in beiden Gruppen keine Unterschiede mehr im Tumorgewicht festgestellt werden (*Abbildung 26E*).

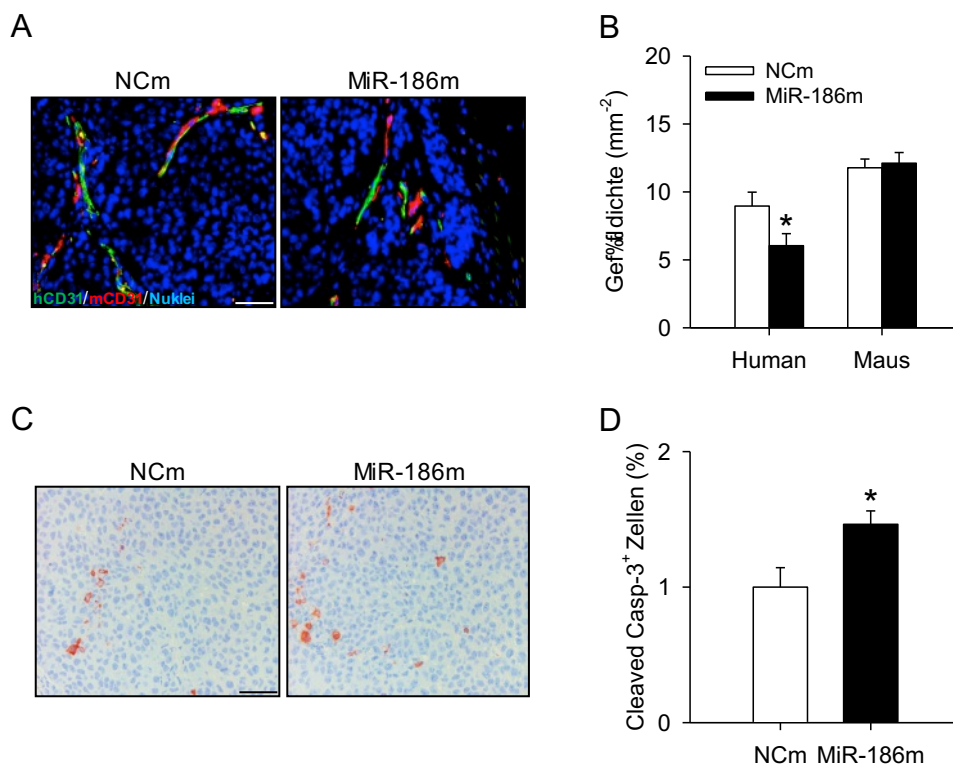


Abbildung 27: MiR-186 reduziert die Dichte humaner Gefäße und steigert die Apoptoserate in Tumoren. A: Immunhistochemische Detektion humaner (grün) und muriner (rot) Gefäße in Tumoren, die NCm- oder miR-186m-transfizierte HDMEC enthielten, 14 Tage nach Tumorimplantation. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Maßstab: 55 μ m. **B:** Dichte (in mm^2) von humanen und murinen Gefäßen in Tumoren, die NCm- oder miR-186m-transfizierte HDMEC enthielten 14 Tage nach Tumorimplantation ($n = 9$). **C:** Immunhistochemische Detektion von Cleaved Caspase-3⁺ (cleaved Casp-3⁺) NCI-H460 Zellen in den Tumoren, die NCm- oder miR-186m-transfizierte HDMEC enthielten. Maßstab: 55 μ m. **D:** Quantitative Auswertung der cleaved Casp-3⁺ NCI-H460 Zellen (in % zur Gesamtzellzahl) innerhalb der Tumore, die NCm- oder miR-186m-transfizierte HDMEC enthielten ($n = 8-9$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm.

Außerdem wiesen die Tumore, die miR-186m-transfizierte HDMEC enthielten, eine reduzierte Dichte humaner Gefäße auf, wohingegen sich keine Effekte auf die Dichte muriner Gefäße zeigten (Abbildung 27A und B).

Zusätzliche immunhistochemische Analysen belegten, dass eine Transfektion von HDMEC mit miR-186m zu einem deutlich höheren Anteil an cleaved Caspase-3-positiven (cleaved Casp-3⁺) Zellen in den Tumoren führt (Abbildung 27C und D).

6.2.4 Identifizierung von PRKCA als direktes Target der miR-186

Um den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus der anti-angiogenen Funktion der miR-186 zu analysieren, wurden zunächst die validierten humanen Targets der miR-186 aus der Literatur geprüft. Dabei wurden zwölf Gene identifiziert, die in die Angiogenese involviert sind: *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4)*, *TGFBR2*, *hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (HIF1A)*, *MAP3K2*, *RELA (p65)*, *Jagged 1 (JAG1)*, *high mobility group box 1 (HMGB1)*, *Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1)*, *yes-associated protein 1 (YAP1)*, *SMAD family member 6 (SMAD6)*, *cell division protein kinase 6 (CDK6)* und *cell division cycle 42 (CDC42)*. Die Daten einer anschließenden qRT-PCR Analyse zeigten, dass in miR-186m-transfizierten HDMEC lediglich die mRNA Expression von YAP1 und CDC42 im Vergleich zu NCm-transfizierten Kontrollzellen geringfügig erniedrigt war (Abbildung 28A und B).

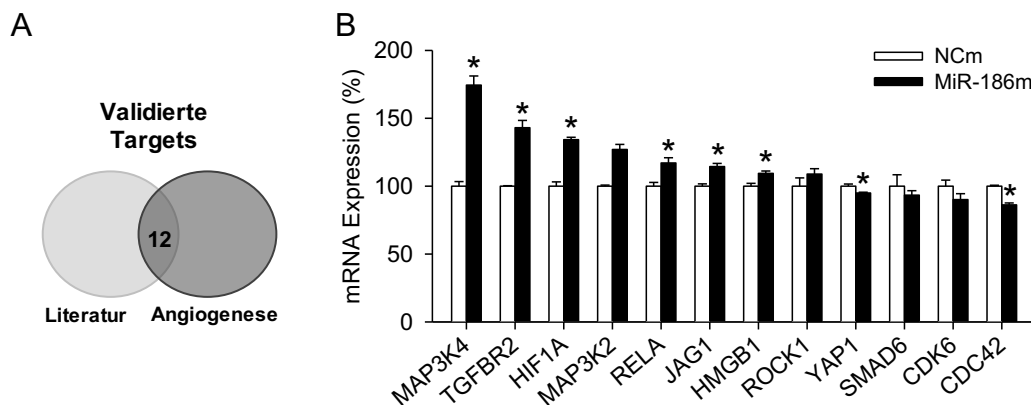


Abbildung 28: Die miR-186 reduziert die Expression von YAP1 und CDC42 in HDMEC. A: Mengendiagramm zur Veranschaulichung der zwölf validierten humanen Targets der miR-186, die in die Angiogenese involviert sind. B: Expression (in % zu NCm) der validierten Targets in NCm- und miR-186m-transfizierten HDMEC. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR (n = 3). Mittelwerte \pm SEM. *P < 0,05 vs. NCm.

Des Weiteren wurden sechs potenzielle humane Targets der miR-186 mithilfe der beiden Datenbanken „miRDB“ und „TargetScan“ identifiziert. Diese weisen eine Bindestelle für die miR-186 auf und sind in die Angiogenese involviert. Bei diesen Genen handelt es sich um *frizzled class receptor 3 (FZD3)*, *metadherin (MTDH)*, *ribosomal protein S6 kinase A3*

(*RPS6KA3*), *SATB homeobox 1* (*SATB1*), *sirtuin 1* (*SIRT1*) and *PRKCA*. Die Ergebnisse einer weiteren qRT-PCR-Analyse zeigten eine signifikante Reduktion der mRNA Expression von *PRKCA* in miR-186m-transfizierten Zellen (*Abbildung 29A und B*). In einer anschließenden Western Blot-Analyse wurde die Proteinexpression von PKC α in transfizierten HDMEC bestimmt. Eine Transfektion mit miR-186m führte dabei zu einer deutlichen Verminderung der Proteinexpression von PKC α im Vergleich zur Kontrolle (*Abbildung 29C und D*).

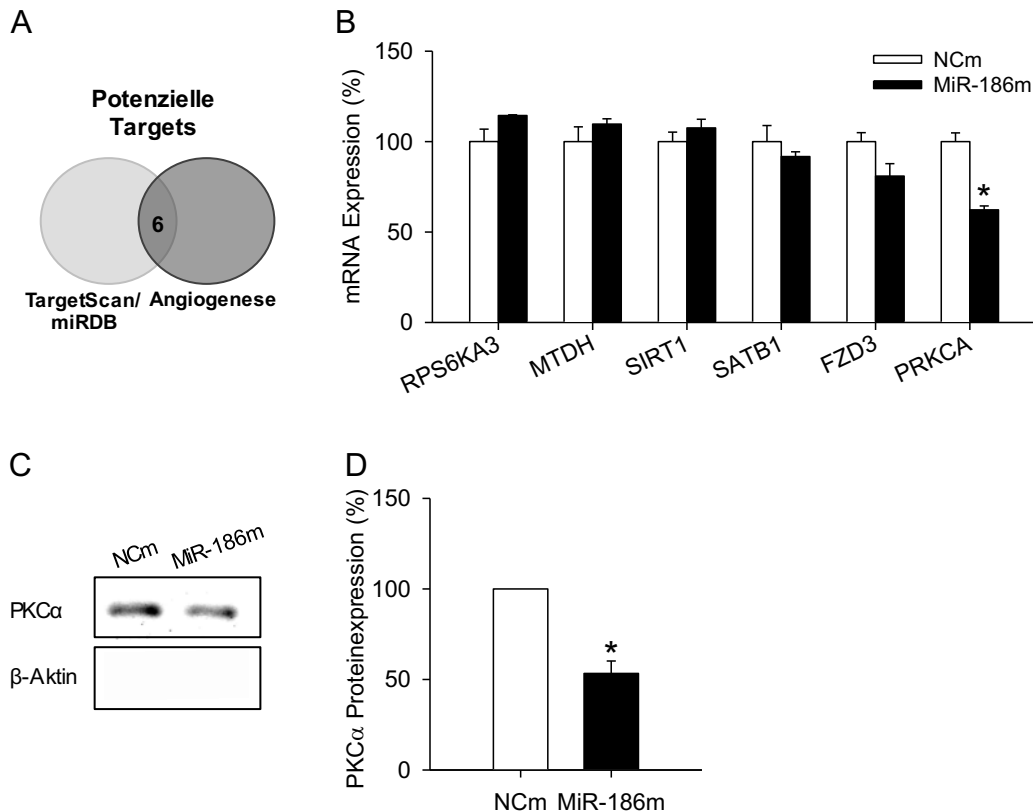


Abbildung 29: MiR-186 reduziert die Expression von PRKCA in Endothelzellen. **A:** Mengendiagramm zur Veranschaulichung der sechs potenziellen humanen Targets der miR-186, die in die Angiogenese involviert sind. Die Analyse erfolgte mit den beiden bioinformatischen Webservern TargetScan und miRDB. **B:** Expression (in % zu NCm) der potenziellen Targets in NCm- und miR-186m-transfizierten HDMEC. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR ($n = 3$). **C:** Western Blot-Analyse der Expression von PKC α und β -Aktin in NCm- und miR-186m-transfizierten HDMEC. **D:** Expression von PKC α normiert auf β -Aktin (in % zu NCm) in NCm- und miR-186m-transfizierten HDMEC ($n = 3$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. NCm.

Um zu überprüfen, ob *PRKCA* ein direktes Target der miR-186 ist, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Hierfür wurden zwei verschiedene Firefly-Luciferaseplasmide kloniert, die unterschiedliche Abschnitte der 3'-UTR der humanen *PRKCA* mRNA Sequenz aufweisen. Dabei enthielt Plasmid „Wildtyp 1“ eine potenzielle Bindestelle und Plasmid „Wildtyp 2“ drei potenzielle Bindestellen für die miR-186 (*Abbildung 30A*). Danach wurden HEK293T Zellen mit NCm oder miR-186m, einem Renilla-Luciferaseplasmid und dem Plasmid „Wildtyp 1“, „Wildtyp 2“ oder einem Plasmid ohne die *PRKCA*-3'-UTR (Mutante) co-transfiziert.

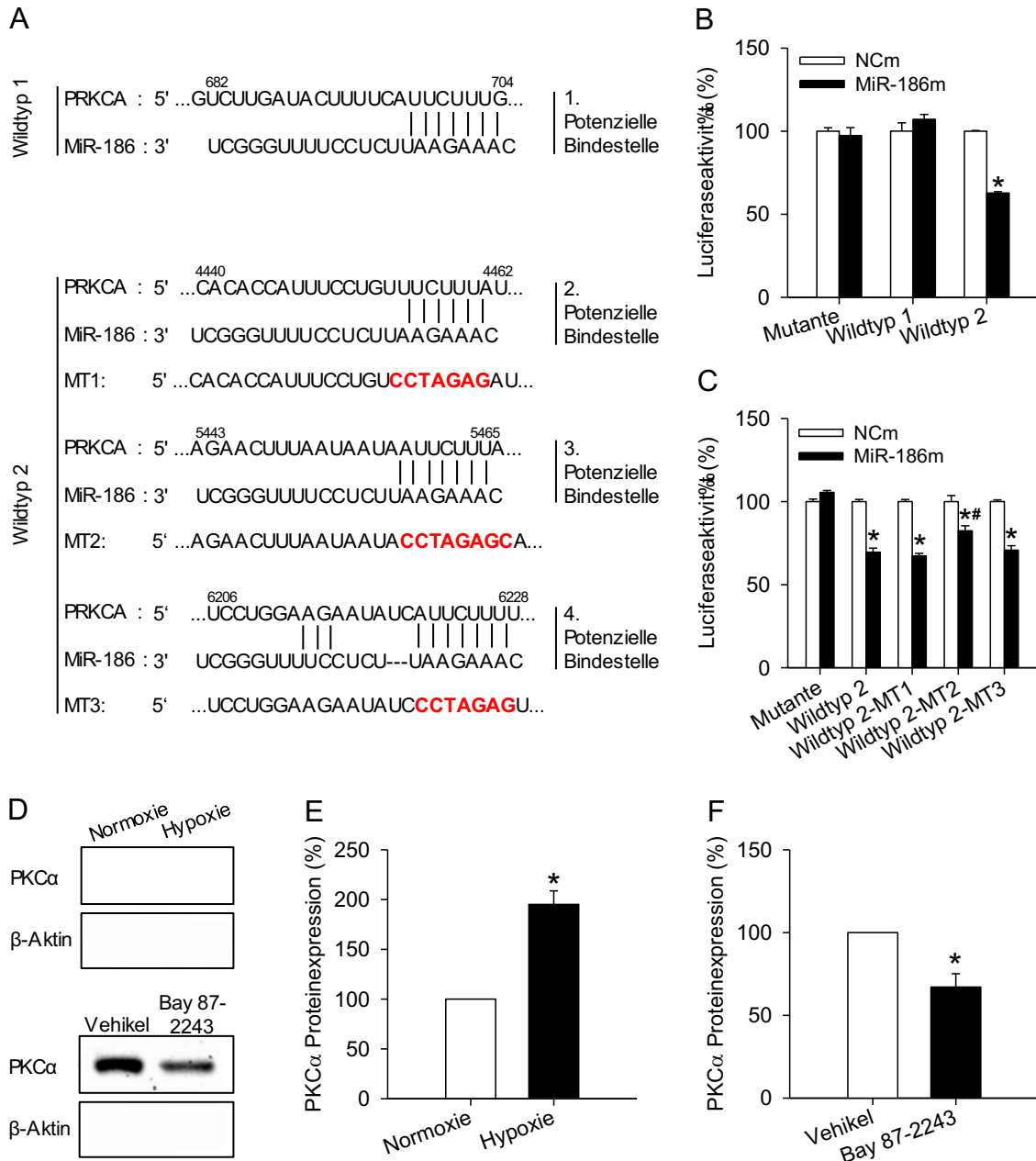


Abbildung 30: PRKCA ist ein direktes Target der miR-186. **A:** Dargestellt sind die vier potenziellen Bindestellen der miR-186 innerhalb der 3'-UTR der humanen PRKCA mRNA Sequenz. **B:** Luciferaseaktivität (in % zu NCm) in HEK293T Zellen. Die Zellen wurden mit NCm oder miR-186m, einem Renilla-Luciferaseplasmid und einem Firefly-Luciferaseplasmid ohne (Mutante) oder mit Wildtyp-Sequenzen der 3'-UTR von PRKCA co-transfiziert. Die Messung erfolgte mittels Luciferase-Assay (n = 4). Dabei enthält Wildtyp 1 die 1. potenzielle Bindestelle und Wildtyp 2 die potenziellen Bindestellen 2-4. **C:** Luciferaseaktivität (in % zu NCm) in HEK293T Zellen, die mit NCm oder miR-186m, einem Renilla-Luciferaseplasmid und einem Firefly-Luciferaseplasmid ohne (Mutante) oder mit Wildtyp 2 Sequenzen der 3'-UTR von PRKCA, die Mutationen in den individuellen potenziellen Bindestellen 2-4 enthalten, co-transfiziert. Die Messung erfolgte mittels Luciferase-Assay (n = 4). **D:** Western Blot-Analyse der Expression von PKCα und β-Aktin in HDMEC, die für 72 h unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert wurden, oder in HDMEC, die für 72 h mit Vehikel oder Bay 87-2243 behandelt wurden. **E:** Expression von PKCα normiert auf β-Aktin (in % zu Normoxie) in HDMEC, die unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert wurden (n = 4). **F:** Expression von PKCα normiert auf β-Aktin (in % zu Vehikel) in Vehikel- oder Bay 87-2243-behandelten HDMEC (n = 4). Mittelwerte ± SEM. *P < 0,05 vs. NCm, Normoxie oder Vehikel. #P < 0,05 vs. miR-186 transfizierten Wildtyp 2.

Durch eine Transfektion mit miR-186m konnte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Verringerung der Luciferaseaktivität in den Zellen nachgewiesen werden, die gleichzeitig das „Wildtyp 2“-Plasmid enthielten. Dagegen zeigte sich keine Abnahme der Luciferaseaktivität in miR-186m-transfizierten HDMEC, die zusätzlich das „Wildtyp 1“-Plasmid oder die Mutante enthielten (*Abbildung 30B*). Daraus kann geschlossen werden, dass die 3'-UTR-Sequenz von *PRKCA* im „Wildtyp 2“-Plasmid selektiv von der miR-186 gebunden wird.

Um zu untersuchen, welche der drei potenziellen Bindestellen für die miR-186-induzierte Hemmung der *PRKCA* verantwortlich ist, wurden Mutationen in die Bindestellen innerhalb des „Wildtyp 2“-Plasmids eingebracht: „Wildtyp 2-MT1“, „Wildtyp 2-MT2“ und „Wildtyp 2-MT3“ (*Abbildung 30A*). In weiteren Luciferase-Assays konnte festgestellt werden, dass die Mutation in der dritten potenziellen Bindestelle („Wildtyp 2-MT2“) zu einer erhöhten Luciferaseaktivität im Vergleich zu miR-186m-transfizierten HDMEC, die das „Wildtyp 2“-Plasmid enthielten, führt (*Abbildung 30C*).

In Abschnitt 6.2.1 konnte gezeigt werden, dass hypoxische Bedingungen die endotheliale miR-186 durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF1 α inhibieren. Deshalb sollte die Expression der PKC α in HDMEC, die für 72 h unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert wurden, untersucht werden. Western Blot-Analysen zeigten, dass durch hypoxische Bedingungen die Proteinexpression von PKC α in Endothelzellen im Vergleich zu HDMEC, die unter normalen Bedingungen kultiviert wurden, um 95 % gesteigert werden kann (*Abbildung 30D und E*). Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Expression von PKC α um 30 %, wenn HIF1 α durch Bay 87-2243 inhibiert wurde (*Abbildung 30D und F*).

6.2.5 Einfluss von *PRKCA* auf die Funktion der miR-186 bei der Angiogenese

In früheren Studien konnte bereits eine relevante pro-angiogene Funktion der PKC α gezeigt werden [Harrington *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2008]. Um herauszufinden, ob die miR-186 die Angiogenese durch direkte Bindung von *PRKCA* inhibiert, wurden HDMEC mit PMA, einem Aktivator der PKC α , behandelt. In einem WST-1-Assay zeigte sich, dass Konzentrationen im Bereich von 0,05 - 0,5 μ M PMA die Viabilität von HDMEC deutlich steigern können (*Abbildung 31A*). Dementsprechend wurde für die nachfolgenden Analysen 0,5 μ M PMA eingesetzt. Die Transfektion von HDMEC mit miR-186m führte zu einer geringeren Viabilität, Migration und Sprosslänge. Eine Behandlung von miR-186m-transfizierten HDMEC mit PMA konnte diesen Effekt zum Teil aufheben (*Abbildung 31B-D*).

Interessanterweise führten Konzentrationen ab 1 nM PMA zu einer deutlich geringeren Ausbildung endothelialer Tubes (*Abbildung 31E*). Im nachfolgenden Tube Formation-Assay wurden miR-186m-transfizierte HDMEC deshalb mit 0,2 nM PMA anstatt mit 0,5 μ M PMA behandelt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die PMA-induzierte Aktivierung der

PKC α den hemmenden Effekt von miR-186m auf die Tube Formation aufheben kann (Abbildung 31F).

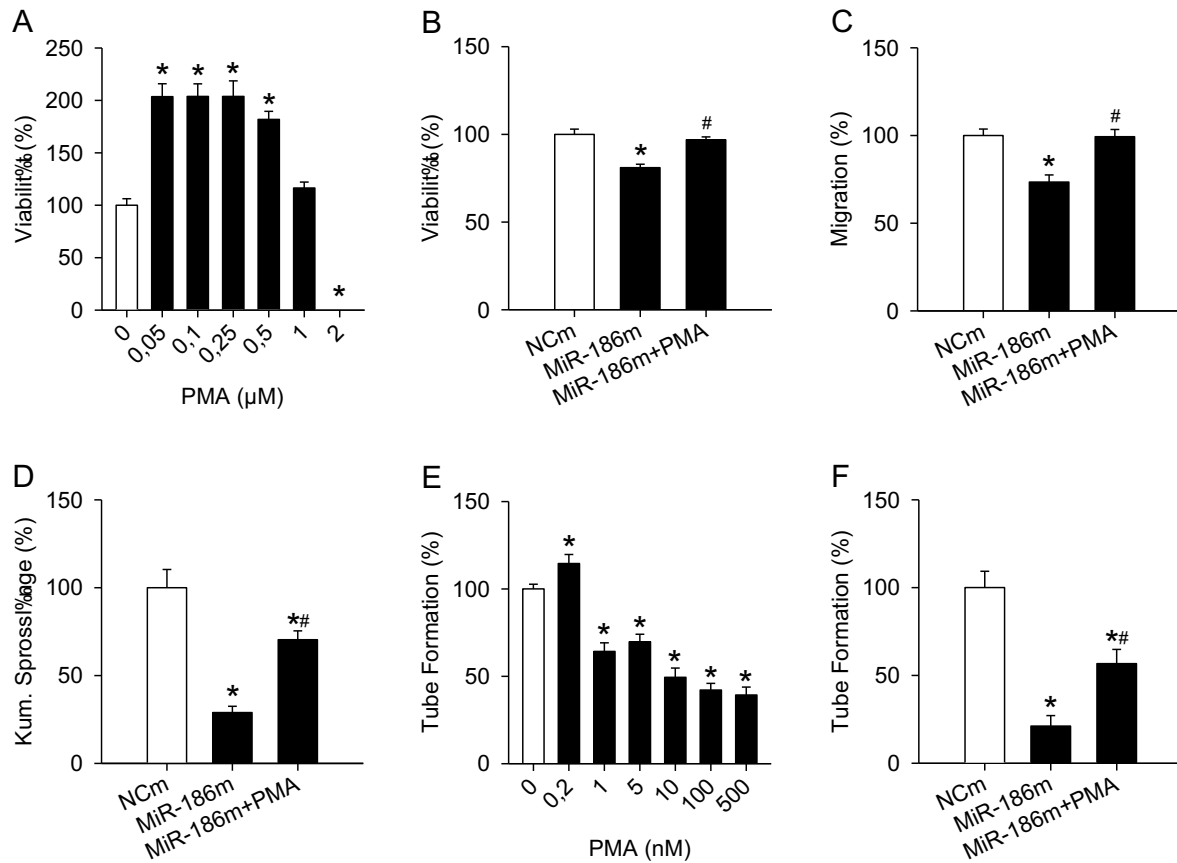


Abbildung 31: MiR-186 inhibiert durch Hemmung der PRKCA die Angiogenese. **A:** Viabilität (in % zu 0 μ M) von HDMEC, die für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von PMA behandelt wurden. Die Messung erfolgte mittels eines WST-1-Assays ($n = 4$). Viabilität (in % zu NCm) von NCm- oder miR-186m-transfizierten HDMEC, die für 72 h mit 0,5 μ M PMA behandelt wurden. Die Messung erfolgte mittels eines WST-1-Assays ($n = 4$). **C:** Migration (in % von NCm) von NCm- oder miR-186-transfizierten HDMEC in einem Transwell-Assay, die mit 0,5 μ M PMA behandelt wurden ($n = 4$). **D:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu NCm) von NCm- oder miR-186m-transfizierten HDMEC, die mit 0,5 μ M PMA behandelt wurden ($n = 15$). **E:** Tube Formation (in % von 0 nM) von HDMEC, die für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von PMA behandelt wurden ($n = 4$). **F:** Tube Formation (in % von NCm) von NCm- oder miR-186-transfizierten HDMEC, die mit 0,2 nM PMA behandelt wurden ($n = 4$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. 0 μ M, 0 nM oder NCm. # $P < 0,05$ vs. miR-186m.

6.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der endothelialen miR-186 auf die Tumorangio-genese genauer analysiert. Die Expression der miR-186 in Endothelzellen aus humanen Adenokarzinomen der Lunge war im Vergleich zum dazugehörigen Normalgewebe deutlich vermindert. Diese Hemmung der endothelialen miR-186 wurde durch Hypoxie bedingt, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF1 α führte. Die miR-186 zeigte im Rahmen verschiedener *in vitro* Untersuchungen anti-angiogene Effekte auf die Viabilität, Migration, Tube Formation und das Aussprossungsverhalten von Endothelzellen. In einem *in vivo* Matrigel-Plug-Assay und einem Tumor-Flankenmodell

konnten die *in vitro* Ergebnisse validiert werden. Die anti-angiogene Wirkung der miR-186 wird durch die direkte Bindung an den pro-angiogenen Regulator *PRKCA* vermittelt. Dieser wird in Endothelzellen gehemmt, was folglich zur Inhibition der Tumorangiogenese führt (Abbildung 32).

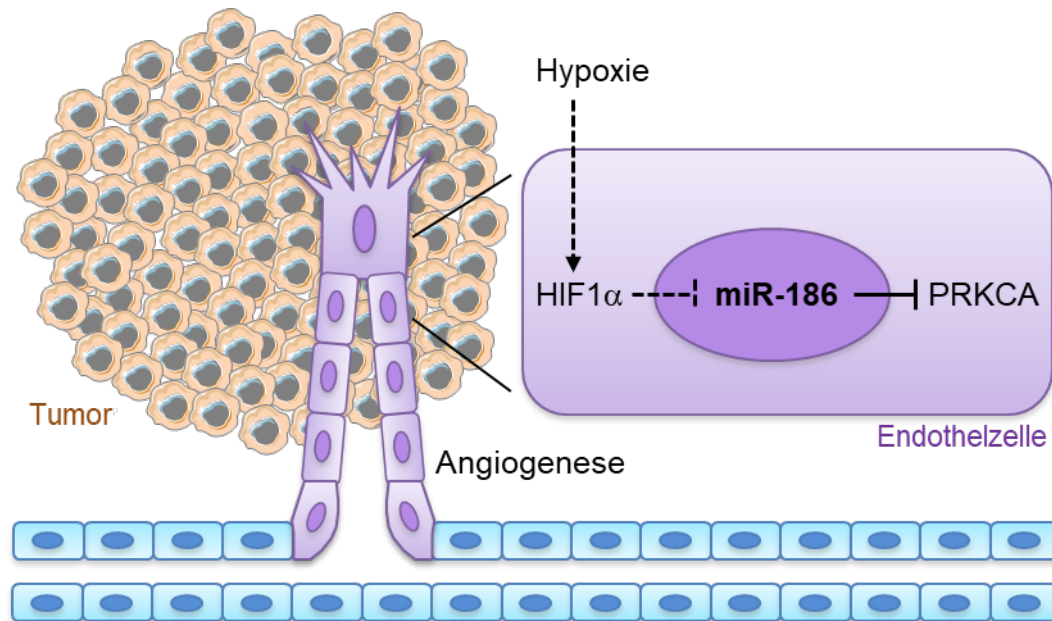


Abbildung 32: Regulatorische Funktion der miR-186 in der Tumorangiogenese. Durch Hypoxie wird der Transkriptionsfaktor HIF1 α in Endothelzellen aktiviert, was wiederum die Transkription der miR-186 hemmt. Diese miRNA bindet an den pro-angiogenen Regulator PKC α in Endothelzellen, was zur Inhibition der Angiogenese in Tumoren führt (erstellt mithilfe von Servier Medical Art).

6.3 Effekte von Linalool auf die Angiogenese

Für die Phytochemikalie Linalool sind bereits anti-oxidative, anti-inflammatorische und anti-karzinogene Eigenschaften beschrieben worden [Peana *et al.*, 2002; Hussain *et al.*, 2008; Jana *et al.*, 2014]. Allerdings ist die Wirkung von Linalool auf die Angiogenese noch unklar. Deswegen wurde im dritten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit erstmalig der Einfluss von Linalool auf die Entwicklung neuer Blutgefäße analysiert. In verschiedenen *in vitro* Experimenten wurde zunächst die Wirkung von Linalool auf die Proliferation, Migration, Tube Formation und auf das Aussprossungsverhalten von Endothelzellen untersucht. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Analysen wurde anschließend in einem *ex vivo* Aorten-Ring-Assay und einem *in vivo* Matrigel-Plug-Assay validiert. Zusätzlich wurden die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der anti-angiogenen Wirkung von Linalool genauer untersucht.

6.3.1 Effekte von Linalool auf die Viabilität, Proliferation und Migration von HDMEC

Zunächst wurde der Einfluss von Linalool auf die Viabilität und Proliferation von Endothelzellen analysiert. Dazu wurden HDMEC für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Linalool behandelt und anschließend WST-1- und LDH-Assays durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass Linalool bis zu einer Konzentration von 2 mM keinen Einfluss auf die Viabilität von HDMEC hat (*Abbildung 33A*). Außerdem konnten zytotoxische Effekte erst nach einer Behandlung von HDMEC mit 4 mM und 5 mM Linalool nachgewiesen werden (*Abbildung 33B*). Dementsprechend wurden bei allen weiteren *in vitro* und *in vivo* Experimenten nicht toxische Konzentrationen zwischen 0,25 mM und 2 mM Linalool verwendet.

Um die Wirkung von Linalool auf die Proliferation von Endothelzellen zu untersuchen, wurde die Inkorporation von BrdU in die zelluläre DNA während der Zellproliferation mittels einer Durchflusszytometrie gemessen. Hierfür wurden HDMEC für 6 h mit verschiedenen Konzentrationen von Linalool behandelt und für weitere 18 h BrdU zugegeben. Dabei führte eine Behandlung mit 1 mM und 2 mM Linalool zu einer reduzierten Proliferation der HDMEC um 15 % bzw. 23 % (*Abbildung 33C und D*).

Die Effekte von Linalool auf die Migration von HDMEC wurden mithilfe eines Scratch- und Transwell-Assays untersucht. Beim Scratch-Assay wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mikroskopische Aufnahmen der freien Flächen im Zellrasen aufgenommen und ausgewertet.

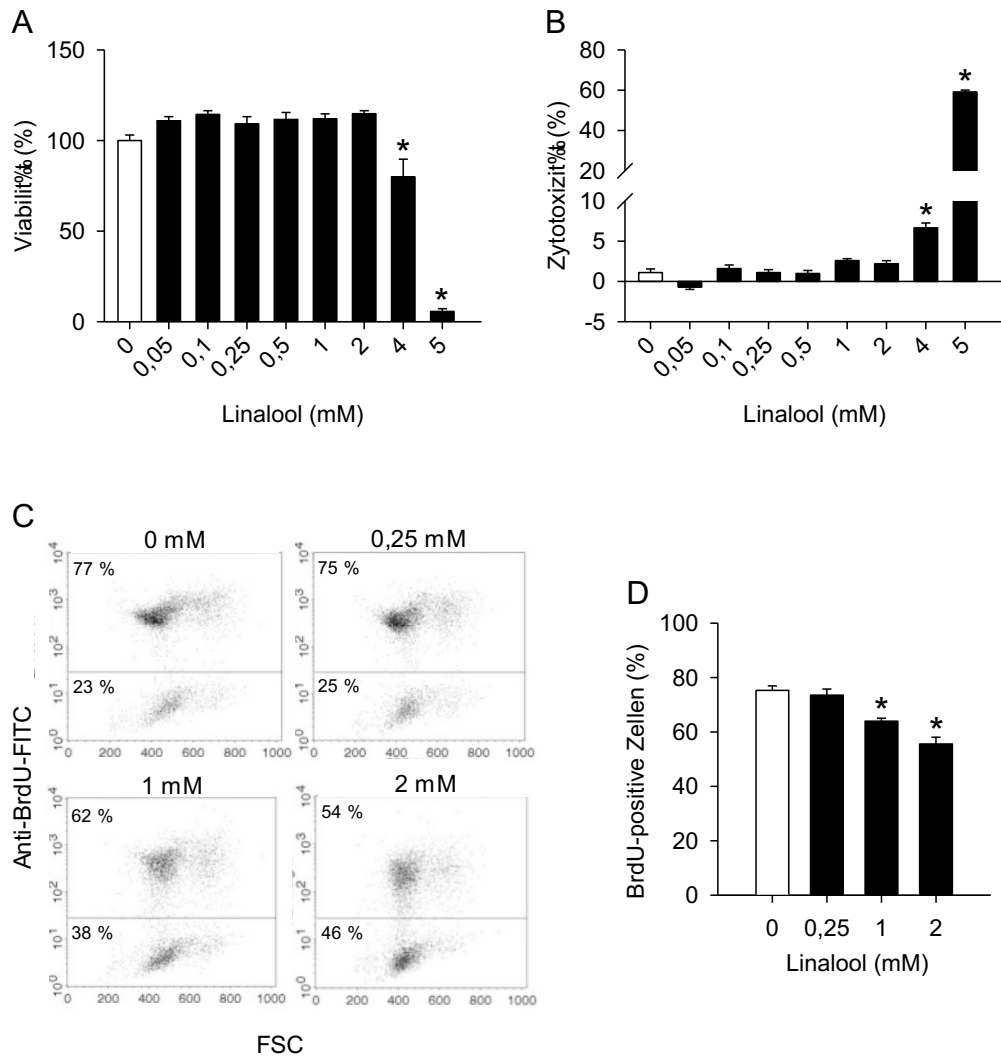


Abbildung 33: Linalool inhibiert die Proliferation von HDMEC. **A, B:** Viabilität (in % von 0 mM) von HDMEC (**A**) und Zytotoxizität (in % von 0 mM) von Linalool (**B**), die mittels WST-1 (**A**) und LDH-Assay (**B**) ermittelt wurden. HDMEC wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (0-5 mM) von Linalool behandelt ($n = 4$). **C:** Streudiagramm einer durchflusszytometrischen Analyse von HDMEC, die für 24 h mit 0 mM, 0,25 mM, 1 mM und 2 mM Linalool und für 18 h mit BrdU behandelt wurden. Im Anschluss wurden diese mit einem FITC-gekoppelten anti-BrdU-Antikörper gefärbt und analysiert. **D:** Anzahl BrdU-positiver HDMEC (in % zur Gesamtzellzahl), die mit Linalool behandelt wurden. Die Messung erfolgte mithilfe durchflusszytometrischer Analysen ($n = 3$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. 0 mM.

Dabei wurde eine signifikant verzögerte Schließung der freien Flächen nach Behandlung mit 1 mM und 2 mM Linalool festgestellt (*Abbildung 34A und B*). Dieser hemmende Effekt von Linalool auf die Migration von HDMEC konnte in einem Transwell-Assay validiert werden. Die Anzahl migrierter HDMEC konnte auch hier in Abhängigkeit der Linalool-Konzentration signifikant reduziert werden (*Abbildung 34C und D*). Die Migration von Endothelzellen wird durch Reorganisation der Aktinfilamente des Zytoskeletts in Filopodien, Lamellipodien und Stressfasern reguliert [Lamalice *et al.*, 2007]. Daher wurde zusätzlich eine Phalloidin-Färbung

der Linalool-behandelten HDMEC durchgeführt. Das Phalloidin bindet an Aktinfilamente des Zytoskeletts, die somit fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden können.

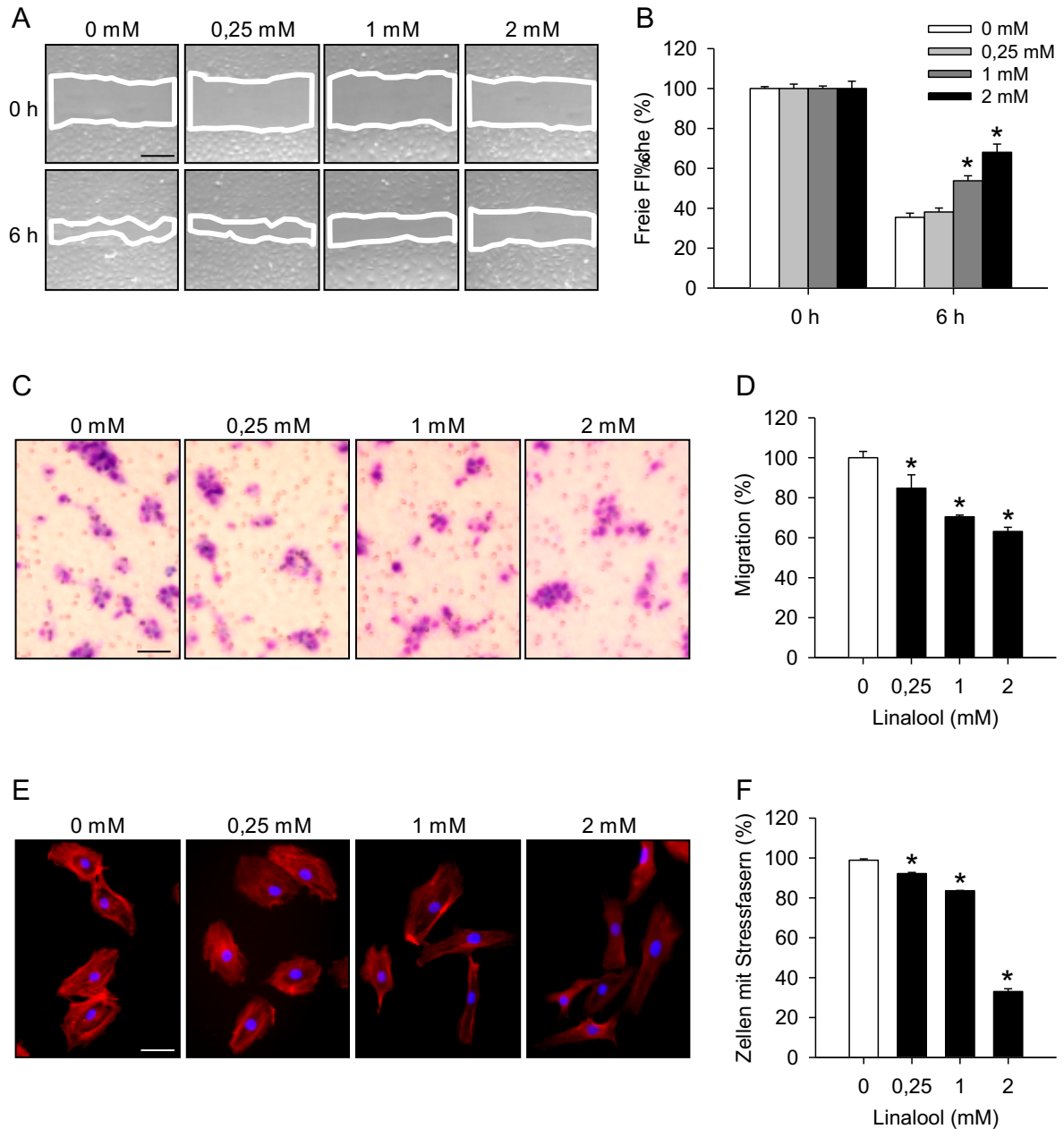


Abbildung 34: Linalool hemmt die Migration von HDMEC. **A:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Linalool-behandelten HDMEC nach Generierung der freien Fläche (weiße Linien) zu den Zeitpunkten 0 h und 6 h im Scratch-Assay. Maßstab: 220 μm . **B:** Freie Fläche (in % zu 0 h) der mit Linalool-behandelten HDMEC zu den Zeitpunkten 0 h und 6 h in einem Scratch-Assay ($n = 8$). **C:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der migrierten HDMEC in einem Transwell-Assay, die für 24 h mit 0 mM, 0,25 mM, 1 mM und 2 mM Linalool behandelt wurden. Maßstab: 70 μm . **D:** Migration (in % von 0 mM) von Linalool-behandelten HDMEC in einem Transwell-Assay ($n = 4$). **E:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Linalool-behandelten HDMEC. Diese wurden mit einem Alexa Fluor 568-Antikörper, der mit Phalloidin (rot) gekoppelt ist, angefärbt. Zur Visualisierung der Zellkerne (blau) wurde Hoechst 33342 verwendet. Maßstab: 50 μm . **F:** Anzahl der Zellen mit Stressfasern (in % zur Gesamtzellzahl) von Linalool-behandelten Zellen. Die Messung erfolgte mittels Phalloidin-Färbung ($n = 4$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. 0 mM.

Hierbei zeigte sich eine dosis-abhängige Wirkung von Linalool, wobei eine Behandlung mit 2 mM Linalool zu einer deutlichen Reduktion der Stressfasern um 67 % führte (Abbildung 34E und F).

6.3.2 Effekte von Linalool auf die Tube Formation und das Sphäroid-Sprouting

Die Wirkung von Linalool auf die Ausbildung endothelialer Tubes wurden mithilfe eines Tube Formation-Assays analysiert. Dazu wurden HDMEC auf Matrigel ausgesät, mit Vehikel oder Linalool behandelt und nach 24 h mikroskopiert.

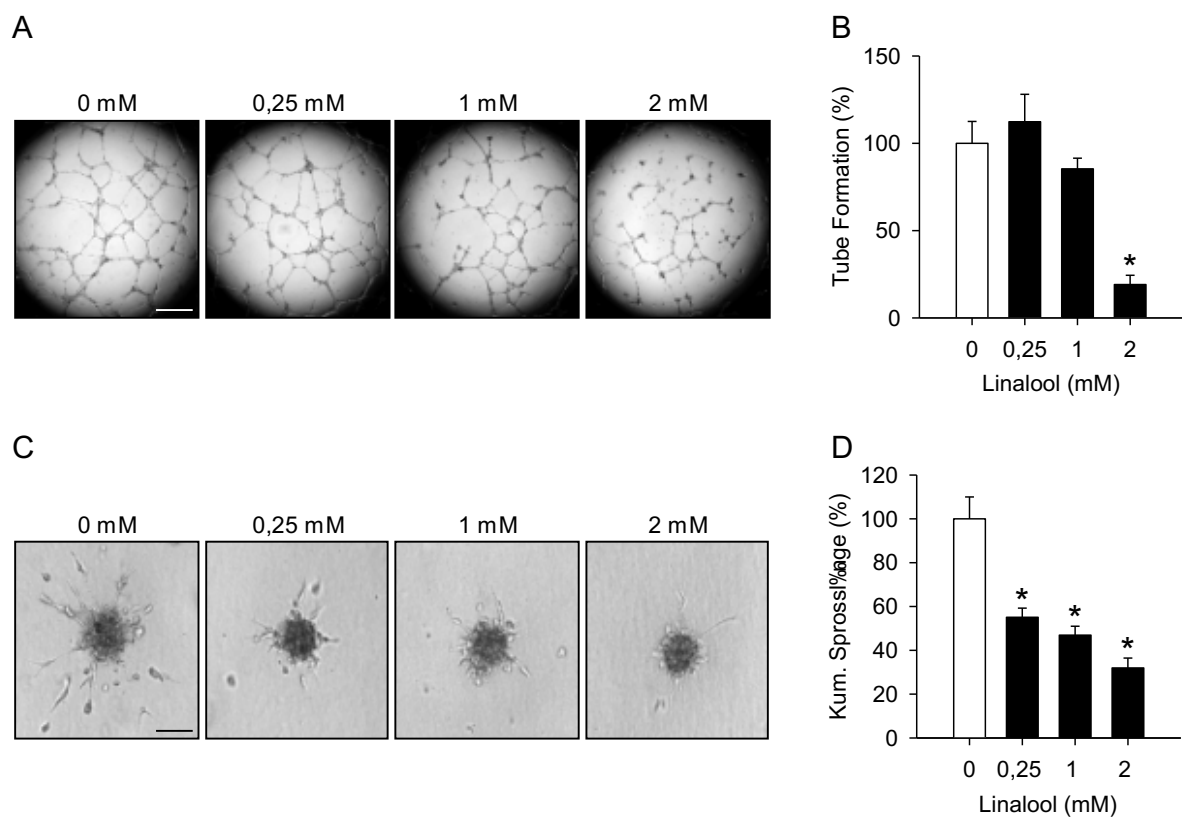


Abbildung 35: Linalool hemmt die Ausbildung endothelialer Tubes und das Aussprossen von Endothelzell-Sphäroiden. **A:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von HDMEC in einem Tube Formation-Assay, die für 24 h mit 0 mM, 0,25 mM, 1 mM und 2 mM Linalool behandelt wurden. Maßstab: 750 μ m. **B:** Tube Formation (in % zu 0 mM) von Linalool-behandelten Zellen ($n = 4$). **C:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von HDMEC Sphäroiden, die für 24 h mit 0 mM, 0,25 mM, 1 mM und 2 mM Linalool behandelt wurden. Maßstab: 90 μ m. **D:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu 0 mM) von Linalool-behandelten HDMEC Sphäroiden ($n = 15$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. 0 mM.

Dabei konnte eine deutliche Reduktion der neugebildeten endothelialen Tubes durch Behandlung mit 2 mM Linalool nachgewiesen werden (Abbildung 35A und B).

Um die Bedeutung von Linalool auf das Aussprossungsverhalten von HDMEC Sphäroiden zu analysieren, wurden die generierten Sphäroide in eine Kollagen-Matrix eingebettet und für 24 h mit 0 mM, 0,25 mM, 1 mM oder 2 mM Linalool behandelt. Die Ergebnisse des 3-

dimensionalen Sphäroid-Sprouting-Assays zeigten, dass die kumulative Sprosslänge in Abhängigkeit von der Linalool-Konzentration signifikant reduziert wird (*Abbildung 35C und D*).

6.3.3 Einfluss von Linalool auf die Angiogenese *ex vivo* und *in vivo*

In den vorherigen Abschnitten konnten anti-angiogene Effekte von Linalool *in vitro* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden in einem anschließenden *ex vivo* Aorten-Ring-Assay validiert. Dazu wurden Aorten-Ringe der Ratte in Matrigel eingebettet, mit verschiedenen Konzentrationen von Linalool behandelt und für sechs Tage inkubiert.

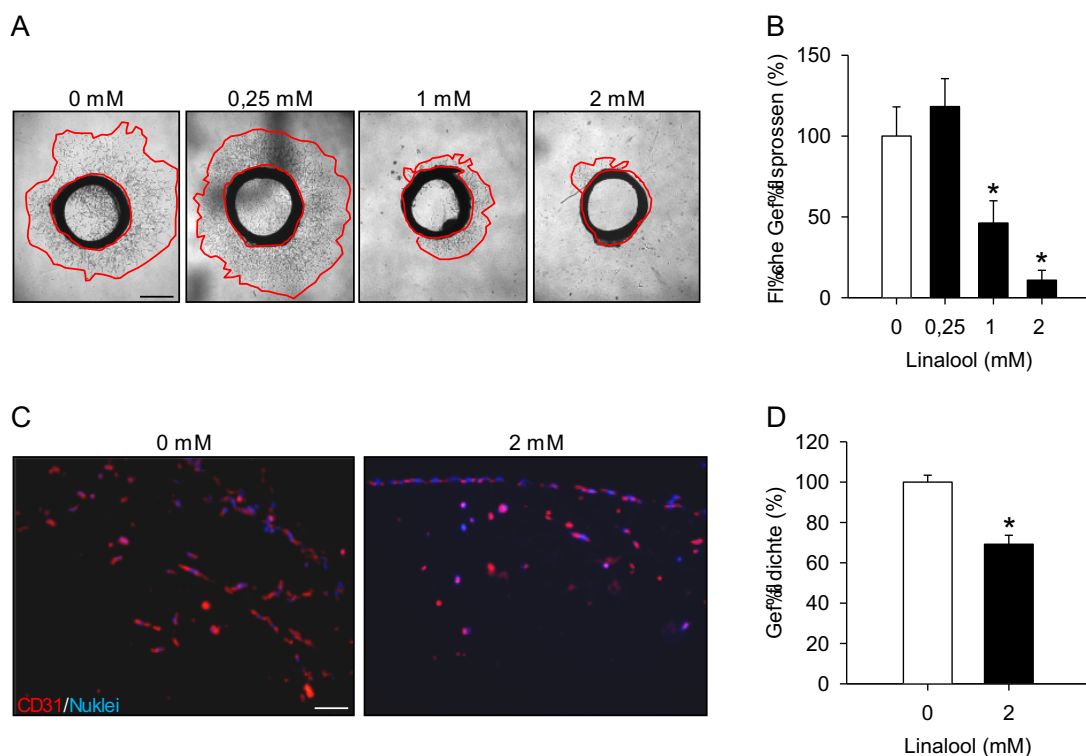


Abbildung 36: Linalool inhibiert die Angiogenese *ex vivo* und *in vivo*. **A:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Aorten-Ringen der Ratte. Die Aorten-Ringe wurden in Matrigel eingebettet und für sechs Tage mit 0 mM, 0,25 mM, 1 mM und 2 mM Linalool behandelt. Die Fläche der Gefäßsprossen ist mit einer roten Linie umrandet. Maßstab: 750 μ m. **B:** Fläche der Gefäßsprossen (in % zu 0 mM) von Linalool-behandelten Aorten-Ringen ($n = 11$). **C:** Immunhistochemische Detektion muriner CD31-positiver Gefäße (rot) in Matrigel-Plugs, die entweder 0 mM oder 2 mM Linalool enthielten. Die Zellkerne (blau) wurden mithilfe von Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 45 μ m. **D:** Gefäßdichte (in % zu 0 mM) der Matrigel-Plugs, die 0 mM oder 2 mM Linalool enthielten ($n = 9$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. 0 mM.

Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass eine Behandlung von Aorten-Ringen mit 1 mM und 2 mM Linalool eine signifikante Reduktion der auswachsenden Gefäßsprossen im Vergleich zur Kontrolle zur Folge hat (*Abbildung 36A und B*).

Außerdem wurden die inhibitorischen Effekte von Linalool auf die Angiogenese in einem *in vivo* Matrigel-Plug-Assay untersucht. Dazu wurde Matrigel mit Linalool oder Vehikel

angereichert und in die Flanken von männlichen BALB/c Mäusen injiziert. Nach sieben Tagen wurden die Matrigel-Plugs entfernt und immunhistochemische Färbungen zur Detektion muriner CD31-positiver Gefäße durchgeführt. In den Matrigel-Plugs, die 2 mM Linalool enthielten, konnte eine 31 % geringere Gefäßdichte gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden (*Abbildung 36C und D*).

6.3.4 Effekte von Linalool auf den AKT und ERK Signalweg

Die gezeigten *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse belegen einen inhibitorischen Effekt von Linalool auf die Entwicklung neuer Blutgefäße. In weiteren Analysen sollten die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen des anti-angiogenen Effekts von Linalool untersucht werden. Die beiden Signalwege PI3K/AKT/mTOR und Raf/MEK/ERK haben eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der Angiogenese. Daher wurde die Wirkung von Linalool auf diese Signalwege analysiert. Dazu wurden Western Blot-Analysen Linalool-behandelter HDMEC durchgeführt. Eine Behandlung mit 2 mM Linalool stimulierte die Phosphorylierung von ERK, ohne dabei die Phosphorylierung von AKT zu beeinflussen (*Abbildung 37A-C*). Daher wurde der ERK Signalweg mit dem selektiven MEK-Inhibitor PD0325901 geblockt. Für alle Analysen wurde eine nicht-toxische Konzentration von 1 μ M PD0325901 verwendet. Die HDMEC, die mit einer Kombination von Linalool und PD03205901 behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu Linalool-stimulierten Zellen eine stark reduzierte Phosphorylierung von ERK (*Abbildung 37D und E*). Interessanterweise wirkte außerdem die Inhibition der ERK-Phosphorylierung der hemmenden Wirkung von Linalool auf das Aussprossen von HDMEC Sphäroiden entgegen (*Abbildung 37F*).

Chemische Inhibitoren können trotz ihrer Selektivität gegenüber einem Target bei ausreichend hoher Konzentration zusätzlich andere Proteine binden, weshalb es zu sogenannten Off-Target-Effekten kommen kann. Aus diesem Grund wurden HDMEC mit einer siRNA gegen ERK (si-ERK) transfiziert. Western Blot-Analysen zeigten, dass dadurch die Expression von ERK im Vergleich zur Kontrolle um 56 % reduziert werden kann (*Abbildung 37G und H*). In einem Sphäroid-Sprouting-Assay verringerte sich die kumulative Sprosslänge von HDMEC, wenn eine Inhibition von ERK mittels siRNA erfolgte (*Abbildung 37I*). Durch Behandlung mit Linalool verringerte sich das Aussprossungsverhalten von HDMEC Sphäroiden. Dieser hemmende Effekt konnte durch Herunterregulation der ERK-Expression aufgehoben werden (*Abbildung 37I*).

Dies deutet darauf hin, dass Linalool die Angiogenese durch eine gesteigerte ERK-Phosphorylierung inhibieren kann.

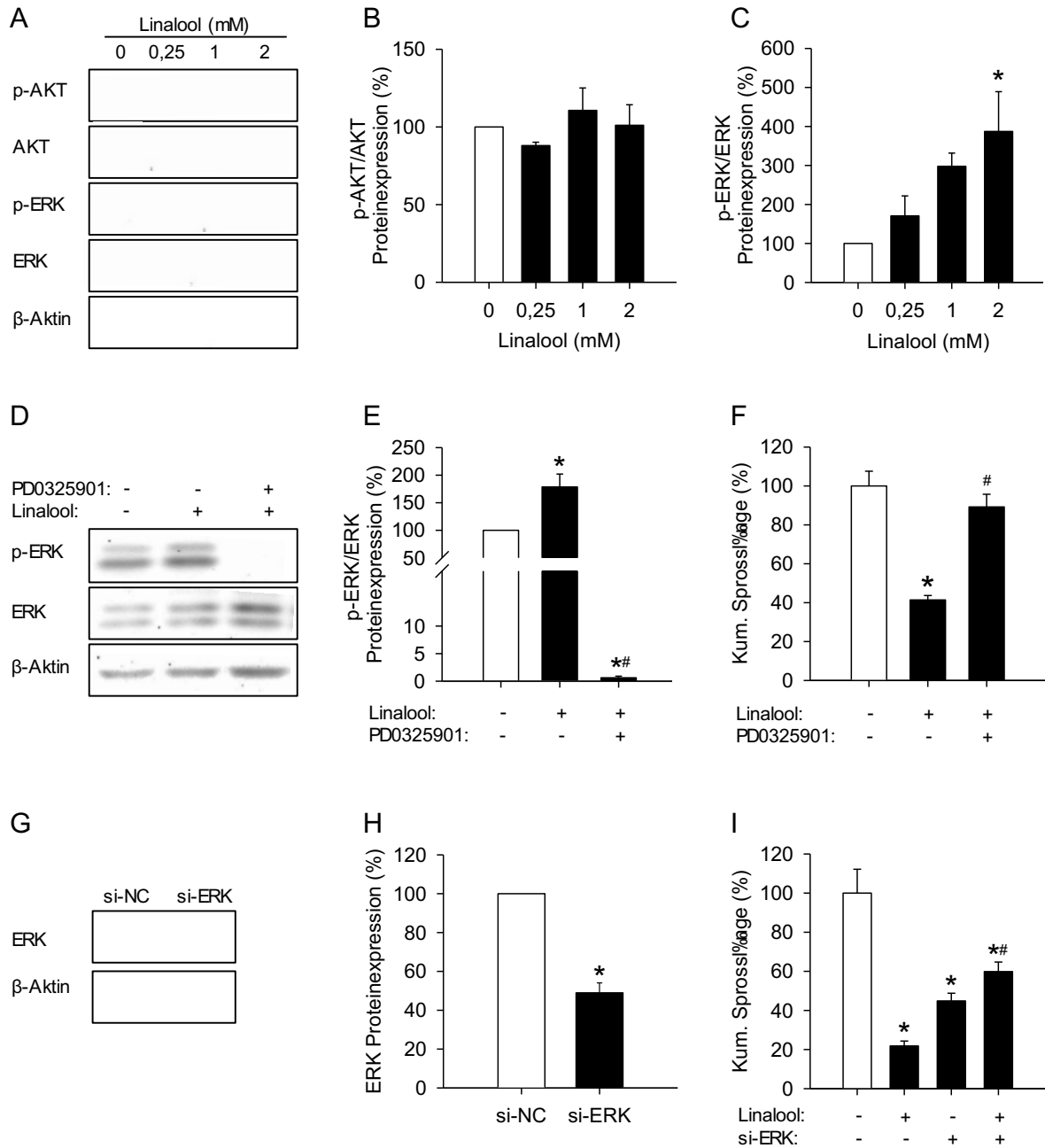


Abbildung 37: Linalool inhibiert die Angiogenese durch Aktivierung von ERK. A: Western Blot-Analyse der Expression von p-AKT, AKT, p-ERK, ERK und β -Aktin in HDMEC, die für 30 min mit 0 mM, 0,25 mM, 1 mM und 2 mM Linalool behandelt wurden. **B, C:** Expression von p-AKT/AKT (**B**) und p-ERK/ERK (**C**) normiert auf β -Aktin (in % zu 0 mM) ($n = 3-4$). **D:** Western Blot-Analyse der Expression von p-ERK, ERK und β -Aktin in HDMEC, die für 2 h mit 1 μ M PD0325901 vorbehandelt und anschließend für 30 min mit 0 mM und 2 mM Linalool behandelt wurden. **E:** Expression von p-ERK/ERK normiert auf β -Aktin (in % zu 0 mM) ($n = 3$). **F:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu 0 mM) von HDMEC, die für 24 h mit 0 mM oder 2 mM Linalool und mit 1 μ M PD0325901 behandelt wurden ($n = 10$). **G:** Western Blot-Analyse der Expression von ERK und β -Aktin in si-NC- oder si-ERK-transfizierten HDMEC. **H:** Expression von ERK/ β -Aktin (in % von si-NC) ($n = 3$). **I:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu 0 mM) von si-NC- oder si-ERK-transfizierten HDMEC Sphäroiden, die für 24 h mit 0 mM oder 2 mM Linalool behandelt wurden ($n = 10$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. 0 mM Linalool oder si-NC. # $P < 0,05$ vs. 2 mM Linalool.

6.3.5 Einfluss von Linalool auf intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und ATP

Studien konnten bereits nachweisen, dass Linalool die Produktion von ROS in verschiedenen Tumorzellen wie U87 und HepG2 induzieren kann [Cheng *et al.*, 2017; Rodenak-Kladniew *et al.*, 2018]. Außerdem wurde gezeigt, dass eine unkontrollierte Produktion von ROS zu einer beeinträchtigten Funktion von Endothelzellen führt [Incalza *et al.*, 2018]. Weiterhin ist bekannt, dass die anti-angiogene Wirkung vieler chemischer Verbindungen, wie beispielsweise Thalidomid, Magnolol und Dextran-Catechin, durch Steigerung der ROS-Produktion vermittelt werden [Schapira *et al.*, 1978; Kim *et al.*, 2013; Yee *et al.*, 2017]. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit zusätzlich die Effekte von Linalool auf intrazelluläre ROS in Endothelzellen analysiert.

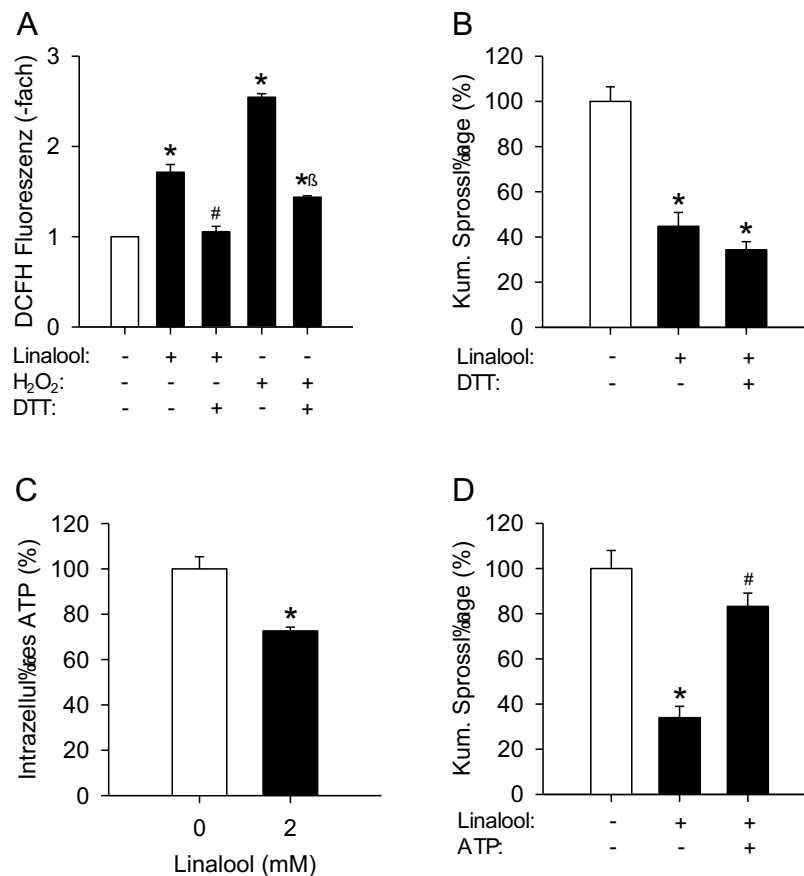


Abbildung 38: Linalool inhibiert die Angiogenese durch Reduktion von intrazellulärem ATP. **A:** DCFH-Fluoreszenz (als -fach von 0 mM Linalool) von HDMEC, die mit 0,5 mM DTT vorbehandelt wurden und für 24 h mit 0 mM oder 2 mM Linalool oder für 30 min mit 0,5 mM H₂O₂ behandelt wurden. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (n = 3). **B:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu 0 mM Linalool) von Linalool-behandelten HDMEC Sphäroiden, die mit 0,5 mM DTT behandelt wurden (n = 10). **C:** Intrazelluläres ATP in Linalool-behandelten HDMEC. Die Messung erfolgte mittels Luciferase-Assay (n = 4). **D:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu 0 mM Linalool) von HDMEC Sphäroiden, die für 24 h mit 0 mM oder 2 mM Linalool und mit 1 mM ATP behandelt wurden (n = 10). Mittelwerte ± SEM. *P < 0,05 vs. 0 mM. #P < 0,05 vs. 2 mM. βP < 0,05 vs. H₂O₂.

Dazu wurden HDMEC mit Vehikel, Linalool, DTT oder H_2O_2 behandelt und mit DCFH-DA gefärbt. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse zeigte gegenüber der Kontrolle eine signifikante gesteigerte ROS Produktion in Linalool-behandelten HDMEC (*Abbildung 38A*), wobei H_2O_2 als Positivkontrolle diente. Um zu untersuchen, ob der anti-angiogene Effekt von Linalool durch die ROS Produktion vermittelt wird, wurde zur Inhibition der ROS Produktion das Reduktionsmittel DTT eingesetzt. In einem WST-1-Assay konnten bei einer Konzentration von 0,5 mM DTT keine toxischen Effekte auf HDMEC nachgewiesen werden. Die zusätzliche Behandlung der Endothelzellen mit 0,5 mM DTT führte zu einer effektiven Reduktion der Linalool- und H_2O_2 -induzierten ROS Produktion (*Abbildung 38A*). Allerdings hatte DTT keinen Effekt auf das verringerte Aussprossungsverhalten von Linalool-behandelten HDMEC Sphäroiden (*Abbildung 38B*). Dies lässt darauf schließen, dass der hemmende Effekt von Linalool auf die Angiogenese nicht durch eine gesteigerte ROS-Produktion induziert wird. Neben der Aktivierung der ROS-Produktion kann Linalool die Konzentration von intrazellulärem ATP senken. Außerdem reduziert Linalool durch Inhibition des mitochondrialen Komplex I und II die Viabilität von HepG2 Zellen [Usta *et al.*, 2009]. Da ATP als universeller Energieträger in Zellen für das Überleben, die Proliferation und Migration von Endothelzellen essentiell ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die Konzentration von intrazellulärem ATP mithilfe eines Luciferase-Assays analysiert. HDMEC, die mit 2 mM Linalool behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringerte Konzentrationen an intrazellulärem ATP (*Abbildung 38C*). Um zu untersuchen, ob der anti-angiogene Effekt von Linalool durch die Reduktion von ATP vermittelt wird, wurden HDMEC Sphäroide mit ATP behandelt. Die Zugabe von ATP wirkte dem negativen Effekt von Linalool auf die Sprosslänge entgegen (*Abbildung 38D*). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Linalool die Angiogenese durch Reduktion von intrazellulärem ATP inhibiert.

6.3.6 Wirkung von Linalool auf die Aktivität des TRPM8 Kanals

Linalool wurde bereits als Agonist des TRPM8 Kanals identifiziert [Behrendt *et al.*, 2004]. Außerdem belegen Studien einen inhibitorischen Effekt des TRPM8 Kanals auf die Adhäsion, Migration, Tube Formation und das Aussprossen von Endothelzellen [Genova *et al.*, 2017]. Der TRPM8 Kanal ist auch als cold and menthol receptor 1 (CMR1) bekannt und im Menschen für das Kälteempfinden von Bedeutung. Dieser Kanal kann durch Spannung, kalte Temperaturen oder kühlende Mittel, wie Menthol und Icilin, aktiviert werden [McKemy *et al.*, 2002; Brauchi *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2019]. Nach der Aktivierung können Kalium- und Calcium-Ionen den Kanal passieren, um verschiedene intrazelluläre Prozesse zu aktivieren [Fiorio Pla und Gkika, 2013]. Interessanterweise konnten Genova *et al.* [2017] zeigen, dass die reduzierte Motilität von Endothelzellen nicht abhängig von der Funktion der Kanalpore ist, sondern eher mit einer direkten Protein-Protein-Interaktion zusammenhängt. Daher wurde in der

vorliegenden Arbeit die Aktivität des TRPM8 Kanals in Linalool- und Menthol-behandelten HDMEC analysiert. Hierzu wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration gemessen. Menthol diente als Positivkontrolle, da es ein bekannter Agonist des TRPM8 Kanals ist.

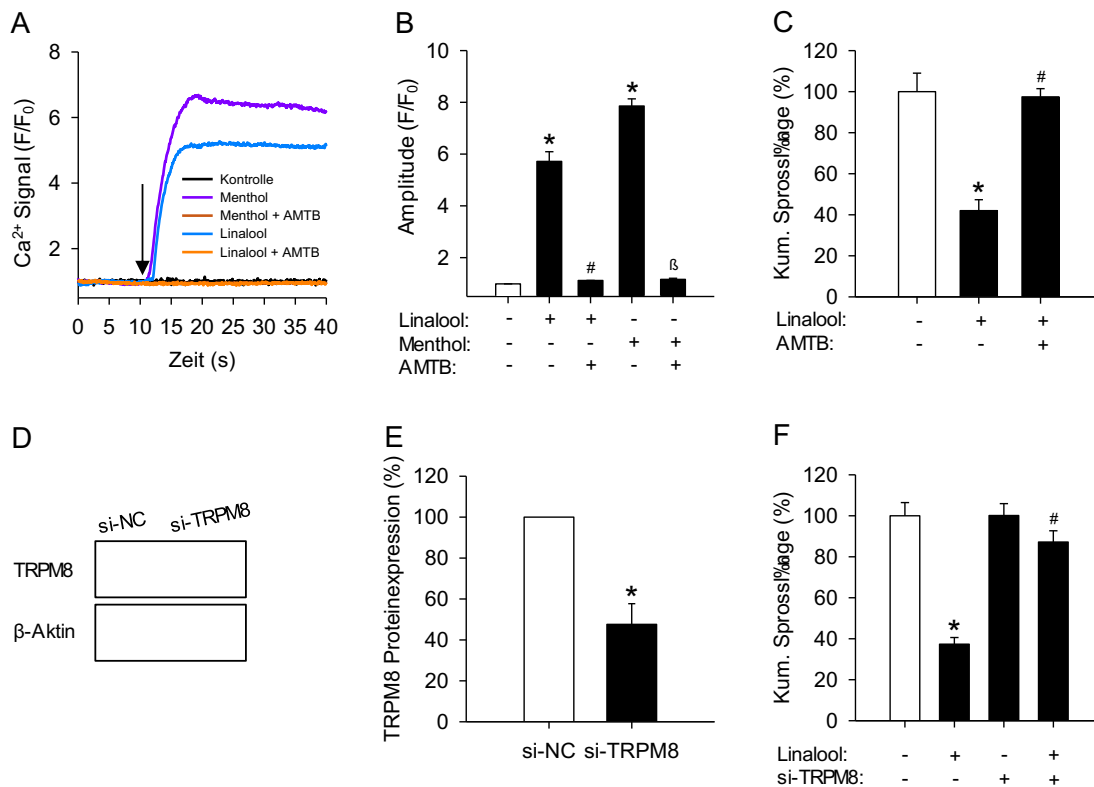


Abbildung 39: Linalool inhibiert die Angiogenese durch Aktivierung des TRPM8 Kanals. **A:** Ca²⁺-Signal (F/F₀) in HDMEC, die für 2 h mit 5 μM AMTB vorbehandelt, mit Fluo-4 AM beladen und anschließend mit 0 mM und 2 mM Linalool oder 1 mM Menthol stimuliert wurden. Der Beginn der Stimulation ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. **B:** Amplitude (F/F₀) des Ca²⁺-Signals in HDMEC, die mit AMTB vorbehandelt, mit Fluo-4 AM beladen und anschließend mit 0 mM Linalool, 2 mM Linalool oder Menthol stimuliert wurden. **C:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu 0 mM Linalool) von Linalool-behandelten HDMEC Sphäroiden, die mit 5 μM AMTB behandelt wurden (n = 10). **D:** Western Blot-Analyse der Expression von TRPM8 und β-Aktin in HDMEC, die zuvor für 48 h mit 120 nM si-NC oder si-TRPM8 transfiziert wurden. **E:** Expression von TRPM8/β-Aktin (in % von si-NC), (n = 3). **F:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu 0 mM Linalool) von HDMEC Sphäroiden bestehend aus si-NC- oder si-TRPM8-transfizierten Zellen, die für 24 h mit 0 mM oder 2 mM Linalool behandelt wurden (n = 10). Mittelwerte ± SEM. *P < 0,05 vs. 0 mM Linalool oder si-NC. #P < 0,05 vs. 2 mM Linalool. §P < 0,05 vs. Menthol.

Im Rahmen dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass Menthol den Einstrom von Ca²⁺-Ionen in HDMEC signifikant steigert (Abbildung 39A und B). Durch Linalool kam es ebenfalls zu einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Abbildung 39A und B). Um zu untersuchen, ob Linalool tatsächlich den Einstrom von Ca²⁺-Ionen durch Aktivierung des TRPM8 Kanals induziert, wurde der spezifische TRPM8-Inhibitor AMTB verwendet. In einem WST-1-Assay konnten bei einer Konzentration von 5 μM AMTB keine toxischen Effekte auf die Viabilität von HDMEC nachgewiesen werden. Die Inhibition des durch Menthol aktivierten TRPM8 Kanals mit AMTB verhinderte den Einstrom von Ca²⁺-Ionen (Abbildung 39A und B). Durch eine gleichzeitige Behandlung der HDMEC mit Linalool und AMTB konnte die erhöhte intrazelluläre

Ca²⁺-Konzentration in den Zellen ebenfalls völlig aufgehoben werden (*Abbildung 39A und B*). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Linalool zu einer Aktivierung des TRPM8 Kanals in HDMEC führt.

Um zu untersuchen, ob der anti-angiogene Effekt von Linalool durch Aktivierung des TRPM8 Kanals vermittelt wird, wurde dieser mit AMTB und einer siRNA (si-TRPM8) geblockt. Western Blot-Analysen von si-TRPM8-transfizierten HDMEC ergaben im Vergleich zur Kontrolle eine um 52 % verringerte Expression von TRPM8 (*Abbildung 39D und E*). Die Behandlung mit Linalool führte zu einer erniedrigten kumulativen Sprosslänge von HDMEC Sphäroiden. Durch Inhibition des TRPM8 Kanals mithilfe von AMTB oder einer siRNA konnte dieser hemmende Effekt aufgehoben werden (*Abbildung 39C und F*). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Linalool die Angiogenese durch Aktivierung des TRPM8 Kanals inhibiert.

6.3.7 Zusammenhang zwischen ERK-Phosphorylierung, Reduktion von intrazellulärem ATP und Aktivierung des TRPM8 Kanals

Die zuvor gezeigten Ergebnisse belegen, dass Linalool die Angiogenese durch Steigerung der ERK-Phosphorylierung, Reduktion von intrazellulärem ATP und Aktivierung des TRPM8 Kanals inhibiert. Um den Zusammenhang zwischen diesen drei Mechanismen zu analysieren, wurde die Proteinexpression von phosphoryliertem ERK in Linalool-behandelten HDMEC, die mit AMTB oder ATP vorbehandelt wurden, untersucht. Western Blot-Analysen konnten nachweisen, dass eine Vorbehandlung mit ATP der Linalool-induzierten ERK-Phosphorylierung vollständig entgegenwirkt (*Abbildung 40A und B*). Dies konnte jedoch nicht durch eine Behandlung mit AMTB erzielt werden (*Abbildung 40A und B*). Des Weiteren wurde die Konzentration von intrazellulärem ATP in Linalool-behandelten HDMEC, die zusätzlich mit AMTB oder PD0325901 inkubiert wurden, analysiert. Dabei konnte weder AMTB noch PD0325901 die durch Linalool verringerte intrazelluläre ATP-Konzentration verändern (*Abbildung 40C*). Außerdem wurde die Aktivität des TRPM8 Kanals in Linalool-stimulierten HDMEC untersucht, die zusätzlich eine Vorbehandlung mit PD0325901 erhielten. Durch die Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition von ERK mit PD0325901 keinen Einfluss auf den Linalool-induzierten Einstrom von Ca²⁺-Ionen hatte (*Abbildung 40D und E*). Daraus kann geschlossen werden, dass die Linalool-induzierte ERK-Phosphorylierung einerseits von der intrazellulären ATP-Konzentration abhängig ist. Andererseits erfolgt die Aktivierung des TRPM8 Kanals unabhängig davon.

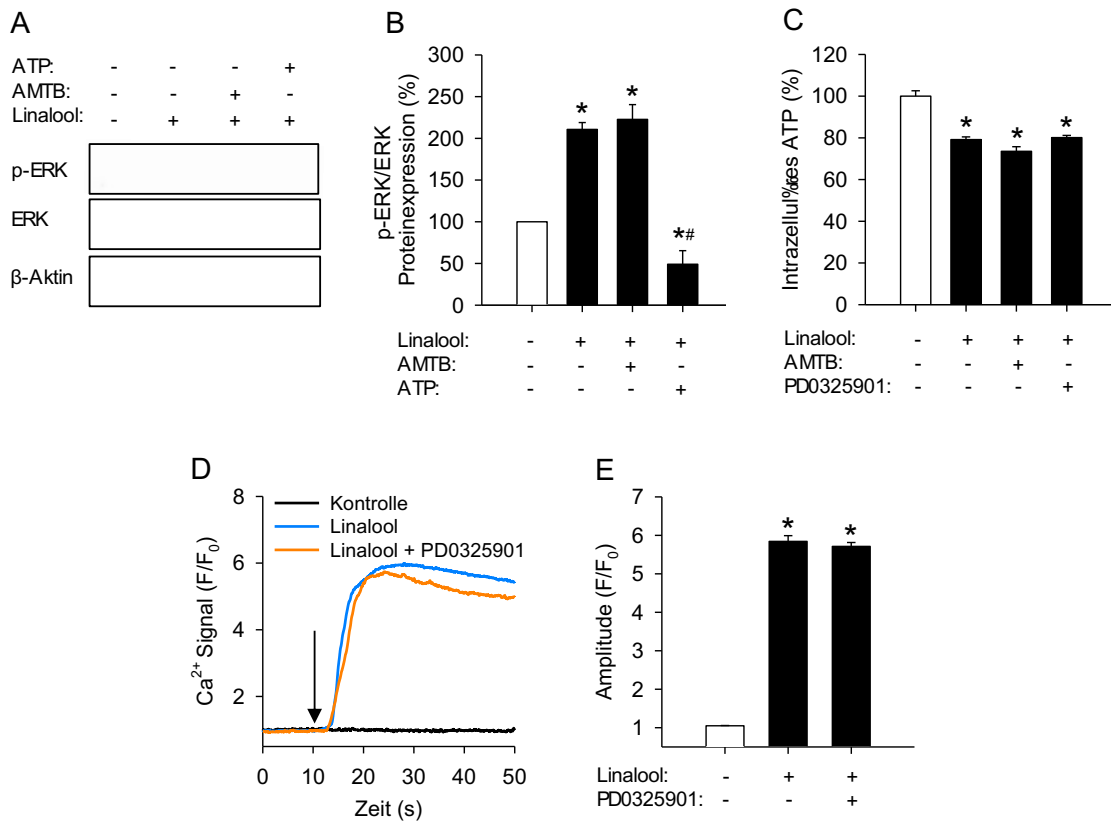


Abbildung 40: ATP wirkt unabhängig von einer TRPM8 Aktivierung der Linalool-induzierten Phosphorylierung von ERK entgegen. **A:** Western Blot-Analyse der Expression von p-ERK, ERK und β -Aktin in Linalool-behandelten HDMEC, die für 2 h mit 5 μ M AMTB oder 1 mM ATP vorbehandelt wurden. **B:** Quantitative Analyse der Expression von p-ERK/ERK normiert auf β -Aktin (in % zu 0 mM) ($n = 3$). **C:** Intrazelluläres ATP in Linalool-behandelten HDMEC, die mit 5 μ M AMTB oder 1 μ M PD0325901 behandelt wurden. Die Messung erfolgte mithilfe von Luciferase-Assays ($n = 4$). **D:** Ca^{2+} -Signal (F/F_0) in HDMEC, die für 2 h mit 1 μ M PD0325901 vorbehandelt, mit Fluo-4 AM beladen und anschließend mit 0 mM oder 2 mM Linalool stimuliert wurden. Der Beginn der Stimulation ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. **E:** Amplitude (F/F_0) des Ca^{2+} -Signals in HDMEC, die mit PD0325901 vorbehandelt, mit Fluo-4 AM beladen und anschließend mit 0 mM oder 2 mM Linalool stimuliert wurden. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. 0 mM Linalool. # $P < 0,05$ vs. 2 mM Linalool.

6.3.8 Anti-angiogene Mediatoren der Linalool-induzierten ERK-Phosphorylierung

Vorangegangene Studien belegen bereits, dass eine Translokation von phosphoryliertem ERK in den Nukleus stattfindet, um dort mit hunderten weiteren Signalmolekülen zu interagieren. Viele davon haben eine wichtige Bedeutung bei physiologischen Prozessen, wie Zellproliferation, -migration, -überleben und -tod [Liu *et al.*, 2018]. Um die anti-angiogenen Mediatoren der Linalool-induzierten ERK-Phosphorylierung zu identifizieren, wurde die Expression von elf Proteinen, die in die Angiogenese involviert sind, analysiert. Dazu wurden die Proteine aus Linalool- oder Vehikel-behandelten HDMEC extrahiert und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Zu den getesteten Proteinen gehörten BMP-2, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), CDK6, CDK9, cyclooxygenase-2 (COX-2), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), p21, Ras homolog family member A (RhoA), SIRT1 und VEGFA.

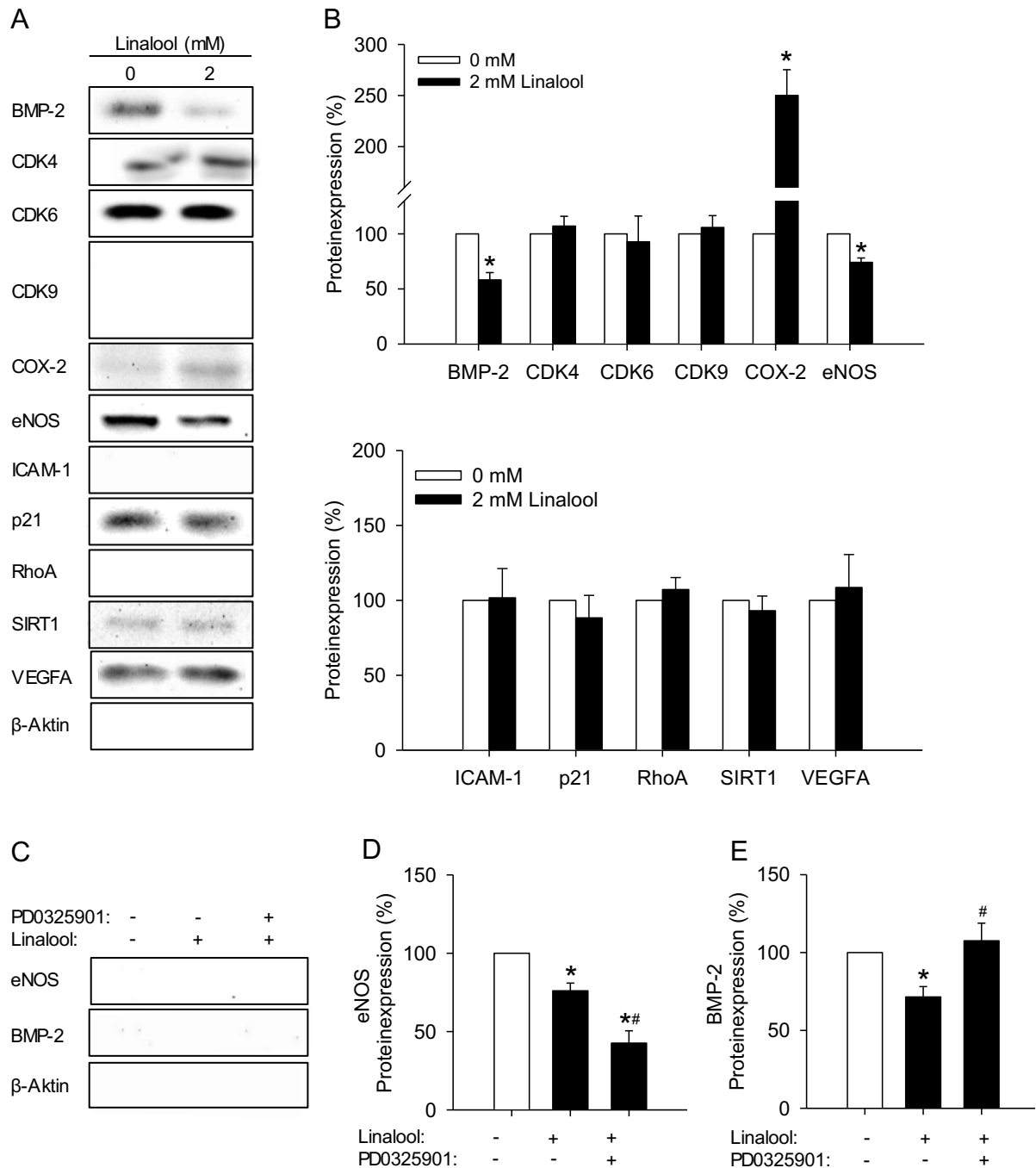


Abbildung 41: Linalool reduziert die Expression von BMP-2 durch die Phosphorylierung von ERK. A: Western Blot-Analyse der Expression von BMP-2, CDK4, CDK6, CDK9, COX-2, eNOS, ICAM-1, p21, RhoA, SIRT1, VEGFA und β -Aktin in HDMEC, die für 30 min mit 0 mM und 2 mM Linalool behandelt wurden. **B:** Quantitative Analyse der verschiedenen Expressionen normiert auf β -Aktin (in % zu 0 mM) ($n = 3-4$). **C:** Western Blot-Analyse der Expression von eNOS, BMP-2 und β -Aktin in Linalool-behandelten HDMEC, die für 2 h mit 1 μ M PD0325901 vorbehandelt wurden. **D, E:** Expression von eNOS/ β -Aktin (**D**) und BMP-2/ β -Aktin (**E**) (in % zu 0 mM Linalool) ($n = 4$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. 0 mM Linalool. # $P < 0,05$ vs. 2 mM Linalool.

Dabei zeigte sich, dass eine Behandlung mit Linalool lediglich zu einer reduzierten Proteinexpression von BMP-2 und eNOS führte, während COX-2 hochreguliert wurde (Abbildung 41A und B). Weiterhin wurde analysiert, ob die verringerte Expression von BMP-2 und eNOS mit der erhöhten ERK-Phosphorylierung zusammenhängt. Dazu wurde die

Expression der beiden Proteine in Linalool- und Vehikel-behandelten HDMEC untersucht, die zusätzlich mit PD0325901 inkubiert wurden. Diese Analyse ergab, dass die Linalool-induzierte Reduktion von BMP-2, aber nicht von eNOS, durch Inhibition von ERK mit PD0325901 komplett aufgehoben werden kann (*Abbildung 41C-E*).

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Linalool-induzierte Phosphorylierung von ERK zu einer Herunterregulierung von BMP-2 führt, was die inhibierende Wirkung von Linalool auf die Angiogenese vermittelt.

6.3.9 Anti-angiogene Mediatoren der Linalool-induzierten TRPM8 Aktivierung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Linalool zu einer Aktivierung des TRPM8 Kanals führt, was einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in Endothelzellen zur Folge hat. Um zu untersuchen, ob die anti-angiogene Wirkung von Linalool von einem TRPM8-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom abhängig ist, wurde der selektive Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM verwendet. Die Wirkung von BAPTA-AM auf die Viabilität von HDMEC wurde zunächst in einem WST-1-Assay ermittelt. Dabei erwies sich eine Konzentration von 2,5 μM BAPTA-AM als nicht toxisch und wurde in den anschließenden Analysen verwendet. Durch eine Behandlung der HDMEC mit BAPTA-AM konnte eine vollständige Reduktion des Linalool-induzierten Ca^{2+} -Einstroms erzielt werden (*Abbildung 42A und B*). Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung von HDMEC Sphäroiden mit BAPTA-AM keinen Einfluss auf die durch Linalool verringerte kumulative Sprosslänge (*Abbildung 42C*). Diese Daten weisen darauf hin, dass Linalool die Angiogenese unabhängig von der Kanalfunktion inhibiert.

Genova *et al.* [2017] zeigten in ihrer Studie, dass der TRPM8 Kanal die Adhäsion von Endothelzellen durch eine Inaktivierung des $\beta 1$ Integrin/FAK Signalweges inhibiert. Daher sollte auch in dieser Arbeit die Aktivität von $\beta 1$ Integrin sowie die Phosphorylierung von FAK in Endothelzellen untersucht werden. Hierfür wurden HDMEC mit Linalool und AMTB behandelt. Durchflusszytometrische Analysen konnten nachweisen, dass eine Behandlung mit Linalool zu einer Reduktion der $\beta 1$ Integrin-Aktivität um 34 % führt, was wiederum durch eine Inhibition des TRPM8 Kanals vollständig aufgehoben wurde (*Abbildung 42D*). Western Blot-Analysen von Linalool-behandelten HDMEC zeigten eine Hemmung der FAK-Phosphorylierung um 30 %. Eine zusätzliche Behandlung mit AMTB konnte diesem Effekt entgegenwirken (*Abbildung 42E und F*). Somit lässt sich schließen, dass die Linalool-induzierte Aktivierung des TRPM8 Kanals zu einer Inhibition des $\beta 1$ Integrin/FAK-Signalweges führt, was die hemmende Wirkung von Linalool auf die Angiogenese vermittelt.

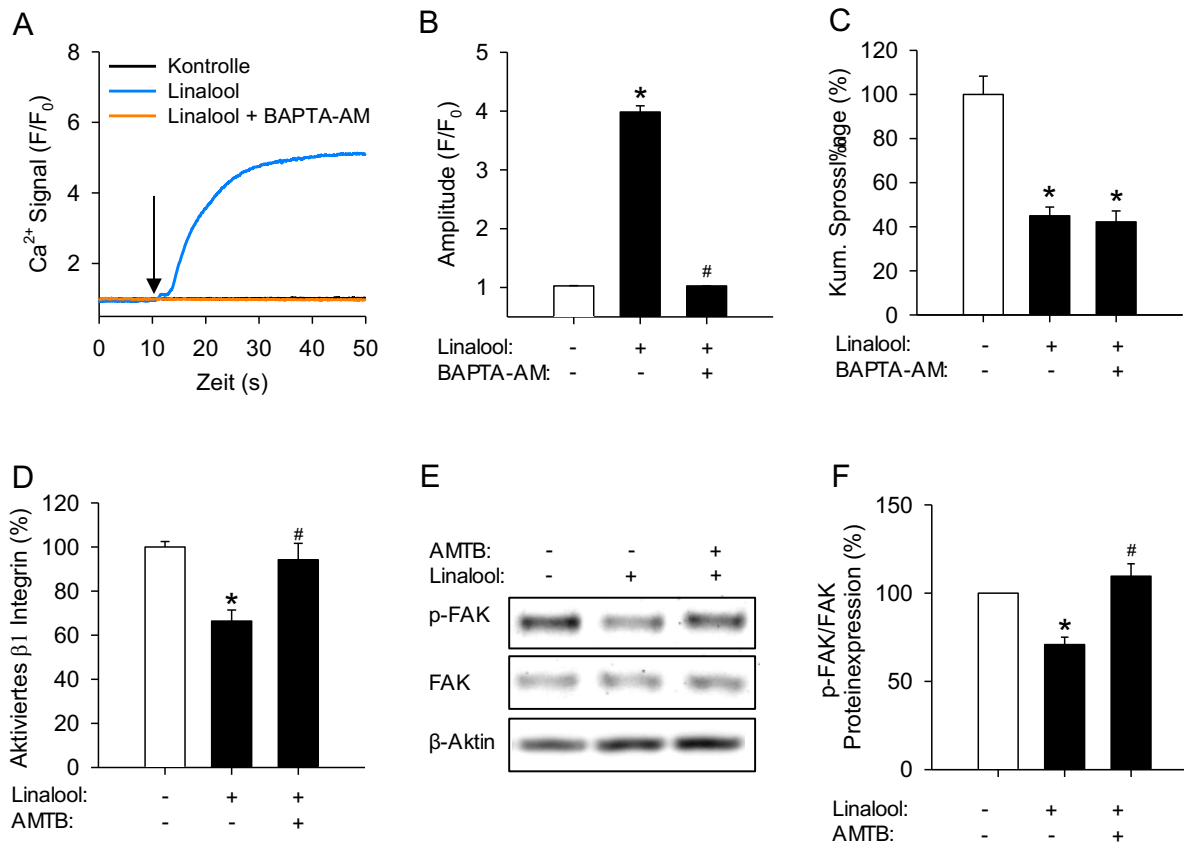


Abbildung 42: Linalool inhibiert den $\beta 1$ Integrin/FAK-Signalweg durch Aktivierung von TRPM8. **A:** Ca^{2+} -Signal (F/F_0) in HDMEC, die für 2 h mit $2,5 \mu\text{M}$ BAPTA-AM vorbehandelt, mit Fluo-4 AM beladen und anschließend mit 0 mM oder 2 mM Linalool stimuliert wurden. Der Beginn der Stimulation ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. **B:** Amplitude (F/F_0) des Ca^{2+} -Signals in HDMEC, die mit BAPTA-AM vorbehandelt, mit Fluo-4 AM beladen und anschließend mit 0 mM oder 2 mM Linalool stimuliert wurden. **C:** Kumulative (Kum.) Sprosslänge (in % zu 0 mM Linalool) von HDMEC Sphäroiden, die für 24 h mit 0 mM oder 2 mM Linalool und $2,5 \mu\text{M}$ BAPTA-AM behandelt wurden ($n = 10$). **D:** Aktiviertes $\beta 1$ Integrin (in % von 0 mM Linalool) in Linalool-behandelten HDMEC, die für 2 h mit $5 \mu\text{M}$ AMTB vorbehandelt wurden. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie ($n = 3$). **E:** Western Blot-Analyse der Expression von p-FAK, FAK und β -Aktin in Linalool-behandelten HDMEC, die für 2 h mit $5 \mu\text{M}$ AMTB vorbehandelt wurden. **F:** Expression von p-FAK/FAK normiert auf β -Aktin (in % zu 0 mM Linalool) ($n = 4$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. 0 mM Linalool. # $P < 0,05$ vs. 2 mM Linalool.

6.3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im dritten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Linalool auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen analysiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass Linalool *in vitro* und *in vivo* die Angiogenese hemmt. Diese Effekte werden durch Aktivierung unterschiedlicher voneinander unabhängiger Signalwege vermittelt. Dabei reduziert Linalool einerseits intrazelluläres ATP und steigert die Phosphorylierung von ERK, wodurch die Expression von BMP-2 erniedrigt wird. Andererseits aktiviert Linalool den TRPM8 Kanal, was eine Hemmung der $\beta 1$ Integrin-Aktivität und eine Stimulation der FAK-Phosphorylierung zur Folge hat und schließlich zur Inhibition der Angiogenese führt (Abbildung 43).

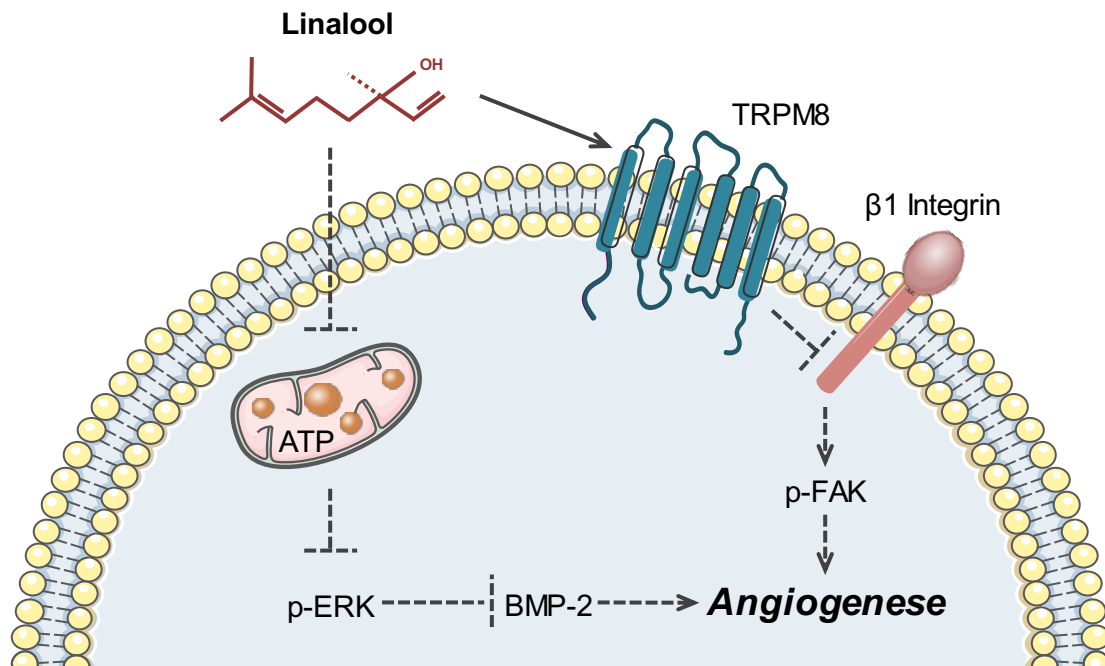


Abbildung 43: Regulatorische Funktion von Linalool auf die Angiogenese. Linalool inhibiert die Angiogenese über zwei unabhängige Signalwege. Die anti-angiogene Wirkung von Linalool wird zum einen über eine Reduktion von intrazellulärem ATP, Stimulation der Phosphorylierung von ERK und Inhibition der Expression von BMP-2 vermittelt. Auf der anderen Seite kann durch Linalool eine Aktivierung des TRPM8 Kanals erfolgen, was zu einer Reduktion des aktiven $\beta 1$ Integrins und der Expression von phosphoryliertem FAK führt und letztendlich die Angiogenese von Endothelzellen hemmt (erstellt mithilfe von Servier Medical Art).

7 Diskussion

7.1 Effekte der miR-370 auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen

Die miR-370 ist auf der delta-like homolog 1-iodothyronine deiodinase 3 (DLK1-DIO3) Region des humanen Chromosoms 14 (14q32) lokalisiert [Benetatos *et al.*, 2013]. Bisher wurden die Funktionen dieser miRNA hauptsächlich im Zusammenhang mit Krebs analysiert. Interessanterweise kann die miR-370 das Tumorstadium sowohl fördern als auch hemmen, indem sie die Proliferation, Apoptose und Migration von Tumorzellen steuert [Lo *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014]. Wu *et al.* [2012] berichteten, dass die miR-370 eine wichtige Funktion bei humanem Prostatakrebs hat. Dabei wurde eine erhöhte Expression der miRNA in fünf verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien im Vergleich zu normalen Prostatazellen detektiert. In weiteren Untersuchungen führte eine Überexpression der miR-370 zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen, was durch eine direkte Inhibition des Tumorsuppressors FOXO1 induziert wurde [Wu *et al.*, 2012]. Im Gegensatz dazu erwies sich die miR-370 in einer anderen Studie bei akuter myeloischer Leukämie (AML) als Tumorsuppressor. Hier wurde eine verminderte Expression der miR-370 sowohl in Leukämiezellen als auch in Patientenproben mit AML nachgewiesen. Durch mechanistische Analysen konnte gezeigt werden, dass die miR-370 in diesem Fall ein anderes Mitglied der FOX-Familie *forkhead Box M1* (FOXO1) inhibiert. Dieser Transkriptionsfaktor ist ein bekanntes Onkogen und fördert die Progression des Zellzyklus [Zhang *et al.*, 2012].

Die miR-370 wird nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in verschiedenen Endothelzelltypen einschließlich HUVEC und retinalen Endothelzellen exprimiert [Wang und Chen, 2017]. Ihre Funktion auf die Angiogenese und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen wurden allerdings bisher noch nicht analysiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen erstmalig einen hemmenden Effekt der miR-370 auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen verschiedenen Ursprungs. Außerdem wurde eine stark erhöhte Expression der miR-370 in HUVEC und HDMEC im Vergleich zu anderen humanen Primärzellen nachgewiesen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen weiterer Studien, die sich mit der Expressionsanalyse von miRNAs beschäftigten. Dabei konnten 27 miRNAs mit einer erhöhten Expression in HUVEC nachgewiesen werden [Poliseno *et al.*, 2006]. Zusätzlich wurden weitere 200 miRNAs identifiziert, die in Endothelzellen exprimiert werden könnten [Heusschen *et al.*, 2010].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der miR-370 auf das Aussprossen von HUVEC- und HDMEC-Sphäroiden untersucht. Der 3D-Sphäroid-Sprouting-Assay ist eine häufig verwendete *in vitro* Methode, um die Wirkung von pro- oder anti-angiogenen Faktoren zu analysieren [Heiss *et al.*, 2015]. Interessanterweise konnte mithilfe dieses Assays

nachgewiesen werden, dass die miR-370 nicht nur die Sprosslänge von HDMEC Sphäroiden, sondern auch von HUVEC Sphäroiden signifikant inhibiert. Diese Resultate zeigen, dass die anti-angiogene Wirkung der miR-370 in verschiedenen Endothelzelltypen reproduzierbar ist. Da die Entwicklung neuer Blutgefäße jedoch typischerweise in der Mikrozirkulation stattfindet, wurden für die weiteren Analysen dieser Arbeit HDMEC aus Kapillargefäßen der Haut und nicht HUVEC aus der Nabelschnurvene verwendet.

Die Reproduzierbarkeit der anti-angiogenen Funktion der miR-370 auf Endothelzellen verschiedenen Ursprungs kann auch mithilfe der Daten des hier durchgeführten Aorten-Ring-Assays gestützt werden. Dieser Assay erlaubt die Analyse der Proliferation, Migration und Tube Formation von Endothelzellen sowie die Reifung kleiner Gefäße [Nicosia, 2009]. Dabei konnte bereits nachgewiesen werden, dass sowohl Endothelzellen aus der äußeren Schicht (*Tunica externa*) als auch aus der inneren Schicht (*Tunica intima*) der Aorten-Ringe aussprossen [Nicosia, 2009]. Ein Vorteil dieses *ex vivo* Assays gegenüber *in vitro* Experimenten mit reinen Endothelzellen ist die Nachahmung einer physiologischen *in vivo* Umgebung, die das Aussprossen von Endothelzellen aus den Aorten-Ringen in Anwesenheit aller beteiligten Zellen, wie glatten Muskelzellen, Perizyten, Makrophagen und Fibroblasten, ermöglicht [Nicosia, 2009]. Zudem werden die nativen Endothelzellen der Aorten-Ringe nicht durch wiederholtes Kultivieren modifiziert und befinden sich in einem inaktiven Zustand, wenn sie in das Matrigel inkorporiert werden [Staton *et al.*, 2009]. Die Ergebnisse des hier durchgeführten Aorten-Ring-Assays zeigten ebenfalls ein reduziertes Aussprossen von Endothelzellen murinen Ursprungs. Dabei konnten allerdings nur signifikante Effekte in Aorten-Ringen, die mit Konzentrationen von 50 nM miR-370m und 1,5 µM miR-370i transfiziert wurden, nachgewiesen werden. Diese Konzentrationen sind 10-15-fach höher als diejenigen, die für die Transfektion von HDMEC bei anderen *in vitro* Analysen notwendig waren. Ein Grund dafür könnte die geringere Transfektionseffizienz bei der Verwendung von nativem Gewebe gegenüber eines einschichtigen Zellrasens sein.

In einem *in vivo* Matrigel-Plug-Assay konnten die *in vitro* Daten der vorliegenden Arbeit zusätzlich validiert werden. Dieser Assay ist sehr zuverlässig und wird häufig für die Analyse pro- oder anti-angiogener Faktoren verwendet [Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018]. Dabei führte eine Überexpression der miR-370 in HDMEC zu einer effektiven Reduktion der Blutgefäßneubildung, was anhand der geringeren Dichte CD31-positiver Gefäße in den implantierten Matrigel-Plugs gezeigt werden konnte. Die Analyse dieses Parameters ist präziser als die Detektion des Plasmavolumens oder der Gesamtmenge an Hämoglobin in den Plugs, da diese Parameter von der Größe der Plugs abhängig sind [Auerbach *et al.*, 2003].

Im Rahmen der hier durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte eine potente anti-angiogene Funktion der miR-370 auf die Angiogenese nachgewiesen werden. Durch eine Analyse intrazellulärer Signalwege sollte im Anschluss aufgeklärt werden, wie diese anti-angiogene Wirkung vermittelt werden.

Der PI3K/AKT/mTOR Signalweg ist nicht nur für die Entwicklung von Tumoren und eine Vielzahl zellulärer Funktionen von Bedeutung, sondern auch für die Angiogenese essentiell [Karar und Maity, 2011]. Dabei wird AKT durch einen PI3K-vermittelten second messenger aktiviert, was wiederum zur Phosphorylierung von mTOR führt und die Expression angiogener Faktoren erhöht [Karar und Maity, 2011]. Neben diesem Signalweg hat auch der Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg eine wichtige Rolle in Endothelzellen [Guo *et al.*, 2020]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Effekte der miR-370 auf diese beiden zentralen Signalwege genauer untersucht.

Mechanistische Analysen zeigten, dass die miR-370 den AKT/mTOR Signalweg inhibiert und die Phosphorylierung von ERK und p38 steigert, jedoch keinen Effekt auf die Phosphorylierung von FAK hat. Eine Inhibition von AKT durch MK-2206 wirkte dem gesteigerten Aussprossen von miR-370i-transfizierten HDMEC Sphäroiden entgegen. Im Gegensatz dazu hatte eine Inhibition von ERK mittels U0126 und von p38 durch SB203580 keinen Einfluss auf die signifikant verminderte Sprosslänge von miR-370m-transfizierten HDMEC Sphäroiden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die anti-angiogene Wirkung der miR-370 hauptsächlich durch eine Hemmung des AKT/mTOR Signalweges vermittelt wird.

Um die angiogenen Targets der miR-370 zu identifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit potenzielle humane Gene, die Bindestellen in ihrer 3'-UTR für die miR-370 aufweisen, analysiert. In einem Luciferase-Assay konnte SMO als direktes Target der miR-370 verifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches die Membran sieben Mal durchquert [Briscoe und Therond, 2013]. Es ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR), der im Hedgehog (Hh)-Signalweg die Transduktion von Signalen steuert. SMO kann durch die Bindung von drei unterschiedlichen Hh Proteinen (Shh, Indian Hh und Desert Hh) an deren Rezeptor PTCH1 aktiviert werden [Ingham und McMahon, 2001]. PTCH1 ist ein Rezeptor, der aus 12 Transmembrandomänen besteht und SMO in einem inaktiven Zustand hält [Wilson und Chuang, 2010]. Durch die Aktivierung von SMO kommt es zu einer Heterodimerisierung von Gi-Proteinen, was wiederum den Transkriptionsfaktor Gli aktiviert und folglich zur Expression von Gli-abhängigen Genen führt [Riobo *et al.*, 2006; Wilson und Chuang, 2010].

Die Ergebnisse des ersten Studienabschnittes dieser Arbeit zeigten, dass eine Inhibition von SMO mittels siRNA die Phosphorylierung von AKT und mTOR in HDMEC reduziert. Dies deutet auf eine wichtige regulatorische Funktion von SMO im AKT/mTOR Signalweg hin.

Dementsprechend führte eine Inhibition von SMO auch zu einer verringerten Viabilität und Migration von HDMEC, wohingegen die Bildung endothelialer Tubes gesteigert wurde.

In weiteren Western Blot- und qRT-PCR-Analysen wurde die Funktion der miR-370 auf die Expression von Shh untersucht. Die Transfektion mit miR-370m führte weder zu einer Änderung der Protein- noch mRNA-Expression von Shh. Obwohl SMO durch Shh aktiviert wird und als Hauptvermittler des Hh-Signalweges gilt, zeigen die Daten dieser Arbeit, dass SMO und Shh die Endothelzellen auf unterschiedliche Weise regulieren können. Dies wurde auch in anderen Studien berichtet, die zwar einen Effekt von Shh auf die Tube Formation, aber nicht auf die Proliferation von Endothelzellen nachweisen konnten [Chinchilla *et al.*, 2010; Renault *et al.*, 2010]. Dabei zeigte sich, dass die erhöhte Ausbildung endothelialer Tubes nicht über den klassischen Signalweg gesteuert wird, also unabhängig vom Gli-Transkriptionsfaktor ist. Es wird davon ausgegangen, dass die induzierte angiogene Aktivität der Endothelzellen eher über die Rho-Kinase vermittelt wird [Chinchilla *et al.*, 2010; Renault *et al.*, 2010].

Außerdem wurde untersucht, ob die miR-370 die Angiogenese durch direkte Bindung von SMO inhibiert und so dessen Expression verringert. Dazu wurden miR-370i-transfizierte HDMEC mit dem SMO Inhibitor Cyclopamin behandelt. Dieser chemische Inhibitor wurde anstelle einer siRNA eingesetzt, da die Effizienz bei einer Co-Transfektion von miR-370i und si-SMO in HDMEC zu gering gewesen wäre. Eine Behandlung von miR-370i-transfizierten HDMEC mit Cyclopamin wirkte der gesteigerten Proliferation und Migration entgegen, zeigte jedoch keinen Effekt auf die Tube Formation. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Inhibition von SMO eher die hemmende Wirkung der miR-370 auf die Proliferation und Migration von HDMEC vermittelt.

Um herauszufinden, durch welche Mediatoren die miR-370 die Tube Formation von HDMEC reguliert, wurden weitere validierte Targets dieser miRNA, die mit der Angiogenese assoziiert sind, aus der Literatur identifiziert. Dabei konnten sechs Kandidaten gefunden werden und es wurde mittels qRT-PCR gezeigt, dass lediglich die Expression von BMP-2 in miR-370m-transfizierten HDMEC herunterreguliert ist.

BMP-2 ist ein Mitglied der TGF- β Familie. Seine Effekte werden über die Bindung an Serin/Threonin Kinase-gekoppelte Rezeptorkomplexe vermittelt [David *et al.*, 2009]. Diese bestehen aus einem Typ IA oder Typ IB und einem Typ IIB Rezeptor. Durch Bindung von BMP-2 an den Rezeptorkomplex wird dieser aktiviert und phosphoryliert mothers against decapentaplegic homolog (Smad) 1/5/8, welches dann mit Smad 4 interagiert [Miyazono *et al.*, 2005]. Smad4 wird anschließend in den Nukleus transloziert und fungiert dort als Transkriptionsfaktor zur Regulation der Genexpression [Miyazono *et al.*, 2005]. Auf der anderen Seite kann BMP-2 aber auch den c-Jun-N-terminalen Kinase- (JNK) und p38-MAPK-Signalweg aktivieren [Massague, 2003; David *et al.*, 2009]. Neben seiner stimulierenden Wirkung auf die Entwicklung von Knorpel- und Knochengewebe [Salazar *et al.*, 2016] ist BMP-

2 auch an der Regulation der Angiogenese beteiligt. So zeigen Mäuse mit einer Mutation in Genen, die für BMP-Liganden und -Rezeptoren kodieren, Abnormalitäten bei der kardiovaskulären Entwicklung [Chang *et al.*, 2002]. Zudem berichteten Raida *et al.* [2005], dass BMP-2 keinen Effekt auf die Proliferation von HDMEC hat, aber die Bildung endothelialer Tubes in einem Matrigel-Assay fördert. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die Wirkung von BMP-2 auf die Tube Formation von HDMEC untersucht. Übereinstimmend mit den Daten der vorherigen Studie, wurde ein dosisabhängiger Effekt von BMP-2 auf die Tube Formation von HDMEC gefunden. Die Proliferation und Migration der Endothelzellen wurde dagegen durch BMP-2 nicht beeinflusst.

Anschließend wurden miR-370m-transfizierte HDMEC mit BMP-2 behandelt. Die Transfektion von HDMEC mit miR-370m führte zu einer reduzierten Tube Formation, was durch eine Behandlung mit BMP-2 aufgehoben werden konnte. Eine Inhibition von BMP-2 mit NAb in miR-370i-transfizierten HDMEC hingegen reduzierte die erhöhte Tube Formation durch Transfektion mit miR-370i. Diese Daten belegen, dass der hemmende Effekt der miR-370 auf die Tube Formation durch die Inhibition von BMP-2 vermittelt wird.

Zusammenfassend konnte im ersten Studienabschnitt dieser Arbeit gezeigt werden, dass die miR-370 ein wirksamer Inhibitor der Angiogenese ist. Dabei wird der AKT/mTOR Signalweg durch die direkte Bindung der miRNA an die 3'-UTR von SMO gehemmt. Folglich werden sowohl die Proliferation als auch die Migration von Endothelzellen unterdrückt. Zusätzlich hemmt die miR-370 die Expression von BMP-2, was zu einer reduzierten Tube Formation mikrovaskulärer Endothelzellen führt. Insgesamt verhindern diese Effekte die Entwicklung neuer Blutgefäße.

7.2 Regulation der miR-186 und deren Funktion auf die Angiogenese

Die miR-186 wurde 2003 erstmals in der humanen Osteosarkom-Zelllinie SaOS-2 identifiziert und ist auf dem Chromosom 1q31.1 innerhalb des *zinc finger RANBP2-type containing 2* (ZRANB2) Gens lokalisiert [Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2012]. Die Funktion der miR-186 wurde bereits ausgiebig in Tumorzellen analysiert [Xiang *et al.*, 2020]. Beispielsweise konnten verschiedene Studien ihre inhibierende Wirkung auf die Proliferation, Migration, Invasion und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika von NSCLC nachweisen [Ye *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020]. Dies zeigt, dass diese miRNA ein vielversprechendes Target für die Krebstherapie sein könnte. Aufgrund der unterschiedlichen Expression der miR-186 in Tumorgewebe und Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Blut, Plasma, Urin oder Sputum von Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, könnte sie auch als Biomarker für die Diagnose von Krebs herangezogen werden [Xiang *et al.*, 2020]. Jedoch ist die Funktion der miR-186 auf die Aktivität von Endothelzellen, die eine entscheidende Komponente des Tumormikromilieus darstellen, noch ungeklärt.

Laut der globalen Statistik für Krebserkrankungen (GLOBOCAN 2020) ist Lungenkrebs die zweithäufigste Krebsart weltweit und im Jahr 2020 die häufigste Todesursache bei Krebspatienten [Sung *et al.*, 2021]. Neben kleinzelligem (SCLC) Lungenkrebs ist NSCLC für 85 % aller Fälle verantwortlich ist [Zappa und Mousa, 2016]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der miR-186 in Endothelzellen untersucht, die aus humanem NSCLC Gewebe und entsprechendem gesunden Normalgewebe isoliert wurden. Interessanterweise war die Expression der endothelialen miR-186 des Tumorgewebes im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Weitere *in vitro* Analysen zeigten, dass eine Co-Kultivierung von HDMEC mit humanen NCI-H460 Zellen zu keiner Veränderung der miR-186 Expression führte. Diese Ergebnisse stimmen mit einer vorherigen Studie überein, die eine konstante Expression der miR-186 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns nachweisen konnte, welche mit der humanen Glioblastomzelllinie U87 co-kultiviert wurden [Wurdinger *et al.*, 2008]. Somit kann geschlossen werden, dass die Inhibition der endothelialen miR-186 nicht durch direkten Kontakt mit Tumorzellen induziert wird. Weitere Untersuchungen konnten diese Vermutung bestätigen, da eine Stimulation von HDMEC mit den pro-angiogenen Faktoren VEGF, bFGF, EGF, TNF α und IL-6, die von Tumorzellen sekretiert werden, auch keinen Einfluss auf die Expression der endothelialen miR-186 zeigten [Jiang *et al.*, 2020; Saman *et al.*, 2020].

Für das Wachstum sowie für die Angiogenese und Metastasierung von Tumoren ist Hypoxie ein kritischer Faktor. Ein wachsender Tumor muss durch Bildung neuer Blutgefäße seine Sauerstoffversorgung sichern [Liao und Johnson, 2007; Jing *et al.*, 2019]. Dabei wird der Transkriptionsfaktor HIF1 α aktiviert und die Expression pro-angiogener Faktoren hochreguliert, was zur Stimulation von Endothelzellen führt [Krock *et al.*, 2011]. Vorherige Studien konnten bereits nachweisen, dass HIF1 α ein positiver Regulator der Tumorangio- und Tumorentstehung, des Tumorwachstums sowie der Tumorprogression und Metastasierung ist [Maxwell *et al.*, 1997; Liao *et al.*, 2007].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob hypoxische Bedingungen die verringerte Expression der endothelialen miR-186 induzieren. Hierfür erfolgte eine 24-stündige Inkubation von HDMEC unter Normoxie und Hypoxie. Dabei wurde eine Reduktion der miR-186 Expression in den Endothelzellen festgestellt, die einer Hypoxie ausgesetzt waren. Eine aktuelle Studie konnte ebenfalls nachweisen, dass die miR-186 Expression in HUVEC durch Hypoxie gehemmt wird [Zheng *et al.*, 2020]. Da Hypoxie häufig in soliden Tumoren vorkommt, könnte die endotheliale miR-186 nicht nur in NSCLC sondern auch in Endothelzellen anderer Krebsarten herunterreguliert sein. Allerdings ist bisher unklar, wie die Hypoxie-induzierte Herunterregulation der miR-186 gesteuert wird. Um dies zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die beiden wichtigsten Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren HIF1 α und NF- κ B analysiert. Es wurde bereits gezeigt, dass Zytokine,

die NF- κ B aktivieren, an den Promoter der miR-186 binden können und so deren Expression induzieren [Zhao *et al.*, 2017]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten hingegen, dass NF- κ B nicht in die durch Hypoxie-induzierte Hemmung der endothelialen miR-186 involviert ist. Im Gegensatz dazu konnte HIF1 α die Expression der miR-186 signifikant reduzieren. Daher wurde genauer analysiert, ob HIF1 α die Hypoxie-vermittelte Inhibition der miR-186 in Endothelzellen reguliert. Hierfür wurde HIF1 α mithilfe des spezifischen Inhibitors Bay 87-2243 geblockt. Dies wirkte der Hypoxie-induzierten Verringerung der miR-186 Expression in HDMEC entgegen.

Anschließend wurde die Funktion der miR-186 auf die Entwicklung neuer Blutgefäße untersucht. Durch verschiedene *in vitro* Analysen konnte gezeigt werden, dass die miR-186 ein pleiotroper Inhibitor der Angiogenese ist. Sie reguliert die Proliferation, Migration und Tube Formation von Endothelzellen sowie das Aussprossen von HDMEC Sphäroiden. Außerdem wurde analysiert, ob die Hypoxie-induzierte Angiogenese durch Inhibition der miR-186 in Endothelzellen vermittelt wird. Dabei führte eine Überexpression der miR-186 im Vergleich zu NCm-transfizierten HDMEC, die unter Hypoxie inkubiert wurden, zu einer signifikant erniedrigten kumulativen Sprosslänge. Es kann daher geschlossen werden, dass Hypoxie die Angiogenese von Endothelzellen durch Hemmung der miR-186 regulieren kann.

Um diese *in vitro* Ergebnisse zu validieren, wurde ein *in vivo* Matrigel-Plug-Assay durchgeführt. Dabei konnten signifikant weniger CD31-positive Gefäße in Matrigel-Plugs, die miR-186m-transfizierte HDMEC enthielten, nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass eine durch Hypoxie stimulierte Angiogenese die endotheliale miR-186 hemmt, um so das Tumorwachstum zu fördern. Um dies zu bestätigen, wurden NCI-H460 Zellen mit NCm- oder miR-186m-transfizierten HDMEC vermischt und in die Flanken von immundefizienten Mäusen injiziert. Dabei zeigte sich, dass eine Überexpression der miR-186 in HDMEC die Bildung neuer Blutgefäße in den Tumoren deutlich verringert und auch zu einer Reduktion des Tumolvolumens an den Tagen 3, 7 und 10 nach Implantation führt. Allerdings war die Größe der Tumore in beiden Gruppen an Tag 14 vergleichbar. Dies könnte mit einer geringeren intrazellulären Konzentration der endothelialen miR-186 über die Zeit aufgrund der Teilungen der Endothelzellen zusammenhängen. Außerdem können in diesem Tumor-Flankenmodell zwar die humanen Endothelzellen mit miR-186 transfiziert werden, jedoch nicht die autochthonen Endothelzellen der Maus, die von außen in den Tumor einwachsen und somit das Tumorwachstum fördern. Nichtsdestotrotz lassen sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine essentielle Funktion der miR-186 bei der Tumorangiogenese schließen.

Seitdem bekannt ist, dass miRNAs mehrere Tumor-assoziierte Gene gleichzeitig regulieren können, stellen sie ein interessantes Target in der Krebstherapie dar. Als natürliche Antisense-Nukleotide haben sie gegenüber Plasmid-DNA oder Protein-basierten-Molekülen den Vorteil

einer reduzierten Toxizität und verursachen eine geringere Immunantwort [Chen *et al.*, 2015]. Eine zielgerichtete *in vivo* Applikation von miRNAs ist aufgrund einer geringen Bioverfügbarkeit momentan jedoch nur begrenzt möglich. In den letzten Jahren konnte die Stabilität der miRNAs und deren Affinität zur Zielsequenz durch chemische Modifikationen verbessert werden. Allerdings kommt es nach systemischer Applikation eher zu einer Akkumulation der miRNAs in der Leber. Daher wurden Nanopartikel-basierte Transportsysteme zur systemischen Verteilung von miRNAs entwickelt [Chen *et al.*, 2015]. So wurde bereits gezeigt, dass miRNAs, die sich in Polyamin-beschichteten Carbon-Nanopartikeln befinden, zielgerichtet in Endothelzellen transportiert werden können, um dort die Angiogenese zu regulieren [Masotti *et al.*, 2016]. Dennoch ist nach wie vor eine effiziente Aufnahme von miRNA-haltigen Partikeln in Tumorgewebe schwierig. Daher ist es weiterhin dringend notwendig, spezifische und effektive Transportsysteme zu entwickeln, um die Ergebnisse aus experimentellen Studien in die Klinik zu translatieren und das Ziel einer miRNA-basierten anti-angiogenen Therapie langfristig zu erreichen.

Zur Entwicklung verbesserter Transportsysteme ist es unter anderem wichtig, molekulare und Wirkmechanismen von miRNAs zu verstehen. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit bezüglich der anti-angiogenen Funktion der miR-186 analysiert. Hierfür wurden zunächst zwölf validierte humane Targets der miR-186, die in die Angiogenese involviert sind, genauer untersucht. Dabei konnte eine Reduktion der mRNA Expression von *YAP1* und *CDC42* in miR-186m-transfizierten HDMEC detektiert werden. Die Tatsache, dass eine Überexpression der miR-186 in HDMEC lediglich die Expression von zwei der zwölf validierten Targets aus der Literatur erniedrigte, zeigt, dass die Funktion der miRNA in diversen Zelltypen offensichtlich sehr unterschiedlich sein kann [O'Brien *et al.*, 2018]. Daher ist es wichtig, die spezifischen Targets der miR-186 in Endothelzellen zu identifizieren. Hierfür wurde die Expression von sechs Angiogenese-assoziierten und potenziellen humanen Targets der miR-186 analysiert, die in den beiden Datenbanken „miRDB“ und „TargetScan“ gelistet sind. Dabei zeigte sich, dass *PRKCA* merklich durch eine Transfektion mit miR-186m herunterreguliert wird.

Die PKC α ist ein Mitglied der PKC Familie von lipid-sensitiven Seronin/Threonin-Kinasen, die viele verschiedene zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Apoptose, regulieren [Singh *et al.*, 2017]. Diese können durch Phosphatidylserine, Diacylglycerole und Phorbolster aktiviert werden [Singh *et al.*, 2017]. Frühere Studien demonstrierten bereits eine wichtige Funktion der PKC α bei der Regulation der Angiogenese [Xu *et al.*, 2008]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die *PRKCA* ein direktes Target der miR-186 ist. Hierfür wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Dabei ließ sich erstmalig eine direkte Interaktion zwischen *PRKCA* und miR-186 nachweisen. Obwohl vier potenzielle Bindestellen der miR-186 in der 3'-UTR der humanen mRNA Sequenz von *PRKCA* vorhanden sind, ist nur eine davon für die miR-186-vermittelte Repression von *PRKCA*

verantwortlich. Die miR-186 hat wahrscheinlich zu den anderen drei Bindestellen eine geringere Affinität, weshalb es nicht zu einer Bildung des miRNA-mRNA Duplex kommt. Außerdem wurde analysiert, ob die Inhibition der *PRKCA* die anti-angiogene Wirkung der miR-186 vermittelt. Dazu wurden miR-186-transfizierte HDMEC mit dem PKC α -Aktivator PMA behandelt. Eine Behandlung mit PMA wurde einer Überexpression der PKC α mithilfe eines Plasmids vorgezogen, da die Effizienz einer Co-Transfektion von miR-186 und einem Vektor in primären Endothelzellen eher gering ist. Vorherige Studien berichteten, dass die Überexpression oder Aktivierung der PKC α durch PMA eine pro-angiogene Wirkung auf die Migration und Tube Formation von Endothelzellen hat [Harrington *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2008]. Im Gegensatz dazu führte eine Inhibition der PKC α durch Antisense-Oligonukleotide, siRNA oder dem chemischen Inhibitor Gö 6976 zu einer Reduktion der endothelialen Migration und Tube Formation [Wang *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2008]. Einhergehend mit diesen Beobachtungen zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Aktivierung der PKC α der hemmenden Wirkung der miR-186 auf die Viabilität, Migration und Tube Formation von Endothelzellen sowie auf das Aussprossen von HDMEC Sphäroiden entgegenwirkt. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Expression der PKC α in HDMEC durch Hypoxie nachgewiesen werden. Umgekehrt wurde diese gesteigerte Expression durch eine Inhibition von HIF1 α vermindert. Folglich konnte die *PRKCA* als funktionelles Target der miR-186 in HDMEC identifiziert werden. Sie vermittelt die Hypoxie-induzierte Angiogenese in Endothelzellen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass durch hypoxische Bedingungen der Transkriptionsfaktor HIF1 α in Endothelzellen aktiviert und die miR-186 gehemmt wird. Diese miRNA bindet den pro-angiogenen Faktor *PRKCA*, was folglich zur Inhibition der Angiogenese führt.

7.3 Effekte von Linalool auf die Angiogenese

Linalool ist ein natürlich vorkommender tertiärer Alkohol aus der Gruppe der azyklischen Monoterpene. Es ist in über 200 Pflanzenarten und manchen Pilzarten enthalten und Hauptbestandteil vieler ätherischer Öle, wie Palisander- und Lavendelöl. In der Industrie findet Linalool Verwendung als Geruchs- und Geschmacksstoff. Es gibt zwei Enantiomere von Linalool, (3S)-(+)-Linalool und (3R)-(-)-Linalool, wobei diese in unterschiedlichen Pflanzenarten vorkommen und sich in ihrem Geruch und ihren biologischen Eigenschaften unterscheiden [Noskova *et al.*, 2016]. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde (3R)-(-)-Linalool eingesetzt, da dieses Enantiomer in der Natur am häufigsten vertreten ist [Aprotosoia *et al.*, 2014]. Angesichts der Tatsache, dass in vielen veröffentlichten Studien die genaue enantiomere Identität des genutzten Linalools nicht näher bezeichnet ist, wurde hier allgemein der Begriff „Linalool“ verwendet.

Linalool weist ein umfassendes Spektrum an biologischen Aktivitäten auf. Eine große Anzahl von Publikationen konnte eine anti-karzinogene Wirkung dieser Phytochemikalie *in vitro* und *in vivo* nachweisen. Dies kann hauptsächlich auf anti-proliferative und zytotoxische Effekte von Linalool auf verschiedene Arten von Tumorzellen zurückgeführt werden. Dabei kann oxidativer Stress gesteigert oder der Zellzyklus und die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) gehemmt werden [Cherng *et al.*, 2007; Cerchiara *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2015; Iwasaki *et al.*, 2016; Xing *et al.*, 2019]. Im Gegensatz dazu sind die Effekte von Linalool auf die Angiogenese noch nicht aufgeklärt. In dieser Arbeit konnte erstmals eine starke inhibitorische Wirkung von Linalool auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen nachgewiesen werden, welche wesentlich zur anti-karzinogenen Wirkung dieser Substanz beitragen könnten.

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der die Proliferation, Migration und Tube Formation von Endothelzellen einschließt [Eilken und Adams, 2010]. Um zu überprüfen, welche dieser Prozesse durch eine Behandlung mit Linalool beeinflusst werden, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst verschiedene *in vitro* Experimente durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Linalool pleiotrope anti-angiogene Effekte auf HDMEC hat. So wurde eine Inhibition der Proliferation, Migration und Tube Formation von HDMEC sowie eine hemmende Wirkung auf das Aussprossen von Endothelzell-Sphäroiden nachgewiesen. Dazu wurden relativ hohe Linalool-Konzentrationen von 1 mM und 2 mM verwendet, die jedoch die Viabilität der HDMEC nicht beeinflussten. Diesbezüglich sollte auch berücksichtigt werden, dass Linalool eine geringe Löslichkeit im Kulturmedium sowie eine geringe Bioverfügbarkeit *in vivo* aufweist. Dementsprechend wurde in den *in vitro* Analysen DMSO genutzt, um die Löslichkeit der Substanz zu verbessern.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von Linalool auf die Angiogenese in einem *ex vivo* Aorten-Ring-Assay und in einem *in vivo* Matrigel-Plug-Assay untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Linalool die Fläche der Gefäßsprossen der Aorten-Ringe sowie die Gefäßdichte in implantierten Matrigel-Plugs signifikant reduziert. Diese Daten entsprechen somit den Ergebnissen der experimentellen Analysen von kultivierten HDMEC.

Um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der anti-angiogenen Effekte von Linalool aufzuschlüsseln, wurden zunächst die beiden Hauptsignalwege PI3K/AKT/mTOR und Raf/MEK/ERK, die in die Angiogenese involviert sind, untersucht. Während in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass durch Linalool der AKT/mTOR Signalweg in OECM 1 und HepG2 Zellen inhibiert werden kann [Rodenak-Kladniew *et al.*, 2018; Pan und Zhang, 2019], konnte im Rahmen der vorliegenden Analyse keine Reduktion des phosphorylierten AKT in Linalool-behandelten HDMEC beobachtet werden. Dies weist auf eine unterschiedliche Wirkungsweise der Phytochemikalie in malignen Tumorzellen im Vergleich zu Endothelzellen hin. Interessanterweise wurde eine erhöhte Expression von phosphoryliertem ERK festgestellt und eine Inhibition des MEK/ERK Signalweges durch PD0325901 wirkte dem verringerten

Aussprossen von Endothelzell-Sphäroiden durch Linalool entgegen. Diese Resultate entsprachen nicht den Erwartungen, da der ERK Signalweg gewöhnlich das Überleben von Endothelzellen und die Angiogenese fördert [Shin *et al.*, 2016]. Trotzdem belegen mehrere Studien, dass eine Aktivierung von ERK einen Arrest des Zellzyklus und Apoptose induzieren kann [Tang *et al.*, 2002; Lu und Xu, 2006].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die durch Linalool induzierte Reduktion von intrazellulärem ATP und die Aktivierung des TRPM8 Kanals zur Hemmung der Angiogenese beiträgt. Im Gegensatz dazu führte eine Linalool-bedingte Erhöhung der ROS-Produktion nicht zur Inhibition der Angiogenese. Interessanterweise führte weniger intrazellulär vorhandenes ATP zu einer erhöhten ERK-Phosphorylierung. Dies wird durch die Ergebnisse unterstützt, dass eine Supplementation von ATP der gesteigerten Phosphorylierung von ERK durch Linalool komplett entgegenwirkt und eine Inhibition der ERK-Phosphorylierung keine Auswirkungen auf die verminderte intrazelluläre ATP-Konzentration hat. Im Gegensatz dazu zeigen frühere Studien, dass extrazelluläres ATP den ERK-Signalweg in verschiedenen Zellen stimuliert [Swanson *et al.*, 1998; Wagstaff *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2008] und eine durch Sauerstoffmangel induzierte Depletion von ATP die Phosphorylierung von ERK reduziert [Abas *et al.*, 2000]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse weisen auf einen sehr komplexen Mechanismus der ERK-Aktivierung in Abhängigkeit von intrazellulärem ATP hin. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine geringe Reduktion von intrazellulärem ATP, was ein Stimulus für eine ERK-Aktivierung sein könnte. Auf der anderen Seite wäre eine Phosphorylierung von ERK bei einem vollständigen ATP-Mangel aufgrund des fehlenden Phosphatdonors nicht möglich. Es müsste allerdings noch genauer analysiert werden, wie eine geringfügige Reduktion von intrazellulärem ATP zu einer ERK-Phosphorylierung führt. In diesem Zusammenhang ist bereits bekannt, dass die beiden Inhibitoren Rotenon und Metformin des Komplexes I der Atmungskette in Mitochondrien intrazelluläres ATP verringern und die Phosphorylierung von ERK durch Dimerisierung von *kinase suppressor of Ras* (KSR) mit Raf fördern, wodurch die Phosphorylierung von MEK katalysiert wird [Verlande *et al.*, 2018]. Da Linalool ein Inhibitor des Komplexes I der Atmungskette in Mitochondrien ist [Usta *et al.*, 2009], kann daher angenommen werden, dass die ERK-Phosphorylierung durch eine Regulation der KSR-Raf-Dimerisierung induziert werden könnte.

Außerdem zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass die Inhibition des TRPM8 Kanals keinen Einfluss auf die Linalool-induzierte Reduktion von intrazellulärem ATP und die gesteigerte ERK-Phosphorylierung hat. Des Weiteren führte eine Inhibition von ERK nicht zur Aktivierung des TRPM8 Kanals in Linalool-stimulierten HDMEC. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Linalool-induzierte Aktivierung von TRPM8 unabhängig vom reduzierten ATP und der erhöhten ERK-Phosphorylierung ist. Linalool aktiviert den TRPM8 Kanal innerhalb von

Sekunden, wohingegen die Phosphorylierung von ERK eine längere Zeit benötigt, was ebenfalls auf die Unabhängigkeit der beiden Mechanismen hindeutet.

Schließlich wurde noch genauer analysiert, wie die durch Linalool verursachte ERK-Phosphorylierung zur Inhibition der Angiogenese führt. Dazu wurde mittels Western Blot die Expression von elf Proteinen, die in die Angiogenese involviert sind, untersucht. Dabei zeigte sich, dass lediglich die Expression von BMP-2 durch eine Linalool-induzierte ERK-Phosphorylierung herunterreguliert wird. BMP-2 gehört zur Familie der transforming growth factors (TGF) und fördert die Proliferation, Migration und Tube Formation verschiedener Endothelzellen [Orloff und Charters, 1972; Raida *et al.*, 2005; Finkenzeller *et al.*, 2012]. *In vivo* steigert BMP-2 die Angiogenese von Tumoren, die aus A549 und MCF-7 Zellen generiert wurden [Langenfeld und Langenfeld, 2004; Raida *et al.*, 2005]. Interessanterweise konnten verschiedenen Studien zeigen, dass BMP-2 zur Aktivierung von ERK führt [Langenfeld und Langenfeld, 2004; Jun *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2018]. Andererseits ist jedoch auch bekannt, dass phosphoryliertes ERK in den Nukleus transloziert, um dort verschiedene Transkriptionsfaktoren zu regulieren [Liu *et al.*, 2018]. Deshalb wäre es ebenso möglich, dass BMP-2 durch eine Linalool-induzierte ERK-Phosphorylierung beeinflusst wird. Studien konnten bereits nachweisen, dass verschiedene Substanzen wie Wedelolacton [Zhu *et al.*, 2018a], Fucoidan [Kim *et al.*, 2015], Imperatorin und Bergapten [Tang *et al.*, 2008] die Phosphorylierung von ERK in humanen mesenchymalen Stammzellen oder Osteoblasten induzieren können, wodurch die Expression von BMP-2 reguliert wird. Die Herunterregulierung von BMP-2 durch die Linalool-induzierte Steigerung der ERK-Phosphorylierung könnte daher den anti-angiogenen Effekt von Linalool vermitteln.

In weiteren Experimenten wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung des TRPM8 Kanals durch Linalool den β 1 Integrin/FAK-Signalweg blockiert. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Genova *et al.* [2017]. Diese konnten zeigen, dass der TRPM8 Kanal unabhängig von seiner Funktion als Kanal die Migration von Endothelzellen inhibiert. Demzufolge könnte dieser Ionenkanal ein neuer und vielversprechender Angriffspunkt für anti-angiogene Therapien darstellen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Linalool ein potenter Inhibitor der Angiogenese ist, was durch zwei unabhängige Signalwege vermittelt wird. Dies könnte ein Vorteil von Linalool gegenüber sehr spezifischen, anti-angiogenen Substanzen sein, da dieses pleiotrope Wirkungsspektrum zellulären Ausweichmechanismen entgegenwirkt.

7.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Der Einsatz von miRNAs und Phytochemikalien als therapeutischer Ansatz zur Behandlung von angiogenen Erkrankungen, wie beispielsweise Krebs, stellt eine vielversprechende Alternative im Vergleich zu konventionellen Behandlungsmethoden dar. Damit diese Strategie in der Klinik Anwendung finden kann, müssen die *in vitro* und *in vivo* Effekte sowie die genauen Wirkmechanismen dieser miRNAs bzw. phytochemischen Substanzen im Detail analysiert werden. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt, dass sowohl die miR-370 und miR-186 als auch die phytochemische Substanz Linalool einen inhibitorischen Effekt auf die Ausbildung neuer Blutgefäße haben. Durch die Analyse der jeweiligen molekularen Mechanismen konnte nachgewiesen werden, dass die anti-angiogene Wirkung der beiden miRNAs und von Linalool über unterschiedliche Signalwege vermittelt wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine anti-angiogene Funktion der miR-370 zeigen, die durch eine miR-370-vermittelte Hemmung von SMO gesteuert wird. Die Expression von SMO ist mit der Tumorgröße, -invasion, -metastasierung und mit Tumorrezidiven assoziiert [Jeng *et al.*, 2020]. Deshalb stellen SMO-Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von Krebs dar. In zukünftigen Experimenten könnte daher untersucht werden, ob eine systemische Applikation der miR-370 zur Reduktion der Tumorgröße führt und das Auftreten von Metastasen verhindert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Herunterregulation der miR-186 in NSCLC und eine inhibierende Wirkung der miR-186 bei der Tumorangio-genese nachgewiesen. In zukünftigen Experimenten könnte untersucht werden, ob eine gesteigerte Expression der miR-186 mit einer positiven Prognose von NSCLC Patienten assoziiert ist. Zusätzlich könnte noch analysiert werden, ob die endotheliale miR-186 auch die Metastasierung von NSCLC inhibiert.

Linalool könnte eine vielversprechende Phytochemikalie sein, um zukünftig angiogene Erkrankungen zu behandeln. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass Linalool, wie auch andere phytochemische Substanzen, eine geringe Bioverfügbarkeit *in vivo* aufweist. Daher ist es zunächst notwendig, ein geeignetes Transportsystem zu entwickeln, durch das Linalool seinen spezifischen Zielort in hoher Konzentration im Körper erreichen kann. Alternativ könnten die pharmakokinetischen Eigenschaften der Phytochemikalie durch Entwicklung neuer Derivate oder Prodrugs verbessert werden.

8 Literaturverzeichnis

1. **Abas L, Bogoyevitch MA, Guppy M.** Mitochondrial ATP production is necessary for activation of the extracellular-signal-regulated kinases during ischaemia/reperfusion in rat myocyte-derived H9c2 cells. *Biochem J* 349: 119-126, 2000
2. **Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, Mathews CA, Pauls DL, Rasin MR, Gunel M, Davis NR, Ercan-Sencicek AG, Guez DH, Spertus JA, Leckman JF, Dure LST, Kurlan R, Singer HS, Gilbert DL, Farhi A, Louvi A, Lifton RP, Sestan N, State MW.** Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science* 310: 317-320, 2005
3. **Anand S, Majeti BK, Acevedo LM, Murphy EA, Mukthavaram R, Schepke L, Huang M, Shields DJ, Lindquist JN, Lapinski PE, King PD, Weis SM, Cheresch DA.** MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat Med* 16: 909-914, 2010
4. **Antebi E, Lehmann JM, Gingold A, Nobel M.** The effect of impairment of blood supply to the rat uterus. *Int J Fertil* 36: 376-378, 1991
5. **Aprotosoiaie AC, Hancianu M, Costache II, Miron A.** Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragr J* 29: 193-219, 2014
6. **Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H.** MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27: 2128-2136, 2008
7. **Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N.** Angiogenesis assays: A critical overview. *Clin Chem* 49: 32-40, 2003
8. **Bader AG, Brown D, Winkler M.** The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 70: 7027-7030, 2010
9. **Bader AG.** miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet* 3: 120, 2012
10. **Baish JW, Jain RK.** Fractals and cancer. *Cancer Res* 60: 3683-3688, 2000
11. **Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H.** The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res* 153: 347-358, 2009
12. **Barbieri R, Coppo E, Marchese A, Daglia M, Sobarzo-Sanchez E, Nabavi SF, Nabavi SM.** Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res* 196: 44-68, 2017
13. **Batista PA, Werner MF, Oliveira EC, Burgos L, Pereira P, Brum LF, Story GM, Santos AR.** The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *J Pain* 11: 1222-1229, 2010
14. **Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R.** Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* 141: 737-745, 2004

15. **Ben-Dov IZ, Tan YC, Morozov P, Wilson PD, Rennert H, Blumenfeld JD, Tuschl T.** Urine microRNA as potential biomarkers of autosomal dominant polycystic kidney disease progression: Description of miRNA profiles at baseline. *PLoS One* 9: e86856, 2014
16. **Benetatos L, Hatzimichael E, Londin E, Vartholomatos G, Loher P, Rigoutsos I, Briasoulis E.** The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: Involvement in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 70: 795-814, 2013
17. **Bielenberg DR, Zetter BR.** The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *Cancer J* 21: 267-273, 2015
18. **Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, D'Urso L, Pagliuca A, Biffoni M, Labbaye C, Bartucci M, Muto G, Peschle C, De Maria R.** The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 14: 1271-1277, 2008
19. **Bouck N, Stellmach V, Hsu SC.** How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 69: 135-174, 1996
20. **Bouis D, Kusumanto Y, Meijer C, Mulder NH, Hospers GA.** A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacol Res* 53: 89-103, 2006
21. **Brauchi S, Orio P, Latorre R.** Clues to understanding cold sensation: Thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15494-15499, 2004
22. **Briscoe J, Therond PP.** The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 416-429, 2013
23. **Bryan BA, D'Amore PA.** What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 64: 2053-2065, 2007
24. **Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM.** MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11755-11760, 2004
25. **Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH.** Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 29: 77-103, 2006
26. **Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000
27. **Carmeliet P, Jain RK.** Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257, 2000
28. **Carmeliet P.** Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-936, 2005
29. **Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ.** The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16: 2733-2742, 2002

30. **Carthew RW, Sontheimer EJ.** Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655, 2009
31. **Cerchiara T, Straface SV, Brunelli E, Tripepi S, Gallucci MC, Chidichimo G.** Antiproliferative effect of linalool on RPMI 7932 human melanoma cell line: Ultrastructural studies. *Nat Prod Commun* 10: 547-549, 2015
32. **Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS.** MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65: 6029-6033, 2005
33. **Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23: 787-823, 2002
34. **Chang KW, Chu TH, Gong NR, Chiang WF, Yang CC, Liu CJ, Wu CH, Lin SC.** miR-370 modulates insulin receptor substrate-1 expression and inhibits the tumor phenotypes of oral carcinoma. *Oral Dis* 19: 611-619, 2013
35. **Chang MY, Shieh DE, Chen CC, Yeh CS, Dong HP.** Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells and cervical cancer cells through CDKIs. *Int J Mol Sci* 16: 28169-28179, 2015
36. **Chang SJ, Tzeng CR, Lee YH, Tai CJ.** Extracellular ATP activates the PLC/PKC/ERK signaling pathway through the P2Y2 purinergic receptor leading to the induction of early growth response 1 expression and the inhibition of viability in human endometrial stromal cells. *Cell Signal* 20: 1248-1255, 2008
37. **Chen JQ, Papp G, Szodoray P, Zeher M.** The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 15: 1171-1180, 2016
38. **Chen WC, Chung CH, Lu YC, Wu MH, Chou PH, Yen JY, Lai YW, Wang GS, Liu SC, Cheng JK, Wu YJ, Yeh HI, Wang LY, Wang SW.** BMP-2 induces angiogenesis by provoking integrin alpha6 expression in human endothelial progenitor cells. *Biochem Pharmacol* 150: 256-266, 2018
39. **Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY.** Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18: 997-1006, 2008
40. **Chen XP, Chen YG, Lan JY, Shen ZJ.** MicroRNA-370 suppresses proliferation and promotes endometrioid ovarian cancer chemosensitivity to cDDP by negatively regulating ENG. *Cancer Lett* 353: 201-210, 2014
41. **Chen Y, Gao DY, Huang L.** In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies. *Adv Drug Deliv Rev* 81: 128-141, 2015
42. **Chen Z, Xu L, Ye X, Shen S, Li Z, Niu X, Lu S.** Polymorphisms of microRNA sequences or binding sites and lung cancer: A meta-analysis and systematic review. *PLoS One* 8: e61008, 2013
43. **Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R.** TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-744, 2005

44. **Cheng Y, Dai C, Zhang J.** SIRT3-SOD2-ROS pathway is involved in linalool-induced glioma cell apoptotic death. *Acta Biochim Pol* 64: 343-350, 2017
45. **Cherng JM, Shieh DE, Chiang W, Chang MY, Chiang LC.** Chemopreventive effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1500-1504, 2007
46. **Chiang AC, Massague J.** Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 359: 2814-2823, 2008
47. **Chinchilla P, Xiao L, Kazanietz MG, Riobo NA.** Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* 9: 570-579, 2010
48. **Cho SY, Jun HJ, Lee JH, Jia Y, Kim KH, Lee SJ.** Linalool reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2- and ubiquitin-dependent mechanisms. *FEBS Lett* 585: 3289-3296, 2011
49. **Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P.** MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res* 7: 68-74, 2016
50. **Chung AS, Lee J, Ferrara N.** Targeting the tumour vasculature: Insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 10: 505-514, 2010
51. **Chung AS, Ferrara N.** Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 563-584, 2011
52. **Cochrane DR, Spoelstra NS, Howe EN, Nordeen SK, Richer JK.** MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther* 8: 1055-1066, 2009
53. **Conway EM, Collen D, Carmeliet P.** Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-521, 2001
54. **Cragg GM, Newman DJ, Snader KM.** Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 60: 52-60, 1997
55. **D'Ignazio L, Rocha S.** Hypoxia induced NF-kappaB. *Cells* 5: 10, 2016
56. **David L, Feige JJ, Bailly S.** Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 203-212, 2009
57. **Davis CD, Ross SA.** Evidence for dietary regulation of microRNA expression in cancer cells. *Nutr Rev* 66: 477-482, 2008
58. **De Jesus Perez VA, Alastalo TP, Wu JC, Axelrod JD, Cooke JP, Amieva M, Rabinovitch M.** Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt-beta-catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways. *J Cell Biol* 184: 83-99, 2009
59. **Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M.** MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 12: 2171-2176, 2008

60. **Dong Y, Jin X, Sun Z, Zhao Y, Song X.** MiR-186 inhibited migration of NSCLC via targeting cdc42 and effecting EMT process. *Mol Cells* 40: 195-201, 2017
61. **Eilken HM, Adams RH.** Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 22: 617-625, 2010
62. **Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA.** Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4: 915-924, 1999
63. **Elisabetsky E, Brum LF, Souza DO.** Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine* 6: 107-113, 1999
64. **Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S.** LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452: 896-899, 2008
65. **Ema M, Rossant J.** Cell fate decisions in early blood vessel formation. *Trends Cardiovasc Med* 13: 254-259, 2003
66. **Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA.** Laser capture microdissection. *Science* 274: 998-1001, 1996
67. **Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, Mckay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP.** miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 3: 87-98, 2006
68. **Esquela-Kerscher A, Slack FJ.** Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259-269, 2006
69. **Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, Weidhaas JB, Brown D, Bader AG, Slack FJ.** The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 7: 759-764, 2008
70. **Fabani MM, Abreu-Goodger C, Williams D, Lyons PA, Torres AG, Smith KG, Enright AJ, Gait MJ, Vigorito E.** Efficient inhibition of miR-155 function in vivo by peptide nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 38: 4466-4475, 2010
71. **Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W.** Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79: 351-379, 2010
72. **Fasanaro P, D'alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, Capogrossi MC, Martelli F.** MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem* 283: 15878-15883, 2008
73. **Femminella GD, Ferrara N, Rengo G.** The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Front Physiol* 6: 40, 2015
74. **Ferrara N.** Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56: 794-814, 1999

75. **Ferrara N, Alitalo K.** Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5: 1359-1364, 1999
76. **Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Rixe T, Muller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S.** Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 107: 677-684, 2010
77. **Finkenzeller G, Hager S, Stark GB.** Effects of bone morphogenetic protein 2 on human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 84: 81-85, 2012
78. **Fiorio Pla A, Gkika D.** Emerging role of TRP channels in cell migration: From tumor vascularization to metastasis. *Front Physiol* 4: 311, 2013
79. **Folkman J.** Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186, 1971
80. **Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP.** Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92-105, 2009
81. **Gale NW, Yancopoulos GD.** Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13: 1055-1066, 1999
82. **Genova T, Grolez GP, Camillo C, Bernardini M, Bokhobza A, Richard E, Scianna M, Lemonnier L, Valdembri D, Munaron L, Philips MR, Mattot V, Serini G, Prevarskaya N, Gkika D, Pla AF.** TRPM8 inhibits endothelial cell migration via a non-channel function by trapping the small GTPase Rap1. *J Cell Biol* 216: 2107-2130, 2017
83. **Giaccia AJ.** Hypoxic stress proteins: Survival of the fittest. *Semin Radiat Oncol* 6: 46-58, 1996
84. **Gibbons A.** Reproductive toxicity: Regs slow to change. *Science* 254: 25, 1991
85. **Gotink KJ, Verheul HM.** Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: What is their mechanism of action? *Angiogenesis* 13: 1-14, 2010
86. **Gu Y, Ting Z, Qiu X, Zhang X, Gan X, Fang Y, Xu X, Xu R.** Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Toxicology* 268: 19-24, 2010
87. **Gu Y, Ampofo E, Menger MD, Laschke MW.** miR-191 suppresses angiogenesis by activation of NF-kappaB signaling. *FASEB J* 31: 3321-3333, 2017
88. **Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL.** ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* 19: 1997-2007, 2020
89. **Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W.** TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6: 961-967, 2005
90. **Halpern SE, Dillman RO, Witztum KF, Shega JF, Hagan PL, Burrows WM, Dillman JB, Clutter ML, Sobol RE, Frincke JM.** Radioimmunodetection of melanoma utilizing In-111 96.5 monoclonal antibody: A preliminary report. *Radiology* 155: 493-499, 1985

91. **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000
92. **Harborne JB.** Role of secondary metabolites in chemical defence mechanisms in plants. *Ciba Found Symp* 154: 126-134, 1990
93. **Harrington EO, Loffler J, Nelson PR, Kent KC, Simons M, Ware JA.** Enhancement of migration by protein kinase C α and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase C δ in capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 7390-7397, 1997
94. **Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, Mclean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM.** Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156: 1363-1380, 2000
95. **Heiss M, Hellstrom M, Kalen M, May T, Weber H, Hecker M, Augustin HG, Korff T.** Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB J* 29: 3076-3084, 2015
96. **Hermsmeier D, Schittko U, Baldwin IT.** Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiol* 125: 683-700, 2001
97. **Heusschen R, Van Gink M, Griffioen AW, Thijssen VL.** MicroRNAs in the tumor endothelium: Novel controls on the angioregulatory switchboard. *Biochim Biophys Acta* 1805: 87-96, 2010
98. **Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA.** Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56: 549-580, 2004
99. **Holderfield MT, Hughes CC.** Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor- β in vascular morphogenesis. *Circ Res* 102: 637-652, 2008
100. **Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA.** Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5: 351-358, 2003
101. **Huang T, Wang G, Yang L, Peng B, Wen Y, Ding G, Wang Z.** MiR-186 inhibits proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer cells by downregulating Yin Yang 1. *Cancer Biomark* 21: 221-228, 2017
102. **Hui X, Reither G, Kaestner L, Lipp P.** Targeted activation of conventional and novel protein kinases C through differential translocation patterns. *Mol Cell Biol* 34: 2370-2381, 2014
103. **Hussain AI, Anwar F, Hussain Sherazi ST, Przybylski R.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem* 108: 986-995, 2008
104. **Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F.** Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol* 100: 1-19, 2018

105. **Ingham PW, McMahon AP.** Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes Dev* 15: 3059-3087, 2001
106. **Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM.** MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65: 7065-7070, 2005
107. **Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Menard S, Croce CM.** MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67: 8699-8707, 2007
108. **Iwasaki K, Zheng YW, Murata S, Ito H, Nakayama K, Kurokawa T, Sano N, Nowatari T, Villareal MO, Nagano YN, Isoda H, Matsui H, Ohkohchi N.** Anticancer effect of linalool via cancer-specific hydroxyl radical generation in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 22: 9765-9774, 2016
109. **Jana S, Patra K, Sarkar S, Jana J, Mukherjee G, Bhattacharjee S, Mandal DP.** Antitumorigenic potential of linalool is accompanied by modulation of oxidative stress: An in vivo study in sarcoma-180 solid tumor model. *Nutr Cancer* 66: 835-848, 2014
110. **Jeng KS, Sheen IS, Leu CM, Tseng PH, Chang CF.** The role of smoothed in cancer. *Int J Mol Sci* 21: 6863, 2020
111. **Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Zhang S, Gong Z, Li X, Cao K, Deng H, He Y, Liao Q, Xiang B, Zhou M, Guo C, Zeng Z, Li G, Li X, Xiong W.** The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 39: 204, 2020
112. **Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, Shu Y.** Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer* 18: 157, 2019
113. **Jun JH, Yoon WJ, Seo SB, Woo KM, Kim GS, Ryoo HM, Baek JH.** BMP2-activated Erk/MAP kinase stabilizes Runx2 by increasing p300 levels and histone acetyltransferase activity. *J Biol Chem* 285: 36410-36419, 2010
114. **Kabekkodu SP, Shukla V, Varghese VK, J DS, Chakrabarty S, Satyamoorthy K.** Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biol Rev Camb Philos Soc* 93: 1955-1986, 2018
115. **Kanda S, Mochizuki Y, Suematsu T, Miyata Y, Nomata K, Kanetake H.** Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 278: 8244-8249, 2003
116. **Karar J, Maity A.** PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Front Mol Neurosci* 4: 51, 2011
117. **Kato M, Paranjape T, Muller RU, Nallur S, Gillespie E, Keane K, Esquela-Kerscher A, Weidhaas JB, Slack FJ.** The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in *C. elegans* and in vitro in human breast cancer cells. *Oncogene* 28: 2419-2424, 2009
118. **Kennedy DO, Wightman EL.** Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv Nutr* 2: 32-50, 2011

119. **Kim BS, Kang HJ, Park JY, Lee J.** Fucoidan promotes osteoblast differentiation via JNK- and ERK-dependent BMP2-Smad 1/5/8 signaling in human mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med* 47: e128, 2015
120. **Kim GD, Oh J, Park HJ, Bae K, Lee SK.** Magnolol inhibits angiogenesis by regulating ROS-mediated apoptosis and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in mES/EB-derived endothelial-like cells. *Int J Oncol* 43: 600-610, 2013
121. **Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H.** Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: Control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95: 189-197, 2000
122. **Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT.** Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137: 1005-1017, 2009
123. **Kotecha R, Takami A, Espinoza JL.** Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: A review of the clinical evidence. *Oncotarget* 7: 52517-52529, 2016
124. **Kralj JG, Munson MS, Ross D.** Total protein quantitation using the bicinchoninic acid assay and gradient elution moving boundary electrophoresis. *Electrophoresis* 35: 1887-1892, 2014
125. **Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS.** A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 9: 1274-1281, 2003
126. **Krock BL, Skuli N, Simon MC.** Hypoxia-induced angiogenesis: Good and evil. *Genes Cancer* 2: 1117-1133, 2011
127. **Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M.** Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438: 685-689, 2005
128. **Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S.** Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101: 59-68, 2007
129. **Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, Jacks T.** Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3903-3908, 2008
130. **Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T.** New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9: 175-179, 2003
131. **Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J.** Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100: 782-794, 2007
132. **Landskroner-Eiger S, Moneke I, Sessa WC.** miRNAs as modulators of angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a006643, 2013
133. **Lang L.** FDA approves sorafenib for patients with inoperable liver cancer. *Gastroenterology* 134: 379, 2008

134. **Langenfeld EM, Langenfeld J.** Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2: 141-149, 2004
135. **Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP.** An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858-862, 2001
136. **Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saib A, Voinnet O.** A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308: 557-560, 2005
137. **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854, 1993
138. **Lee RC, Ambros V.** An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864, 2001
139. **Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN.** MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21: 4663-4670, 2002
140. **Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN.** The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25: 522-532, 2006
141. **Leitzmann C.** Characteristics and health benefits of phytochemicals. *Forsch Komplementmed* 23: 69-74, 2016
142. **Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J, Api AM.** Fragrance material review on linalool. *Food Chem Toxicol* 41: 943-964, 2003
143. **Li Z, Rana TM.** Therapeutic targeting of microRNAs: Current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov* 13: 622-638, 2014
144. **Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS.** Hypoxia-inducible factor-1 α is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* 67: 563-572, 2007
145. **Liao D, Johnson RS.** Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26: 281-290, 2007
146. **Lin SL, Kim H, Ying SY.** Intron-mediated RNA interference and microRNA (miRNA). *Front Biosci* 13: 2216-2230, 2008
147. **Linck VM, Da Silva AL, Figueiro M, Caramao EB, Moreno PR, Elisabetsky E.** Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine* 17: 679-683, 2010
148. **Lindow M, Kauppinen S.** Discovering the first microRNA-targeted drug. *J Cell Biol* 199: 407-412, 2012
149. **Liu F, Yang X, Geng M, Huang M.** Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 8: 552-562, 2018
150. **Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ.** Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437-1441, 2004

151. **Liu X, Zhou X, Chen Y, Huang Y, He J, Luo H.** miR-186-5p targeting SIX1 inhibits cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cells (NSCLCs). *Neoplasma* 67: 147-157, 2020
152. **Liu Y, Whelan RJ, Pattnaik BR, Ludwig K, Subudhi E, Rowland H, Claussen N, Zucker N, Uppal S, Kushner DM, Felder M, Patankar MS, Kapur A.** Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. *PLoS One* 7: e53178, 2012
153. **Lo SS, Hung PS, Chen JH, Tu HF, Fang WL, Chen CY, Chen WT, Gong NR, Wu CW.** Overexpression of miR-370 and downregulation of its novel target TGFbeta-RII contribute to the progression of gastric carcinoma. *Oncogene* 31: 226-237, 2012
154. **Lopes-Bastos BM, Jiang WG, Cai J.** Tumour-endothelial cell communications: Important and indispensable mediators of tumour angiogenesis. *Anticancer Res* 36: 1119-1126, 2016
155. **Lu CH, Hou QR, Deng LF, Fei C, Xu WP, Zhang Q, Wu KM, Ning BF, Xie WF, Zhang X.** MicroRNA-370 attenuates hepatic fibrogenesis by targeting smoothed. *Dig Dis Sci* 60: 2038-2048, 2015
156. **Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR.** MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838, 2005
157. **Lu K, Bhat M, Basu S.** Plants and their active compounds: Natural molecules to target angiogenesis. *Angiogenesis* 19: 287-295, 2016
158. **Lu Z, Xu S.** ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 58: 621-631, 2006
159. **Masotti A, Miller MR, Celluzzi A, Rose L, Micciulla F, Hadoke PW, Bellucci S, Caporali A.** Regulation of angiogenesis through the efficient delivery of microRNAs into endothelial cells using polyamine-coated carbon nanotubes. *Nanomedicine* 12: 1511-1522, 2016
160. **Massague J.** Integration of Smad and MAPK pathways: A link and a linker revisited. *Genes Dev* 17: 2993-2997, 2003
161. **Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ.** Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8104-8109, 1997
162. **Mckemy DD, Neuhauser WM, Julius D.** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52-58, 2002
163. **Mehler MF, Mattick JS.** Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol Rev* 87: 799-823, 2007
164. **Meijer HA, Smith EM, Bushell M.** Regulation of miRNA strand selection: Follow the leader? *Biochem Soc Trans* 42: 1135-1140, 2014
165. **Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T.** Involvement of human micro-RNA in growth and response to

- chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 130: 2113-2129, 2006
166. **Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T.** MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133: 647-658, 2007
167. **Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M.** Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10513-10518, 2008
168. **Miyashita M, Sadzuka Y.** Effect of linalool as a component of *Humulus lupulus* on doxorubicin-induced antitumor activity. *Food Chem Toxicol* 53: 174-179, 2013
169. **Miyazono K, Maeda S, Imamura T.** BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 251-263, 2005
170. **Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K.** Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol* 50: 453-460, 2009
171. **Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM.** Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97: 99-107, 1998
172. **Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF.** Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* 11: 109-119, 2008
173. **Narusuye K, Kawai F, Matsuzaki K, Miyachi E.** Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. *J Neural Transm (Vienna)* 112: 193-203, 2005
174. **Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM.** Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149, 2000
175. **Nelson PA, Kawamura A, Akselband Y, Peattie DA, Aldape RA, Harding MW.** Effect of immunosuppressive drugs on cytokine gene transcription studied by message amplification phenotyping (MAPPING) polymerase chain reaction. *Transplant Proc* 23: 2867-2869, 1991
176. **Newman DJ, Cragg GM.** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70: 461-477, 2007
177. **Nicosia RF.** The aortic ring model of angiogenesis: A quarter century of search and discovery. *J Cell Mol Med* 13: 4113-4136, 2009
178. **Noskova K, Dovrtelova G, Zendulka O, Reminek R, Jurica J.** The effect of (-)-linalool on the metabolic activity of liver CYP enzymes in rats. *Physiol Res* 65: S499-S504, 2016
179. **Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, Augustin HG, Bates DO, Van Beijnum JR, Bender RHF, Bergers G, Bikfalvi A, Bischoff J, Bock BC, Brooks PC, Bussolino F, Cakir B, Carmeliet P, Castranova**

- D, Cimpean AM, Cleaver O, Coukos G, Davis GE, De Palma M, Dimberg A, Dings RPM, Djonov V, Dudley AC, Dufton NP, Fendt SM, Ferrara N, Fruttiger M, Fukumura D, Ghesquiere B, Gong Y, Griffin RJ, Harris AL, Hughes CCW, Hultgren NW, Iruela-Arispe ML, Irving M, Jain RK, Kalluri R, Kalucka J, Kerbel RS, Kitajewski J, Klaassen I, Kleinmann HK, Koolwijk P, Kuczynski E, Kwak BR, Marien K, Melero-Martin JM, Munn LL, Nicosia RF, Noel A, Nurro J, Olsson AK, Petrova TV, Pietras K, Pili R, Pollard JW, Post MJ, Quax PHA, Rabinovich GA, Raica M, Randi AM, Ribatti D, Ruegg C, Schlingemann RO, Schulte-Merker S, Smith LEH, Song JW, Stacker SA, Stalin J, Stratman AN, Van De Velde M, Van Hinsbergh VWM, Vermeulen PB, Waltenberger J, Weinstein BM, Xin H, Yetkin-Arik B, Yla-Herttuala S, Yoder MC, Griffioen AW. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis* 21: 425-532, 2018
180. **O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C.** Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 402, 2018
181. **Orloff MJ, Charters AC.** Injuries of the small bowel and mesentery and retroperitoneal hematoma. *Surg Clin North Am* 52: 729-734, 1972
182. **Paik SY, Koh KH, Beak SM, Paek SH, Kim JA.** The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull* 28: 802-807, 2005
183. **Pan W, Zhang G.** Linalool monoterpene exerts potent antitumor effects in OECM 1 human oral cancer cells by inducing sub-G1 cell cycle arrest, loss of mitochondrial membrane potential and inhibition of PI3K/AKT biochemical pathway. *J BUON* 24: 323-328, 2019
184. **Park SJ, Huh JW, Kim YH, Kim HS, Chang KT.** Intron retention and TE exonization events in ZRANB2. *Comp Funct Genomics* 2012: 170208, 2012
185. **Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G.** Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408: 86-89, 2000
186. **Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia P, Moretti MD.** Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* 9: 721-726, 2002
187. **Peng X, Gao H, Xu R, Wang H, Mei J, Liu C.** The interplay between HIF-1alpha and noncoding RNAs in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 39: 27, 2020
188. **Perkins DO, Jeffries CD, Jarskog LF, Thomson JM, Woods K, Newman MA, Parker JS, Jin J, Hammond SM.** microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol* 8: R27, 2007
189. **Perrins R, Weiss KR.** A cerebral central pattern generator in *Aplysia* and its connections with buccal feeding circuitry. *J Neurosci* 16: 7030-7045, 1996
190. **Philippen LE, Dirkx E, Da Costa-Martins PA, De Windt LJ.** Non-coding RNA in control of gene regulatory programs in cardiac development and disease. *J Mol Cell Cardiol* 89: 51-58, 2015

191. **Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, Mercatanti A, Hammond S, Rainaldi G.** MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108: 3068-3071, 2006
192. **Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T.** MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 67: 6130-6135, 2007
193. **Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Yla-Herttuala S.** Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett* 582: 2397-2401, 2008
194. **Qiu L, Zhang W, Tan EK, Zeng L.** Deciphering the function and regulation of microRNAs in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *ACS Chem Neurosci* 5: 884-894, 2014
195. **Raida M, Clement JH, Leek RD, Ameri K, Bicknell R, Niederwieser D, Harris AL.** Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 131: 741-750, 2005
196. **Rajasekar J, Perumal MK, Vallikannan B.** A critical review on anti-angiogenic property of phytochemicals. *J Nutr Biochem* 71: 1-15, 2019
197. **Ravizza R, Gariboldi MB, Molteni R, Monti E.** Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncol Rep* 20: 625-630, 2008
198. **Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G.** The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906, 2000
199. **Renault MA, Roncalli J, Tongers J, Thorne T, Klyachko E, Misener S, Volpert OV, Mehta S, Burg A, Luedemann C, Qin G, Kishore R, Losordo DW.** Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 49: 490-498, 2010
200. **Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE.** Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-720, 2000
201. **Riobo NA, Saucy B, Dilizio C, Manning DR.** Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12607-12612, 2006
202. **Rock EP, Goodman V, Jiang JX, Mahjoob K, Verbois SL, Morse D, Dagher R, Justice R, Pazdur R.** Food and Drug Administration drug approval summary: Sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *Oncologist* 12: 107-113, 2007
203. **Rodenak-Kladniew B, Castro A, Starkel P, De Saeger C, Garcia De Bravo M, Crespo R.** Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells through oxidative stress generation and modulation of Ras/MAPK and Akt/mTOR pathways. *Life Sci* 199: 48-59, 2018
204. **Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A.** Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902-1910, 2004

205. **Salazar VS, Gamer LW, Rosen V.** BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol* 12: 203-221, 2016
206. **Saman H, Raza SS, Uddin S, Rasul K.** Inducing angiogenesis, a key step in cancer vascularization, and treatment approaches. *Cancers (Basel)* 12: 1172, 2020
207. **Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Pillai B, Brahmachari SK.** Host-virus interaction: A new role for microRNAs. *Retrovirology* 3: 68, 2006
208. **Schagger H, Von Jagow G.** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379, 1987
209. **Schapira F, Gregori C, Banroques J.** Microheterogeneity of human galactose-1-phosphate uridylyl transferase. Isoelectrofocusing results. *Biochem Biophys Res Commun* 80: 291-297, 1978
210. **Seyfried TN, Huysentruyt LC.** On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog* 18: 43-73, 2013
211. **Shanmugam MK, Warriar S, Kumar AP, Sethi G, Arfuso F.** Potential role of natural compounds as anti-angiogenic agents in cancer. *Curr Vasc Pharmacol* 15: 503-519, 2017
212. **Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN.** Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: Implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3112-3118, 1996
213. **Shin M, Beane TJ, Quillien A, Male I, Zhu LJ, Lawson ND.** Vegfa signals through ERK to promote angiogenesis, but not artery differentiation. *Development* 143: 3796-3805, 2016
214. **Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY.** miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26: 2799-2803, 2007
215. **Singh RK, Kumar S, Gautam PK, Tomar MS, Verma PK, Singh SP, Kumar S, Acharya A.** Protein kinase C- α and the regulation of diverse cell responses. *Biomol Concepts* 8: 143-153, 2017
216. **Small EM, Sutherland LB, Rajagopalan KN, Wang S, Olson EN.** MicroRNA-218 regulates vascular patterning by modulation of Slit-Robo signaling. *Circ Res* 107: 1336-1344, 2010
217. **Smith SK.** Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab* 12: 147-151, 2001
218. **Sriraman SK, Aryasomayajula B, Torchilin VP.** Barriers to drug delivery in solid tumors. *Tissue Barriers* 2: e29528, 2014
219. **Staton CA, Reed MW, Brown NJ.** A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 90: 195-221, 2009
220. **Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S.** Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence* 3: 1, 2012

221. **Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC.** Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 100: 1164-1173, 2007
222. **Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, Gerber SA, Harrison KD, Pober JS, Iruela-Arispe ML, Merkenschlager M, Sessa WC.** Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14082-14087, 2008
223. **Suarez Y, Sessa WC.** MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res* 104: 442-454, 2009
224. **Sun G, Hou YB, Jia HY, Bi XH, Yu L, Chen DJ.** MiR-370 promotes cell death of liver cancer cells by Akt/FoxO3a signalling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20: 2011-2019, 2016
225. **Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F.** Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 71: 209-249, 2021
226. **Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ.** OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Res* 76: 3666-3670, 2016
227. **Swanson KD, Reigh C, Landreth GE.** ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X2 purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *J Biol Chem* 273: 19965-19971, 1998
228. **Tang CH, Yang RS, Chien MY, Chen CC, Fu WM.** Enhancement of bone morphogenetic protein-2 expression and bone formation by coumarin derivatives via p38 and ERK-dependent pathway in osteoblasts. *Eur J Pharmacol* 579: 40-49, 2008
229. **Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, Kidd VJ, Mak TW, Ingram AJ.** ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 277: 12710-12717, 2002
230. **Timar J, Dome B, Fazekas K, Janovics A, Paku S.** Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res* 7: 85-94, 2001
231. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354, 1979
232. **Trang P, Weidhaas JB, Slack FJ.** MicroRNAs as potential cancer therapeutics. *Oncogene* 27 Suppl 2: S52-S57, 2008
233. **Usta J, Kreydiyyeh S, Knio K, Barnabe P, Bou-Moughlabay Y, Dagher S.** Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. *Chem Biol Interact* 180: 39-46, 2009
234. **Valastyan S, Weinberg RA.** Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147: 275-292, 2011

235. **Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN.** A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18255-18260, 2006
236. **Van't Veer P, Jansen MC, Klerk M, Kok FJ.** Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr* 3: 103-107, 2000
237. **Vasudev NS, Reynolds AR.** Anti-angiogenic therapy for cancer: Current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 17: 471-494, 2014
238. **Verlande A, Krafcikova M, Potesil D, Trantirek L, Zdrahal Z, Elkalaf M, Trnka J, Soucek K, Rauch N, Rauch J, Kolch W, Uldrijan S.** Metabolic stress regulates ERK activity by controlling KSR-RAF heterodimerization. *EMBO Rep* 19: 320-336, 2018
239. **Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM.** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2257-2261, 2006
240. **Wagstaff SC, Bowler WB, Gallagher JA, Hipkind RA.** Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced c-fos gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 21: 2175-2181, 2000
241. **Wang A, Nomura M, Patan S, Ware JA.** Inhibition of protein kinase Calpha prevents endothelial cell migration and vascular tube formation in vitro and myocardial neovascularization in vivo. *Circ Res* 90: 609-616, 2002
242. **Wang J, Sen S.** MicroRNA functional network in pancreatic cancer: From biology to biomarkers of disease. *J Biosci* 36: 481-491, 2011
243. **Wang XH, Qian RZ, Zhang W, Chen SF, Jin HM, Hu RM.** MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36: 181-188, 2009
244. **Wang XH, Chen L.** MicroRNA-370 suppresses the retinal capillary endothelial cell growth by targeting KDR gene. *Bratisl Lek Listy* 118: 202-207, 2017
245. **Wang Y, Ma DL, Yu CH, Sha KF, Zhao MJ, Liu TJ.** MicroRNA-370 suppresses SOX12 transcription and acts as a tumor suppressor in bladder cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24: 2303-2312, 2020
246. **Wang Z, Sha HH, Li HJ.** Functions and mechanisms of miR-186 in human cancer. *Biomed Pharmacother* 119: 109428, 2019
247. **Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, Gillespie E, Slack FJ.** MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res* 67: 11111-11116, 2007
248. **Weng CJ, Yen GC.** Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev* 31: 323-351, 2012
249. **Westermarck B, Siegbahn A, Heldin CH, Claesson-Welsh L.** B-type receptor for platelet-derived growth factor mediates a chemotactic response by means of ligand-

- induced activation of the receptor protein-tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 128-132, 1990
250. **Wightman B, Ha I, Ruvkun G.** Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-862, 1993
251. **Wilson CW, Chuang PT.** Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction. *Development* 137: 2079-2094, 2010
252. **Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S.** Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11: 228-234, 2009
253. **Wu Z, Sun H, Zeng W, He J, Mao X.** Upregulation of MicroRNA-370 induces proliferation in human prostate cancer cells by downregulating the transcription factor FOXO1. *PLoS One* 7: e45825, 2012
254. **Wurdinger T, Tannous BA, Saydam O, Skog J, Grau S, Soutschek J, Weissleder R, Breakefield XO, Krichevsky AM.** miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 14: 382-393, 2008
255. **Xiang Y, Tian Q, Guan L, Niu SS.** The dual role of miR-186 in cancers: oncomir battling with tumor suppressor miRNA. *Front Oncol* 10: 233, 2020
256. **Xing X, Ma JH, Fu Y, Zhao H, Ye XX, Han Z, Jia FJ, Li X.** Essential oil extracted from *Erythrina corallodendron* L. leaves inhibits the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells. *Medicine (Baltimore)* 98: e17009, 2019
257. **Xu H, Czerwinski P, Hortmann M, Sohn HY, Forstermann U, Li H.** Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc Res* 78: 349-355, 2008
258. **Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC.** Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9: 189-198, 2006
259. **Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G.** Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 280: 9330-9335, 2005
260. **Ye J, Zhang Z, Sun L, Fang Y, Xu X, Zhou G.** miR-186 regulates chemo-sensitivity to paclitaxel via targeting MAPT in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Mol Biosyst* 12: 3417-3424, 2016
261. **Yee EMH, Brandl MB, Pasquier E, Cirillo G, Kimpton K, Kavallaris M, Kumar N, Vittorio O.** Dextran-Catechin inhibits angiogenesis by disrupting copper homeostasis in endothelial cells. *Sci Rep* 7: 7638, 2017
262. **Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR.** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17: 3011-3016, 2003
263. **Yin Y, Le SC, Hsu AL, Borgnia MJ, Yang H, Lee SY.** Structural basis of cooling agent and lipid sensing by the cold-activated TRPM8 channel. *Science* 363: eaav9334, 2019

264. **Yu S, Lu Z, Liu C, Meng Y, Ma Y, Zhao W, Liu J, Yu J, Chen J.** miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res* 70: 6015-6025, 2010
265. **Zappa C, Mousa SA.** Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res* 5: 288-300, 2016
266. **Zhang X, Zeng J, Zhou M, Li B, Zhang Y, Huang T, Wang L, Jia J, Chen C.** The tumor suppressive role of miRNA-370 by targeting FoxM1 in acute myeloid leukemia. *Mol Cancer* 11: 56, 2012
267. **Zhang YJ, Gan RY, Li S, Zhou Y, Li AN, Xu DP, Li HB.** Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules* 20: 21138-21156, 2015
268. **Zhao X, Deng R, Wang Y, Zhang H, Dou J, Li L, Du Y, Chen R, Cheng J, Yu J.** Twist1/Dnmt3a and miR186 establish a regulatory circuit that controls inflammation-associated prostate cancer progression. *Oncogenesis* 6: e315, 2017
269. **Zheng J, Zhuo YY, Zhang C, Tang GY, Gu XY, Wang F.** LncRNA TTTY15 regulates hypoxia-induced vascular endothelial cell injury via targeting miR-186-5p in cardiovascular disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24: 3293-3301, 2020
270. **Zhou K, Liu M, Cao Y.** New insight into microRNA functions in cancer: Oncogene-microRNA-tumor suppressor gene network. *Front Mol Biosci* 4: 46, 2017
271. **Zhu D, Deng X, Han XF, Sun XX, Pan TW, Zheng LP, Liu YQ.** Wedelolactone enhances osteoblastogenesis through ERK- and JNK-mediated BMP2 expression and Smad/1/5/8 phosphorylation. *Molecules* 23: 561, 2018a
272. **Zhu F, Du B, Xu B.** Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58: 1260-1270, 2018b
273. **Zhu J, Zhang B, Song W, Zhang X, Wang L, Yin B, Zhu F, Yu C, Li H.** A literature review on the role of miR-370 in disease. *Gene Rep* 4: 37-44, 2016
274. **Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY.** MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 18: 350-359, 2008

9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit bedanken, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes zu promovieren.

Bedanken möchte ich mich auch ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Matthias W. Laschke für die zahlreichen Diskussionen, Anregungen und neuen Ideen, die letztendlich zur Fertigstellung meiner Projekte und der damit verbundenen Promotion geführt haben.

Ich möchte mich ebenfalls bei Dr. Yuan Gu für die großartige Betreuung und Unterstützung während meiner Promotion bedanken und für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen. Dadurch habe ich nicht nur vieles im Laboralltag dazugelernt, sondern auch das Schreiben von Anträgen und Publikationen.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Kolleginnen Julia Parakenings, Christina Marx und Ruth Nickels, die mir in allen Situationen immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich auch experimentell unterstützt haben. Ohne Euch wäre der Laboralltag nur halb so schön gewesen.

Auch bei Dr. Lisa Nalbach, Ann-Sophie Böwe, Beate Schmitt und PD Dr. Emmanuel Ampofo möchte ich mich herzlich für die wissenschaftlichen Gespräche, Anregungen und Diskussionen bedanken. Eure stetige Hilfsbereitschaft, guten Ratschläge und Unterstützung in experimenteller Hinsicht haben mir sehr geholfen. Außerdem möchte ich mich bei Caroline Bickelmann, Sandra Hans und Janine Becker für die Unterstützung und Hilfe bei der Immunhistochemie bedanken sowie bei den restlichen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und die tolle Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich auch bei Dr. Xin Hui aus dem Institut für Zellbiologie für die Durchführung der Calcium Messung bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, ganz besonders bei Anna Lauer, die mich während meinem kompletten Bachelor- und Masterstudium begleitet hat und auch während der Promotionszeit immer für mich da war.

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

11 Publikationen und Abstracts

11.1 Originalarbeiten aus dieser Dissertation

Gu Y, **Becker V**, Zhao Y, Menger MD, Laschke MW. MiR-370 inhibits the angiogenic activity of endothelial cells by targeting smoothened (SMO) and bone morphogenetic protein (BMP)-2. *FASEB J* 33: 7213-7224, 2019

Becker V, Hui X, Nalbach L, Ampofo E, Lipp P, Menger MD, Laschke MW, Gu Y. Linalool inhibits the angiogenic activity of endothelial cells by downregulating intracellular ATP levels and activating TRPM8. *Angiogenesis* 24: 613-630, 2021

Becker V, Zhao Y, Boewe AS, Ampofo E, Ebert E, Hohneck J, Bohle RM, Meese E, Menger MD, Laschke MW, Gu Y. Hypoxia-induced downregulation of endothelial microRNA-186-5p promotes non-small cell lung cancer angiogenesis by upregulating protein kinase C alpha. (eingereicht bei Cellular and Molecular Life Sciences)

11.2 Weitere Originalarbeiten

Kiani K, Rudzitis-Auth J, Scheuer C, Movahedin M, Sadati Lamardi SN, Ardakani HM, **Becker V**, Moini A, Aflatoonian R, Ostad SN, Menger MD, Laschke MW. Calligonum comosum (Escanbil) extract exerts anti-angiogenic, anti-proliferative and anti-inflammatory effects on endometriotic lesions. *J Ethnopharmacol* 239: 111918, 2019

Nalbach L, Schmitt BM, **Becker V**, Scheller A, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. Nerve/glia antigen 2 is crucially involved in the revascularization of freely transplanted pancreatic islets. *Cell Tissue Res* 378: 195-205, 2019

Rudzitis-Auth J, Fuß SA, **Becker V**, Menger MD, Laschke MW. Inhibition of erythropoietin-producing hepatoma receptor B4 (EphB4) signalling suppresses the vascularization and growth of endometriotic lesions. *Br J Pharmacol* 177: 3225-3239, 2020

Schmitt BM, Boewe AS, **Becker V**, Nalbach L, Gu Y, Götz C, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Protein kinase CK2 regulates nerve/glia antigen (NG)2-mediated angiogenic activity of human pericytes. *Cells* 9: 1546, 2020

Nalbach L, Roma LP, Schmitt BM, **Becker V**, Körbel C, Wrublewsky S, Pack M, Später T, Metzger W, Menger MM, Frueh FS, Götz C, Lin H, Fox JEM, MacDonald PE, Menger MD,

Laschke MW, Ampofo E. Improvement of islet transplantation by the fusion of islet cells with functional blood vessels. *EMBO Mol Med* 13: e12616, 2021

Gu Y, Pais G, **Becker V**, Körbel C, Ampofo E, Ebert E, Hohneck J, Ludwig N, Messe E, Bohle RM, Zhao Y, Menger MD, Laschke MW. Suppression of endothelial miR-22 mediates non-small cell lung cancer cell-induced angiogenesis. *Mol Ther Nucleic Acids* 26:849-864, 2021

11.3 Zitierfähige Abstracts aus dieser Dissertation

Becker V, Gu Y, Ampofo E, Laschke MW, Menger MD. Identification of miR-186 as a potent angiogenesis inhibitor. *Eur Surg Res* 58: 302, 2017

Becker V, Gu Y, Ampofo E, Laschke MW, Menger MD. MiR-186 is an effective angiogenesis inhibitor. *Eur Surg Res* 59: 61, 2018

Gu Y, **Becker V**, Menger MD, Laschke MW. MiR-370 inhibits the angiogenic activity of endothelial cells by targeting SMO and BMP2. *Eur Surg Res* 59: 195, 2018

Becker V, Gu Y, Menger MD, Laschke MW. Linalool: A novel phytochemical angiogenesis inhibitor. *Eur Surg Res* 59: 195-196, 2018

Becker V, Gu Y, Menger MD, Laschke MW. Linalool inhibits angiogenesis by down-regulating intracellular ATP levels and activation of TRMP8 channels. *Eur Surg Res* 60: 176, 2019

11.4 Weitere zitierfähige Abstracts

Nalbach L, Ampofo E, Später T, **Becker V**, Metzger W, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Co-culture of pancreatic islet cells and adipose tissue-derived microvascular fragments for the generation of prevascularized pseudo-Islets. *Eur Surg Res* 59: 42, 2018

Nalbach L, Ampofo E, Später T, **Becker V**, Metzger W, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments enhances the revascularization of pseudo-islets. *Eur Surg Res* 59: 204-205, 2018

Ampofo E, Nalbach L, Schmitt BM, **Becker V**, Laschke MW, Menger MD. Effect of nerve/glial antigen (NG)2 on the revascularization of transplanted islets. *Eur Surg Res* 59: 191, 2018

Nalbach L, Ampofo E, Später T, **Becker V**, Metzger W, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Prevascularization of pseudo-islets with adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Surg Res* 60: 23-24, 2019

Nalbach L, Ampofo E, **Becker V**, Schmitt BM, Später T, Metzger W, Laschke MW. Improvement of islet transplantation by the generation of prevascularized pseudo-islets. *Eur Surg Res* 60: 172, 2019

Schmitt BM, **Becker V**, Nalbach L, Gu Y, Götz C, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Protein kinase CK2 regulates nerve/glial antigen (NG)2-mediated angiogenic activity of human pericytes. *Eur Surg Res* 60: 177, 2019

Gu Y, Pais G, **Becker V**, Körbel C, Zhao Y, Menger MD, Laschke MW. The tumor microenvironment promotes angiogenesis by down-regulation of endothelial miR-22. *Eur Surg Res* 60: 178, 2019