

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Molekulare Analyse von MicroRNAs
auf dem distalen langen Arm von Chromosom 10 in malignen
astrozytären Gliomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Artur Werner
2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schaal

Wie sagt man Danke für etwas, das 6 Jahre währte, zahlreiche Menschen involvierte am Ende vor allem aber als eigener Glücksfall zu sehen ist?

Ich denke persönlich.

Düsseldorf, im Frühjahr 2013

Thomas Artur Werner

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	10
1 Einleitung	12
1.1 Astrozytäre Tumoren	12
1.1.1 Diffuses Astrozytom	14
1.1.2 Anaplastisches Astrozytom	15
1.1.3 Glioblastom	15
1.1.4 Pathomechanismen der Gliomentstehung	17
1.1.4.1 Dysregulation des Zellzyklus	17
1.1.4.2 Dysregulation der Zellproliferation	19
1.1.4.3 Dysregulation der Apoptose	22
1.1.4.4 Dysregulation der Angiogenese	23
1.1.4.5 Dysregulation der Zellinvasion	24
1.1.5 Genomische Profile	25
1.2 MicroRNAs	28
1.2.1 Biogenese der MicroRNAs	28
1.2.2 Effektormechanismen der MicroRNAs	32
1.2.3 Regulation der MicroRNA-Biogenese	33
1.2.4 MicroRNAs in Gliomen	34
1.3 Ziele dieser Arbeit	38
2 Material und Methoden	39
2.1 Tumorproben	39
2.2 Sequenzen der MicroRNAs	40
2.3 Polymerase-Kettenreaktion	41

2.4	MicroRNA-cDNA-Synthese	42
2.5	Real-Time PCR.....	45
2.6	Natrium-Bisulfitbehandlung genomischer DNA.....	48
2.7	Pyrosequenzierung.....	50
2.8	Methoden der Zellkultur	57
2.8.1	Transfektion der Glioblastomzelllinien	57
2.8.2	Bestimmung der Zellproliferation mittels eines BrdU (5-Brom- 2'- Desoxyuridin)-basierten Chemilumineszenz-Nachweisverfahrens.....	58
2.8.3	Bestimmung der Zellvitalität mittels eines Chemilumineszenz-basierten CellTiter-Glo Luminescent Viability Assays	59
2.8.4	Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität mittels eines Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assays	59
2.9	Validierung potentieller miRNA-Zielgene mittels Luciferase 3'-Reporter- Assays	61
2.9.1	Klonierung der miRNA-Bindungsstellen potentieller Zielgene in psiCHECK2 und Plasmid-DNA Präparation	63
2.9.2	Plasmid-Sequenzierung mittels „Dye Terminator“-Methode.....	68
2.9.3	Luciferase 3'-Reporter-Gen-Assay	69
2.9.4	Generierung mutierter miRNA-Bindungsstellen mittels „Overlap-Extension“- PCR.....	71
2.9.5	Western Blot	72
3	Ergebnisse	75
3.1	Expressionsanalyse von distal auf dem langen Arm von Chromosom 10 lokalisierten MicroRNAs.....	75
3.1.1	Expressionsanalysen der MicroRNAs <i>hsa-miR-606</i> , <i>-607</i> , <i>-608</i> , <i>-609</i> , <i>-936</i> , <i>- 548e</i> , <i>-202</i> , <i>-202*</i>	76
3.1.2	Expressionsanalyse der MicroRNA <i>hsa-miR-605</i>	77
3.1.3	Expressionsanalyse der MicroRNA <i>hsa-miR-146b</i>	78

3.1.4	Expressionsanalyse der MicroRNA <i>hsa-miR-346</i> und ihres Wirtsgens <i>GRID1</i>	81
3.1.4.1	Expressionsanalyse der MicroRNA <i>hsa-miR-346</i>	81
3.1.4.2	Expressionsanalyse von <i>GRID1</i>	83
3.1.5	Expressionsanalyse der MicroRNA <i>hsa-miR-107</i> und ihres Wirtsgens <i>PANK1</i>	87
3.1.5.1	Expressionsanalyse der MicroRNA <i>hsa-miR-107</i>	87
3.1.5.2	Expressionsanalyse von <i>PANK1</i>	90
3.2	Methylierungsanalyse der 5'-lokalisierten CpG-Inseln von <i>hsa-mir-146b</i> , <i>hsa-miR-107/PANK1</i> und <i>hsa-miR-346/GRID1</i>	93
3.2.1	Methylierungsanalyse der 5'-lokalisierten CpG-Insel von <i>hsa-miR-146b</i>	93
3.2.2	Methylierungsanalyse der potentiellen Promotorregion von <i>hsa-miR-107/PANK1</i>	96
3.2.3	Methylierungsanalyse der potentiellen Promotorregion von <i>hsa-miR-346/GRID1</i>	98
3.2.3.1	Methylierungsanalyse der CpG-Insel-47 im 3'-Bereich von <i>hsa-miR-346</i>	99
3.2.3.2	Methylierungsanalyse der CpG-Insel-356 in der 5'-Region von <i>GRID1</i>	102
3.2.3.2.1	Methylierungsanalyse der CpG-Insel-356.1	102
3.2.3.2.2	Methylierungsanalyse der CpG-Insel-356.2	104
3.3	Funktionale Effekte einer Überexpression der MicroRNAs <i>hsa-miR-107</i> , <i>-146b</i> und <i>-346</i> in humanen Gliomzellen	107
3.3.1	Effekte der Überexpression von <i>hsa-miR-107</i> in Gliomzelllinien	108
3.3.2	Effekte der Überexpression von <i>hsa-miR-146b</i> in Gliomzellen	110
3.3.3	Effekte der Überexpression von <i>hsa-miR-346</i> in Gliomzellen	111
3.4	Identifizierung und Validierung potentieller Zielgene der microRNAs <i>hsa-miR-107</i> , <i>-146b</i> und <i>-346</i>	114
3.4.1	<i>CDK6</i> als Zielgen der miRNA <i>hsa-miR-107</i>	115
3.4.2	<i>EGFR</i> als Zielgen der miRNA <i>hsa-miR-146b</i>	118
3.4.3	<i>SEMA6A</i> und <i>BCL6</i> als Zielgene der miRNA <i>hsa-miR-346</i>	120

4 Diskussion	123
4.1 MicroRNAs mit veränderten Expressionsprofilen in malignen Gliomen	123
4.1.1 Expression von <i>hsa-miR-107</i> in astrozytären Gliomen	124
4.1.2 Expression von <i>hsa-miR-146b</i> in astrozytären Gliomen	127
4.1.3 Expression von <i>hsa-miR-346</i> in astrozytären Gliomen	129
4.2 Epigenetische DNA-Modifikationen als Ursache dysregulierter Genexpression	132
4.2.1 Methylierungsanalyse der 5'-genomischen Sequenzen der <i>hsa-miR-146b</i>	132
4.2.2 Methylierungsanalyse der 5'-CpG-Insel von <i>PANK1/hsa-miR-107</i>	133
4.2.3 Methylierungsanalyse der 5'-gelegenen CpG-Inseln von <i>GRID1/hsa-miR-346</i>	135
4.3 Biologische Effekte der Überexpression der MicroRNAs <i>has-miR-107</i> , <i>-146b</i> und <i>-346</i> in humanen Gliomzelllinien	138
4.3.1 Vitalität von Gliomzellen nach Transfektion von Vorläufer-miRNAs	138
4.3.2 Proliferationsaktivität von Gliomzellen nach Transfektion von Vorläufer-miRNAs	140
4.3.3 Apoptoseaktivität von Gliomzellen nach Transfektion von Vorläufer-miRNAs	144
4.4 <i>hsa-miR-107</i> reguliert die <i>CDK6</i> -Expression in Gliomzellen	147
4.4.1 <i>hsa-miR-146b</i> reguliert die <i>EGFR</i> -Expression in Gliomzellen	148
4.4.2 <i>hsa-miR-346</i> reguliert die <i>SMEA6A</i> - und <i>BCL6</i> -Expression in Gliomzellen.	149
5 Zusammenfassung	154
6 Literaturverzeichnis	156
7 Eidesstattliche Versicherung	182

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht molekularer Alterationen in diffusen Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen	27
2	Übersicht über die miRNA-Biogenese	31
3	Prinzip der stem-loop RT-PCR	47
4	Enzymatische Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin durch die DNA-Methyltransferase (DNMT) und S-Adenosylmethionin (SAM)	48
5	Chemischer Verlauf der Bisulfit-induzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil	49
6	Prinzip der Pyrosequenzierung	53
7	Spaltung des nicht fluoreszierenden Z-DEVD-R110 durch die Caspasen-3/7 unter Erzeugung des grün fluoreszierenden Rhodamin 110	60
8	Die psiCHECK™-2 Vektor-Karte	63
9	Biolumineszenzreaktionen katalysiert durch die Firefly und Renilla Luciferase	70
10	Schematischer Aufbau der Blotting-Kammer	73
11	Expression der MicroRNA <i>hsa-miR-605</i> in astrozytären Tumoren (AII, AAIII, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB)..	77
12	Expression der MicroRNA <i>hsa-miR-146b</i> in astrozytären Tumoren (AII, AAIII, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB)..	79
13	Chromosomale Lokalisation der MicroRNA <i>hsa-miR-346</i> und ihrem Wirtsgen <i>GRID1</i>	81
14	Expression der MicroRNA <i>hsa-miR-346</i> in astrozytären Tumoren (AII, AAIII, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB)	82
15	Expression des Gens <i>GRID1</i> in astrozytären Tumoren (AII, AAIII, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB)	84

16	Die Box-Plots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und –minimum der normalisierten relativen Expressionswerte für das Gen <i>GRID1</i> und die <i>hsa-miR-346</i>	86
17	Chromosomale Lokalisation der MicroRNA <i>hsa-miR-107</i> und ihres Wirtsgens <i>PANK1</i>	87
18	Expression der MicroRNA <i>hsa-miR-107</i> in astrozytären Tumoren (AII, AAI, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB)	88
19	Relative Genexpression von <i>PANK1</i> in astrozytären Tumoren (AII, AAI, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB)	90
20	Die Box-Plots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und –minimum der normalisierten Expressionswerte für das Gen <i>PANK1</i> und die <i>hsa-miR-107</i>	92
21	Genomische Lokalisation der MicroRNA <i>hsa-miR-146b</i> und der assoziierten 5'-CpG-reichen Region (CpG-Insel-45)	93
22	Methylierungsmuster der CpG-Insel-45 in der 5'-genomischen Region von <i>hsa-miR-146b</i>	95
23	Methylierungsmuster der CpG-Insel-93 in der 5'-genomischen Region von <i>PANK1</i>	97
24	Methylierungsmuster der CpG-Insel-47 im Intron 1 von <i>GRID1</i> bzw. 3'-Bereich von <i>hsa-miR-346</i>	100
25	Relative mRNA-Expression von <i>GRID1</i> in AZA/TSA-behandelten Gliomzelllinien (A+T1, A+T2) sowie in nicht behandelten Kontrollzellen (Co.)	103
26	Methylierungsmuster in der ersten untersuchten Region der CpG-Insel-356 in der 5'-genomischen Region von <i>GRID1</i>	104
27	Methylierungsmuster im zweiten untersuchten Bereich der CpG-Insel-356 in der 5'-genomischen Region von <i>GRID1</i>	107

28	Graphische Darstellung der photometrisch gemessenen Signalstärken in den Zelllinien A172 und T98G für Vitalität, Proliferation und Apoptose nach Transfektion der Vorläufer-miRNAs <i>pre-miR-107</i> , <i>-146b</i> oder <i>-346</i> in Relation zur Kontrolltransfektion mit <i>pre-miR-NC1</i>	113
29	Relative CDK6 mRNA-Expression in <i>pre-miR-107</i> (107) und <i>pre-NC1</i> -transfizierten (NC1) T98G Gliomzellen	115
30	Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität eines Konstruktes mit der in der 3'-UTR von <i>CDK6</i> gelegenen <i>miR-107</i> Bindungsstelle in T98G Gliomzellen nach Transfektion mit der <i>pre-miR-107</i> (107) beziehungsweise <i>pre-NC1</i> (NC1)	116
31	Western Blot-Analyse mit einem Cdk6-spezifischen Antikörper	117
32	Relative EGFR-mRNA-Expression in <i>pre-miR-146b</i> (146b) und <i>pre-NC1</i> -transfizierten (NC1) Zellen	118
33	Relative Darstellung der Luciferase-Aktivität für 3'-UTR Konstrukte des <i>EGFR</i> -Transkripts mit der <i>miR-146b</i> Bindungsstelle in T98G Gliomzellen nach Transfektion mit der <i>pre-miR-146b</i> (146b) beziehungsweise <i>pre-NC1</i> (NC1)	119
34	Relative mRNA-Expression von (A) <i>SEMA6A</i> und (B) <i>BCL6</i> in <i>pre-miR-346</i> (346) und <i>pre-NC1</i> -transfizierten (NC1) T98G Gliomzellen.....	121
35	Relative Darstellung der Luciferase-Aktivität für 3'-UTR Konstrukte des <i>SEMA6A</i> - und <i>BCL6</i> -Transkripts mit der <i>miR-346</i> Bindungsstelle in T98G Gliomzellen nach Transfektion mit der <i>pre-miR-346</i> (346) beziehungsweise <i>pre-NC1</i> (NC1).....	122

Tabellenverzeichnis

1	WHO-Gradierung der astrozytären Tumoren	13
2	Für Real-Time RT-PCR Analysen verwendete käuflich erhältliche RNA-Proben	40
3	Primersequenzen der cDNA-Synthese.....	44
4	Übersicht der Primerlokalisationen der unterschiedlichen CpG-Inseln für die Pyrosequenzierung	54
5	Primersequenzen für die Pyrosequenzierung	55
6	Primersequenzen für die Zielgen-Validierung mittels Real-Time PCR	62
7	Übersicht der miRNAs auf Chromosom 10q24-qter mit Angabe der genauen Nukleotidlokalisierung	75
8	Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für <i>hsa-miR-605</i> zwischen ausgewählten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test	78
9	Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für <i>hsa-miR-146b</i> zwischen den untersuchten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test	80
10	Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für <i>hsa-miR-346</i> zwischen den untersuchten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test	83
11	Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für <i>GRID1</i> zwischen den untersuchten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test	85
12	Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für <i>hsa-miR-107</i> der untersuchten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test	89

13	Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für <i>PANK1</i> zwischen ausgewählten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test	91
14	Darstellung der mittleren Methylierungsrate (in % methylierter Allele) und der Standardabweichung sowie der statistischen Signifikanz des Methylierungsniveaus für die CpG-Insel-47 zwischen ausgewählten Gruppen mittels T-Test	101
15	Darstellung der mittleren Methylierungsrate (in % methylierter Allele) und der Standardabweichung sowie der statistischen Signifikanz des Methylierungsniveaus für das zweite untersuchte Fragment der CpG-Insel-356 zwischen den einzelnen Gruppen mittels T-Test	105
16	Übersicht der einzelnen photometrisch bestimmten Signalemissionswerte bezogen auf die <i>pre-miR-NC1</i> -transfizierten Zellen für die Gliomzelllinien A172 und T98G nach 10 nM bzw. 25 nM Transfektion von <i>pre-miR-107</i> ..	110
17	Übersicht der einzelnen photometrisch bestimmten Signalemissionswerte bezogen auf die <i>pre-miR-NC1</i> -transfizierten Zellen für die Gliomzelllinien A172 und T98G nach 10 nM bzw. 25 nM Transfektion von <i>pre-miR-146b</i> .	111
18	Übersicht der einzelnen photometrisch bestimmten Signalemissionswerte bezogen auf die <i>pre-miR-NC1</i> -transfizierten Zellen für die Gliomzelllinien A172 und T98G nach 10 nM bzw. 25 nM Transfektion von <i>pre-miR-346</i>	112

1 Einleitung

1.1 Astrozytäre Tumoren

Das Nervensystem des Menschen umfasst die Gesamtheit aller im Organismus enthaltenen Nerven- und Gliazellen. Dieses Organsystem ermöglicht es uns, in eine geordnete Interaktion mit unserer Umgebung zu treten. Wesentliche Aufgabe dieses hoch komplexen und ausdifferenzierten Netzwerkes ist die Reizwahrnehmung aus der Umwelt, die Integration des entstandenen neuronalen Signals in sich entwickelnde oder bereits bestehende Muster sowie die Generierung einer adäquaten Antwort.

Neben vaskulären, inflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen zählen Neoplasien zu den wichtigsten Pathologien des zentralen Nervensystems (ZNS). Obwohl Tumoren des ZNS lediglich für 2 % aller Tumorerkrankungen des Menschen verantwortlich sind, haben sie aufgrund ihrer meist weitreichenden funktionellen Folgen und ihrer schlechten Prognose eine Sonderstellung inne^{1,2}. Während sich prinzipiell aus jedem Zelltyp und in jedem Abschnitt des Nervensystems eine maligne Neoplasie entwickeln kann, sind mit Abstand die häufigsten bösartigen Neubildungen dem Stützgewebe des ZNS, den sogenannten Gliazellen zuzuschreiben, mit einer jährlichen Inzidenzrate von 4,6 – 9,5/100.000 Personen³.

Die astrozytären Gliome sind die häufigsten primären Hirntumoren. Ihre Tumorzellen zeigen zytologische Ähnlichkeiten zu den Astrozyten. Astrozytäre Gliome sind verantwortlich für 31 % aller Tumoren des ZNS und für 80 % der malignen Formen (Tabelle 1)³. Aufgrund ihres unterschiedlichen Wachstumsverhaltens werden die astrozytären Gliome in zwei Hauptkategorien unterteilt: (1) die häufigere Gruppe der diffus infiltrierenden Astrozytome und (2) die Gruppe der selteneren Entitäten mit einem mehr zirkumskripten Wachstum. Zur Gruppe der diffus infiltrierenden Astro-

zytome gehören das diffuse Astrozytom des WHO-Grades II (AII), das anaplastische Astrozytom des WHO-Grades III (AIII), das primäre und sekundäre Glioblastom des WHO-Grades IV (GBIV) sowie die Gliomatosis cerebri. Zur Kategorie (2) gehören das pilozytische Astrozytom, das subependymale Riesenzellastrozytom sowie das pleomorphe Xanthoastrozytom. Letztgenannte Gruppe ist charakterisiert durch ihr präferentielles Vorkommen im Kindes- und jungen Erwachsenenalter, ihr langsames Wachstum, ihr geringes Potential zur malignen Progression sowie die Möglichkeit der Heilung durch Resektion. Im Gegensatz hierzu zeigen die diffus infiltrierenden Astrozytome einen Häufigkeitsgipfel im mittleren Erwachsenenalter sowie ein schnelles Wachstum, eine inhärente Neigung zu lokalen Rezidiven und maligner Progression mit daraus resultierenden mangelhaften therapeutischen Möglichkeiten^{2,4}.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den diffus infiltrierenden Astrozytomen, so dass sich die folgenden Ausführungen auf diese Gruppe beschränken.

Tabelle 1: WHO-Gradierung der astrozytären Tumoren⁵.

WHO-Grad	Definition
I	Läsionen mit geringgradiger proliferativer Aktivität, zirkumskriptem Wachstum und möglicher Heilung nach alleiniger chirurgischer Resektion
II	Infiltratives Wachstum, histologisch mäßig zellreicher Tumor mit zytologischer Atypie aber ohne Anaplasiezeichen
III	Infiltratives Wachstum, histologisch zellreicher Tumor mit Merkmalen der Anaplasie, inklusive zytologischer Atypie und erhöhter mitotischer Aktivität
IV	Infiltratives Wachstum, histologisch zellreicher Tumor mit starken Merkmalen der Anaplasie, inklusive zytologischer Atypie, mitotischer Aktivität, pathologischer mikrovaskulärer Proliferation und/oder Nekrosen

1.1.1 Diffuses Astrozytom

Definitionsgemäß handelt es sich hierbei um ein langsam wachsendes, gut differenziertes, diffus infiltrierendes Astrozytom, welches sich vornehmlich supratentoriell bei jungen Erwachsenen mit einem Altersgipfel zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr manifestiert. Im zeitlichen Verlauf imponiert eine inhärente Neigung zur Ausbildung einer malignen Progression hin zum anaplastischen Astrozytom (AAIII) und letztendlich zum sekundären Glioblastom (GBIV). Sie sind verantwortlich für 5 % aller primären ZNS-Tumoren und 10-15 % aller astrozytären Gliome^{1,2,5,6}.

Klinisch imponieren diffuse Astrozytome insbesondere bei frontaler Lokalisation primär mit Wesensveränderungen, welche Anfangs subtiler Natur sein können, sich im weiteren Krankheitsverlauf bezüglich ihrer Ausprägung aber merklich steigern. Weitere Manifestationsformen, welche in der Regel zu einer vergleichbar schnelleren Abklärung führen, sind Krampfanfälle, neurologische Ausfälle und Zeichen eines gesteigerten Hirndrucks⁷.

Die Dauer des klinisch manifesten Krankheitsverlaufes wird im Wesentlichen durch die initiale biologische Wertigkeit des Malignoms bestimmt. Neben der histologischen Artendiagnose, welche entitätenspezifisch ist, folgt die Einteilung der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) für Tumoren des zentralen Nervensystems einer Malignitätsskala, reichend von niedriggradig bis hochgradig maligne, deren Anwendung entitätsübergreifend Bestand hat⁵. Gliale Tumoren des WHO-Grades II imponieren histologisch alleinig durch ihre zytologischen Atypien und ihre infiltrative Natur (Tabelle 1). Trotz der geringgradigen proliferativen Aktivität der WHO-Grad II diffusen Gliome haben diese eine ausgeprägte Rezidivneigung².

Die Diagnosestellung erfolgt in der Regel mittels kranialer Bildgebung unter Verwendung von Computer Tomographie (CT) und der Magnetresonanztomographie (MRT) sowie histologischer Untersuchung einer offen oder stereotaktisch gewonnenen Biopsieprobe. Die Therapie besteht bei diffus infiltrierenden Astrozytomen des

WHO-Grades II primär in der chirurgischen Resektion. In Einzelfällen ist auch eine zunächst abwartende Beobachtung des weiteren Verlaufes gerechtfertigt. Radio- oder Chemotherapie werden bei klinisch-radiologischem Tumorprogress bzw. einer malignen Progression im Rezidivfall eingesetzt⁷⁻⁹. Trotz multimodaler Therapieregime beträgt die Überlebensdauer von Patienten mit einem diffusen Astrozytom WHO Grad II nach Diagnosestellung im Mittel nur ca. 5-8 Jahre^{1,5}.

1.1.2 Anaplastisches Astrozytom

Anaplastische Astrozytome des WHO-Grades III können sich im Rahmen einer malignen Progression aus einem bereits vorbestehenden AII entwickeln oder sich *de novo*, das heißt in der Abwesenheit einer niedriggradigeren malignen Vorläuferläsion manifestieren. Es handelt sich hierbei um diffus infiltrierende Astrozytome, welche sich von AII durch eine vermehrte Zellularität, zytologische Atypien und eine erhöhte mitotische Aktivität unterscheiden. Zusätzlich bestehen auch hier eine intrinsische Neigung zur malignen Progression sowie eine ausgeprägte Rezidivneigung^{1,2,5,7}. Epidemiologisch betrachtet stehen die anaplastischen Astrozytome (AIII) für ca. 10 % aller Gliome, mit der höchsten Inzidenz zwischen dem 40. und 45. Lebensjahr². Die Diagnostik erfolgt in Analogie zu den AII. Aufgrund der rascheren Progredienz, der höheren Rezidivneigung und dem destruierenderen Wachstumsverhalten werden jedoch aggressivere Therapiekonzepte mit adjuvanter Radio- oder Chemotherapie gewählt. Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt ca. 2-3 Jahre⁵.

1.1.3 Glioblastom

Das Glioblastom WHO-Grad IV (GBIV) ist der häufigste primäre Tumor des ZNS. Das vornehmlich in den Großhirnhemisphären, insbesondere frontotemporal lokalisierte Malignom ist verantwortlich für 10-15 % aller intrakraniellen Tumoren sowie

für 50-60 % aller Gliome. Die jährliche Inzidenzrate beträgt 2-3/100.000 mit der höchsten Inzidenz in der Altersgruppe der 50-70 Jährigen^{2,3}.

Histologisch zeigt das Glioblastom alle der in Tabelle 1 aufgeführten Charakteristika eines WHO-Grad IV Malignoms. Hierzu gehören ein aggressives infiltratives Wachstum, nukleare Atypien und zelluläre Pleomorphie, sehr hohe mitotische Aktivität, sowie mikrovaskuläre Proliferationen und Nekrosen. Makroskopisch resultiert hieraus die „charakteristische „bunte“ Schnittfläche [...] mit gelblichen Nekrosen, Blutungen und grau-weißem Tumorgewebe“^{1,2,6}.

In Analogie zu den AAIII unterscheidet man bei den GBIV die sich schnell entwickelnden, *de novo* entstehenden primären GBIV (pGBIV), von den sich aus vorbestehenden niedriggradigeren Gliomen entwickelnden sekundären GBIV (sGBIV). Letztere sind mit 5 % deutlich in der Minderheit und stellen den Endpunkt der malignen Progression niedriggradiger Astrozytome dar. Man geht davon aus, dass ca. 70 % der WHO-Grad II Gliome in einem Zeitraum von 5-10 Jahren nach Diagnose in sekundäre anaplastische Gliome bzw. Glioblastome übergehen^{6,10}. Bemerkenswerterweise sind beide Entitäten trotz ihrer distinkten Anamnese morphologisch und in der abschließenden klinischen Präsentation nicht zu unterscheiden. Molekulargenetische Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass, obwohl beide Glioblastom-Subtypen einen gemeinsamen phänotypischen Endpunkt erreichen, sich die Muster ihrer genetischen und epigenetischen Veränderungen auffallend von einander unterscheiden^{2,6,9}.

Die Diagnosestellung sowie Therapie entspricht dem bereits beschriebenen Vorgehen, nur dass hier aufgrund des raschen Wachstums der Tumoren eine weitere Eskalation der Therapie mit kombinierter Radiochemotherapie nach Operation durchgeführt wird. Trotzdem ist die Prognose des Glioblastoms mit einer zu erwartenden Krankheitsdauer von im Durchschnitt weniger als einem Jahr sehr ungünstig^{1,5}.

1.1.4 Pathomechanismen der Gliomentstehung

Die histopathologischen Kennzeichen eines GBIV sind unkontrollierte Zellproliferation, diffuse Infiltration, pathologische Angiogenese, Nekrosenbildung, extensive Resistenzen gegen Apoptose und eine ausgeprägte genomische Instabilität, welche sich unter anderem in einer prominenten intratumoralen Heterogenität manifestiert⁶. Diese Fixpunkte glialer Entartung haben ihre Ursache in spezifischen genetischen und epigenetischen Alterationen, die wiederum zu Veränderungen in abhängigen Signalwegen führen (Abb. 1).

1.1.4.1 Dysregulation des Zellzyklus

Mutationen in Zellzyklus-regulierenden Genen, wie beispielsweise dem Retinoblastomgen (*RBI*) und dem *CDKN2A*-Gen gehören zu den häufigsten inaktivierenden Mutationen in Gliomen (Abb. 1). Der pRB-Signalweg ist verantwortlich für den geordneten Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus und hält somit eine Schlüsselfunktion für Zellteilung und –proliferation inne. In Abwesenheit eines funktionsfähigen pRB-Signalweges sind Tumorzellen besonders anfällig für inadäquate Zellteilungen, welche zusätzlich durch Verlust der p53-Funktion sowie Aktivierung mitogener Signalkaskaden wie dem Phosphoinositol-3'-Kinase (PI3K) und dem Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signalweg befeuert werden⁶.

In ruhenden Zellen ist pRB hypophosphoryliert und blockiert so den Transkriptionsfaktor E2F, der essentiell für das Fortschreiten des Zellzyklus ist. Durch mitogene Stimulierung erfolgt die Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (Cyclin-Dependent Kinases, CDK) CDK4 und CDK6 als auch die Inaktivierung des CDK2/Cyclin E Inhibitors p27^{Kip1}^{6,9}. Die Aktivierung dieser Faktoren ermöglicht nun die Phosphorylierung des pRB mit der anschließenden Freisetzung von E2F und dem daraus resultierenden Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus¹¹.

Die pRB-vermittelte Inhibierung der Zellteilung wird in astrozytären Gliomen durch eine Reihe von Mechanismen umgangen. Das *RBI*-Gen liegt auf dem Chromosom 13q14 und ist in bis zu 25 % aller hochgradigen Gliome mutiert¹². Weiterhin besteht die Möglichkeit einer funktionellen Inaktivierung von pRB durch die Amplifikation von CDK4, die man in ca. 15 % der Glioblastome findet¹³. Außerdem besteht häufig der Verlust der pRB-Funktion durch die Inaktivierung des *CDKN2A*-Gens auf 9p21, dessen Genprodukt p16^{Ink4a} als Inhibitor von Cdk4 und Cdk6 fungiert. In 50-70 % aller Glioblastome ist das *CDKN2A*-Gen durch Verluste beider Allele deletiert (homozygote Deletion) oder wird durch externe Punktmutation sowie aberrante Promotormethylierung inaktiviert^{6,14,15}.

Das Tumorsuppressorprotein p53 verhindert die Vernetzung genomisch instabiler bzw. defekter Zellen in der S-Phase des Zellzyklus und führt entweder zum Zellzyklusarrest bzw. bei besonders schweren genomischen Defekten zur Apoptose¹⁶. Durch zytotoxischen Stress kommt es zu einer Stabilisierung von p53, was zu einer veränderten transkriptionellen Aktivität von p53-regulierten Zielgenen führt. Insgesamt kann p53 als Transkriptionsfaktor an Promotorregionen von mehr als 2500 potentiellen Effektorgenen binden^{17,18}. Das in der chromosomalen Region 17p13.1 lokalisierte Gen *TP53* ist in einem Großteil von Tumoren in unterschiedlichen Organen verändert. Am häufigsten finden sich Punktmutationen, welche z. B. die DNA-Bindung verhindern, seltener auch Verluste beider Allele. In Gliomen stellen *TP53*-Mutationen eine frühe genetische Veränderung dar, die bereits in über 60 % der diffusen Astrozytome WHO-Grad II anzutreffen sind⁶. Neben Mutationen des *TP53*-Gens selbst finden sich in malignen Gliomen weitere Veränderungen in anderen Genen, deren Genprodukte die Funktion bzw. Aktivität von p53 regulieren. So zeigen ca. 10 % der Glioblastome eine Amplifikation des *MDM2*-Gens. Interessanterweise finden sich *MDM2*-Amplifikationen vornehmlich in der Gruppe der Glioblastome mit intaktem *TP53* Gen¹⁹. Das *MDM2*-Protein wirkt als Inhibitor der p53-Funktion durch Ubiquitinierung von p53 und letztlich Induktion seines proteasomalen Abbaus^{20,21}. Das dem *MDM2* verwandte Gen *MDM4*, welches die Ligaseaktivität von *MDM2* an

p53 unterstützt, zeigt eine Amplifikation in ca. 4 % der Glioblastome, wiederum zu meist Tumoren, die weder eine *TP53*-Mutation noch eine *MDM2*-Amplifikation aufweisen²². Schließlich finden sich in ca. 40 % der Glioblastome homozygote Deletionen des *p14^{ARF}*-Gens, dessen Genprodukt als Inhibitor von MDM2 fungiert^{6,23}.

1.1.4.2 Dysregulation der Zellproliferation

Die Zellproliferation ist normalerweise abhängig von Signalen aus der Umgebung der Zelle. Exogene Stimuli, Zelladhäsionsprozesse oder Kontakte zur extrazellulären Matrix aktivieren z. B. unterschiedlichste intrazelluläre Signalkaskaden, welche wiederum im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke das Zellwachstum stimulieren oder inhibieren können. Zwei zentrale Pfade sind hierbei der PI3K- und MAPK-Signalweg. Im Gegensatz zu normalen Zellen haben sich maligne entartete Zellen den kontrollierenden Regulationen durch externe Signale auf verschiedenste Arten entzogen. Sie sind hierdurch in der Lage, unabhängig vom extrazellulären Milieu ihre Zellteilung, ihre Mobilität und ihr Überleben autonom zu steuern. Dies geschieht u.a. durch die unkontrollierte Aktivierung der zentralen Signalwege, nicht selten durch Veränderung der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK)⁶.

Der MAPK-Signaltransduktionsweg kann auf unterschiedliche Arten aktiviert werden: (1) durch die Bindung von Integrinen, welche über die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe zur Phosphorylierung und somit Aktivierung von Regulatorkinasen führen oder (2) über die Aktivierung von RTK, z. B. durch Wachstumsfaktorbindung, die durch Rezeptordimerisation Bindungsstellen aktiviert, welche über Adapterproteinkomplexe wie Grb2/SOS Ras aktivieren^{6,9}. Ras ist ein Protoonkogen und bildet als kleines G-Protein die gemeinsame Endstrecke beider Aktivierungsmechanismen. In seiner aktivierten GTP-gebundenen Form fungiert es als molekularer Einschalter für Signalmoleküle. Am Ende des MAPK-Signaltransduktionsweges steht

die Aktivierung der Extracellular Signal-regulated Kinasen (ERK), welche intranukleär eine Reihe proliferationsfördernder Transkriptionsfaktoren aktivieren und dadurch das Zellwachstum fördern⁶.

Ein weiterer zentraler Regulationsmechanismus ist die Interaktion von PI3K, PTEN und AKT. Durch Mitogenstimulation kommt es durch RTK zur Aktivierung der PI3K, welche ihrerseits Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃) phosphoryliert. Der *second messenger* PIP₃ aktiviert nun seinerseits zahlreiche weitere Signalproteine, von denen das wichtigste AKT ist, das u. a. Zellproliferation und –überleben reguliert. Mutationen mit einer Aktivitätssteigerung des Gens *PIK3CA*, welches die katalytische Untereinheit p110 α der PI3K kodiert, sind in mehreren Karzinomen dokumentiert und werden in Glioblastomen mit einer Frequenz von 17-25 % angegeben^{6,24,25}.

Das Phosphatase-and-tensin-homolog (PTEN) Protein ist eines der bedeutendsten Tumorsuppressoren und in ca. ~30 % der Glioblastome mutiert oder durch epigenetische Modifikationen inaktiviert (Abb. 1). Das *PTEN*-Gen ist in der chromosomalen Region 10q23.3 lokalisiert und kodiert für eine Phosphatase mit dualer Spezifität²⁶. Als Folge einer Inaktivierung von PTEN, z. B. durch eine Mutation, kann es zu einer aberranten Aktivierung des PI3K-Signalweges und seines protoonkogenen Potentials kommen²⁷.

In mehreren Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine gehirnspezifische Inaktivierung von PTEN zu einer übermäßigen Proliferation, verstärkter Migration und einer gesteigerten Resistenz gegenüber Apoptose in Astrozyten führt. Zusätzlich gelang der Nachweis, dass bei Inaktivierung der pRB-Proteinfamilie in Astrozyten eine gleichzeitige Abschaltung von PTEN eine Zunahme der Angiogenese zur Folge hat, wie sie auch bei Glioblastomen beobachtet wird^{28,29}. Neben der bereits oben beschriebenen antagonistischen Wirkung von PTEN auf PI3K spielt PTEN zusätzlich eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität durch Stabilisierung der Zentromere und Unterstützung der DNA-Reparatur⁶.

Der letzte wesentliche Akteur in dieser Signalkaskade ist die Proteinkinase AKT. Neben ihrer Beteiligung an der Regulation von Zellproliferation und -invasion bekleidet sie eine Schlüsselfunktion in der Initiationsverhinderung der Apoptose. Ein Großteil der höhergradigen Gliome zeigt eine signifikante Zunahme der AKT-Aktivität³⁰. Das AKT-Protoonkogen wird mittels Phosphorylierung durch PI3K aktiviert und ist seinerseits in der Lage, durch Modifikation des Bcl-2-associated death promoter (BAD), eines pro-apoptotischen Proteins der Bcl-2 Familie, die Dissoziation des Bcl-2/Bcl-X Komplexes zu bewirken, welcher so seine apoptotische Wirkung verliert^{6,31}. Zusätzlich ist AKT in der Lage, durch spezifische Modifikationen weitere Protoonkogene wie NF- κ B und mTOR zu aktivieren, welche wiederum die Transkription anderer Protoonkogene steigern^{6,30}.

Ein weiterer elementarer Bestandteil der Pathogenese maligner Gliome ist die Dysregulation der Wachstumsfaktorrezeptoren für den Epidermal Growth Factor (EGF) und den Platelet-derived Growth Factor (PDGF). Beide Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle sowohl in der ZNS-Entwicklung, als auch in der Tumorentstehung und stellen zwei Schlüsselziele in der *targeted therapy* dar. Rund 40 % aller pGBIV-Patienten zeigen molekulargenetisch eine Amplifikation des *EGF-Rezeptor (EGFR)* Gens (Abb. 1). Die Mutationsvariante EGFRvIII, mit einer Deletion der Exone 2-7, finden sich zusätzlich zur *EGFR*-Amplifikation in 20-30 % aller pGBIV^{5,6,32}. Dieses ausschließlich in Tumorzellen vorkommende mutierte EGFR-Protein ist aufgrund des Verlustes eines großen Teils der extrazellulären Domäne nicht in der Lage, Liganden zu binden, führt jedoch aufgrund einer konstitutiven Phosphorylierung zu einer Aktivierung des weiter stromabwärts gelegenen EGFR-Signalweges. Zusätzlich entgeht EGFRvIII einer effektiven Herunterregulierung durch gestörte Internalisierung und mangelhafte Ubiquitinierung für die lysosomale Degradation, was sein onkogenes Potential noch verstärkt^{6,33}. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des EGFR-Systems zu einer Steigerung des onkogenen Potentials von Zellen führt, hervorgerufen durch eine reduzierte

Apoptoseneigung durch die Hochregulation von Bcl-x_L und eine gesteigerte zelluläre Proliferation³⁴⁻³⁷.

Einen zweiten für Gliome relevanten Signalweg stellen der PDGF-Rezeptor A (PDGFRA) und seine Liganden PDGFA und PDGFB dar (Abb. 1). Eine erhöhte Expression von PDGFRA in Tumorzellen finden sich in ca. 60 % der Gliome, während der PDGFRB in den Endothelzellen maligner Gliome überexprimiert wird³⁸⁻⁴⁰. Im Gegensatz zum *EGFR*-Gen ist eine Amplifikation des *PDGFRA*-Gens eine relativ seltene Veränderung in Gliomen (< 10 % der Fälle)⁹. Dessen ungeachtet ist auch hier in Analogie zur Variante EGFRvIII eine Deletion beschrieben, welche unter Verlust der Exone 8 und 9 eine konstitutiv aktivierende Mutante erzeugt, die wiederum die Tumorigenität steigert⁴¹. Neben EGFR und PDGFR sind simultan weitere RTK in Gliomzellen aktiv, so dass in Zelllinien erst eine vollständige Aufhebung malignen Wachstumsverhaltens festgestellt wurde, nachdem mindestens drei separate RTK ausgeschaltet wurden^{6,42}.

1.1.4.3 Dysregulation der Apoptose

Ein charakteristisches Merkmal maligner Gliome ist ihre inhärente Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli wie Radio- oder Chemotherapie. Diese Eigenschaft steht in Verbindung mit Aberrationen molekulargenetischer Regelkreise durch Mutation diverser Schlüsselmoleküle. Hierbei handelt es sich um die bereits unter 1.1.4.1-2 beschriebenen RTK und die p53-abhängigen Signalkaskaden sowie die PI3K-PTEN-AKT-Achse. Weitere wichtige Akteure in diesem Netzwerk sind die klassischen Todesrezeptoren TNFR1, TRAILR1, TRAILR2 und CD95 sowie die intrinsischen mitochondrialen Regelkreise^{6,9}.

Die Bedeutung der Todesrezeptoren für Liganden-induzierte Apoptose konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden. So kam es im Rahmen der malignen Entdifferenzierung von Tumoren zu einer Veränderung in der Expressionsdichte der Rezep-

toren, deren Avidität zu den jeweiligen spezifischen Liganden und deren Funktionalität sowie zu einer Abnahme der Dichte nicht Apoptose-induzierender Decoy-Rezeptoren⁴³⁻⁴⁵. Ein weiterer gewichtiger Aspekt des gestörten Apoptoseprotokolls in Gliomzellen ist die dysregulierte Expression der Proteine der anti-apoptotischen Bcl-2-Familie (BAK, BAD, BID, BAX, BCL-X_L, MCL-1)⁶. Sie erhalten die Integrität der mitochondrialen Membran und verhindern die Freisetzung von Cytochrom c, mit der Konsequenz einer Störung der apoptotischen Caspase-Kaskade³¹. Das Expressionsniveau verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Familie korreliert interessanterweise mit dem WHO-Grad der Gliome^{46,47}. Neu in den Fokus der Erforschung der Resistenzmechanismen glialer Tumorzellen gegen Apoptose-induzierende Chemotherapeutika ist das Protein Bcl2-like 12 (Bcl2L12) gerückt. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen potenten Inhibitor post-mitochondrialer Apoptosesignale handelt, welcher insbesondere in pGBIV signifikant überexprimiert ist. Seinen Effekt erzielt Bcl2L12 durch seine spezifische Interaktion mit der Effektor-Caspase 7 und dem Tumorsuppressor p53. Dabei führt Bcl2L12 zu einer Inhibition der p53-abhängigen Seneszenz und apoptotischen Prozessen in Gliomzellen^{6,48-}

50

1.1.4.4 Dysregulation der Angiogenese

Mikrovaskuläre Prolifereate gehören zu den histologischen Definitionskriterien des Glioblastoms (Tabelle 1). Obwohl primäre und sekundäre GBIV unterschiedliche ätiopathogenetische Veränderungen aufweisen⁵¹, scheint es doch so zu sein, dass die unterschiedlichen genetischen Veränderungen eine gemeinsame angiogenetische Endstrecke erreichen, die zu einer Aktivierung von Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-abhängigen und HIF-unabhängigen, positiven (VEGF, PDGF, bFGF, IL-8, SDF-1) und negativen (Thrombospondin 1/2, Endostatin, Tumstatin, Interferone) Effektoren führt^{6,52-54}.

Obwohl die genauen molekularen Mechanismen der Angiogenese in GBIV noch nicht vollständig geklärt sind, zeichnet sich doch ein Nebeneinander von Kaskaden ab, welche zum einen durch Hypoxie induziert werden, im Sinne einer Adaptation, und zum anderen Folge kritischer genetischer Mutationen sind. Beide Mechanismen scheinen in den Tumoren gemeinsam abzulaufen und sich gegenseitig zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass charakteristische Schlüsselmutationen im *PTEN*-, *EGFR*- und *CMYC*-Gen als eine Art angiogener Schalter (angiogenic switch)⁶ dienen können, welche HIF-1 α oder VEGF stabilisieren und somit die Neoangiogenese fördern⁵⁵⁻⁵⁹ (Abb. 1).

1.1.4.5 Dysregulation der Zellinvasion

Das infiltrative Wachstum astrozytärer Gliome ist eines der wesentlichen Faktoren für die ungünstige Prognose des Patienten. Es ist diese Eigenschaft sowie der Konsequenzen behaftete Kontext des ZNS, die eine umfassende Tumorresektion und damit potentielle Heilung in der Mehrheit der Patienten unmöglich macht. Die Folge sind Rezidivtumoren in unmittelbarer Nähe der Resektionsränder und ein weiterer Progress der Erkrankung.

Die Entstehung des infiltrativen Tumorzellwachstums ist ein multifaktorielles Geschehen, welches sich aus der Interaktion zwischen Tumorzellen, Mikrogliazellen und der extrazellulären Matrix (EZM) ergibt. Hierzu gehören u. a. die Aktivierung biochemischer Prozesse, die die proteolytische Degradation der EZM vorantreiben sowie die aktive Zellmigration fördern. Es handelt sich also um Prozesse, welche eine auffallende Ähnlichkeit zur Embryogenese glialer Netzwerke aufweisen^{6,22,60}. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren Expressionsprofil mit der Invasivität glialer Tumoren korrelierten. Bekannte Vertreter sind Mitglieder der Familie der Matrix-Metalloproteasen (MMP) und deren Gewebsinhibitoren (TIMP). Das Level der Expression von MMP-2 korreliert z. B. mit dem Grad der Invasivität

des Tumors und der Prognose des Patienten⁶¹. Weitere in verschiedenen Arbeiten beschriebene molekulargenetische Veränderungen betreffen Integrine, allen voran $\alpha V\beta 3$ -Integrin⁶², Tumorsuppressorproteine wie das Invasion Inhibitor Protein 45 (*Iip45*)⁶³ sowie Ephrin-Rezeptoren und ihre Liganden, welche bereits während der neuronalen Entwicklung Zellmigration und axonale Bahnung koordinierten^{6,64,65}.

Abschließend bleibt jedoch zu bemerken, dass es sich hierbei lediglich um einen verkürzten Blick auf die möglichen Ursachen infiltrativen Wachstums in malignen Gliomen handelt und eine weitere Vielzahl an Mechanismen und Quervernetzungen besteht, welche dieses charakteristische Merkmal glialer Tumoren bedingen.

1.1.5 Genomische Profile

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass gerade durch die molekulargenetische Aufarbeitung von Patientenproben eine genauere und detailliertere Einteilung der jeweiligen Entitäten möglich ist. Durch die Erstellung genetischer Profile und deren Korrelation mit den klinischen Verläufen und der Ansprache auf Therapie ist es nun möglich, genauere Vorhersagen darüber zu treffen, wie sich bestimmte Tumoren, definiert anhand ihrer genetischen Aberrationen, prognostisch entwickeln und von welchen therapeutischen Maßnahmen die entsprechenden Patienten am ehesten profitieren^{6,66-68}.

Die Einteilung erfolgt zum einen anhand der Überprüfung der Anzahl chromosomaler Kopien und zum anderen durch Anfertigung von Genexpressionsprofilen. Die genomische Analyse wiederkehrender numerischer Aberrationen kann z. B. mittels komparativer genomischer Hybridisierung erfolgen. Dieser Ansatz offenbarte eine ganze Fülle an genomischen Gewinnen bzw. Amplifikationen sowie Verlusten in malignen Gliomen. Durch die so gewonnenen neuen molekularen Marker konnten die klassischen histologischen Einteilungskriterien komplementiert und erweitert werden. Dies ist gerade im Hinblick auf histologisch kaum zu unterscheidende Enti-

täten wie das primäre und sekundäre GBIV von großer Bedeutung. Die Korrelation der gefundenen rekurrierenden numerischen Veränderungen mit dem klinischen Verlauf der Patienten konnte die prognostische Relevanz einzelner Marker weiter unterstreichen. So geht gerade der Verlust von Chromosom 10q mit einer signifikanten Abnahme der Überlebenszeit einher^{6,10}.

Nach der Identifizierung der veränderten Genloci konzentriert sich die Forschung nun darauf, die klinisch relevanten Gene in den entsprechenden Lokalisationen zu identifizieren, gerade im Hinblick auf die immer präsenter werdende „*targeted therapy*“⁶⁹⁻⁷⁶ eine Aufgabe, der sich auch diese Arbeit widmet.

Die Erstellung transkriptioneller Profile hat sich als hoch effektive Methode zur Einschätzung des biologischen Status eines Tumors mit nachweislichem Nutzen für die Diagnosestellung und weiterem klinischen Management erwiesen⁷⁷⁻⁷⁹. Gerade im Hinblick auf die Prognoseeinschätzung scheinen die Expressionsprofile der klassischen histologischen Graduierung überlegen zu sein⁷³. Besondere Beachtung im Sinne eines „molecularly informed clinical management“⁶ wird in der heutigen Basisdiagnostik bereits dem Methylierungsstatus des O(6)-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) Genpromotors zuteil. Speziell solche Glioblastompatienten profitierten von der Gabe des alkylierenden Zytostatikums Temozolomid, deren DNA-Reparaturgen *MGMT* methylierungsbedingt im Tumorgewebe inaktiviert ist^{9,22,67,80}. Setzt sich der Trend fort, so werden weitere molekulare Untersuchungen in Zukunft die Prognoseeinschätzung und die Wahl der Therapieregime maßgeblich beeinflussen.

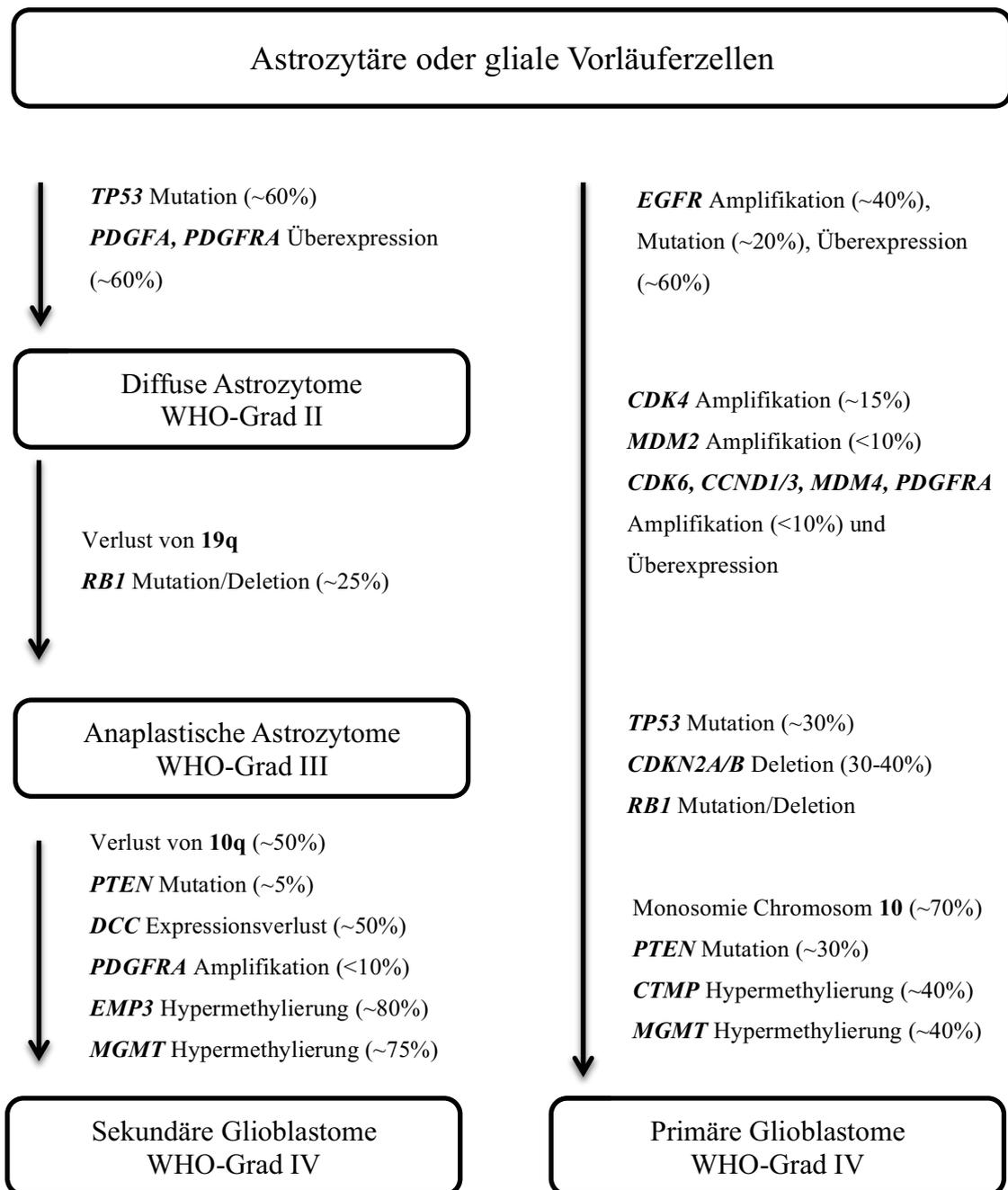


Abbildung 1: Übersicht molekularer Alterationen in diffusen Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen^{9,23,81}.

1.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind einzelsträngige RNAs (ssRNAs) mit einer Länge von 19-25 Nukleotiden. Sie entstehen aus endogen synthetisierten hairpin-Transkripten und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression, in dem sie mittels Basenpaarung an komplementäre Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region ihrer spezifischen Ziel-mRNAs binden, mit der Folge eines konsekutiven Abbaus der mRNA und/oder einer translationellen Repression⁸²⁻⁸⁴. MiRNAs und ihre Ziel-mRNAs bilden hierbei komplexe regulatorische Netzwerke aus. So ist eine miRNA in der Lage mehrere mRNAs zu binden und zu regulieren, während eine mRNA von mehreren miRNAs kontrolliert werden kann⁸⁵. MiRNAs sind somit in der Lage, diverse regulatorische Signalwege zu beeinflussen und zu kontrollieren, wie beispielsweise hämatopoetische Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellproliferation⁸⁶. Der Weg zur Untersuchung der Bedeutung von miRNAs für die Onkogenese war angesichts dieser zahlreichen Verbindungen zu regulatorischen Kernelementen zellulärer Integrität nicht mehr weit, und so konnte in den letzten Jahren in zahlreichen Arbeiten die Relevanz der miRNAs in der Onkogenese herausgearbeitet werden⁸⁷⁻⁹⁰.

1.2.1 Biogenese der MicroRNAs

Die Mehrheit der miRNA-Genloci sind Teil bekannter Transkriptionseinheiten. Bezüglich ihrer genomischen Lokalisation lassen sich miRNAs in drei Gruppen einteilen: (1) intergen gelegene miRNAs mit >1kb Abstand zu annotierten oder vorhergesagten Genen, (2) exonische miRNAs in nicht-kodierenden Gensequenzen und (3) intronische miRNAs. MiRNAs, welche aufgrund ihrer genetischen Lokalisation sowohl in einem Exon als auch in einem Intron liegen, werden den oben genannten Gruppen aufgrund ihres Spleißmusters zugewiesen⁹¹.

Interessanterweise präsentierten intragenische miRNAs oftmals ein ähnliches Expressionsprofil wie ihr Wirtsgen. Diese Form der koordinierten Expression deutet darauf hin, dass beide einem gemeinsamen Vorläufer-Transkript entstammen und/oder vom selben Promoter reguliert werden^{91,92}.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der genomischen Organisation von miRNAs ist, dass sie häufig in Clustern gefunden werden. So wurden ~50 % der bekannten miRNAs in nächster Umgebung zu weiteren miRNAs gefunden^{91,93,94}. Transkripte dieser Cluster-miRNAs werden in der Regel gemeinsam als Polycistron generiert⁹⁵. In der ganz überwiegenden Mehrzahl der Fälle erfolgt die Transkription der miRNA-Gene durch die RNA-Polymerase II (RPOLII)^{95,96} (Abb. 2). Eine kleine Minderheit der miRNAs wird jedoch auch durch die RPOLIII transkribiert, wie beispielsweise ein miRNA-Cluster auf Chromosom 19^{97,98}. Das primäre Transkript (pri-miRNA) ist bis zu mehreren Kilobasen lang und besitzt eine 5'-Cap-Struktur, einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende sowie in der monocistronischen Form den charakteristischen stem-loop^{95,96}. Der Stamm ist doppelsträngig (ds) und besteht aus ~33 bp, welche in einen oberen und unteren Stamm unterteilt werden, wobei der obere die reife miRNA enthält sowie eine terminale Schleife und zwei flankierende einzelsträngige (ss) Segmente^{82,99}. Es ist diese charakteristische tertiäre Struktur, welche die Substratspezifität im nächsten Prozessierungsschritt durch den MicroRNA-Prozessorkomplex determiniert¹⁰⁰⁻¹⁰². Dieser setzt sich zusammen aus der nuklearen RNase III Drosha und ihrem Co-Faktor, dem DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 (DGCR8) Protein (Abb. 2). Drosha spaltet die ds-RNA am Übergang zwischen oberem und unterem Stamm, während DGCR8 als ds-RNA-bindendes Protein den Übergang zwischen den ss und ds-Segmenten erkennt und die korrekte Positionierung des katalytischen Zentrums von Drosha sicherstellt^{99,100}.

Dieser Schritt, als „cropping“ bezeichnet, hinterlässt eine ~70 Nukleotide lange Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) mit charakteristischer Haarnadelstruktur und einem 3'-2-Nukleotid-Überhang¹⁰⁰ (Abb. 2). Es sind diese Strukturmerkmale, welche die Voraussetzungen für einen spezifischen Export der pre-miRNA in das Zytoplasma

schaffen, wo die abschließenden Prozessierungsschritte stattfinden¹⁰³. Der Kernporenkomplex Exportin-5, ein Ran-GTP-abhängiger Transportrezeptor, erkennt diese Motive und koordiniert den geordneten Austausch zwischen den beiden Kompartimenten. Exportin-5 ermöglicht hierbei nicht nur den Übertritt der pre-miRNA vom Nukleus ins Zytoplasma, sondern verhindert weiterhin die Degradation des Vorläufer-Transkriptes und bildet somit einen Knotenpunkt in der miRNA-Biogenese¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Im Anschluss an den Export erfolgt die abschließende Prozessierung durch die zytoplasmatische RNase III Dicer (Abb. 2). Dieses hoch konservierte Protein spaltet das Haarnadelmotiv der pre-miRNA zwischen Stamm und terminaler Schleife. Das Ergebnis ist eine ~22 Nukleotide lange miRNA-Duplex, bestehend aus der reifen miRNA und ihrem komplementären Strang, welche sich in Folge thermodynamischer Asymmetrie trennt und den Weg freigibt für die Inkorporation der reifen ss-miRNA in den Effektor-Komplex miRNP (miRNA-containing ribonucleoprotein complex) bzw. miRISC (miRNA-containing RNA-induced silencing complex)^{82,106,108}. Welcher RNA-Strang nun die Effektorrolle übernimmt, entscheidet die 5'-Bindungsaffinität der beiden Stränge. Derjenige Strang, der weniger stabil an sein Gegenüber gebunden ist, formt die Effektor-miRNA, welche in den miRISC inkorporiert wird^{109,110}.

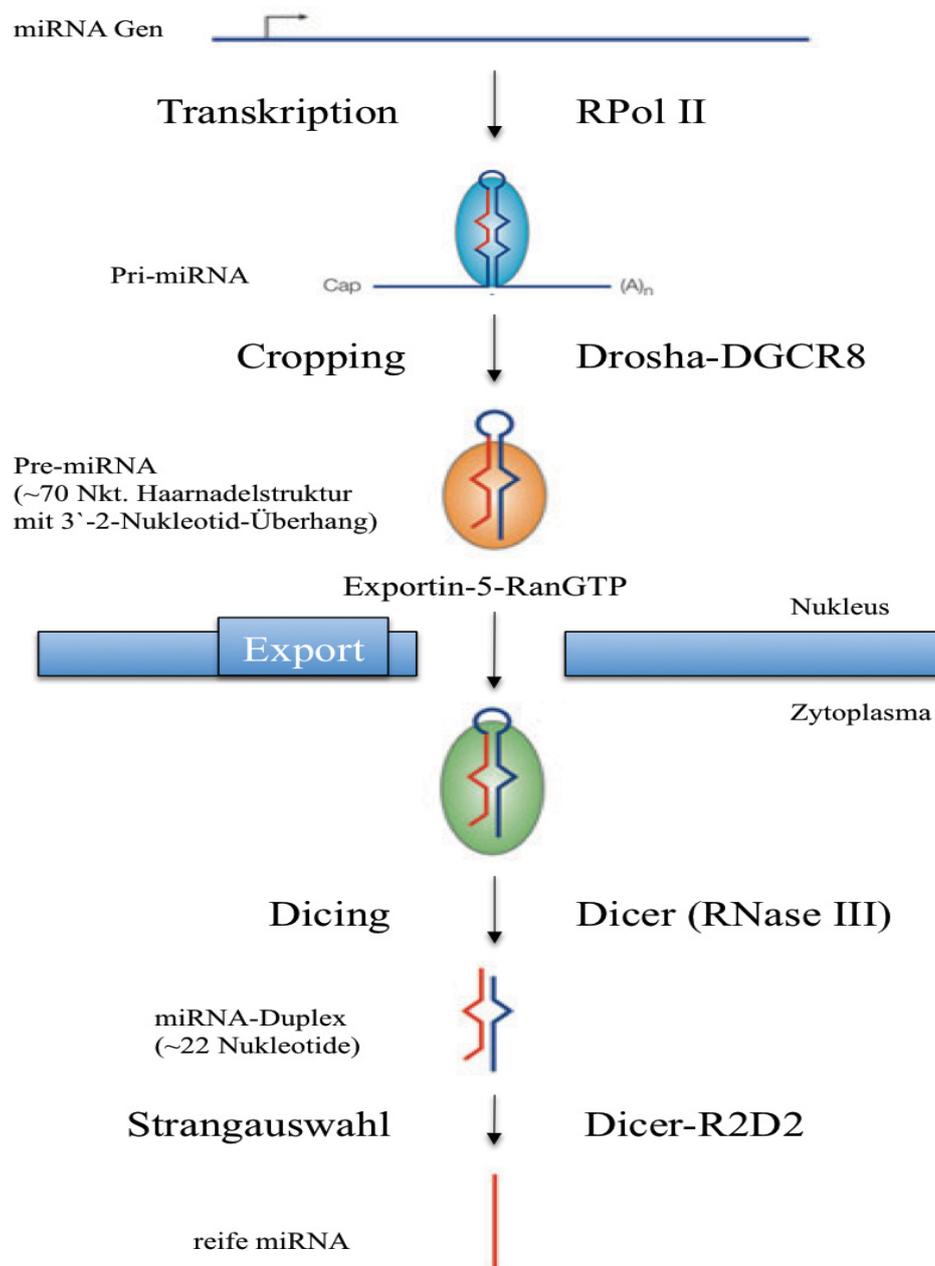


Abbildung 2: Übersicht über die miRNA-Biogenese (Abbildung modifiziert nach Referenz¹¹¹).

1.2.2 Effektormechanismen der MicroRNAs

Gebunden an den miRISC fungieren die miRNAs als eine Art Leseraster für ihre Ziel-mRNAs und regulieren so mehr als ein Drittel der menschlichen Gene¹¹². Der miRISC setzt sich aus mehreren Proteinen zusammen, von denen der Gruppe der Argonaut-Proteine (Ago) eine besondere Bedeutung zu Teil wird. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe hoch konservierter Proteine, welche essentiell für diverse kleine-RNA Signalwege sind und zwei unterschiedliche RNA-Bindungsdomänen aufweisen: (1) die PAZ-Domäne, eine RNA-Bindungsstelle, die vorzugsweise mit dem 3'-Ende der RNA interagiert, und (2) die PIWI-Domäne, welche strukturell der Ribonuklease-H entspricht und das 5'-Ende des Orientierungsstranges bindet¹¹³⁻¹¹⁵. Die eigentliche Verminderung der Genexpression erfolgt über drei wesentliche Mechanismen: (1) endonukleolytische Spaltung der mRNA, (2) Inhibierung der Translation und (3) Destabilisierung der mRNA¹¹⁶. Welche dieser Methoden Anwendung findet wird im Wesentlichen durch die Komplementarität der RNA-Stränge determiniert. Liegt beispielsweise eine vollständige Komplementarität der miRISC und der 3'-UTR der Ziel-mRNA vor, so erfolgt eine RNAi-ähnliche endonukleolytische Spaltung der mRNA zwischen denen an Position 10 und 11 der miRNA gebundenen Nukleotiden¹¹⁷. Diese Form der Auftrennung ist jedoch nur möglich, wenn der miRISC eine Isoform des Ago2 enthält¹¹⁸. Viel häufiger ist jedoch der Fall der nicht vollständig komplementären Bindung zwischen miRNA und mRNA mit den Folgen einer Inhibition der Translation oder Destabilisierung der mRNA. Diese beiden Effektormechanismen scheinen von allen Angehörigen der Argonaut-Familie durchgeführt werden zu können^{119,120}. Der genaue Mechanismus der Translationsprävention der mRNA ist noch nicht abschließend geklärt. Es scheint jedoch so, dass der miRISC an mehreren Stellen des Translationsprozesses eingreift. So stört miRISC den Zusammenbau des 40s Initiationskomplexes durch kompetitive Hemmung von eIF4E¹²¹ oder die Anlagerung der 60s ribosomalen Untereinheit an den

Initiationskomplex durch Induktion von eIF6¹²². Weiterhin besteht die Möglichkeit der Reduzierung der Translationsgeschwindigkeit durch kurze RNAs im Anschluss an die Bildung des Initiationskomplexes¹²³. Die Destabilisierung der mRNA wird durch die Rekrutierung eines decapping- und Deadenylationkomplexes herbeigeführt¹²⁴. Neben den Regulationsmöglichkeiten im Bereich der Translation sind in den letzten Jahren immer weitere Mechanismen aufgedeckt worden, über welche miRNAs die Expression ihrer Zielgene kontrollieren. So sind miRNAs in der Lage, Veränderungen in der Chromatinstruktur zu vermitteln und durch diese epigenetische Modifikation eine Veränderung des Expressionsniveaus zu erreichen¹²⁵. Wesentlich ist es, in diesem Zusammenhang darauf zu verweisen, dass sich die miRNA-vermittelte Regulation der Expression keinesfalls exklusiv auf die Herunterregulierung von Genen konzentriert. So sind bestimmte miRNAs auch in der Lage, Gene zu aktivieren und ihre Expression zu steigern^{126,127}.

1.2.3 Regulation der MicroRNA-Biogenese

So mannigfaltig wie die Effektormechanismen der miRNAs, so komplex gestaltet sich ihre Regulation¹²⁸. Zahlreiche miRNAs stehen unter der Kontrolle von entwicklungs- und gewebespezifischen Signalwegen. Die Regulation der miRNA-Transkription erfolgt über eine Fülle von Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise c-MYC, p53 oder HIF, welche wahlweise als Aktivatoren oder Repressoren fungieren¹²⁹⁻¹³². Zusätzlich bestehen epigenetische Modifikationsmöglichkeiten und post-transkriptionale Kontrollmechanismen. So hat der Methylierungsgrad der Promotorregion der miRNA *hsa-miR-127* entscheidenden Einfluss auf ihr Expressionsniveau¹³³. Post-transkriptional erfolgt die Regulation vornehmlich durch Beeinflussung der Enzym-getragenen Prozessierungsschritte Cropping und Dicing^{134,135}. Über komplexe Kaskaden ist es somit auch miRNAs möglich, durch koordinierte transkriptionale oder post-transkriptionale Effektoren die Expression anderer miRNAs zu beein-

flussen¹³⁶. Neben der direkten Beeinflussung der Transkription und Prozessierung bestehen weitere Mechanismen, welche direkt die Funktionalität der miRNA beeinflussen. So kann beispielsweise das RNA-bindende Protein Dnd1 der miRNA den Zugang zu seiner Ziel-mRNA versperren¹³⁷. Aber auch genetische Veränderungen, wie Translokationen oder Mutationen, können die Aktivität spezifischer miRNAs maßgeblich beeinflussen¹³⁸⁻¹⁴¹. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulation der Expression von miRNAs ein hoch komplexes Unterfangen ist, welches in seiner Gesamtheit aktuell noch nicht abschließend verstanden ist.

1.2.4 MicroRNAs in Gliomen

Die Dysregulation der miRNA-Expression und ihre daraus resultierende Beteiligung an der Pathogenese unterschiedlichster Malignome wurde in zahlreichen Publikationen belegt^{142,143}. In Glioblastomen wurde eine mögliche divergente Expression von miRNAs in Tumorgewebe und nicht-neoplastisch verändertem Gewebe erstmals 2005 von Ciafre und Kollegen dokumentiert¹⁴⁴. Mittels Microarray-Technik wurde das Expressionsniveau von 245 miRNAs in neun pGBIV mit dem angrenzenden Gliagewebe der gleichen Patienten verglichen. Es zeigte sich eine ausgeprägte Diskrepanz im Expressionsniveau sowie eine Korrelation der miRNA-Expression mit dem Malignitätsgrad der Gliome. Es konnte nachgewiesen werden, dass die miRNA *hsa-miR-181a/b* ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau in hochgradigen Gliomen aufweist als in niedriggradigen¹⁴⁵. Des Weiteren konnte in funktionellen Assays gezeigt werden, dass *hsa-miR-181a/b* als Tumorsuppressor fungiert und in Gliomzelllinien die Apoptose induziert und Wachstum und Invasion inhibiert¹⁴⁵.

In einer ähnlichen Arbeit von Dong et al. aus dem Jahr 2010 wurde weiterhin die Korrelation bestimmter miRNA-Expressionsmuster und dem Überlebenszeitraum der Patienten herausgearbeitet. Mittels „*pathway enrichment analysis*“ wurde die Beteiligung von miRNAs in den komplexen Netzwerkstrukturen Malignom-as-

soziierter Signalkaskaden nachgewiesen¹⁴⁶. Bestimmte miRNAs, wie beispielsweise *hsa-miR-10b*, sind in der Lage, die Invasivität von Gliomzellen zu modulieren und zeigen eine Assoziation zum WHO-Grad der Tumoren. In Gliomproben imponiert die miRNA mit einem deutlich gesteigerten Expressionsniveau und moduliert die Tumordinfiltration über Beeinflussung der Expression von MMP-14 und uPAR (urokinase-type Plasminogen Activator Receptor)¹⁴⁷. Die Manipulation des MMP-14/uPAR-Signalweges erfolgt über die direkte Inhibierung der *miR-10b*-Zielstruktur HOXD10. Unter Verwendung spezifischer *hsa-miR-10b* Antisense-Oligonukleotide dokumentierten Sun et al. einen Verlust der Invasivität von Gliomzellen¹⁴⁷.

Eine weitere miRNA, die das infiltrative Wachstum astrozytärer Tumoren zu beeinflussen scheint, ist *hsa-miR-218*. In funktionellen Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Überexpression dieser miRNA einen suppressiven Effekt auf das Wachstum von Gliomzellen hat¹⁴⁸. Das Expressionslevel dieser miRNA ist in Gliomzellen vermindert. Nach Hochregulation fand sich ein drastischer Abfall der Migrationsgeschwindigkeit und infiltrativen Eigenschaften von Gliomzellen. Die erhöhte Expression der miRNA *hsa-miR-218* ging hierbei mit einer Reduktion der MMP-9 und einer Abnahme der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B einher. Weiterführend konnten Song und Kollegen zeigen, dass die Inaktivierung des NF- κ B-Signalweges über die Inhibierung der IKK- β -Expression (Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase subunit beta) durch die gezielte Bindung der *hsa-miR-218* an die 3'-UTR von IKK- β erreicht wird¹⁴⁸. In Gliomzellen mit einem Verlust eines funktionierenden *PTEN*-Gens wurde gezeigt, dass eine Hochregulierung der miRNA *hsa-miR-21* zu einer Dysregulation des Wachstumsverhaltens astrozytärer Zellen führt. Diese MicroRNA scheint mitverantwortlich zu sein für das invasive Wachstum der Tumoren. Über die Hemmung ihres Zielgens *SPRY2* (Sprouty homolog 2) sorgt *hsa-miR-21* für eine Aufhebung des negativen Feedback-Mechanismus des RAS/MAPK-Signalweges¹⁴⁹. Erniedrigte *SPRY2*-Proteinlevel fanden sich konsequenter Weise ausschließlich in ~80 % der invasiven Gliome WHO-Grad II-IV, nicht jedoch in den nicht-invasiven Tumoren des WHO-Grad I. Es fand sich zudem eine inverse Korre-

lation zwischen der Expression der miRNA *hsa-miR-21* und dem Expressionsniveau des Proteins SPRY2¹⁴⁹.

Ein weiterer miRNA-Tumorsuppressorkandidat ist die MicroRNA *hsa-miR-451*, die ebenfalls in Gliomzelllinien signifikant herunterreguliert ist. Eine Erhöhung ihrer Expression durch Transfektion spezifischer miRNA-Oligonukleotiden führte zu einer Umkehr malignomtypischer biologischer Eigenschaften. Es kam zu einer Reduktion des Zellwachstums, einer Abnahme der Invasivität und einer Zunahme der Apoptose-rate¹⁵⁰.

Auch beim vierten Kernmerkmal astrozytärer Gliome, der Neoangiogenese, spielt die Dysregulation der Expression bestimmter miRNAs eine wesentliche Rolle. So zeigt die miRNA *hsa-miR-296* ein signifikant höheres Expressionsniveau in Endothelzellen von Hirntumoren im Vergleich zu nicht-neoplastisch verändertem Hirngewebe. Die *hsa-miR-296* unterstützt die Angiogenese durch Suppression von HGS (Hepatocyte Growth factor-regulated tyrosine kinase Substrate), was zu einer Reduktion der HGS-abhängigen Degradation der Wachstumsfaktorrezeptoren VEGFR2 und PDGFR β führt¹⁵¹. Weiterhin konnte 2011 durch Fang et al. gezeigt werden, dass die MicroRNA *hsa-miR-93* durch Inhibierung ihres Zielgens *Integrin- β 8* das Tumorstadium fördert und das Zellüberleben verlängert¹⁵². Dies könnte daraus resultieren, dass eine Überexpression von *hsa-miR-93* in einer Co-Kultur aus Tumorzellen der Gliomlinie U87MG mit Endothelzellen zu einem vermehrten Wachstum und der Ausbreitung der Endothelzellen führte sowie eine Steigerung der Migration der Endothelzellen und Ausbildung von Schlauchformationen bewirkte. Diese Beobachtungen wurden durch *in vivo* Studien gestützt, die zeigten, dass *hsa-miR-93* exprimierende Zellen die Formierung von Blutgefäßen induzierten und den Gefäßen den Weg zur Tumormasse ebneten¹⁵².

Diese kurze Zusammenstellung verdeutlicht die große Bedeutung der kleinen RNAs im komplexen Netz der Differenzierung und Entwicklung. Sie sind mitbeteiligt an allen charakteristischen Merkmalen der astrozytären Gliome¹⁵³. Sie beeinflussen das Tumorzellwachstum und -überleben, die Proliferation, die Invasivität und die Angi-

ogenese. Und das Netz wächst an Verknüpfungen und Komplexität mit jedem neuen verifizierten miRNA/Zielgen-Paar. Die Forschung in diesem Bereich nimmt aktuell immer mehr an Geschwindigkeit auf und generiert ständig neue Erkenntnisse, welche vielleicht am Ende zu neuen therapeutischen Interventionen oder diagnostischen und prognostischen Markern führen. Die Herausforderung wird sein, die rapide wachsende Fülle an Informationen und Erkenntnissen in die Klinik zu überführen, um letztlich die Prognose der Patienten zu verbessern.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Diffus infiltrierende astrozytäre Tumoren sind die häufigsten primären Hirntumoren im Erwachsenenalter. Häufig findet sich in diesen Tumoren ein Verlust des Chromosoms 10 bzw. des langen Armes von Chromosom 10, mit der höchsten Inzidenz von ca. 70% in Glioblastomen. Mit *PTEN* ist letztlich jedoch nur ein Tumorsuppressorgen auf 10q identifiziert, das in 30 % der Glioblastome verändert ist. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es weitere Tumorsuppressorgene auf dem langen Arm von Chromosom 10 geben muss¹⁰.

Wichtigstes Ziel dieser Arbeit war es daher, MicroRNAs als mögliche Tumorsuppressorgenkandidaten in dieser Region zu identifizieren und ihre Rolle in der Pathogenese astrozytärer Tumoren zu charakterisieren. Mittels stem-loop real-time RT-PCR wurde hierfür ein Tumorkollektiv bestehend aus 6 diffusen Astrozytomen (WHO Grad II), 8 anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III), 10 sekundären Glioblastomen (WHO Grad IV) und 40 primären Glioblastomen (WHO Grad IV) auf ein mögliches divergentes Expressionsprofil bezüglich der 12 in der Region 10q23-ter lokalisierten MicroRNAs hin untersucht und mit dem Expressionsverhalten dieser miRNAs in nicht neoplastisch verändertem Hirngewebe verglichen. Zur Klärung möglicher Ursachen einer tumorassoziierten veränderten Expression der untersuchten miRNAs wurde im Anschluss für ausgewählte Kandidaten der DNA-Methylierungsstatus bestimmt. Zusätzlich wurden funktionelle Analysen der miRNAs durch Überexpression in Gliomzelllinien angeschlossen sowie abschließend eine Identifizierung potentieller Zielgene der miRNAs vorgenommen.

2 Material und Methoden

2.1 Tumorproben

Alle hier untersuchten Tumorproben entstammen der Tumorbank des Instituts für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Tumoren wurden anhand der gültigen Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für Tumoren des zentralen Nervensystems eingeteilt (Tabelle 1). Die Tumorgewebsproben werden postoperativ schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Sie stammen ausschließlich von Patienten, die primär operativ versorgt wurden und die zu diesem Zeitpunkt keine Radio- oder Chemotherapie erfahren hatten. Für die nachfolgenden molekulargenetischen Untersuchungen wurden nur solche Proben verwendet, die histologisch einen Tumorgehalt von 80% oder mehr aufwiesen. Die DNA- und RNA-Extraktion erfolgte anschließend durch Ultrazentrifugation über Caesiumchlorid^{154,155}.

Das untersuchte Tumorkollektiv setzte sich zusammen aus sechs diffusen Astrozytomen WHO-Grad II (AII), acht anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III (AIII), 10 sekundären Glioblastomen WHO-Grad IV (sGBIV) und 40 primären Glioblastomen WHO-Grad IV (pGBIV). Als Referenzen wurden 12 kommerziell erhältliche, nicht neoplastische humane RNA-Proben verwendet (Tabelle 2). Die Universal Human Reference RNA (HU; Stratagene) diente der Kalibrierung der Real-Time Reversen Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

Tabelle 2: Für Real-Time RT-PCR Analysen verwendete käuflich erhältliche RNA-Proben.

Bezeichnung RNA-Probe	Hirnregion	Firma
CC	Cerebraler Cortex	BioChain
CrCa	Corpus callosum	BioChain
HB	Gesamtgehirn	Clontech
HB Ambion	Gesamtgehirn	Ambion
HB BD	Gesamtgehirn	BD Biosciences
HB BioChain	Gesamtgehirn	BioChain
HB FL	Frontallappen	BioChain
HB OL	Occipitallappen	BioChain
HB PL	Parietallappen	BioChain
HB TL	Temporallappen	BioChain
HBS	Gesamtgehirn	Stratagene
HFB	Humanes fetales Gehirn	Clontech
HU	Allgemeine Referenz-RNA	Stratagene

2.2 Sequenzen der MicroRNAs

Nukleotidsequenzen der microRNAs wurden der Sanger Institut miRBase Registry Release 14 entnommen (<http://www.mirbase.org/>).

2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung von bekannten Nukleotidsequenzen und ist der Grundstein verschiedenster Methoden der Molekulargenetik. Für die PCR wird ein Primerpaar definiert, welches die zu amplifizierende Nukleotidsequenz flankiert. Diese Sequenz wird mit Hilfe einer DNA Polymerase reproduziert und über eine bestimmte Anzahl von Zyklen exponentiell vermehrt.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Matrizennukleinsäure	20-100 ng
10 x PCR-Puffer (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl
2 mM dNTP-Gemisch	2,5 µl
Forward Primer (10 µM)	0,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 u/µl)	0,125 µl

H₂O dest. *ad* 25µl

Der anschließende PCR-Prozess fand in einem Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen) statt. Initial erfolgte eine fünfminütige Denaturierung, der sich eine Amplifikation der Matrize über 30-40 Zyklen unter folgenden Bedingungen anschloss:

Denaturierung	95°C	30 sec
Annealing	56-60°C	30 sec
Elongation	72°C	30 sec

Optional wurde die PCR durch Zugabe von 5 μ l Q-Solution (Qiagen, Hilden), 1,25 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma, Taufkirchen) oder 2,5 μ l TMAC (Trimethylammoniumacetat oder „Betain“; Sigma) optimiert. Die Anzahl der Zyklen und Höhe der Annealing-Temperaturen wurden für die jeweiligen Primerpaare ausgetestet und angepasst.

2.4 MicroRNA-cDNA-Synthese

Zur quantitativen real-time PCR Expressionsanalyse der microRNAs ist es nötig, die Tumor-RNA mittels Reverser Transkriptase (RT) in die spezifische komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben (für Primersequenzen siehe Tabelle 3). Hierzu wurden spezielle stem-loop RT Primer verwendet, welche gegenüber linearen Primern aufgrund einer höheren thermischen Stabilität der RT-Primer/RNA-Duplex eine deutlich höhere Spezifität und Effektivität aufweisen. Des Weiteren verhindert die räumliche Ausdehnung der stem-loop Struktur die Bindung an doppelsträngige-Nukleinsäure-Moleküle, so dass weder pre-microRNA-Moleküle detektiert werden noch ein DNase-Verdau der Proben notwendig ist¹⁵⁶. Der stem-loop Primer bindet mit seinen am 3'-Ende lokalisierten 5-6 zur jeweiligen miRNA komplementären Basen an die reife miRNA und bietet so der Reversen Transkriptase einen Transkriptionsstartpunkt (Abb. 3A).

Zu jeweils 5 μl RNA-Probe mit einer Konzentration von 20 ng/ μl gibt man folgende Reagenzien für die cDNA-Synthese der spezifischen microRNA (miRNA; hier mit „X“ bezeichnet) und der Referenz-miRNA *hsa-let-7a* in ein Reaktionsgefäß:

0,1 M DTT (Invitrogen, Karlsruhe)	0,16 μl
Rnasin (Fermentas, St. Leon-Rot)	0,4 μl
BSA (1 mg/ml)	0,7 μl
dNTP-Mix (10 mM je dNTP; Bio-Budget, Krefeld)	1,0 μl
miR-X-RT-Primer (10 pmol/ μl)	1,0 μl
hsa -let7a-RT-Primer (10 pmol/ μl)	1,0 μl
5 x HR Puffer (Invitrogen)	4,0 μl
Reverse Transkriptase (200 u/ μl ; Invitrogen)	0,25 μl
DEPC- <i>Aqua dest.</i>	6,49 μl
<hr/> gesamt	15 μl

Der daraus resultierende Reaktionsansatz wurde für folgende Zeiten in einem Thermozykler der Firma Biometra (Göttingen) inkubiert:

5 Minuten	4°C
30 Minuten	16°C
50 Minuten	42°C
5 Minuten	85°C
Pause	4°C

Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Proben bei 4°C gelagert oder bei -20°C eingefroren.

Tabelle 3: Primersequenzen der cDNA-Synthese

Name	Sequenz
hsa-let-7a-F	gccgctgaggtagtaggttga
hsa-let-7a-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacacaacta
miR-universal-RT	gtgcagggtccgaggt
miR-107-F	cggcagcagcattgtacaggg
miR-107-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacactgatag
miR-146b-F	ccgcgtgagaactgaattcc
miR-146b-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagacagccta
miR-202-F	gcgcctttcctatgcatatac
miR-202-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacacaagaagaa
miR-346-F	aactccagctgggtgctgcccgatgcct
miR-346-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagacagagggc
miR-605-F	gcgctaaatccatggtgcct
miR-605-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagacaggaga
miR-606-F	cggcggaaactactgaaaatc
miR-606-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagaca
miR-607-F	cggcgggttcaaatccagatg
miR-607-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagacg
miR-608-F	aggggtggtgtgggacag
miR-608-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagacagggag
miR-609-F	cgcggagggtgtttctctc
miR-609-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagacagagat
miR-936-F	gcgcacagtagaggaggga
miR-936-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagactgcga
U6snRNA-F	ctcgcttcggcagcaca
U6snRNA-RT	aacgcttcacgaatttgcgt

2.5 Real-Time PCR

Dieses semiquantitative Verfahren der Expressionsanalyse basiert auf den Grundprinzipien der PCR und ermöglicht mit Hilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (hier: SYBR[®] Green) oder einer TaqMan[®]-Sonde die kontinuierliche Bestimmung der PCR-Produktmenge. Die Real-Time PCR (RT-PCR) Untersuchungen der microRNAs wurden an einem StepOnePlus[™] System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt unter der Verwendung von TaqMan[®] miRNA Assays (Applied Biosystems) mit farbstoffmarkierten TaqMan[®] Sonden (Abb. 3B). Für das Referenzgen wurde SYBR[®] Green als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Der Reaktionsansatz von 20 µl Gesamtvolumen setzte sich wie folgt zusammen: PCR-Ansatz für die spezifische miRNA:

2 x TaqMan [®] GenEX Master Mix	10 µl
miRNA-spezifische TaqMan [®] -Probe und Primer	1 µl
<i>Aqua dest.</i>	8 µl
cDNA-Synthese-Ansatz (siehe 2.4)	1 µl

PCR-Ansatz für die Referenz-miRNA *hsa-let-7a*:

2 x SYBR [®] Green-Mix (Invitrogen)	10,0 µl
<i>hsa-let7a-F</i>	0,6 µl
Universal-R	0,6 µl
<i>Aqua dest.</i>	7,8 µl
cDNA-Synthese-Ansatz (siehe 2.4)	1,0 µl

Die Proben wurden in einem zweifachen Ansatz anschließend auf eine 96well PCR-Platte aufgetragen und in dem StepOnePlus™ System folgenden Bedingungen ausgesetzt, wobei die letzten beiden Schritte 39 x wiederholt wurden:

Temperatur	Zeit	Funktion
50°C	2 min	Aktivierung der Uracil-Glykosylase
95°C	10 min	Aktivierung der <i>Taq</i> DNA Polymerase
95°C	15 sec	Denaturierung des DNA-Doppelstranges
60°C	1 min	Anlagerung der Primer und DNA-Synthese

Für jede Gewebeprobe wurde die Expression der spezifischen miRNA bestimmt und mit der Expression des Kontrollgens *hsa-let-7a* ins Verhältnis gesetzt. Als Normalisierungsprobe diente die Universal Human Reference RNA. Die erworbenen Fluoreszenzwerte wurden durch eine SDS Software in *Threshold Cycle* konvertiert und in Microsoft Excel exportiert. Diese Daten wurden anschließend entsprechend der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet^{157,158}.

Für jede untersuchte Tumor- und Normalhirnprobe sowie für die Referenzprobe wird zuerst der Mittelwert der C_T -Werte der beiden Ansätze von Ziel- und Kontrollgen ermittelt und anschließend die Differenz (C_T Zielgen – C_T Referenzgen = ΔC_T) bestimmt. Um nun die Expression der miRNAs in den untersuchten Gewebeproben zu normalisieren, zieht man den ΔC_T -Wert der Referenzprobe (hier: Universal Human Referenz RNA) vom ΔC_T -Wert der jeweiligen Gewebeprobe ab (ΔC_T Gewebeprobe - ΔC_T Referenzprobe = $\Delta\Delta C_T$). Die relative miRNA-Expression in den Gewebeproben ergibt sich durch anschließende Entlogarithmierung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). Dadurch erhält die Referenzprobe für die Expression einer bestimmten miRNA den Wert „1“ zugeordnet, und alle Gewebeproben mit Werten größer als 1 zeigen eine stärkere Expression dieser miRNA und alle Gewebeproben mit einem Wert kleiner 1 eine geringere Expression der entsprechenden miRNA im Vergleich zur Referenzprobe.

Die Proben wurden am Ende der RT-PCR auf einem 2% Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) aufgetrennt und photographisch mit Hilfe eines Gel Doc 1000 Systems (Bio-Rad, München) dokumentiert, um die Reinheit der Amplifikationsprodukte und die Negativität der DNA-freien Probe (*no template control*, NTC) zu kontrollieren.

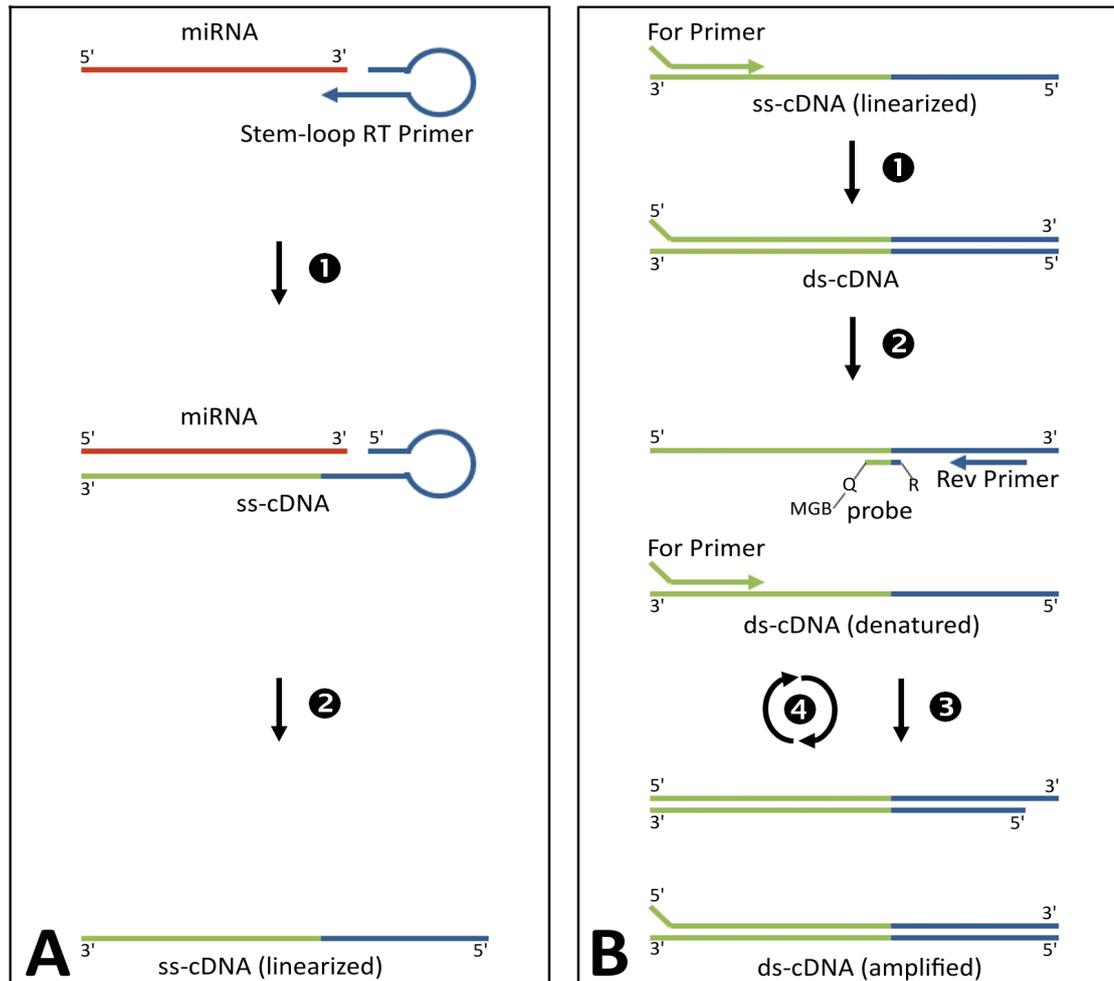


Abbildung 3: Prinzip der stem-loop RT-PCR. (A) Um die reverse Transkription einer reifen miRNA durchzuführen, wurde für jede zu untersuchende miRNA ein spezifischer stem-loop Primer designed. Das 3'-Ende des stem-loop Primers ist dabei komplementär zur 3'-Sequenz der miRNA und bindet daran (1). Anschließend wird der erste Strang der cDNA mittels der Reversen Transkriptase synthetisiert (2). (B) In einem zweiten Schritt kommt es nun zur exponentiellen Vermehrung der ss-cDNA

im Rahmen der PCR. Durch Anlagerung des Forward-Primers wird die Polymerisation und Synthese der ds-cDNA initiiert (1). Nach Denaturierung der ds-cDNA kommt es zur Anlagerung von Forward- und Reverse-Primer sowie der fluoreszenzmarkierten TaqMan®-Sonde mit dem Reporterfarbstoff (R), dem sogenannten Quencher (Q) und dem *Minor Groove Binder* (MGB). Die Sonde bindet spezifisch an eine komplementäre Region zwischen Forward- und Reverse-Primer (2). Während der Amplifikation wird dieser Sondenkomplex durch die 5' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase fragmentiert. Dabei wird die Reporter-Fluoreszenz freigesetzt, welche vorher durch den Quencher mittels eines Förster-ähnlichen Energietransfers unterdrückt wurde, solange Quencher und Reporter sich in unmittelbarer Nähe zueinander befanden. Hierdurch kommt es zu einer stöchiometrischen Vermehrung des Fluoreszenzsignals während jedes Zyklus und somit zu einer quantitativen Erfassung des Amplifikationsprozesses (3). Nach der Duplikation der vorhandenen cDNA beginnt der nächste Zyklus mit der Denaturierung der synthetisierten ds-cDNA (4)¹⁵⁹.

2.6 Natrium-Bisulfitbehandlung genomischer DNA

Ein häufiger Alterationsmechanismus, welcher auf epigenetischer Ebene das Expressionsverhalten des Genoms verändert, ist die Methylierung von Cytosin am Kohlenstoffatom fünf zu 5-Methylcytosin (Abb. 4).

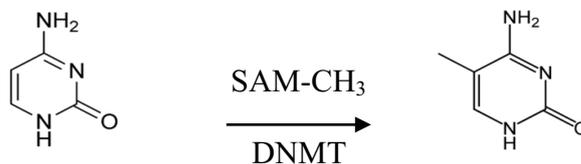


Abbildung 4: Enzymatische Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin durch die DNA-Methyltransferase (DNMT) und S-Adenosylmethionin (SAM) .

Diese, vor allem in CpG-reichen Regionen des DNA-Doppelstranges stattfindende Modifikation, verändert zwar die Struktur und das biochemische Verhalten des Cytosin, nicht aber seine Basenpaarungseigenschaften. Um den Methylierungsgrad der genomischen DNA in den relevanten DNA-Abschnitten zu bestimmen, wurde eine Natrium-Bisulfitbehandlung mit anschließender Pyrosequenzierung (2.7) durchge-

führt. Bei der Natrium-Bisulfitbehandlung erfolgt über mehrere Schritte eine Umwandlung des unmethylierten Cytosin hin zum Uracil, während das 5-Methylcytosin unverändert bleibt (Abb. 5). Dies hat zur Folge, dass in der anschließenden PCR-Amplifikation und Sequenzierung das modifizierte Uracil als Thymin abgelesen wird, während das methylierte Cytosin als Cytosin erkannt wird.

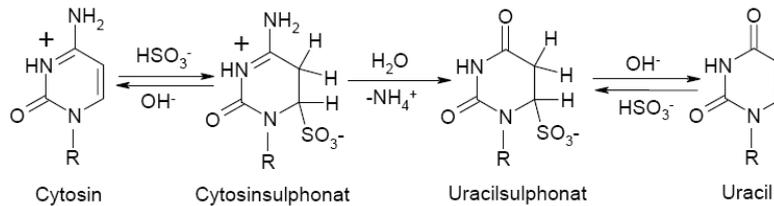


Abbildung 5: Chemischer Verlauf der Bisulfit-induzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil (modifiziert nach¹⁶⁰).

Über das C5-Atom nimmt Cytosin das Bisulfit-Ion auf und reagiert bei niedrigem pH-Wert streng einzelstrangspezifisch zu Cytosinsulphonat. Durch Desaminierung im wässrigen Medium und anschließender Desulphonierung in alkalischer Lösung entsteht Uracil.

Folgende Lösungen wurden vor Versuchsbeginn frisch angesetzt:

Natriumhydroxid (10 N)

Hydrochinon (10 mM)

Natriumbisulfit (3 M, pH 5,0).

Zur Denaturierung der genomischen DNA-Proben wurden folgende Lösungen in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

10,0 µl DNA-Lösung (100 ng/µl)

1,5 µl Natriumhydroxid (10 N)

28,5 µl *Aqua dest.*

und für 15 Minuten bei 37°C denaturiert.

Für die eigentliche Bisulfitbehandlung erfolgte die Zugabe von

30 µl 10 mM Hydrochinonlösung
520 µl 3 M Natriumbisulfit (pH 5,0).

Nach kurzem Mischen wurden die DNA-Proben bei 55°C für 16 Stunden in einem Hybridisierofen (Biometra) inkubiert. Anschließend wurden die behandelten DNA-Proben mit Hilfe des Wizard DNA Clean-Up System von Promega (Mannheim) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde mit 50 µl *Aqua dest.* eluiert und mit 1,5 µl 10 N Natriumhydroxid für 15 Minuten bei 37°C desulphoniert. Abschließend erfolgte die Salzfällung durch Zugabe von

1/10 Vol. 3 M Natriumacetat
2 Vol. 99% Ethanol.

Nach kurzem Mischen wurde die DNA bei -20°C für 30 Minuten gefällt und anschließend durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 14000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl *Aqua dest.* aufgenommen.

2.7 Pyrosequenzierung

In der Genetik und Biochemie bedeutet Sequenzierung die Bestimmung der Primärstruktur eines Biopolymers. DNA-Sequenzierung wiederum ist das Verfahren zur Bestimmung der Nukleotidabfolge eines gegebenen DNA-Fragmentes. Die momentan führenden Modelle sind das modifizierte Kettenabbruchverfahren nach Sanger und das auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese basierende Pyrosequenzieren.

Während die Methode nach Sanger auf einer Kettentermination durch den Einbau von Dideoxynukleotiden fußt, welche unterschiedlich lange DNA-Fragmente erzeugt, die durch elektrophoretische Auftrennung auf einem Acrylamidgel Rückschlüsse auf die untersuchte DNA-Sequenz liefert, wird bei der Pyrosequenzierung das bei der Synthese des komplementären DNA-Stranges entstehende Pyrophosphat (PP_i) detektiert und ermöglicht so die Sequenzierung während der Synthese.

Für die Methylierungsanalysen in dieser Arbeit wurde ausschließlich das Pyrosequenzieren verwendet. Bevor man jedoch mit der eigentlichen Sequenzierungsanalyse beginnen kann, muss man den gewünschten Genabschnitt mittels PCR amplifizieren. Einer der beiden verwendeten Primer muss dabei biotinyliert sein, um später die Einzelsträngigkeit des DNA-Fragmentes in der Pyrosequenzierung zu gewährleisten.

Die Sequenzen und damit die Lokalisation der verwendeten Primer wurden über den Human Genome Browser UCSC¹⁶¹ bestimmt (Tabelle 5). Die dort aufgeschlüsselte genomische Sequenz im Bereich der CpG-Inseln lieferte die Matrix für die benötigten Primer und das „*reverse complement*“ für die Pyrosequenzierungssoftware (siehe Tabelle 4).

In den nachfolgenden Schritten erfolgt die Immobilisierung der Biotin-markierten PCR-Produkte an Streptavidin-überzogene Sepharosebeads. Die Vereinzelnung der DNA-Stränge wird durch Denaturierung in NaOH erreicht, wobei der durch den Biotin-konjugierten Primer markierte DNA-Einzelstrang an die Beads gebunden bleibt, während der nicht-markierte Strang abgewaschen wird. Abschließend erfolgt die Bindung des Sequenzierungsprimers an den Einzelstrang (Abb. 6).

Die Immobilisierung der Biotin-markierten PCR-Produkte an die Streptavidin-überzogenen Sepharosebeads erfolgte durch Zugabe von Bindungspuffer (Qiagen) und Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) zum PCR-Produkt in folgendem Verhältnis:

Sepharosebeads	2 μ l
<i>Aqua dest.</i>	18 μ l
Bindungspuffer	40 μ l
PCR-Produkt	20 μ l

In den nachfolgenden Schritten werden die DNA-Stränge denaturiert und der immobilisierte DNA-Einzelstrang gewaschen. Dazu wurden die Sepharosebeads mit Hilfe eines Vakuums über das sogenannte „*Vacuum Prep Tool*“ (Qiagen) an Metallstifte gesaugt, in 70 % EtOH gewaschen, in 0,2 M NaOH denaturiert und in 10 mM Tris-Acetat Puffer neutralisiert, bevor sie unter Abschaltung des Vakuums auf eine PyroMark Q24 Platte (Qiagen) mit je 25 μ l 0,3 μ M Sequenzierungsprimer pro Well transferiert wurden. Abschließend wurden die PyroMark Q24 Platten für 2 Minuten bei 85°C auf einem Heizblock erhitzt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur in das PyroMark Q24 System (Qiagen) eingesetzt.

Entsprechend der genomischen Sequenz des zu untersuchenden Bereiches wurde die Software für den jeweiligen Lauf programmiert, die sich daraus ergebenden Mengen an Nukleotiden sowie Enzym- und Substratmix durch die Software bestimmt, die Kartusche des PyroMark Q 24 entsprechend dieser Vorgaben beladen und der Lauf gestartet. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der PyroMark Q24 Software von Qiagen¹⁶²⁻¹⁶⁴.

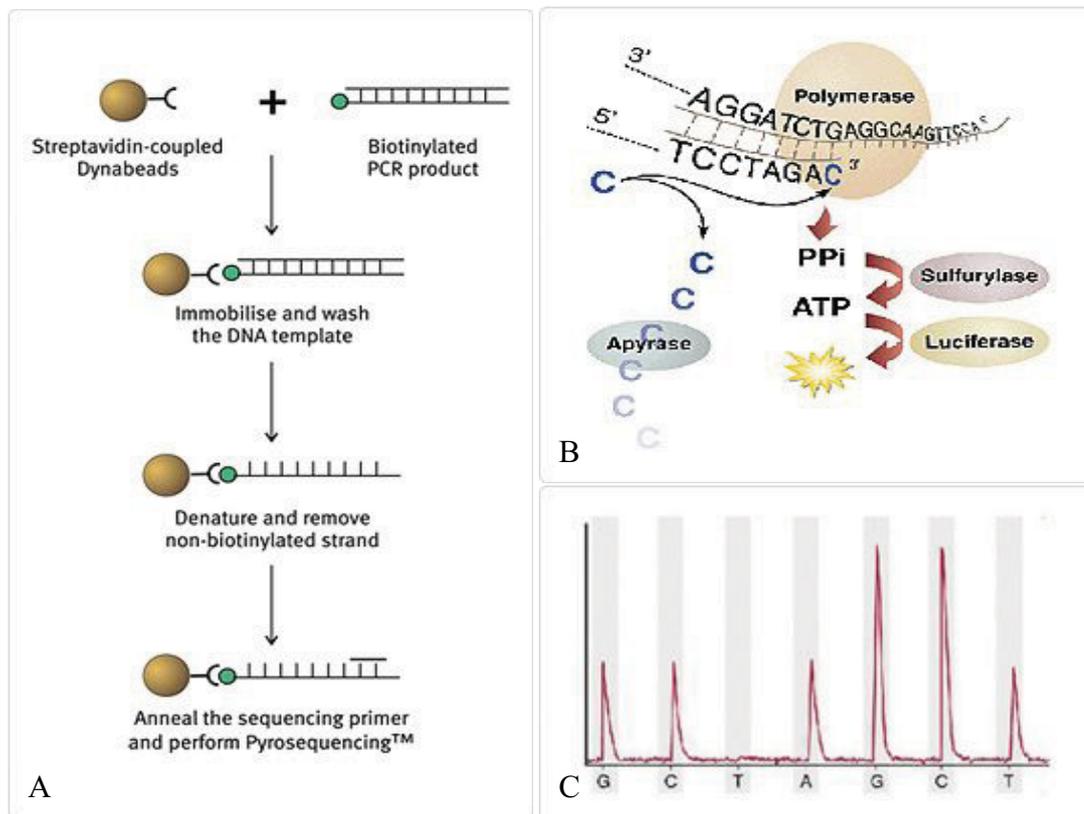


Abbildung 6: Prinzip der Pyrosequenzierung. **(A)** Durch Zugabe der an Streptavidin-gekoppelten Dynabeads wird der biotinylierte DNA-Doppelstrang immobilisiert und durch NaOH-Zugabe denaturiert. Durch sich anschließende Waschschritte werden alle Reaktionskomponenten bis auf den biotinylierten, immobilisierten DNA-Einzelstrang entfernt. Im nächsten Schritt bindet der Sequenzierungsprimer an den Einzelstrang und bildet somit den Startpunkt für die Polymerase. **(B)** Die eigentliche Sequenzierung erfolgt durch Zugabe eines Enzymmixes, bestehend aus DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase sowie zweier Substrate, Adenosin-5-Phosphosulfat (APS) und Luciferin. Nun wird eines der vier Nukleotide hinzugefügt und wenn es komplementär zu der Base des DNA-Stranges ist, durch die DNA-Polymerase inkorporiert. Das hierdurch freiwerdende PP_i dient der Umwandlung von APS in Adenosintriphosphat (ATP) durch die ATP-Sulfurylase. Im Rahmen einer Enzymkaskade wird abschließend Luciferin zu Oxyluciferin durch das Enzym Luciferase in der Anwesenheit von ATP umgewandelt. Die hierbei freigesetzte Energie in Form eines Lichtsignals wird detektiert und durch das Pyrogram[™] dargestellt **(C)**. Alle nicht inkorporierten Nukleotide werden vor der Zugabe des nächsten Nukleotides Pyrase-vermittelt abgebaut¹⁶⁵.

Tabelle 4: Übersicht der Primerlokalisationen der unterschiedlichen CpG-Inseln für die Pyrosequenzierung.

Name	Sequenz
PANK1-bisu-F	atgttgagggagtagtggt
PANK1-bisu-R	cactctcaaaaacccc
PAR3-Taq-F	gggacggccacatgaaagtt
PAR3-Taq-R	ctccatgtccaagcgatgc
LLGL2-Taq-F	gcgggacctgtccagtta
LLGL2-Taq-R	agcttgatggctccagaacg
PANK1-bisu-Fbio	atgttgagggagtagtggt
PANK1-bisu-RSeqC	caaccgaaatccaataa
PANK1-bisu-RSeqT	caaccaaataccaataa
GRID1-bis-F1/Not	gcggccgctttgagttgcgtagaagggttt
GRID1-bis-R1	ataacttctcccctaaatataccaata
GRID1-bis-F1.2/Not	gcggccgcggggagcggtagtagtag
GRID1-bis-F2/Not	gcggccgcttttagtttagtttagttt
GRID1-bis-R2	aacacacaaccaacccaaaa
GRID1-bis-F3/Not	gcggccgcggggagtaagaagagagat
GRID1-bis-R3	cacataaaaactccgtacaaaa
PANK1-Taq-F	acgtccacctggaactgaaa
PANK1-Taq-R	caggccctgaatcagacagt
GRID1-bis-R4Seq	taacaacttaaaccaa
GRID1-bis-F5/bio	ttgggttggttggtt
GRID1-bis-R5	taacatatcaaaaaaaaaaaccaaa
GRID1-bis-R5SeqA	aacattccatatcc
GRID1-bis-R5SeqG	aacgttccatatcc
GRID1-CpG47-F/bio	tggtggttagagtgtgtgtt
GRID1-CpG47-R	acttattctacaaataaaaaaccac

GRID1-CpG47-Rseq	attccaactaaccca
GRID1-bis-F5bBio	tgggtgggtgggtgg

	Größe	Lokalisation
CpG-Insel-45	543bp	chr10: 104181975 – 104182517
Vorwärts-Primer (biotinyliert)	21bp	chr10: 104182118 – 104182139
Sequenzierungsprimer 1	21bp	chr10: 104182234 – 104182255
Sequenzierungsprimer 2	24bp	chr10: 104182313 – 104182335
Rückwärts-Primer	21bp	chr10: 104182391 - 104182412
<hr/>		
CpG-Insel-47	639bp	chr10: 88012621 – 88013259
Vorwärts-Primer (biotinyliert)	20bp	chr10: 88012979 – 88012999
Sequenzierungsprimer	17bp	chr10: 88013088 – 88013105
Rückwärts-Primer	25bp	chr10: 88013224 – 88013249
<hr/>		
CpG-Insel-356.1	639bp	chr10: 88112905 – 88117344
Vorwärts-Primer (biotinyliert)	19bp	chr10: 88116879 – 88116898
Sequenzierungsprimer	22bp	chr10: 88117074 – 88117096
Rückwärts-Primer	22bp	chr10: 88117182 – 88117204
<hr/>		
CpG-Insel-356.2	639bp	chr10: 88112905 – 88117344
Vorwärts-Primer 1	24bp	chr10: 88116494 – 88116518
Vorwärts-Primer 2 (biotinyliert)	17bp	chr10: 88116306 – 88116323
Sequenzierungsprimer	15bp	chr10: 88116124 – 88116139
Rückwärts-Primer	26bp	chr10: 88116124 – 88116139

Tabelle 5: Primersequenzen für die Pyrosequenzierung.

Name	Sequenz
PANK1-bisu-F	atggtgaggagtagtggt
PANK1-bisu-R	cactctcaaaaacccc
PANK1-bisu-Fbio	atggtgaggagtagtggt

PANK1-bisu-RSeqC	caaccgaaatccaataa
PANK1-bisu-RSeqT	caacccaaaatccaataa
GRID1-bis-F1/Not	gcggccgcgtttgagttgcgtagaagggtt
GRID1-bis-R1	ataacttctcccctaaatataccaata
GRID1-bis-F1.2/Not	gcggccgcgggagcggttaagtagttag
GRID1-bis-F2/Not	gcggccgcgttttagtttagtttagtttagtt
GRID1-bis-R2	aacacacaaccaacccaaaa
GRID1-bis-F3/Not	gcggccgcggggagtaagaagagagat
GRID1-bis-R3	cacataaaaactccgtacaaaa
PANK1-Taq-F	acgtccacctggaactgaaa
PANK1-Taq-R	caggccctgaatcagacagt
GRID1-bis-R4Seq	taacaacttaaacccea
GRID1-bis-F5/bio	ttgggttgggttgggtt
GRID1-bis-R5	taacatatccaaaaaaaaaaccacaa
GRID1-bis-R5SeqA	aacacttccatatcc
GRID1-bis-R5SeqG	aacgttccatatcc
GRID1-CpG47-F/bio	tgggtggttagagtgtgtgtt
GRID1-CpG47-R	acttattctacaaataaaaaaccac
GRID1-CpG47-Rseq	atttcccaactaaccca
GRID1-bis-F5bBio	tgggttgggttgggttgg

2.8 Methoden der Zellkultur

2.8.1 Transfektion der Glioblastomzelllinien

Zur Bestimmung der Effekte einer Überexpression der microRNAs *hsa-miR-107*, *miR-146b* und *hsa-miR-346* auf Vitalität, Proliferation und Apoptose-Aktivität von Glioblastomzellen *in vitro* wurden die Zelllinien A172 und T98G verwendet. Beide Zellreihen entstammen der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) und wurden als Monolayerkultur in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen), ergänzt durch 10 % hitzeinaktiviertes Kälberserum (HIFCS; PAA, Cölbe) und Penicillin/Streptomycin (P+S; Invitrogen), bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 24 Stunden vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen und mit Trypsin gelöst. Nach kurzer Inkubation für 2-3 Minuten bei 37°C wurden die Zellen in DMEM/HIFCS/P+S aufgenommen und mittels einer Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden je 2000 Zellen/Well für die Proliferations- und Vitalitätsbestimmung bzw. 8000 Zellen/well für die Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität in eine 96-Well Platte in einem Volumen von 100 µl DMEM/HIFCS/P+S pro Well pipettiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor der Transfektion wurde das alte Medium entfernt und durch 50 µl frisches DMEM/HIFCS ohne Antibiotika-Zusatz ersetzt. Auf die Zellen wurden anschließend 50 µl des sich wie folgt zusammensetzenden Transfektionsansatzes gegeben:

0,2 µl LipofectamineTM 2000 wurden mit 24,8 µl OptiMEM[®] (beides Invitrogen) gemischt. Die verwendeten Pre-miRTM miRNA „*Precursor*“-Moleküle (Ambion) für *miR-107*, *miR-146b* und *miR-346* sowie die zur Normalisierung von unspezifischen, nicht durch die Überexpression der miRNAs erzeugten Effekte verwendeten negativen Kontroll-Moleküle (Pre-miRTM negativ control; Ambion) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (10 nM und 25 nM) ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 25 µl in OptiMEM[®] verdünnt. Nach 5 min wurden beide Ansätze gemischt und für

15-20 min bei RT inkubiert, bevor sie zu den Zellen gegeben wurden. Abschließend erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ für einen entsprechenden Zeitraum.

2.8.2 Bestimmung der Zellproliferation mittels eines BrdU (5-Brom- 2'-Desoxyuridin)-basierten Chemilumineszenz-Nachweisverfahrens

Die Bestimmung der DNA-Syntheserate in den Zellen erfolgt durch den Einbau und Nachweis von 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU). BrdU ist ein Analogon der Base Thymidin und wird während der S-Phase des Zellzyklus, anstelle von dTTP, in den neusynthetisierten DNA-Strang inkorporiert. Eine nachfolgende Behandlung mit einem markierten BrdU-Antikörper ermöglicht die Bewertung der Proliferationsrate der mit *pre-miRNA*-Molekülen transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit Kontroll-Molekülen transfizierten Zellen. Hierzu wurden die wie unter 2.8.1 beschriebenen, transfizierten Zellen mit einem kommerziell erwerblichen „*Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence)*“-Assay von Roche (Mannheim) wie folgt weiterbehandelt:

48 h (entspricht dem 72 h-Wert) nach Transfektion wurden die Zellen mit jeweils 10 µl/well *BrdU Labeling Reagent* entsprechend den Herstellerangaben versetzt¹⁶⁶. Anschließend erfolgte die Inkubation für 24 h über Nacht bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl/well *FixDenat* für 30 Minuten bei RT fixiert und dann mit 100 µl/well verdünnter *Anti-BrdU-POD* Lösung (1:100 mit Antibody Dilution Solution verdünnte Anti-BrdU-POD) bei Raumtemperatur für 90 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 200 µl/well *Washing Buffer PBS* (1:10 verdünnt mit ddH₂O) erfolgte die Zugabe von 100 µl/well *Substrate Solution (1:100 Verdünnung der Substratlösung B in der Substratlösung A)*. Nach 3-10 min bei RT erfolgte die Auswertung in einer Beckman Coulter PARADIGM™ Detection Platform.

2.8.3 Bestimmung der Zellvitalität mittels eines Chemilumineszenz-basierten CellTiter-Glo Luminescent Viability Assays

Um den Einfluss der miRNA Modulation auf die Vitalität der transfizierten Zellen zu bestimmen, wurde ein Chemilumineszenz-basierter CellTiter-Glo Luminescent Viability Assay der Firma Promega angewendet. Grundlage des Assays ist die Bestimmung der Zahl an lebenden Zellen durch Quantifizierung der vorhandenen ATP-Moleküle. Die Menge an ATP korreliert mit der Zahl der metabolisch aktiven Zellen. Das Medium der, wie unter 2.8.1 beschrieben, transfizierten Zellen wurde nach 72 h durch 50 µl frisches DMEM mit HIFCS ohne Antibiotikum ersetzt und die Zellkulturplatte auf Raumtemperatur äquilibriert. Es erfolgte die Zugabe von 50 µl CellTiter-Glo Reagent und ein 2 minütiges Schütteln auf einem Orbital-Schüttler zur Zellyse. Danach wurde die Platte für weitere 10 min bei RT zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals inkubiert und anschließend in einer Beckman Coulter PARADIGM™ Detection Platform das Lumineszenzsignal gemessen¹⁶⁷.

2.8.4 Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität mittels eines Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assays

Die Apoptose bietet Zellen und Geweben die Möglichkeit, geschädigte oder überschüssige Vertreter ihrer Art ohne Schädigung der unmittelbar anliegenden Strukturen zu beseitigen. Die mangelnde Fähigkeit zur Apoptose und die daraus resultierende Dysregulation des Proliferationsverhaltens wiederum sind charakteristische Merkmale maligner Gliome. Über intrinsische und extrinsische Wege kommt es zur Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 9, welche dann die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 freischalten. Diese Effektorcaspasen sind es nun, die integrale Bestandteile der

Zelle lysieren und weitere sekundäre Zielproteine wie die Caspase-aktivierte DNase durch limitierte Proteolyse aktivieren. Die Folge ist der regulierte, entzündungsfreie Zelltod.

Als hinreichend sensitive Surrogat-Parameter für die Determinierung der Apoptose hat sich die Bestimmung der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 erwiesen. Hierzu wurde in dieser Arbeit der Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay von Promega verwendet¹⁶⁸. Das Prinzip des Assays basiert auf dem spektrometrischen Nachweis von fluoreszierendem Rhodamin 110, welches durch die spezifische proteolytische Aktivität der Caspasen 3 und 7 aus dem den Zellen zuvor zugeführten Substrat Rhodamin 110, bis-(N-CBZL-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide; Z-DEVD-R110) herausgelöst wird. Durch die Abspaltung der DEVD-Gruppe wird das Fluoreszenzsignal von Rhodamin 110 detektierbar, mit einem Emissionsmaximum bei 521nm (Abb. 7). Die Menge an generiertem Fluoreszenzsignal ist proportional zur Spaltungsaktivität der Caspasen 3 und 7 und somit ein Marker für die apoptotische Aktivität der Zellen.

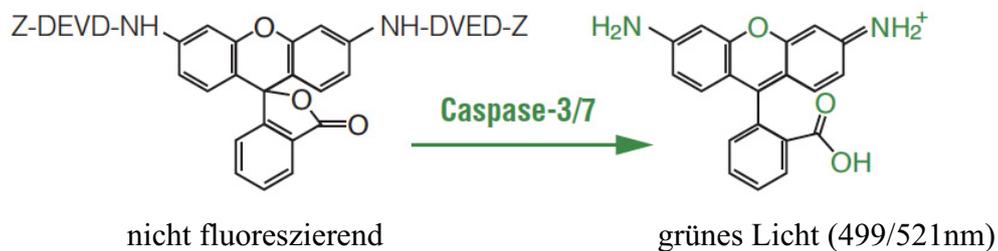


Abbildung 7: Spaltung des nicht fluoreszierenden Z-DEVD-R110 durch die Caspasen-3/7 unter Erzeugung des grün fluoreszierenden Rhodamin 110 (modifiziert nach¹⁶⁸).

Nach Transfektion der Zellen mit den entsprechenden pre-miRNAs und Kontrollen (siehe Abschnitt 2.8.1) erfolgte die Messung der Caspase-3/7 Aktivität nach 72 Stunden. Hierzu wurde das Substrat Caspase Substrate Z-DEVD-R110 in dem Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Puffer im Verhältnis 1:100 verdünnt. Während

das Substrat den fluoreszierenden Marker enthält, dient der Puffer der Lyse der Zellen und optimiert die Caspase 3/7-Aktivitätsbedingungen. Von dem so erzeugten Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz wurden jeweils 50 µl zu dem 50 µl Transfektionsansatz gegeben, so dass das Verhältnis von Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz zu Probe 1:1 beträgt. Im Anschluss wurde die Zellkulturplatte auf einem Plattenschüttler bei 400 rpm für einen Zeitraum von 30 Sekunden gestellt und abschließend bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die spektrometrische Auswertung erfolgte in einer Beckman Coulter PARADIGM™ Detection Platform.

2.9 Validierung potentieller miRNA-Zielgene mittels Luciferase 3'-Reportergen-Assays

Potentielle Zielgene der untersuchten miRNAs wurden über Internetdatenbanken wie MAMI („*meta miR:target interference*“, <http://mami.med.harvard.edu/>) ermittelt und mit Expressionsprofilen der jeweiligen Ziel-mRNAs in Gliomproben verglichen. Spiegelte das Expressionsprofil des potentiellen Zielgens das Expressionsverhalten der entsprechenden miRNA, so erfolgte im nächsten Schritt mittels Real-Time PCR die Bestimmung der Expression der Ziel-mRNA in den mit den entsprechenden miRNAs transfizierten Zellen, entsprechend den Primersequenzen aufgeführt in Tabelle 6. Zeigte sich eine Herunterregulierung des Zielgens in der behandelten Zelllinie im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen, wurde diese Ziel-mRNA zur Validierung mittels eines Luciferase-3' Reportergen-Assays ausgewählt.

Tabelle 6: Primersequenzen für die Zielgen-Validierung mittels Real-Time PCR.

Name	Sequenz
BCL6-Taq-F	agccgtgagcagtttagagc
BCL6-Taq-R	aagtccaggaggatgcagaa
CFLAR-Taq-F	ctgatggcagagattggtga
CFLAR-Taq-R	ggcaaccagatttagtttctcc
DYRK1A-Taq-F	tccttgcgactccagaact
DYRK1A-Taq-R	agcacctctggagaccgata
EFEMP2-Taq-F	cgtcatcaacgacctacag
EFEMP2-Taq-R	atcttgcggtaaccatcagg
ELAVL1-Taq-F	gggctatggcttttgaact
ELAVL1-Taq-R	gagcccgtgatgtacaagt
KCTD15-Taq-F	ccagctcaccaagtccaatg
KCTD15-Taq-R	ctacgtcctgagcttctgc
LIF-Taq-F	gtgcagcccataatgaaggt
LIF-Taq-R	tggctcctgatctggtcat
SOX12-Taq-F	acatcaagaggccgatgaac
SOX12-Taq-R	aacgggatcttctccgagtc
TAZ-Taq-F	gcacctacagctgcttctgg
TAZ-Taq-R	cagagatgagggtcgtcca
ZNF12-Taq-F	cattcaaggacgtggctgt
ZNF12-Taq-R	catggctcttctccttgctc

2.9.1 Klonierung der miRNA-Bindungsstellen potentieller Zielgene in psiCHECK2 und Plasmid-DNA Präparation

In der Molekularbiologie werden Plasmide verwendet, um Gene in Zellen einzubringen und die Veränderung ihrer Expression in funktionalen Assays zu untersuchen. Bei dem hier verwendeten Vektor handelt es sich um den psiCHECK™-2 Vektor der Firma Promega. Der 6273 bp große Vektor erlaubt die Quantifizierung der Luciferase-Aktivität nach Einbau der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des Zielgens durch die Fusionierung mit dem Reporter-Gen *Renilla* Luciferase. Dabei wird die 3'-UTR Sequenz distal des Stopp-Codons von *Renilla* in einer Multiple Cloning Site über die Restriktionsenzyme *XhoI* und *NotI* eingebaut. Kommt es nun zu RNA-Interferenzen mit folgender Degradierung der Fusions-mRNA, resultiert daraus eine quantifizierbare Abnahme der *Renilla*-Aktivität. Der psiCHECK™-2 Vektor enthält zusätzlich noch ein zweites Reporter-Gen, die *Firefly* Luciferase. Diese ermöglicht die Normalisierung der *Renilla* Luciferase-Expression durch einen internen Abgleich (Abb. 8).

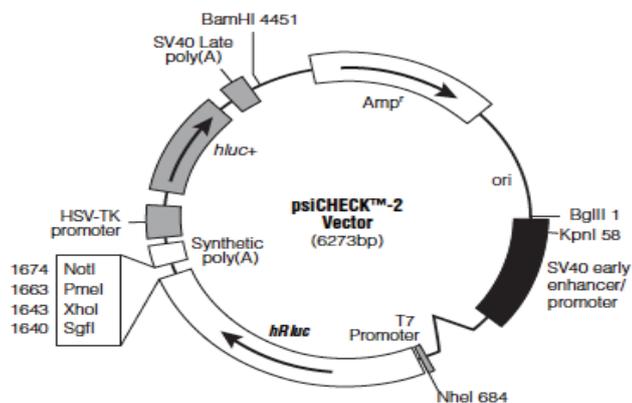


Abbildung 8: Die psiCHECK™-2 Vektor-Karte¹⁶⁹.

In einem ersten Schritt wurde die zu untersuchende potentielle Bindungsstelle der entsprechenden miRNA amplifiziert. Hierzu wurde jeweils cDNA nicht-neoplastisch

veränderter Hirnproben in einer Verdünnung von 1:10 verwendet. Die entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthielten die Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *NotI*. Das Pipettierschema und die PCR-Reaktion gestalteten sich wie in 2.3 beschrieben. Um einen späteren Einbau der gewünschten DNA-Sequenz in den Vektor zu ermöglichen, erfolgte ein Verdau der PCR mit den Restriktions-Enzymen *XhoI* und *NotI*.

PCR-Produkt von Schritt 1	40,0 µl
<i>XhoI</i> (20 u/µl; New England Biolabs)	2,0 µl
<i>NotI</i> (10 u/µl; New England Biolabs)	2,0 µl
10 x Puffer 3 (New England Biolabs)	6,0 µl
100 x BSA (New England Biolabs)	0,6 µl
Milli Q-H ₂ O	9,4 µl

Der Ansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert und dann für 20 min auf 65°C zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme erhitzt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Restriktionsansatzes durch das Aufreinigungs-Kit MSB® Spin PCRapace von Invitex. Hierzu wurde im ersten Schritt das PCR-Produkt mit 250 µl Binding Buffer 1 versetzt, nach Durchmischen auf einen Spin Filter übertragen und bei 12.000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurde der Spin Filter in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß platziert, die DNA mit 10 µl *Aqua dest.* eluiert und nach einminütiger Inkubation bei 10.000 rpm zentrifugiert¹⁷⁰.

Als nächstes erfolgte der eigentliche Einbau der 3'-UTR des Zielgens in den Vektor. Hierzu musste zuerst eine optische Dichtemessung des aufgereinigten PCR-Produktes erfolgen, um im Anschluss das richtige Verhältnis zwischen Einbaustück und Vektor zu gewährleisten. Das Einbaustück sollte sich hierbei in Bezug auf die Molarität zum Vektor verhalten wie 3:1. Die Messung erfolgte mit dem Nanodrop 1000 der Firma PeqLab (Erlangen). Zusätzlich musste der Vektor, in den das Insert eingebaut werden soll, vor der Fusion geschnitten und dephosphoryliert werden. Bei einer

Konzentration des Vektors von 419 ng/ μ l ergab sich für den Verdau folgendes Pipettierschema:

psiCHECK 2	12,0 μ l		
<i>Xho</i> I	2,0 μ l		
<i>Not</i> I	2,0 μ l	37°C	3 h
10x Puffer 3	3,0 μ l	65°C	20 min
100x BSA	0,3 μ l	8°C	∞
<i>Aqua dest.</i>	10,7 μ l		

Der geschnittene Vektor wurde anschließend wie folgt dephosphoryliert:

FastAP™ (Fermentas)	1,0 μ l	37°C	10 min
		75°C	5 min

Alle Reaktionsschritte erfolgten in einem Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen).

Der so entstandene dephosphorylierte und an seinen Bindungsstellen freigelegte Vektor wurde nun entsprechend dem folgenden Schema in dem oben beschriebenen Verhältnis mit dem Einbaustück zusammengegeben und bei 14°C über Nacht inkubiert:

Vektor (\cong 167 ng/ μ l)	1,0 μ l
Insert (\cong 150 ng/ μ l)	1,5 μ l
T4 DNA Ligase (Invitrogen)	1,0 μ l
5x DNA Ligase Puffer (Invitrogen)	2,0 μ l

Nach Ablauf der Inkubation erfolgte die Transformation der Plasmid-DNA in Bakterien-Zellen. Hierzu wurden teilkompetente *Escherichia coli* verwendet, welche mit-

tels Calciumchlorid-Behandlung und anschließendem Hitzeschock zur Aufnahme des DNA-Plasmids bewogen wurden. Die Bakterien wurden nach Zugabe von 5 µl Ligationsansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 30 Sekunden in einem Wasserbad bei 42°C hitzegeschockt und danach für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Super Optimal broth with Catabolite repression) wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm geschüttelt, bevor 100 µl des Transformationsansatzes auf einem Ampicillin-enthaltenden Selektivagar ausplattiert wurden. Aufgrund des mit Antibiotikum versetzten Nährmediums sind lediglich solche Bakterien in der Lage, auf dem Agar zu wachsen, die eine auf dem Plasmid kodierte Antibiotikum-Resistenz tragen. Die Platte wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in ein 15 ml-Falcon mit 3 ml LB-Medium („lysogeny broth“; 1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 1 % NaCl) versetzt mit 0,1 mg/ml Ampicillin transfert. Die Anzucht der transformierten *E. coli* erfolgt im Brutschrank unter Schütteln bei 37°C über Nacht. Das in den *E. coli* amplifizierte Plasmid wurde anschließend durch das Plasmid Miniprep Kit I von PEQLAB aus den Bakterien isoliert.

1. Pelletierung der Bakterien: Die Bakterienübernachtkultur wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 rpm für 1 Minute pelletiert. Der Überstand wird verworfen und der Schritt mit den restlichen 1,5 ml Bakterienkultur wiederholt.
2. Alkalische Lyse: Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Lösung I/RNaseA vollständig resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl der Lösung II dazugegeben und durch Invertieren gemischt. Abschließend folgten weitere 350 µl der Lösung III mit Mischung durch Invertieren und Zentrifugation für 10 Minuten bei 14.000 rpm.
3. Bindung der DNA an die Säulenmatrix: Nach Abschluss der Zentrifugation erfolgte das Beladen der PerfectBind DNA Column mit dem Überstand. Maximal wur-

den 750 µl geladen und anschließend bei 14.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis sämtlicher Überstand geladen war.

4. Waschen: Zur Entfernung zellulärer Bestandteile und anderer Kontaminationen erfolgte ein Waschschrift mit 750 µl DNA Waschpuffer und anschließender Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 Minute.

5. Trockenzentrifugation: Die PerfectBind DNA Column wurde bei 14.000 rpm für 1 Minute trocken zentrifugiert.

6. Elution: 50 µl H₂O dest wurden zur Elution der DNA direkt auf die Matrix gegeben und die DNA in ein frisches 1,5-ml Reaktionsgefäß bei 7.000 rpm für 1 Minute eluiert.

Mittels *XhoI/NotI*-Restriktionsenzymverdau (s. o.) wurden solche Plasmide bestimmt, die eine Insertion enthalten. Diese Plasmide wurden anschließend zur Validierung der inserierten Sequenzen sequenziert.

2.9.2 Plasmid-Sequenzierung mittels „Dye Terminator“-Methode

Die Sequenzierung der ausgewählten Plasmide mit Inserierung erfolgte mit Hilfe eines semiautomatischen Sequenziergerätes ABI377 PRISM und dem Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems; Forster City, USA).

Die Sequenzierungsreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Plasmid DNA	5,0 µl
psi-CHECK2-F2	
oder. psi-CHECK2-R2	0,5 µl
Big Dye Terminator v1.1 Cycle SequencingMix	2,0 µl
<i>Aqua dest.</i>	2,5 µl

Die Sequenzreaktion erfolgte in einem PCR-Gerät der Firma Biometra unter folgenden Bedingungen für 25 Zyklen:

96°C	10 sec
50°C	5 sec
60°C	4 min

Die Reaktionen wurden bis zur Fällung der DNA bei 8°C gelagert.

Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von

Natriumacetat 3 M	1,0 µl
96% Ethanol	25,0 µl

und einer Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C mit 14.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweifach mit je 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Der Alkohol wurde vollständig entfernt, das Pellet für 15-20 min bei 37°C getrocknet

und anschließend in 4 µl Ladungspuffer (5 Teile Formamid zu einem Teil 0,5 M EDTA, 50 mg/ml Blue Dextran (Sigma)) gelöst.

Die so vorbereiteten Proben werden auf ein denaturierendes Sequenzierungsgel folgender Zusammensetzung aufgetragen:

Urea	21,0 g
30% Acrylamid/Bis-Acrylamid, Vernetzung 29:1; Roth)	8,4 ml
10 x TBE	6,0 ml
<i>Aqua dest.</i>	20,0 ml
10 % Ammoniumpersulfat	350,0 µl
TEMED	30,0 µl

Die Auftrennung der Sequenzierreaktion erfolgte in einem semi-automatischen ABI PRISM[®] Sequenziergerät (Applied Biosystems) bei 2500 Volt, 48 Watt und 51°C Geltemperatur für 6 Stunden. Zur Auswertung wurden die erhaltenen Sequenzen mit der Sequenz in den Genombibliotheken der NCBI Blast-Internet Homepage (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verglichen.

2.9.3 Luciferase 3'-Reportergen-Assay

Mittels des Luciferase 3'-Reportergen-Assays sollen mögliche Ziel-mRNAs der miRNAs *hsa-miR-107*, *-miR-146b* und *-miR-346* validiert werden. Durch Bindung der miRNAs an die 3'-UTR der entsprechenden Ziel-mRNA erfolgt eine messbare Hemmung der Luciferase-Aktivität. Je 8000 T98G-Zellen wurden in 96-Well Platten, wie unter 2.8.1 beschrieben, ausgesät und transfiziert. Die Transfektion der Zellen mit 200 ng Vektor und 100 nM der jeweiligen pre-miRNAs- bzw. negativen Kontroll-Molekülen erfolgte 24 h nach Aussaat. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte 48 h nach Transfektion mit dem Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega) wie folgt¹⁷¹:

Zuerst wurde das Medium durch 50 μ l frisches Medium mit HiFCS ohne Antibiotikum ersetzt und 50 μ l Dual-Glo[®] Luciferase Reagenz pro Well zugegeben, welches sich aus Dual-Glo[®] Luciferase Substrate und Dual-Glo[®] Luciferase Puffer zusammensetzt. Nach 10 minütiger Inkubation wird die Aktivität der *Firefly* Luciferase in einer Beckman Coulter PARADIGM[™] Detection Platform gemessen (Abb. 9). Zur Bestimmung der Renilla Lumineszenz wurde jedem Well 50 μ l Dual-Glo[®] Stop & Glo[®] Reagenz (1:100 Dual-Glo[®] Stop & Glo[®] Substrate in Dual-Glo[®] Stop & Glo[®] Puffer) zugeführt. Das Reagenz unterdrückt die *Firefly* Lumineszenz und bildet das Substrat für die *Renilla* Luciferase (Abb. 9). Nach 10 minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Lumineszenz.

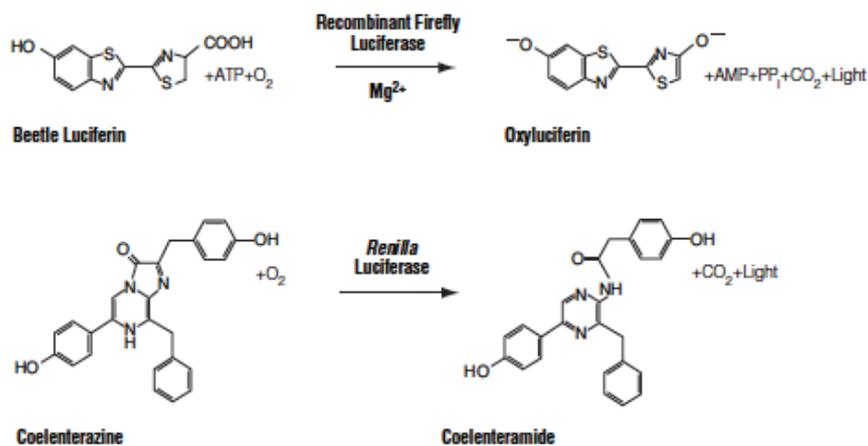


Abbildung 9: Biolumineszenzreaktionen katalysiert durch die *Firefly* und *Renilla* Luciferase¹⁷¹.

Zur quantitativen Auswertung wurde die *Renilla*-Lumineszenz gegen die *Firefly*-Lumineszenz normalisiert und die Meßwerte der *pre-miRNA*-transfizierten Zellen gegen die der *pre-NC1*-transfizierten Zellen ins Verhältnis gesetzt.

2.9.4 Generierung mutierter miRNA-Bindungsstellen mittels „Overlap-Extension“-PCR

Zur Überprüfung der Spezifität der Bindung von miRNA an die entsprechende 3'-UTR des potentiellen Zielgens wird die Bindungsstelle der miRNA im Vektor deletiert. Die Deletion der Bindungsstelle erfolgt über eine sogenannte „Overlap-Extension“-PCR (OE-PCR), bei der zuerst zwei PCR-Fragmente, wie unter 2.3 beschrieben, erzeugt werden, die sich im Bereich der zu deletierenden Bindungsstelle überlappen.

Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch unter Verwendung des MSB® Spin PCRapace Kits von Invitex, wie unter 2.9.1 beschrieben, aufgereinigt. Im nächsten Schritt ging es darum, die überhängenden PCR-Fragmente A + B zu vervollständigen und hierdurch die miRNA-Bindungsstelle vollständig zu entfernen. Um dies zu erreichen, wurden zunächst die PCR-Produkte A + B ohne Vorwärts- und Rückwärts-Primer zusammenpipettiert und um die weiteren PCR-Reagenzien ergänzt.

PCR-Fragment A	50 ng
PCR-Fragment B	50 ng
<hr/>	
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 10 µl</i>
10x PCR	2,5 µl
2 mM dNTPs	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,5 µl

Im Thermocycler durchlief der PCR-Ansatz folgendes Schema, wobei nach initialer Denaturierung bei 94°C die Schritte 1-3 einmal wiederholt wurden.

94 °C	1 min
52 °C	2 min
72 °C	1 min
72 °C	5 min
8 °C	∞

Nach Zugabe von jeweils 1,0 µl WT-Vorwärts-Primer und 1,0 µl WT-Rückwärts-Primer zum Reaktionsansatz wurden die Schritte 1-3 12 mal wiederholt. Die Klonierung des modifizierten DNA-Fragments in den Vektor psiCHECK™-2 erfolgte wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben.

2.9.5 Western Blot

Der Nachweis einer veränderten Proteinexpression möglicher miRNA-Zielgene nach Transfektion von Gliomzellen mit entsprechenden pre-miRNA-Molekülen erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Dabei werden Proteine auf eine Membran transferiert und Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen. Zuerst wurde ein 12 % Trenngel angefertigt. Für ein Volumen von 20 ml ergibt sich folgende Zusammensetzung:

<i>Aqua dest.</i>	6,6 ml
Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)	8,0 ml
1,5 M TRIS (pH 8,8)	5,0 ml
10% SDS	0,2 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,2 ml
TEMED	8,0 µl

Nach Aushärtung wird das Sammelgel hinzugegeben. Für ein Volumen von 6 ml ergibt sich folgende Zusammensetzung:

<i>Aqua dest.</i>	4,1 ml
Acrylamid 30%	1,0 ml
1,0 M TRIS (pH 6,8)	0,75 ml
10 % SDS	0,06 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,06 ml
TEMED	6,0 μ l

Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer der Firma BioRad eingelegt, welche mit 1 x Gel-Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS) gefüllt war. 20-25 μ g Proteinlösung wurde mit Ladungspuffer versetzt, 5 min bei 95°C aufgekocht und auf das Gel aufgetragen. Als Marker diente eine „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Fermentas). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 180 V für ungefähr 1,5 h.

Das Gel wurde entsprechend der Abb. 10 zusammen mit einer Nitrozellulose-Membran (Whatman GmbH, Dassel) und Filterpapieren in eine Blotting-Kammer transferiert.

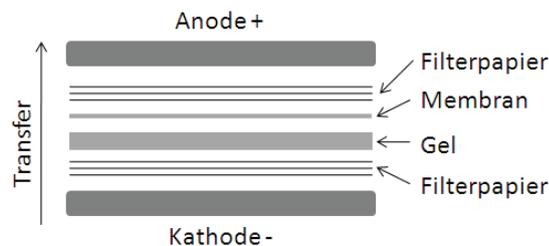


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Blotting-Kammer.

Der horizontale Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte unter Kühlung bei 250 mA über einen Zeitraum von 1,5 Stunden. Zur Überprüfung eines erfolgreichen Proteintransfers wurde die Membran in Ponceau S-Lösung zur Färbung der Proteine

für eine Minute inkubiert, überschüssige Färbelösung anschließend mit Wasser ausgewaschen und eine Fotodokumentation der nun unspezifisch angefärbten Proteine durchgeführt.

Danach wurde die Membran zur Blockierung freier Bindungsstellen für 30 min unter Schütteln in einer 5 % Milchpulverlösung inkubiert. Überschüssige Milchpulverlösung wurde durch Waschen mit 1 x PBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄ versetzt mit 0,05 % Tween-20) entfernt. Die entsprechenden primären Antikörper wurden in 5 % Milchpulver gelöst und die Membran über Nacht bei 8 Grad unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran zur Entfernung des primären Antikörpers dreimal für jeweils 15 Minuten mit 1 x PBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde der an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 für 1,5 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nachdem die Membran dreimal mit 1 x PBS-T gewaschen wurde, wurde die Membran mit der Lumineszenzlösung versetzt. Hierzu werden 500 µl Immobilon Western HRP Substrate Luminol Reagent mit 500 µl HRP Substrate Peroxide Solution zusammengegeben und auf der Membran verteilt. Die Fotodokumentation erfolgt am LAS-3000 über eine Expositionszeit von 10 Sekunden.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von distal auf dem langen Arm von Chromosom 10 lokalisierten MicroRNAs

Um eine mögliche pathogenetische Beteiligung der MicroRNAs als Tumorsuppressorkandidaten an der Entstehung und der Progression astrozytärer Tumoren zu untersuchen, bedarf es einer differenzierten Analyse des Expressionsverhaltens dieser nicht-kodierenden, regulatorischen Nukleotidfragmente in den unterschiedlichen Tumorentitäten. Aufgrund des bekannten häufigen Verlustes der Heterozygotie auf dem langen Arm von Chromosom 10 in höhergradigen astrozytären Tumoren wurden in einem Screening-Ansatz solche miRNAs untersucht, deren Genorte distal des bekannten Glioblastom-assoziierten Tumorsuppressorgens *PTEN* auf Chromosom 10q23-qter liegen. Die dort lokalisierten miRNAs sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht der miRNAs auf Chromosom 10q24-qter mit Angabe der genauen Nukleotidlokalisierung.

	Start	Ende		Start	Ende
<i>hsa-mir-605</i>	53059333	53059415	<i>hsa-mir-146b</i>	104196269	104196341
<i>hsa-mir-606</i>	77312216	77312311	<i>hsa-mir-936</i>	105807847	105807944
<i>hsa-mir-346</i>	88024451	88024545	<i>hsa-mir-609</i>	105978547	105978641
<i>hsa-mir-107</i>	91352504	91352584	<i>hsa-mir-548e</i>	112748684	112748771
<i>hsa-mir-607</i>	98588426	98588521	<i>hsa-mir-202</i>	135061015	135061124
<i>hsa-mir-608</i>	102734742	102734841	<i>hsa-miR-202*</i>	135061015	135061125

Die Liste entstammt dem UCSC Genome Browser und entspricht der Gesamtheit aller zum Zeitpunkt März 2006 auf diesem Genabschnitt bekannten miRNAs

(„Human Mar. 2006 (NCBI36/hg18)Assembly). MicroRNAs, die als Tumorsuppressorkandidaten fungieren könnten, sollten aufgrund ihrer biologischen Funktion eine signifikant erniedrigte Expression in den Tumorproben gegenüber den nicht-neoplastisch veränderten Gehirnproben aufweisen bzw. einen Expressionsunterschied zwischen den niedrig- und hochgradigen astrozytären Tumorentitäten zeigen. Mittels stem-loop Real-Time RT-PCR wurde in einem Tumorkollektiv aus insgesamt 64 Tumoren, davon sechs diffuse Astrozytome (AII), acht anaplastische Astrozytome (AIII), 10 sekundäre (sGBIV) und 40 primäre Glioblastome (GBIV) die Expression von 12 auf 10q23-qter lokalisierten MicroRNAs untersucht und mit der Expression in nicht-neoplastisch veränderten Gehirnproben verglichen.

3.1.1 Expressionsanalysen der MicroRNAs *hsa-miR-606*, *-607*, *-608*, *-609*, *-936*, *-548e*, *-202*, *-202**

Die Expressionsanalysen der 12 MicroRNAs zeigten, dass die MicroRNAs *hsa-miR-606*, *-607*, *-608*, *-609*, *-936*, *-548e*, *-202* und *-202** weder in den glialen Tumorproben noch in den Normalkontrollen exprimiert wurden. Als nicht exprimiert galten hierbei MicroRNAs, deren Expressionslevel in der Real Time-PCR einen C_T -Wert über 35 zeigten. Aufgrund dessen wurden diese MicroRNAs im Rahmen der Fragestellung der eigenen Arbeit als nicht relevant eingestuft und in den folgenden Experimenten nicht weiter berücksichtigt.

3.1.2 Expressionsanalyse der MicroRNA *hsa-miR-605*

Die MicroRNA *hsa-miR-605* wurde in allen untersuchten 64 astrozytären Tumorproben und den Normalgewebsproben exprimiert (Abb. 11). Hierbei imponierte insbesondere innerhalb der Normalgewebsproben eine deutlich ausgeprägte Varianz in Bezug auf die Höhe der MicroRNA-Expression (Abb. 11). Während die Standardabweichung der einzelnen Tumorentitäten von $\pm 0,35$ bis $\pm 0,87$ reichte, erzielte die Standardabweichung der Kontrollproben einen Wert von $\pm 3,02$ bei einem Mittelwert der normalisierten MicroRNA-Expressionswerte von 1,99.

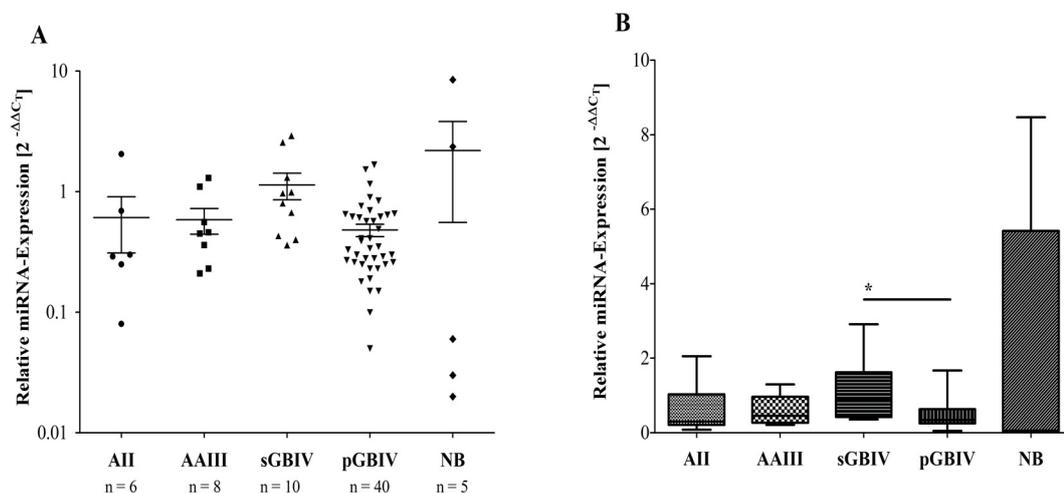


Abbildung 11: Expression der MicroRNA *hsa-miR-605* in astrozytären Tumoren (AII, AAIII, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB), relativ zur Referenz HU. **(A)** Verteilung der miRNA-Expression in den einzelnen Tumorgruppen und Normalgewebsproben. Schwarzer Querbalken – mittlere Expression, schwarzer Längsbalken – Standardabweichung. **(B)** Der Box-Plot zeigt den Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und –minimum der normalisierten Expressionswerte für die MicroRNA *hsa-miR-605*. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$.

Nach der statistischen Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test für nicht parametrische Modelle (Tabelle 8) konnte keine signifikant veränderte Expression der MicroRNA *hsa-miR-605* zwischen den jeweiligen Tumorgruppen und dem nicht-

neoplastisch veränderten Kontrollgewebe nachgewiesen werden. Im Vergleich der Tumorentitäten untereinander zeigte sich lediglich eine signifikant erniedrigte Expression der MicroRNA *hsa-miR-605* in pGBIV im Vergleich zu sGBIV. Zusammenfassend konnten keine signifikant unterschiedlichen Expressionslevel der *hsa-miR-605* zwischen den Tumorproben und dem Normalhirngewebe nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für *hsa-miR-605* zwischen ausgewählten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test.

	<i>p</i> -Wert		<i>p</i> -Wert
AII vs. NB	ns	AII vs. AAIII	ns
AAIII vs. NB	ns	AII vs. pGBIV	ns
sGBIV vs. NB	ns	AII vs. sGBIV	ns
pGBIV vs. NB	ns	AAIII vs. pGBIV	ns
pGBIV vs. sGBIV	*	AAIII vs. sGBIV	ns

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; ns, nicht signifikant.

Als Konsequenz der fehlenden Expressionsunterschiede im Vergleich zu den Normalgewebeproben wurde die MicroRNA *hsa-miR-605* als nicht relevant im Sinne der eigenen Fragestellung eingestuft und in den folgenden Experimenten nicht weiter berücksichtigt.

3.1.3 Expressionsanalyse der MicroRNA *hsa-miR-146b*

Ein interessanter Tumorsuppressorkandidat ist die MicroRNA *hsa-miR-146b*. Sie wurde in allen 64 Tumorproben und neun Normalhirnproben exprimiert (Abb. 12A) und zeigte ein signifikant unterschiedliches Expressionsprofil zwischen den jeweiligen Tumorentitäten und der Kontrollgruppe (Tabelle 9, Abb. 12B).

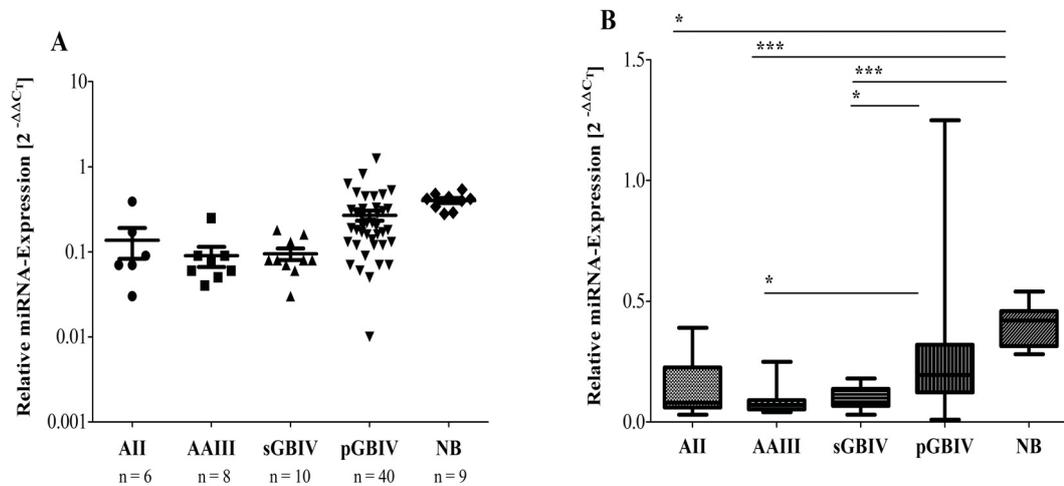


Abbildung 12: Expression der MicroRNA *hsa-miR-146b* in astrozytären Tumoren (AII, AAIII, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB), relativ zur Referenz HU. **(A)** Verteilung der miRNA-Expression in den einzelnen Tumoren und Normalgewebsproben. Schwarzer Querbalken – mittlere Expression, schwarzer Längsbalken – Standardabweichung. **(B)** Der Box-Plot zeigt den Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und –minimum der normierten Expressionswerte für die MicroRNA *hsa-miR-146b*. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Im Vergleich zu den nicht-neoplastisch veränderten Gehirnproben wiesen alle Tumorentitäten, mit Ausnahme der pGBIV, ein signifikant erniedrigtes mittleres Expressionslevel für die MicroRNA *hsa-miR-146b* auf. Hierbei imponierten AAIII und sGBIV mit der deutlichsten Abweichung gegenüber der Kontrollgruppe (Tabelle 9, Abb. 12). Eine signifikant erniedrigte Expression der MicroRNA *hsa-miR-146b* zeigte sich ebenfalls zwischen sGBIV und pGBIV ($p < 0,05$; Tabelle 9) sowie zwischen AAIII und pGBIV ($p < 0,05$; Tabelle 9).

Tabelle 9: Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für *hsa-miR-146b* zwischen den untersuchten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test.

	<i>p</i> -Wert		<i>p</i> -Wert
AII vs. NB	*	AII vs. AAI	ns
AAI vs. NB	***	AII vs. pGBIV	ns
sGBIV vs. NB	***	AII vs. sGBIV	ns
pGBIV vs. NB	ns	AAI vs. pGBIV	*
pGBIV vs. sGBIV	*	AAI vs. sGBIV	ns

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant.

Aufgrund des signifikant unterschiedlichen Expressionsverhaltens der jeweiligen Tumorguppen für die MicroRNA *hsa-miR-146b* im Vergleich zu den nicht-neoplastisch veränderten Hirngewebeproben wurde diese als interessanter Tumorsuppressor-kandidat für die eigene Fragestellung eingestuft und zur weiteren funktionellen Analyse ausgewählt.

3.1.4 Expressionsanalyse der MicroRNA *hsa-miR-346* und ihres Wirtsgens *GRID1*

Die MicroRNA *hsa-miR-346* ist eine intronisch gelegene MicroRNA. Sie liegt mit ihrer Nukleotidsequenz im Intron 1 des Wirtsgens *GRID1* (Abb. 13).

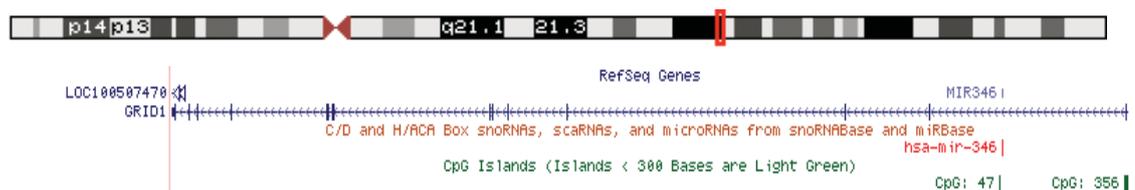


Abbildung 13: Chromosomale Lokalisation der MicroRNA *hsa-miR-346* und ihrem Wirtsgen *GRID1*. Grün markiert – CpG-Inseln; rot markiert – miRNA¹⁷².

Um ein möglicherweise analoges Expressionsverhalten der „hosting transcription unit“ und der MicroRNA nachzuweisen, erfolgte neben der Expressionsanalyse der MicroRNA *hsa-miR-346* auch die Untersuchung des Expressionsverhalten von *GRID1*.

3.1.4.1 Expressionsanalyse der MicroRNA *hsa-miR-346*

Die MicroRNA *hsa-miR-346* wurde in allen 64 untersuchten Tumorproben und in den 12 Normalgehirnproben exprimiert (Abb. 14). Während alle vier Tumorgruppen im Mittel ein niedrigeres Expressionsniveau als die Normalhirnproben aufwiesen, war dies jedoch lediglich für die Gruppe der primären Glioblastome (pGBIV) im Rahmen der Varianz statistisch signifikant ($p < 0,001$; Tabelle 10, Abb. 14).

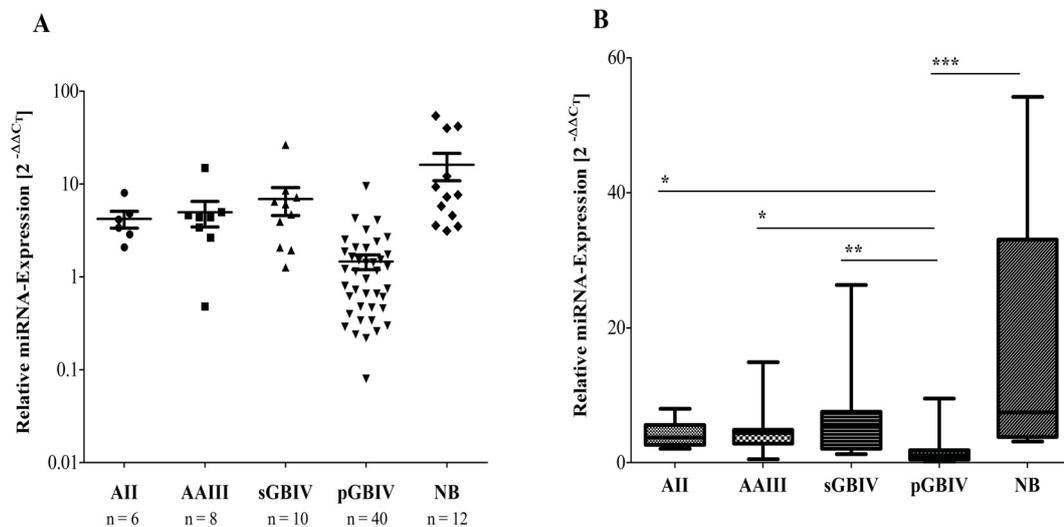


Abbildung 14: Expression der MicroRNA *hsa-miR-346* in astrozytären Tumoren (AII, AAIII, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB), relativ zur Referenz HU. **(A)** Verteilung der miRNA-Expression in den einzelnen Tumoren und Normalgewebeproben. Schwarzer Querbalken – mittlere Expression, schwarzer Längsbalken – Standardabweichung. **(B)** Der Box-Plot zeigt den Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und –minimum der normierten Expressionswerte für die MicroRNA *hsa-miR-346*. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Die Abb. 14 zeigt deutlich die unterschiedlichen Expressionsniveaus der jeweiligen Tumorgruppen im Überblick. Augenfällig ist hier die signifikant erniedrigte Expression von *hsa-miR-346* in pGBIV im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen. Die *hsa-miR-346* zeigte signifikante Expressionsunterschiede zwischen AII und pGBIV ($p < 0,05$) sowie zwischen sGBIV und pGBIV ($p < 0,01$; Tabelle 10, Abb. 14). Im Vergleich zu den Normalhirnproben war die Expression von *hsa-miR-346* in pGBIV deutlich erniedrigt ($p < 0,001$; Tabelle 10; Abb. 14).

Tabelle 10: Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für *hsa-miR-346* zwischen den untersuchten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test.

	<i>p</i> -Wert		<i>p</i> -Wert
AII vs. NB	ns	AII vs. AAI	ns
AAI vs. NB	ns	AII vs. pGBIV	*
sGBIV vs. NB	ns	AII vs. sGBIV	ns
pGBIV vs. NB	***	AAI vs. pGBIV	*
pGBIV vs. sGBIV	**	AAI vs. sGBIV	ns

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant.

Aufgrund der deutlich verminderten Expression von *hsa-miR-346* in primären Glioblastomen im Vergleich zu den nicht-neoplastisch veränderten Hirnproben wurde diese miRNA als ein möglicher Tumorsuppressorkandidat kategorisiert und weiteren epigenetischen und funktionellen Untersuchungen zugeführt.

3.1.4.2 Expressionsanalyse von *GRID1*

Wie *hsa-miR-346* wurde auch *GRID1* in allen untersuchten Tumorkollektiven und den Normalgewebeproben exprimiert. Innerhalb der Tumorgruppen zeigte sich eine mit dem WHO-Grad assoziierte Minderung der Expression von *GRID1*. AII wiesen hierbei die höchste relative Genexpression mit einem Wert von $283,8 \pm 89,4$ auf, während pGBIV mit einem Wert von $115,5 \pm 67,6$ das niedrigste Expressionsniveau zeigten. AAI und sGBIV nahmen in dieser Reihung die beiden mittleren Positionen ein, mit einer relativen *GRID1* Expression von $262,1 \pm 158,8$ bzw. $131,9 \pm 82,2$. In den Normalhirnproben lag das relative Expressionslevel von *GRID1* mRNA bei $200,1 \pm 83,1$ (Abb. 15).

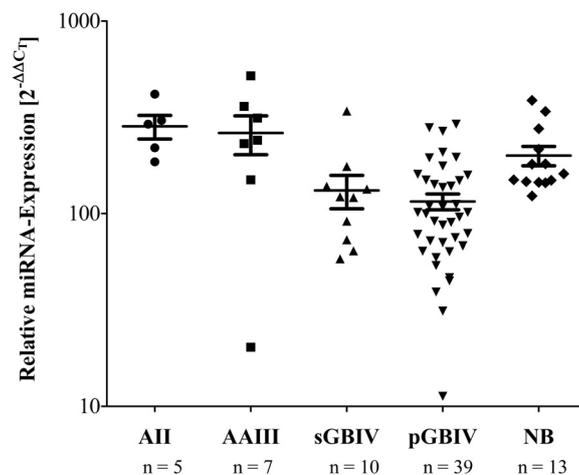


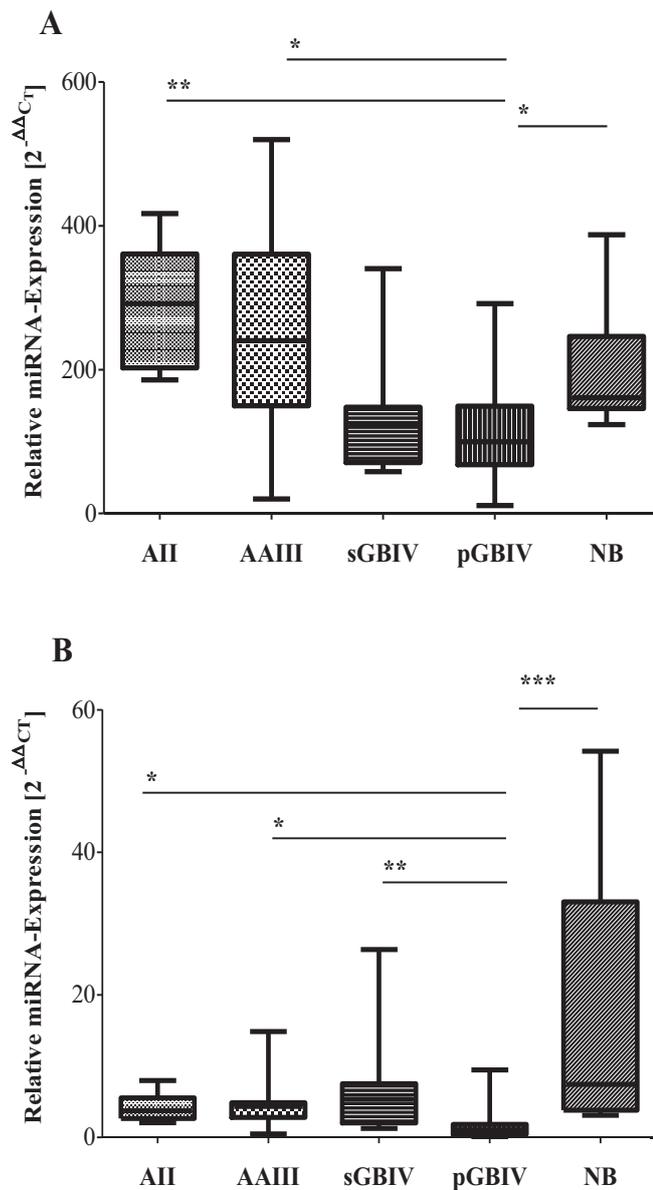
Abbildung 15: Expression des Gens *GRID1* in astrozytären Tumoren (AII, AIII, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Hirngewebe (NB). Verteilung der Gen-Expression in den einzelnen Tumoren und Normalgewebeproben, relativ zur Referenz HU. Schwarzer Querbalken – mittlere Expression, schwarzer Längsbalken – Standardabweichung.

Im Vergleich zu nicht-neoplastisch verändertem Hirngewebe wiesen die pGBIV eine signifikant erniedrigte Expression für *GRID1* auf ($p < 0,05$; Tabelle 11). In den anderen Tumorentitäten entsprach das Expressionsverhalten von *GRID1* im Rahmen der statistischen Varianzen dem der Kontrollgruppe (Tabelle 11). Im Vergleich der Tumorentitäten untereinander imponierten die Expressionsprofile ähnlich denen, die bereits bei der MicroRNA *hsa-miR-346* beobachtet wurden, d.h. es fand sich ein signifikant erniedrigtes Expressionsniveau in der Gruppe der pGBIV für *GRID1* im Vergleich zu den AII bzw. AIII ($p < 0,01$ respektive $p < 0,05$; Tabelle 11).

Tabelle 11: Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für *GRID1* zwischen den untersuchten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test.

	<i>p</i> -Wert		<i>p</i> -Wert
AII vs. NB	ns	AII vs. AAIH	ns
AAIH vs. NB	ns	AII vs. pGBIV	**
sGBIV vs. NB	ns	AII vs. sGBIV	ns
pGBIV vs. NB	*	AAIH vs. pGBIV	*
pGBIV vs. sGBIV	ns	AAIH vs. sGBIV	ns

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, nicht signifikant.



Besonders beeindruckend wird die Analogie der beiden Expressionsprofile im Vergleich der Box-Plot Diagramme (Abb. 16). *GRID1* und *hsa-miR-346* zeigten die niedrigste Expression in der Gruppe der pGBIV. Diese wiesen für beide Gene sowohl eine signifikant erniedrigte Expression gegenüber der Kontrollgruppe auf, als auch im Vergleich der Tumorguppen untereinander. So demonstrierte die Gruppe der pGBIV ein signifikant erniedrigtes Expressionsverhalten für *GRID1* als auch *hsa-miR-346* im Vergleich zu den AII und AIII Gruppen.

Abbildung 16: Die Box-Plots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und –minimum der normalisierten relativen Expressionswerte für das Gen *GRID1* (A) und die *hsa-miR-346* (B), bezogen auf die Referenz HU. * markiert signifikante Expressionsunterschiede. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

3.1.5 Expressionsanalyse der MicroRNA *hsa-miR-107* und ihres Wirtsgens *PANK1*

Wie bei der MicroRNA *hsa-miR-346* handelt es sich bei *hsa-miR-107* um eine intronisch gelegene MicroRNA, die in einer Intronregion des Gens für *PANK1* liegt (Abb. 17). Um eine etwaige gleichgeschaltete Expressionsminderung von MicroRNA und Wirtsgen nachzuweisen, erfolgte auch hier die Expressionsanalyse in den Tumorproben und den Normalgewebeproben sowohl für *hsa-miR-107* als auch für *PANK1*.

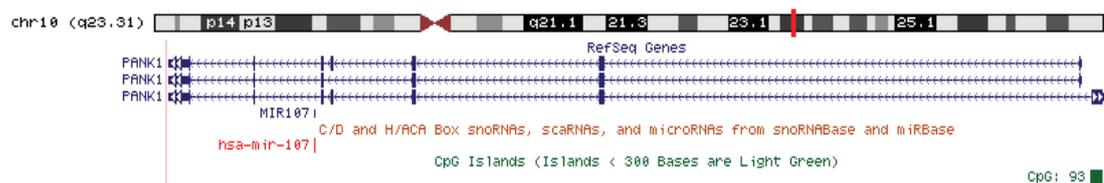


Abbildung 17: Chromosomale Lokalisation der MicroRNA *hsa-miR-107* und ihres Wirtsgens *PANK1*. Grün markiert – CpG-Inseln; rot markiert – miRNA¹⁷³.

3.1.5.1 Expressionsanalyse der MicroRNA *hsa-miR-107*

Wie die vorher beschriebenen MicroRNAs wurde auch die MicroRNA *hsa-miR-107* in allen Tumorproben sowie den Kontrollen exprimiert (Abb. 18). Zwischen den jeweiligen Tumorgruppen zeigte sich eine deutlich unterschiedliche Expression. Während die *hsa-miR-107* Level im Mittel in allen untersuchten Tumorgruppen unterhalb des Mittelwertes in den nicht-neoplastisch veränderten Gewebeproben ($1,51 \pm 0,87$) lagen, wiesen AII (Mittelwert: $0,28 \pm 0,10$), AAI (Mittelwert: $0,19 \pm 0,08$) und pGBIV (Mittelwert: $0,22 \pm 0,18$) das niedrigste Expressionsniveau

auf, während sGBIV mit einem mittleren Expressionslevel von $0,55 \pm 0,23$ am ehesten an das Niveau der Kontrollgruppe heran reichte (Abb. 18A).

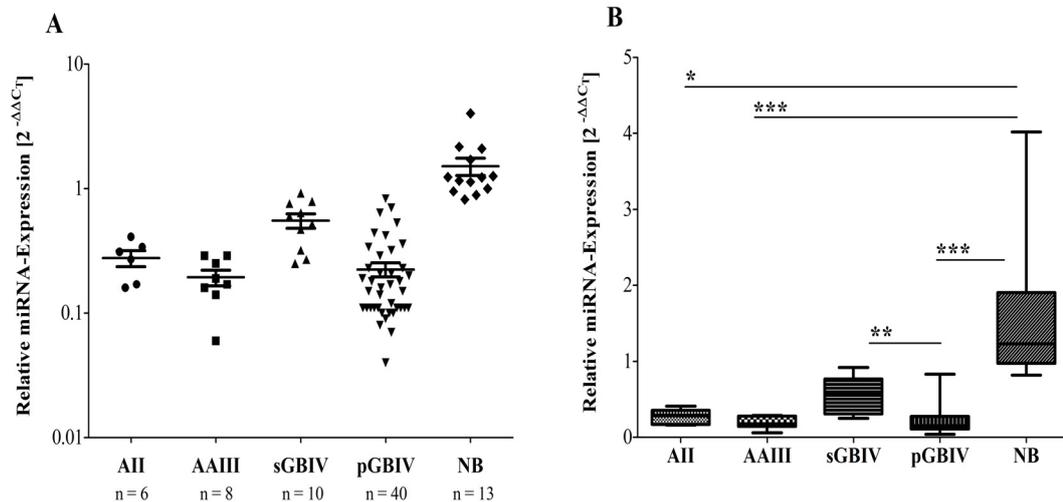


Abbildung 18: Expression der MicroRNA *hsa-miR-107* in astrozytären Tumoren (AII, AAIH, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB), relativ zur Referenz HU. **(A)** Verteilung der miRNA-Expression in den einzelnen Tumoren und Normalgewebeproben. Schwarzer Querbalken – mittlere Expression, schwarzer Längsbalken – Standardabweichung. **(B)** Der Box Plot zeigt den Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und –minimum der normalisierten Expressionswerte für die MicroRNA *hsa-miR-107*. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

In der statistischen Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test ergab sich eine signifikant erniedrigte Expression von *hsa-miR-107* in den Tumorgruppen der AII ($p < 0,05$), AAIH ($p < 0,001$) und pGBIV ($p < 0,001$) gegenüber dem nicht-neoplastisch veränderten Hirngewebe (Tabelle 12, Abb. 18B).

Im Vergleich der Tumorgruppen untereinander konnte zwischen pGBIV und sGBIV ein signifikanter Expressionsunterschied ($p < 0,01$) festgestellt werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für *hsa-miR-107* der untersuchten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test.

	<i>p</i> -Wert		<i>p</i> -Wert
AII vs. NB	*	AII vs. AAIII	ns
AAIII vs. NB	***	AII vs. pGBIV	ns
sGBIV vs. NB	ns	AII vs. sGBIV	ns
pGBIV vs. NB	***	AAIII vs. pGBIV	ns
pGBIV vs. sGBIV	**	AAIII vs. sGBIV	ns

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant.

Aufgrund ihrer statistisch signifikant erniedrigten Expression in den untersuchten astrozytären Tumoren im Vergleich zu den Normalgewebeproben wurde die MicroRNA *hsa-miR-107* als möglicher Tumorsuppressorkandidat gewertet und in epigenetischen Analysen und funktionellen Untersuchungen weitergehend charakterisiert.

3.1.5.2 Expressionsanalyse von *PANK1*

In den untersuchten Tumorgruppen zeigte *PANK1* in seiner Gesamtheit ein auffallend ähnliches Expressionsverhalten wie die MicroRNA *hsa-miR-107* (Abb. 19).

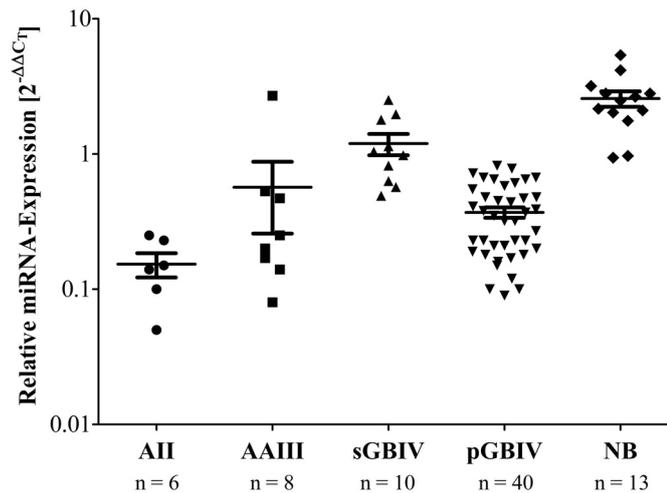


Abbildung 19: Relative Genexpression von *PANK1* in astrozytären Tumoren (AII, AAI, sGBIV, pGBIV) und in nicht-neoplastischem Gehirngewebe (NB), bezogen auf die Referenz HU. Schwarzer Querbalken – mittlere Expression, schwarzer Längsbalken – Standardabweichung.

Alle Tumorentitäten lagen bezüglich ihres mittleren Expressionslevels von *PANK1* unter dem Niveau der Kontrollgruppe. Es zeigten sich jedoch im Vergleich der Tumorgruppen deutliche Unterschiede im Expressionsverhalten. Das niedrigste Expressionsniveau wiesen AII mit einem Mittelwert von $0,15 \pm 0,08$ auf, gefolgt von pGBIV (Mittelwert: $0,37 \pm 0,21$). AAI reihen sich in der Mitte ein mit einem durchschnittlichen Expressionswert von $0,57 \pm 0,88$, während sGBIV mit einem Wert von $1,19 \pm 0,68$ der Kontrollgruppe am nächsten kamen (Mittelwert: $2,57 \pm 1,21$).

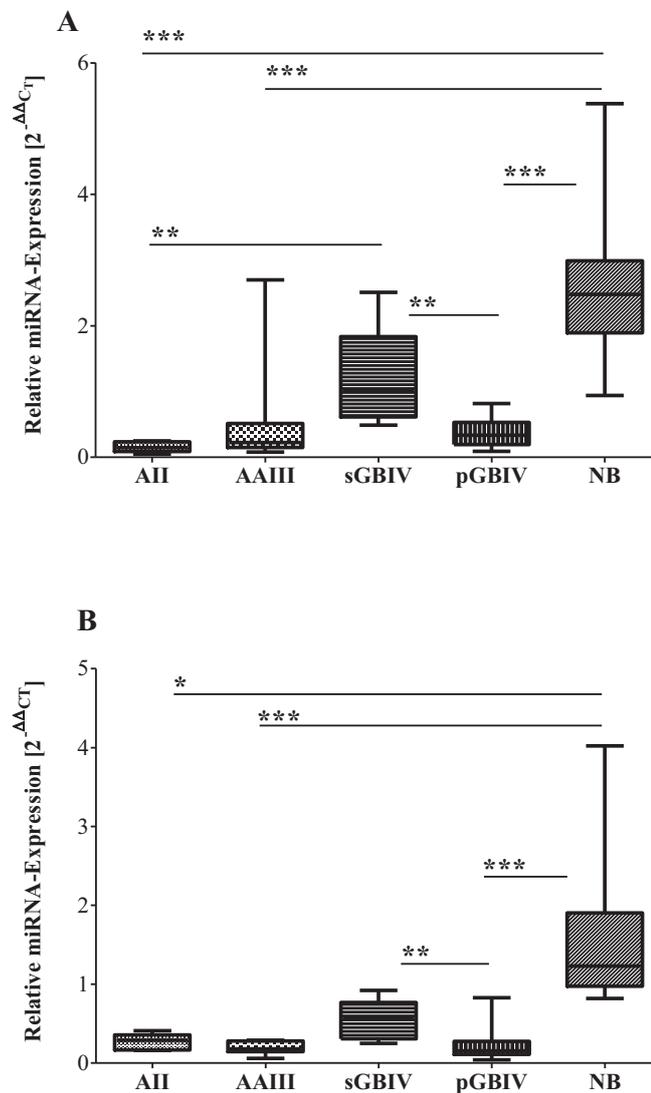
In der statistischen Auswertung der Daten auf Basis der Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test wiesen alle Tumorgruppen mit Ausnahme der sGBIV eine signifikante Expressionerniedrigung im Vergleich zu den nicht-neoplastisch veränderten

Gehirnproben auf (Tabelle 13). Im Vergleich der Tumorgruppen untereinander zeigten alle Tumorentitäten, mit Ausnahme der AAI, ein signifikant erniedrigtes Expressionsniveau gegenüber den sGBIV.

Tabelle 13: Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionsniveaus für *PANK1* zwischen ausgewählten Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Dunns Post-Test.

	<i>p</i> -Wert		<i>p</i> -Wert
AII vs. NB	***	AII vs. AIII	**
AAIII vs. NB	***	AII vs. pGBIV	ns
sGBIV vs. NB	ns	AII vs. sGBIV	ns
pGBIV vs. NB	***	AIII vs. pGBIV	ns
pGBIV vs. sGBIV	**	AIII vs. sGBIV	ns

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant.



Die Ähnlichkeit der Expressionsprofile zwischen Wirtsgen und MicroRNA wird auch hier besonders augenscheinlich, wenn man die beiden Box-Plot Darstellungen vergleicht. Sowohl für das Gen *PANK1* als auch für die MicroRNA *hsa-miR-107* zeigten AII, AAIII und pGBIV ein signifikant erniedrigtes Expressionsniveau im Vergleich zum nicht-neoplastisch veränderten Hirngewebe. Des Weiteren fand sich unter den vier Tumorgruppen das jeweils höchste Expressionsniveau für beide Gene in sGBIV.

Abbildung 20: Die Box-Plots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und –minimum der normalisierten relativen Expressionswerte für das Gen *PANK1* (**A**) und die MicroRNA *hsa-miR-107* (**B**), bezogen auf die Referenz HU. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

3.2 Methylierungsanalyse der 5'-lokalisierten CpG-Inseln von *hsa-miR-146b*, *hsa-miR-107/PANK1* und *hsa-miR-346/GRID1*

Eine wesentliche Ursache eines aberranten Genexpressionsverhaltens in Tumoren stellen epigenetische Veränderungen dar. Eine der häufigsten Modifikationen ist hierbei die Änderung des Methylierungsmusters von 5'-CpG-Inseln im Bereich der Genpromotorregionen. Um eine mögliche pathogenetische Beteiligung einer DNA-Hypermethylierung an der in den Expressionsanalysen gefundenen verminderten miRNA-Expression in astrozytären Gliomen zu untersuchen, erfolgte im Anschluss an die unter 3.1 beschriebenen Ergebnisse eine DNA-Methylierungsanalyse der jeweiligen CpG-Inseln in den 5'-Regionen der MicroRNAs *hsa-miR-346*, *-107* und *-146b* sowie der Gene *PANK1* und *GRID1*.

3.2.1 Methylierungsanalyse der 5'-lokalisierten CpG-Insel von *hsa-miR-146b*

Der Genort von *miRNA-146b* befindet sich in der chromosomalen Bande 10q24.32. 3742 Basenpaare (bp) vom 5'-Start der reifen miRNA entfernt befindet sich das 3'-Ende einer CpG-Insel mit 45 CpG-Dinukleotiden (CpG-Insel-45; Abb. 21). Sie überspannt eine genomische Länge von 543 bp. Der prozentuale Anteil von Cytosin oder Guanin in dieser Region beträgt 65,7%.



Abbildung 21: Genomische Lokalisation der MicroRNA *hsa-miR-146b* und der assoziierten 5'-CpG-reichen Region (CpG-Insel-45)¹⁷⁴.

Mittels Pyrosequenzierung von Bisulfit-modifizierter DNA wurden acht CpG-Stellen von Nukleotid 104182118 bis Nukleotid 104182413 in der CpG-Insel-45 untersucht. Die Auswertung der Methylierung an den acht untersuchten CpG-Positionen zeigte im Vergleich zu nicht-neoplastisch verändertem Hirngewebe kein signifikant erhöhtes Methylierungsniveau in den Tumoren (Abb. 22).

Fallnr.	Diagnose	CpG-Sites								Fallnr.	Diagnose	CpG-Sites							
		1	2	3	4	5	6	7	8			1	2	3	4	5	6	7	8
A151	AII	8	6	4	7	9	8	5	10	GB1020	pGBIV	11	7	3	7	7	7	6	7
A140	AII	7	7	2	8	5	6	7	5	GB963	pGBIV	2	3	2	4	2	1	3	2
A157	AII	5	6	3	5	6	7	9	5	GB954	pGBIV	20	14	6	15	15	14	13	6
A138	AII	6	7	2	7	5	5	7	5	GB967	pGBIV	6	16	6	8	9	9	5	6
A208	AII	3	3	3	5	4	6	6	4	GB956	pGBIV	9	8	3	7	7	8	11	6
A191	AII	9	4	10	12	9	12	11	8	GB652	pGBIV	15	15	19	17	29	20	13	14
										GB968	pGBIV	5	8	3	5	7	8	5	3
										GB191	pGBIV	12	10	4	13	9	9	11	8
										GB974	pGBIV	2	8	2	4	8	8	5	2
										GB986	pGBIV	9	10	5	11	5	5	8	3
AA117	AAIII	6	6	3	10	6	6	5	6	GB973	pGBIV	14	10	12	12	16	14	13	12
AA232	AAIII	6	7	6	9	10	11	8	6	GB650	pGBIV	22	19	8	23	13	14	16	15
AA236	AAIII	15	12	6	13	14	15	11	11	GB877	pGBIV	35	31	17	25	31	28	29	29
AA134	AAIII	6	5	5	7	6	9	8	5	GB955	pGBIV	19	8	19	19	14	16	11	13
AA111	AAIII	6	6	6	6	7	10	10	7	GB883	pGBIV	12	5	10	13	12	14	8	8
AA233	AAIII	6	7	3	7	6	6	7	6	GB113	pGBIV	16	8	12	23	14	22	10	15
AA1	AAIII	5	6	4	6	7	10	9	4	GB866	pGBIV	34	22	13	18	23	22	18	22
AA234	AAIII	38	28	12	15	20	18	16	18	GB962	pGBIV	23	15	17	25	17	27	14	20
										GB709	pGBIV	5	7	4	6	7	9	5	4
										GB981	pGBIV	2	8	3	4	7	8	5	2
										GB944	pGBIV	24	21	9	18	17	17	20	18
										GB964	pGBIV	5	5	2	6	4	5	6	5
										GB961	pGBIV	3	8	3	5	7	9	5	3
GB229	sGBIV	1	8	2	4	8	8	5	2	GB181	pGBIV	10	12	4	10	7	7	8	8
GB119	sGBIV	8	7	8	10	10	14	6	8	GB985	pGBIV	4	8	4	4	8	8	9	3
GB927	sGBIV	12	8	8	9	10	12	6	8	GB880	pGBIV	4	7	4	6	7	7	4	3
GB239	sGBIV	6	5	3	5	5	8	5	6	GB627	pGBIV	10	11	5	13	13	12	10	12
GB988	sGBIV	11	13	4	11	9	8	9	9	GB975	pGBIV	3	7	2	3	7	8	6	2
GB987	sGBIV	5	5	2	7	4	4	6	5	GB621	pGBIV	6	20	21	17	20	11	24	4
GB834	sGBIV	8	6	4	7	6	6	6	8	GB714	pGBIV	9	26	22	22	24	12	18	27
GB989	sGBIV	9	7	9	9	10	11	8	8	GB980	pGBIV	9	9	4	12	7	7	10	7
GB4	sGBIV	0	5	3	6	3	0	6	9	GB96	pGBIV	5	12	12	10	11	9	11	3
GB175	sGBIV	44	30	22	18	28	23	10	13	GB941	pGBIV	5	20	14	17	17	11	10	14
										GB137	pGBIV	24	17	24	22	22	13	16	18
										GB640	pGBIV	6	32	29	17	20	13	17	11
										GB970	pGBIV	8	5	6	8	9	8	3	5
										GB976	pGBIV	9	10	3	10	6	8	9	8
										GB25	pGBIV	8	8	2	11	6	6	9	4
OL	NB	28	24	7	27	18	19	24	19	GB971	pGBIV	5	17	13	15	15	11	12	
HB BD	NB	17	22	25	19	12	21	22	27	GB978	pGBIV	18	7	23	19	18	19	9	16
MethDNA	Kontrolle	90	84	90	81	85	89	83	87										

Abbildung 22: Methylierungsmuster der CpG-Insel-45 in der 5'-genomischen Region von *hsa-miR-146b*. Spalten 1-8: Prozent methylierter Allele an den acht mittels Pyrosequenzierung untersuchten CpG-Dinukleotiden. Zeilen – individuelle Tumoren. Graphische Darstellung der Ergebnisse als 4-stufige semiquantitative Graustufenskala: weiß – keine Methylierung (0-25%), hell grau – geringgradige Methylierung (26-50%), dunkel grau – moderate Methylierung (51-75%), schwarz – starke Methylierung (76-100%). OL, HB BD – nicht-neoplastisch verändertes Hirngewebe, MethDNA, *in vitro* methylierte Positivkontrolle.

Insgesamt zeigte sich in allen Tumorproben und im Normalgewebe eine inhomogene, allenfalls schwache Methylierung der untersuchten CpG-Dinukleotide. Auch beim Vergleich der einzelnen Tumorgruppen untereinander ließ sich keine differentielle Methylierung erkennen.

3.2.2 Methylierungsanalyse der potentiellen Promotorregion von *hsa-miR-107/PANK1*

In den untersuchten Gliomen wies die Expression der MicroRNA *hsa-miR-107* eine auffällige Ähnlichkeit zur Expression ihres Wirtsgens *PANK1* auf (vgl. Abschnitt 3.1.5, Abb. 20). Die Transkription intronischer MicroRNAs erfolgt häufig analog zur Transkription des Wirtsgens. Eine mögliche Erklärung der verminderten Expression von *hsa-miR-107* und *PANK1* in Gliomen wäre eine Hypermethylierung der in der Promotorregion von *PANK1* liegenden CpG-Insel-93. Diese CpG-Insel erstreckt sich über 811 bp, enthält 93 CpG-Dinukleotide und einen prozentualen Anteil von Cytosin bzw. Guanin von 71,8 %¹⁷⁵. In dieser CpG-Insel wurden acht CpG-Stellen von Nukleotid 91394401 bis Nukleotid 91394590 durch Pyrosequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA bezüglich ihrer Methylierung untersucht. Die Auswertung der Pyrosequenzierungsdaten ergab, dass sich die Methylierung in dieser CpG-Insel in den untersuchten Tumorgruppen insgesamt nicht wesentlich von derjenigen in nicht-neoplastisch veränderten Hirngewebsproben unterschied, abgesehen von einer verstärkten Methylierung zweier der acht untersuchten CpG Dinukleotide in einem Teil der Tumoren, insbesondere der pGBIV (Abb. 23).

Fallnr.	Diagnose	CpG-sites							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A151	AII	3	3	1	2	2	3	2	2
A140	AII	3	3	2	2	2	2	2	2
A157	AII	3	3	1	2	1	2	2	1
A138	AII	3	3	1	2	1	2	1	11
A208	AII	4	3	1	3	2	2	2	2
A191	AII	3	3	1	3	2	3	2	2
AA117	AAIII	3	3	1	2	1	2	2	2
AA232	AAIII	3	3	1	2	2	2	2	1
AA236	AAIII	3	3	2	2	1	2	2	1
AA134	AAIII	3	3	1	2	2	3	27	21
AA111	AAIII	3	3	3	2	2	4	24	17
AA233	AAIII	3	2	2	2	2	4	22	19
AA1	AAIII	3	2	1	2	2	1	24	20
AA234	AAIII	3	3	2	2	2	3	2	1
GB229	sGBIV	3	3	1	3	2	3	2	2
GB119	sGBIV	3	3	2	2	2	2	2	1
GB927	sGBIV	3	3	2	2	2	2	2	2
GB239	sGBIV	4	3	2	3	2	3	3	2
GB988	sGBIV	4	3	2	3	2	3	4	2
GB987	sGBIV	3	3	1	2	2	2	2	1
GB834	sGBIV	4	3	2	3	2	2	2	2
GB989	sGBIV	2	2	3	2	2	2	3	3
GB4	sGBIV	0	5	3	6	3	0	6	9
GB175	sGBIV	3	3	2	2	2	3	2	1
OL	NB	4	3	2	3	2	3	3	2
HB BD	NB	3	3	1	3	2	3	2	2
MethDNA	Kontrolle	94	95	82	94	90	89	93	96
GB1020	pGBIV	4	3	2	2	2	2	2	1
GB963	pGBIV	3	3	1	3	2	2	2	1
GB954	pGBIV	3	3	1	3	2	3	2	2
GB967	pGBIV	4	3	2	3	2	3	3	2
GB956	pGBIV	2	3	3	2	3	2	3	4
GB652	pGBIV	4	3	2	2	2	3	2	2
GB968	pGBIV	3	3	1	2	1	2	2	1
GB191	pGBIV	3	3	3	2	3	4	31	24
GB974	pGBIV	3	3	2	2	1	3	23	16
GB986	pGBIV	4	4	4	4	5	5	36	28
GB973	pGBIV	6	6	6	7	6	13	31	20
GB650	pGBIV	3	4	5	2	4	8	32	24
GB877	pGBIV	4	4	5	4	6	13	29	21
GB955	pGBIV	3	3	3	3	3	6	29	22
GB883	pGBIV	3	3	3	3	4	5	29	22
GB113	pGBIV	3	3	2	2	2	3	22	18
GB866	pGBIV	3	3	2	2	4	5	25	19
GB962	pGBIV	3	3	2	2	2	3	2	1
GB709	pGBIV	3	3	2	2	2	4	24	21
GB981	pGBIV	6	6	5	5	7	9	32	20
GB944	pGBIV	4	4	5	4	3	7	28	21
GB964	pGBIV	3	3	2	2	3	3	38	27
GB961	pGBIV	4	4	6	2	1	4	28	21
GB181	pGBIV	4	3	2	3	2	3	3	2
GB985	pGBIV	4	8	4	4	8	8	9	3
GB880	pGBIV	4	7	4	6	7	7	4	3
GB627	pGBIV	4	5	4	3	5	5	37	27
GB975	pGBIV	7	7	6	7	5	11	31	21
GB621	pGBIV	16	11	10	12	7	13	24	22
GB714	pGBIV	8	8	8	6	7	11	30	21
GB980	pGBIV	7	4	9	4	7	9	28	16
GB96	pGBIV	7	7	6	4	6	8	29	19
GB941	pGBIV	3	3	3	2	3	4	27	20
GB137	pGBIV	4	5	2	3	3	5	24	20
GB640	pGBIV	4	4	4	4	3	5	28	23
GB970	pGBIV	4	4	4	3	4	6	26	19
GB976	pGBIV	3	3	3	3	3	4	4	2
GB25	pGBIV	3	3	2	3	2	3	3	2
GB971	pGBIV	3	2	1	2	2	2	2	2
GB978	pGBIV	3	2	2	2	2	3	27	21

Abbildung 23: Methylierungsmuster der CpG-Insel-93 in der 5'-genomischen Region von *PANK1*. Spalten 1-8: Prozent methylierter Allele an den acht mittels Pyrosequenzierung untersuchten CpG-Dinukleotiden. Zeilen – individuelle Tumoren. Graphische Darstellung der Ergebnisse als 4-stufige semiquantitative Graustufenskala: weiß – keine Methylierung (0-25%), hell grau – geringgradige Methylierung (26-50%), dunkel grau – moderate Methylierung (51-75%), schwarz – starke Methylierung (76-100%). OL, HB BD – nicht-neoplastisch verändertes Hirngewebe, MethDNA, *in vitro* methylierte Positivkontrolle.

Insbesondere in der Gruppe der pGBIV fand sich ein erhöhter Prozentsatz methylierter Allele an den Positionen sieben und acht. Um diesen Befund weiter abzuklären, erfolgte eine methylierungsspezifische PCR (MSP), wobei die MSP-Primer so gelegt wurden, dass der Vorwärts-Primer 19 bp vor dem Rückwärts-Primer der Pyrosequenzierung ansetzt und der Rückwärts-Primer der MSP zusätzliche 139 bp weiter distal. Letztlich zeigte sich jedoch auch hier keine methylierungsspezifische Bande im Agarosegel, so dass eine epigenetische Veränderung im Sinne einer Hypermethylierung der CpG-Insel-93 als mögliche Ursache der signifikant reduzierten Expression von *hsa-miR-107* und *PANK1* als unwahrscheinlich anzusehen ist. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Resultaten einer PCR-Untersuchung von Franziska Liesenberg am Institut für Neuropathologie bzgl. der Änderung des Expressionsverhaltens der MicroRNA *hsa-miR-107* in Zelllinien, welche mit dem Demethylierungsagens 5-Aza-2'-Deoxycytidine (AZA) und dem Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A (TSA) vorbehandelt wurden. Hier zeigte sich keine signifikante Zunahme des Expressionsniveaus in den vier Gliomzelllinien A172, TP365, T98G und U138 im Vergleich der AZA/TSA-vorbehandelten Zellen mit den nicht vorbehandelten Kontrollen. Auch ließ sich kein Unterschied in der Expression der miRNA in der Gruppe der stärker methylierten pGBIV im Vergleich zu den schwächer methylierten pGBIV nachvollziehen.

3.2.3 Methylierungsanalyse der potentiellen Promotorregion von *hsa-miR-346/GRID1*

Die MicroRNA *hsa-miR-346* und ihr Wirtsgen *GRID1* waren gleichermaßen in den untersuchten Tumoren im Vergleich zu normalem Hirngewebe herunterreguliert (vgl. Abschnitt 3.1.4, Abb. 16). Um eine mögliche pathogenetische Beteiligung einer Hypermethylierung CpG-reicher Bereiche in der Genregion von *GRID1* und *hsa-miR-*

346 zu untersuchen, erfolgte die Pyrosequenzierung zweier dort lokalisierter CpG-Inseln nach Vorbehandlung der DNA mit Natriumbisulfit. Die CpG-Insel-47 befindet sich intragenisch in der chromosomalen Bande 10q23.2 und liegt am 3'-Ende der MicroRNA *hsa-miR-346*. Die CpG-Insel-356 befindet sich ebenfalls auf der chromosomalen Bande 10q23.2, am 5'-Start von *GRID1*.

3.2.3.1 Methylierungsanalyse der CpG-Insel-47 im 3'-Bereich von *hsa-miR-346*

Die CpG-Insel-47 hat eine genomische Größe von 639 bp und enthält 47 CpG-Dinukleotide. Der prozentuale Anteil von Cytosin und Guanin beträgt 59,5 %¹⁷⁶. Die durch die Pyrosequenzierung erhobenen Methylierungsdaten an neun CpG-Stellen von Nukleotid 88012979 bis Nukleotid 88013249 zeigten eine deutlich verstärkte Methylierung in den untersuchten Tumorproben (Abb. 24). In allen vier Tumorgruppen fand sich ein erhöhter Prozentsatz methylierter Allele im Vergleich zu nicht-neoplastisch verändertem Hirngewebe, wobei sich die Unterschiede für pGBIV als statistisch signifikant erwiesen (Tabelle 14).

Fallnr.	Diagnose	CpG-Sites								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A151	AII	67	67	70	68	58	61	64	58	63
A140	AII	40	44	46	40	35	49	45	36	45
A157	AII	25	31	32	25	24	38	30	24	31
A138	AII	14	12	20	19	14	23	20	17	20
A208	AII	6	6	11	11	7	14	10	9	12
A191	AII	2	3	7	4	4	9	6	5	6
AA117	AAIII	60	60	61	63	53	56	56	51	57
AA232	AAIII	41	41	44	40	36	43	44	38	42
AA236	AAIII	9	8	42	46	20	73	57	32	61
AA134	AAIII	10	10	17	12	10	20	17	12	16
AA111	AAIII	7	8	14	10	8	15	13	9	12
AA233	AAIII	4	7	9	8	7	13	10	9	11
AA1	AAIII	5	6	9	8	7	12	9	7	10
AA234	AAIII	6	7	7	9	6	7	7	6	10
GB229	sGBIV	58	57	60	59	46	60	60	52	64
GB119	sGBIV	65	45	76	70	39	45	41	37	47
GB927	sGBIV	25	29	53	34	26	52	50	42	52
GB239	sGBIV	30	28	40	33	28	41	36	29	35
GB988	sGBIV	20	22	34	30	20	37	32	21	29
GB987	sGBIV	14	13	21	12	12	27	21	14	19
GB834	sGBIV	9	11	19	11	9	26	18	15	20
GB989	sGBIV	8	7	12	14	9	15	13	10	15
GB4	sGBIV	6	7	11	9	8	13	9	7	12
GB175	sGBIV	3	5	10	6	7	9	9	7	10
OL	NB	18	20	25	22	17	24	22	20	24
HB BD	NB	20	21	24	19	19	23	20	20	23
MethDNA	Kontrolle	97	98	95	97	82	85	87	95	96
GB970	pGBIV	77	76	81	87	66	73	72	70	85
GB137	pGBIV	77	78	75	77	72	75	78	81	72
GB978	pGBIV	79	78	79	84	61	76	79	68	71
GB1020	pGBIV	70	70	83	84	61	76	77	67	75
GB980	pGBIV	81	84	70	83	51	62	57	83	76
GB963	pGBIV	79	79	80	79	62	67	70	60	69
GB954	pGBIV	70	71	79	82	63	65	59	69	82
GB967	pGBIV	71	71	76	75	64	71	71	61	66
GB956	pGBIV	60	65	76	79	56	64	68	56	70
GB652	pGBIV	76	76	81	51	40	70	68	57	67
GB968	pGBIV	70	68	76	67	51	63	63	55	62
GB941	pGBIV	63	65	66	62	55	59	63	62	73
GB191	pGBIV	64	66	64	61	55	59	63	53	62
GB974	pGBIV	58	56	64	63	50	58	55	50	72
GB96	pGBIV	48	49	60	59	71	59	57	68	53
GB986	pGBIV	61	64	68	60	47	58	55	47	60
GB973	pGBIV	48	49	60	59	71	59	57	59	53
GB971	pGBIV	65	59	47	62	58	47	54	66	55
GB650	pGBIV	58	55	66	59	46	59	57	49	58
GB877	pGBIV	54	58	56	59	46	56	54	48	54
GB955	pGBIV	61	60	40	66	56	62	64	31	42
GB883	pGBIV	54	56	60	63	46	46	53	41	56
GB113	pGBIV	56	57	59	47	35	57	57	41	54
GB866	pGBIV	44	48	56	58	39	62	52	44	55
GB976	pGBIV	44	41	56	55	45	52	53	42	52
GB962	pGBIV	50	48	56	47	35	51	50	38	52
GB709	pGBIV	47	45	51	47	37	52	48	41	45
GB981	pGBIV	47	46	49	50	37	51	46	40	45
GB640	pGBIV	42	40	45	45	35	48	45	44	50
GB944	pGBIV	44	42	49	44	34	46	44	36	44
GB964	pGBIV	41	41	43	46	33	44	41	37	45
GB961	pGBIV	27	23	43	33	27	36	36	27	44
GB181	pGBIV	22	25	29	25	16	30	26	24	27
GB985	pGBIV	22	18	28	23	18	27	25	19	24
GB880	pGBIV	19	17	25	25	21	25	24	20	24
GB25	pGBIV	19	21	26	23	18	25	23	19	26
GB627	pGBIV	17	12	23	16	16	28	21	20	21
GB975	pGBIV	13	12	23	20	16	24	17	15	18
GB621	pGBIV	14	15	23	17	14	24	19	13	19
GB714	pGBIV	11	11	20	14	11	24	20	18	21

Abbildung 24: Methylierungsmuster der CpG-Insel-47 im Intron 1 von *GRID1* bzw. 3'-Bereich von *hsa-miR-346*. Spalten 1-9: Prozent methylierter Allele an den neun mittels Pyrosequenzierung untersuchten CpG-Dinukleotiden. Zeilen – individuelle Tumoren. Graphische Darstellung der Ergebnisse als 4-stufige semiquantitative Graustufenskala: weiß – keine Methylierung (0-25%), hell grau – geringgradige Methylierung (26-50%), dunkel grau – moderate Methylierung (51-75%), schwarz – starke Methylierung (76-100%). OL, HB BD – nicht-neoplastisch verändertes Hirngewebe, MethDNA, *in vitro* methylierte Positivkontrolle.

Vergleicht man die Tumorgruppen untereinander, zeigt die Gruppe der pGBIV den höchsten Anteil an Tumoren mit verstärkter DNA-Methylierung, während in den AII, AAIII und sGBIV Gruppen nur ein geringerer Anteil von Tumoren gefunden wurde, die eine im Vergleich zum Normalgewebe stärkere Methylierung aufwiesen.

Tabelle 14: Darstellung der mittleren Methylierungsrate (in % methylierter Allele) und der Standardabweichung sowie der statistischen Signifikanz des Methylierungsniveaus für die CpG-Insel-47 zwischen ausgewählten Gruppen mittels T-Test.

	mittlere Methylierungsfrequenz in %		<i>p</i> -Wert
AII	28±20	AII vs. NB	ns
AAIII	23±18	AAIII vs. NB	ns
sGBIV	27±17	sGBIV vs. NB	ns
pGBIV	51±18	pGBIV vs. NB	***
NB	21±1		

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant.

Diese Ergebnisse stehen in Analogie zum Expressionsprofil der MicroRNA *hsa-miR-346* und des Gens *GRID1*. Bei beiden zeigte sich eine Minderung der Expression in astrozytären Gliomen, mit der stärksten Ausprägung in der Gruppe der pGBIV.

3.2.3.2 Methylierungsanalyse der CpG-Insel-356 in der 5'-Region von *GRID1*

Die CpG-Insel-356 ist 4440 bp groß und enthält 356 CpG-Dinukleotide. Ihr prozentualer Anteil von Cytosin bzw. Guanin beträgt 61,7 %¹⁷⁷. Es wurden zwei Primerpaare (CpG-Insel-356.1 und CpG-Insel-356.2) eingesetzt, um die Region um den Start der mRNA-Sequenz von *GRID1* zu untersuchen.

3.2.3.2.1 Methylierungsanalyse der CpG-Insel-356.1

Die Auswertung der Pyrosequenzierungsdaten von acht CpG-Stellen innerhalb der CpG-Insel-356 (Nukleotid 88116879 bis Nukleotid 88117204) erbrachte in den Tumoren ein unauffälliges Methylierungsprofil (Abb. 26). Keine der Tumorgruppen zeigte eine relevante Erhöhung der Methylierungsfrequenz im Vergleich zu nicht-neoplastisch veränderten Kontrollproben. Auch der Vergleich der jeweiligen Tumorgruppen untereinander erbrachte keine gruppenspezifische Zunahme der Methylierung. Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu PCR-Ergebnissen, welche eine deutliche Zunahme der Expression von *GRID1* in mit AZA und TSA vorbehandelten Zelllinien gezeigt hat. So stieg das relative Expressionslevel in den Zelllinien T98G und U138 nach AZA/TSA-Behandlung in Relation zur unbehandelten Kontrolle um den Faktor 14-15 bzw. 16-18 an, jeweils abhängig von der entsprechenden Behandlung (Abb. 25).

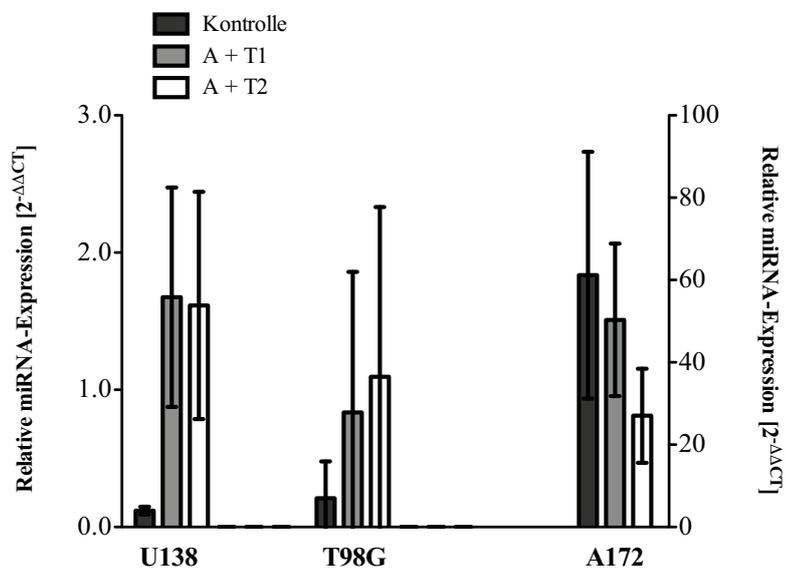


Abbildung 25: Relative mRNA-Expression von *GRID1* in AZA/TSA-behandelten Gliomzelllinien (A+T1, A+T2) sowie in nicht behandelten Kontrollzellen (Co.), bezogen auf die Referenz HU.

Zur Klärung dieser diskrepanten Ergebnisse erfolgte die weitergehende Evaluation der CpG-Insel-365 durch die Sequenzierung eines zweiten Bereichs (Fragment 365.2).

Fallnr.	Diagnose	CpG-Sites							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A151	AII	2	2	3	1	2	4	2	3
A140	AII	3	3	3	2	4	3	3	1
A157	AII	0	10	5	3	7	0	6	0
A138	AII	0	0	2	2	2	0	5	0
A208	AII	0	0	3	2	0	0	4	4
A191	AII	2	1	2	1	2	2	2	3
AA117	AAIII	4	3	4	2	3	0	3	5
AA232	AAIII	2	0	4	2	0	5	0	6
AA236	AAIII	4	0	0	0	4	0	0	0
AA134	AAIII	0	0	0	2	4	8	0	0
AA111	AAIII	5	4	4	2	3	2	3	6
AA233	AAIII	6	5	5	2	3	3	4	6
AA1	AAIII	6	4	4	2	3	2	3	6
AA234	AAIII	5	3	4	2	2	2	3	5
GB229	sGBIV	3	2	4	1	3	4	5	2
GB119	sGBIV	4	3	4	2	2	1	3	6
GB927	sGBIV	0	0	3	2	0	0	0	4
GB239	sGBIV	3	0	0	1	6	5	4	8
GB988	sGBIV	3	3	5	1	4	5	2	5
GB987	sGBIV	0	0	6	3	7	0	0	7
GB834	sGBIV	2	2	2	1	2	1	2	3
GB989	sGBIV	0	9	6	1	5	14	6	9
GB4	sGBIV	7	0	0	1	3	0	5	9
GB175	sGBIV	22	23	31	6	35	12	7	8
OL	NB	3	2	2	1	2	1	1	3
HB BD	NB	2	2	2	2	3	1	2	2
MethDNA	Kontrolle	97	98	95	97	82	85	87	95
GB1020	pGBIV	20	11	34	6	31	4	5	7
GB963	pGBIV	4	3	3	2	3	2	2	5
GB954	pGBIV	2	1	2	1	1	2	2	2
GB967	pGBIV	4	3	4	2	3	2	3	6
GB956	pGBIV	6	4	4	2	3	2	3	6
GB652	pGBIV	6	3	3	2	2	2	2	5
GB968	pGBIV	1	2	3	3	3	3	3	3
GB191	pGBIV	3	2	2	1	2	4	2	1
GB974	pGBIV	2	2	2	1	2	0	2	4
GB986	pGBIV	0	0	4	3	7	11	11	0
GB973	pGBIV	2	1	2	1	1	1	2	2
GB650	pGBIV	4	2	3	2	2	2	2	5
GB877	pGBIV	5	3	4	2	2	1	3	5
GB955	pGBIV	2	2	2	1	22	2	2	3
GB883	pGBIV	5	3	4	2	3	2	3	6
GB113	pGBIV	3	2	3	1	2	4	3	4
GB866	pGBIV	2	1	2	1	1	1	1	4
GB962	pGBIV	0	5	3	2	3	0	3	4
GB709	pGBIV	2	2	2	1	2	2	2	3
GB981	pGBIV	4	3	3	2	2	2	3	5
GB944	pGBIV	5	3	3	2	2	1	3	6
GB964	pGBIV	3	3	3	2	2	2	2	4
GB961	pGBIV	3	2	3	2	3	4	3	4
GB181	pGBIV	4	4	3	2	4	3	3	2
GB985	pGBIV	5	4	4	2	3	2	3	6
GB880	pGBIV	6	4	4	2	3	2	3	6
GB627	pGBIV	5	3	4	2	3	1	3	5
GB975	pGBIV	5	2	3	2	2	1	2	5
GB621	pGBIV	5	3	4	2	2	2	3	6
GB714	pGBIV	2	1	2	1	1	1	1	2
GB980	pGBIV	4	3	4	2	3	2	3	6
GB96	pGBIV	3	1	2	1	2	2	2	5
GB941	pGBIV	2	4	3	2	3	4	3	4
GB137	pGBIV	2	2	3	3	3	2	4	4
GB640	pGBIV	2	1	4	3	1	1	3	3
GB970	pGBIV	3	2	3	2	3	2	2	4
GB976	pGBIV	3	4	2	1	2	1	4	2
GB25	pGBIV	2	2	2	3	2	3	3	3
GB971	pGBIV	2	4	3	2	4	4	3	3
GB978	pGBIV	2	2	3	3	2	1	1	2

Abbildung 26: Methylierungsmuster in der ersten untersuchten Region der CpG-Insel-356 in der 5'-genomischen Region von *GRID1*. Spalten 1-8: Prozent methylierter Allele an den acht mittels Pyrosequenzierung untersuchten CpG-Dinukleotiden. Zeilen – individuelle Tumoren. Graphische Darstellung der Ergebnisse als 4-stufige semiquantitative Graustufenskala: weiß – keine Methylierung (0-25%), hell grau – geringgradige Methylierung (26-50%), dunkel grau – moderate Methylierung (51-75%), schwarz – starke Methylierung (76-100%). OL, HB BD – nicht-neoplastisch verändertes Hirngewebe, MethDNA, *in vitro* methylierte Positivkontrolle.

3.2.3.2.2 Methylierungsanalyse der CpG-Insel-356.2

Die Pyrosequenzierung der acht CpG-Stellen in der CpG-Insel-356 von Nukleotid 88116494 bis Nukleotid 88116139 zeigte eine ausgeprägte Zunahme der Methylierung in den Tumorproben. Der Anstieg der Methylierungsrate korrelierte mit dem WHO-Grad der Tumoren. Mit Ausnahme der AII wiesen alle Tumorgruppen eine signifikant erhöhte Methylierungsrate im Vergleich zu nicht-neoplastisch veränderten Hirngewebsproben auf. Die höchsten Methylierungswerte von durchschnittlich $48 \% \pm 33 \%$ fanden sich in pGBIV. Die nicht-neoplastisch veränderten Kontrollen zeigten eine durchschnittliche Methylierungsfrequenz von $2 \% \pm 1 \%$ (Abb. 27; Tabelle 15).

Tabelle 15: Darstellung der mittleren Methylierungsrate (in % methylierter Allele) und der Standardabweichung sowie der statistischen Signifikanz des Methylierungsniveaus für das zweite untersuchte Fragment der CpG-Insel-356 zwischen den einzelnen Gruppen mittels T-Test.

	mittlere Methylierungsfrequenz %		<i>p</i> -Wert
AII	29±33	AII vs. NB	ns
AAIII	29±26	AAIII vs. NB	*
sGBIV	14±16	sGBIV vs. NB	*
pGBIV	48±33	pGBIV vs. NB	***
NB	2±1		

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant.

Das Methylierungsprofil korreliert mit dem Expressionsprofil des Gens *GRID1*. Auch hier zeigte sich eine Abnahme der Expression mit steigendem WHO-Grad der Tumoren, mit der stärksten Methylierung in der Gruppe der pGBIV (vgl. 3.1.4.2, Abb. 15). Dasselbe gilt für die MicroRNA *hsa-miR-346*, welche ebenfalls ihr

niedrigstes Expressionsniveau in der Gruppe der pGBIV aufwies (vgl. 3.1.4.1, Abb. 14).

Fallnr.	Diagnose	CpG-Sites							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A157	AII	99	92	98	99	98	99	97	98
A191	AII	34	30	32	32	31	30	29	29
A138	AII	27	26	27	27	26	26	25	25
A151	AII	3	19	20	21	21	20	19	19
A208	AII	2	1	2	2	2	2	1	1
A140	AII	2	1	1	2	2	1	1	2
AA232	AAIII	83	78	82	83	83	83	81	81
AA236	AAIII	46	56	58	59	58	57	19	55
AA111	AAIII	35	32	34	33	34	33	32	32
AA233	AAIII	34	32	33	33	33	32	31	31
AA1	AAIII	30	31	33	31	31	32	32	32
AA134	AAIII	2	1	1	1	2	6	1	1
AA117	AAIII	2	1	1	2	3	2	1	2
AA234	AAIII	2	1	1	1	2	1	1	1
GB987	sGBIV	60	54	59	59	60	58	57	58
GB927	sGBIV	4	22	22	23	25	23	22	22
GB989	sGBIV	19	17	18	18	18	17	16	16
GB119	sGBIV	71	16	7	8	7	11	5	7
GB834	sGBIV	24	10	10	10	10	11	12	11
GB239	sGBIV	9	9	9	9	8	14	9	9
GB229	sGBIV	4	2	4	2	3	2	2	3
GB4	sGBIV	3	2	2	2	3	2	2	3
GB988	sGBIV	3	2	2	3	2	2	2	2
GB175	sGBIV	3	2	1	2	2	2	2	3
HB BD	NB	4	4	3	3	5	3	2	2
OL	NB	2	1	2	2	2	1	1	3
MethDNA	Kontrolle	99	93	97	97	98	97	97	92
GB980	pGBIV	98	91	97	98	98	98	96	97
GB978	pGBIV	99	89	97	97	98	97	97	96
GB971	pGBIV	95	93	95	95	94	93	97	91
GB191	pGBIV	93	87	92	93	93	93	91	91
GB709	pGBIV	92	86	91	92	92	67	90	91
GB956	pGBIV	89	83	87	89	89	88	87	87
GB880	pGBIV	89	81	87	88	89	88	86	86
GB877	pGBIV	85	80	84	84	85	84	83	83
GB961	pGBIV	3	90	94	96	96	96	95	95
GB963	pGBIV	85	78	82	84	73	83	82	82
GB883	pGBIV	80	75	79	80	80	80	78	78
GB968	pGBIV	75	70	74	75	75	75	73	73
GB627	pGBIV	74	69	73	75	74	74	73	73
GB985	pGBIV	67	56	64	68	71	69	65	65
GB640	pGBIV	67	69	64	65	68	69	70	64
GB986	pGBIV	66	62	65	64	66	65	63	64
GB964	pGBIV	60	57	60	61	61	61	59	58
GB137	pGBIV	58	56	54	57	49	54	56	49
GB976	pGBIV	45	46	46	44	45	47	44	43
GB970	pGBIV	41	43	42	46	46	44	46	44
GB975	pGBIV	46	42	44	45	44	44	41	43
GB714	pGBIV	39	38	38	38	39	38	37	37
GB1020	pGBIV	37	35	36	36	37	36	35	35
GB113	pGBIV	43	32	32	32	34	32	30	30
GB25	pGBIV	32	29	31	34	33	32	31	29
GB981	pGBIV	31	29	31	31	32	31	30	30
GB973	pGBIV	31	29	30	31	31	30	28	28
GB954	pGBIV	31	20	21	21	33	25	20	20
GB955	pGBIV	7	6	4	6	7	6	5	5
GB962	pGBIV	4	2	3	3	3	2	26	3
GB866	pGBIV	5	3	4	10	5	3	3	3
GB974	pGBIV	5	2	2	4	3	3	3	2
GB621	pGBIV	4	2	2	3	4	3	3	3
GB650	pGBIV	5	2	3	3	4	2	2	2
GB967	pGBIV	4	2	2	4	4	2	2	3
GB181	pGBIV	4	2	3	3	3	2	2	3
GB944	pGBIV	4	2	1	2	3	2	2	2
GB652	pGBIV	3	2	2	2	3	2	1	2

Abbildung 27: Methylierungsmuster im zweiten untersuchten Bereich der CpG-Insul-356 in der 5'-genomischen Region von *GRID1*. Spalten 1-8: Prozent methylierter Allele an den acht mittels Pyrosequenzierung untersuchten CpG-Dinukleotiden. Zeilen – individuelle Tumoren. Graphische Darstellung der Ergebnisse als 4-stufige semiquantitative Graustufenskala: weiß – keine Methylierung (0-25%), hell grau – geringgradige Methylierung (26-50%), dunkel grau – moderate Methylierung (51-75%), schwarz – starke Methylierung (76-100%). OL, HB BD – nicht-neoplastisch verändertes Hirngewebe, MethDNA, *in vitro* methylierte Positivkontrolle.

3.3 Funktionale Effekte einer Überexpression der MicroRNAs *hsa-miR-107*, *-146b* und *-346* in humanen Gliomzellen

Zur Feststellung miRNA-spezifischer Einflüsse auf die Vitalität, Proliferation und Apoptoserate wurden humane Gliomzellen (A172 und T98G) mit den entsprechenden precursor-miRNAs (pre-miRNA) *pre-miR-107*, *pre-miR-146b* und *pre-miR-346* transient transfiziert und die biologischen Effekte einer Überexpression der jeweiligen miRNA mit entsprechenden zellbiologischen Assays bestimmt. Die Vitalität wurde durch den CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) bestimmt, die Proliferation mit Hilfe des BrdU-basierenden Chemilumineszenz-Nachweisverfahrens (Roche) sowie das Apoptoseverhalten durch den Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7-Assay (Promega). Die Gliomzelllinien A172 und T98G wurden jeweils mit 10 nM bzw. 25 nM der entsprechenden pre-miRNA transfiziert. Als Vergleichsgruppe wurden in analoger Weise behandelte Zelllinien gewählt, welche mit der pre-miRNA miRNA Precursor-Negative Control 1 (*pre-miR-NC1*) transfiziert wurden. Jede Testreihe wurde dreimal wiederholt. 72 Stunden nach Transfektion mit *pre-miR-107*, *-146b* oder *-346* Molekülen bzw. mit den Kontrollmolekülen *pre-miR-NC1* erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität und –proliferation sowie der Caspase-3/7-Aktivität.

3.3.1 Effekte der Überexpression von *hsa-miR-107* in Gliomzelllinien

Bezüglich des Einflusses auf die Vitalität zeigte die Überexpression von *hsa-miR-107* im CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay lediglich in der Gliomzelllinie T98G für eine Konzentration von 25 nM einen signifikanten Vitalitäts-reduzierenden Effekt. Die gemessene Signalintensität sank in Relation zu den *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen auf 48 % ($p < 0,001$; Abb. 28). In der Zelllinie A172 zeigte sich

ein Vitalitäts-fördernder Effekt für den 10 nM Reaktionsansatz ($p < 0,05$; Abb. 28). Dieser Effekt bestätigte sich jedoch nicht nach Transfektion von 25 nM pre-miRNA. Hinsichtlich eines Einflusses auf die Zellproliferation ergab sich ein ähnliches Bild. Im BrdU-Assay zeigte sich in der Zelllinie T98G eine signifikante Abnahme der photometrisch gemessenen Signalintensität für den 10 nM Versuchsansatz auf 83 % des Referenzwertes ($p < 0,05$; Abb. 28; Tabelle 16). Unter allen anderen Bedingungen konnte keine relevante Signaldivergenz in Relation zu den kontrolltransfizierten Zellen nachgewiesen werden. Anders verhielt es sich bei der Untersuchung der Auswirkung einer Überexpression von *hsa-miR-107* auf die Caspase-3/7-Aktivität. Im Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7-Assay konnte für beide Konzentrationen in beiden Zelllinien eine signifikante Zunahme der Caspase-Aktivität dokumentiert werden ($p < 0,05$; Abb. 28; Tabelle 16).

Tabelle 16: Übersicht der einzelnen photometrisch bestimmten Signalemissionswerte bezogen auf die *pre-miR-NC1*-transfizierte Zellen für die Gliomzelllinien A172 und T98G nach 10 nM bzw. 25 nM Transfektion von *pre-miR-107*.

A172	<i>pre-miR-107</i> 10 nM	<i>p</i> -Wert	<i>pre-miR-107</i> 25 nM	<i>p</i> -Wert
Vitalität %	111±12	*	102±20	ns
Proliferation %	106±45	ns	97±49	ns
Apoptose %	186±83	*	198±97	*

T98G	<i>pre-miR-107</i> 10 nM	<i>p</i> -Wert	<i>pre-miR-107</i> 25 nM	<i>p</i> -Wert
Vitalität %	98±47	ns	48±17	***
Proliferation %	83±22	*	88±23	ns
Apoptose %	134±46	*	189±124	*

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant.

3.3.2 Effekte der Überexpression von *hsa-miR-146b* in Gliomzellen

Eine signifikante Reduktion der Vitalität von Gliomzellen durch Überexpression von *hsa-miR-146b* konnte im CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay nicht nachgewiesen werden. Für beide untersuchten Zelllinien zeigte sich für den 25 nM Transfektionsansatz keine Änderung des kolorimetrisch gemessenen Signalwertes, während sich für den 10 nM Versuchsaufbau sogar eine geringfügige Zunahme der Vitalität für beide Zelllinien nachweisen ließ ($p < 0,05$; Abb. 28).

Hinsichtlich der Proliferation von Gliomzellen fand sich keine antiproliferative Wirkung der Überexpression dieser miRNA in den beiden untersuchten Zelllinien. Anders verhielt es sich wiederherum in Bezug auf die Caspase-3/7-Aktivität und somit auf die Apoptose-induzierende Wirkung. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der *pre-miR-146b* mit einer gesteigerten Caspase-Aktivität einherging. So stieg die Caspase 3/7 Aktivität in der Gliomlinie A172 auf 186 % respektive 198 % in Relation zu den *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen ($p < 0,05$; Abb. 28; Ta-

belle 17). Für die Zelllinie T98G fiel der prozentuale Anteil gesteigerter Caspase-3/7-Aktivität im Verhältnis zwar kleiner aus (134 % bzw. 189 %), zeigte jedoch aufgrund der geringeren Standardabweichung sogar ein höheres Signifikanzniveau ($p < 0,001$; Abb. 28; Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht der einzelnen photometrisch bestimmten Signalemissionswerte bezogen auf die *pre-miR-NC1*-transfizierten Zellen für die Gliomzelllinien A172 und T98G nach 10 nM bzw. 25 nM Transfektion von *pre-miR-146b*.

A172	<i>pre-miR-146b</i> 10 nM	<i>p</i> -Wert	<i>pre-miR-146b</i> 25 nM	<i>p</i> -Wert
Vitalität %	115±17	*	104±16	ns
Proliferation %	123±50	ns	115±55	ns
Apoptose %	133±48	*	134±51	*

T98G	<i>pre-miR-146b</i> 10 nM	<i>p</i> -Wert	<i>pre-miR-146b</i> 25 nM	<i>p</i> -Wert
Vitalität %	144±59	*	104±41	ns
Proliferation %	94±16	ns	90±15	ns
Apoptose %	126±17	***	128±10	***

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant.

3.3.3 Effekte der Überexpression von *hsa-miR-346* in Gliomzellen

Die Überexpression von *hsa-miR-346* zeigte in der Zelllinie A172 keinerlei Veränderung der Zellvitalität im CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay in Relation zu den *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen. In der Gliomlinie T98G ergab sich sogar eine Zunahme der Signalintensität auf 173 % des Kontrollwertes bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (Abb. 28; Tabelle 18). Nach Überexpression von *hsa-miR-346* in der 10 nM Konzentration fand sich eine deutliche Reduktion der Proliferationsaktivität mit Abnahme der photometrisch gemessenen

Signalintensitäten auf 70 % bzw. 79 % des Referenzwertes ($p < 0,05$; Abb. 28; Tabelle 18). Weiterhin zeigte die *hsa-miR-346* den ausgeprägtesten proapoptischen Effekt im Vergleich der drei miRNAs untereinander. So kam es für die beiden Konzentrationen 10 nM und 25 nM in der Zelllinie A172 zu einer Zunahme der Caspase-3/7-Aktivität auf 185 % respektive 206 % des Kontrollwertes ($p < 0,001$; Tabelle 18). Für die Gliomlinie T98G ergab sich ein ähnliches Bild mit einer Steigerung der Caspasen-Aktivität auf 149 % bzw. 141 % ($p < 0,001$; Abb. 28; Tabelle 18).

Tabelle 18: Übersicht der einzelnen photometrisch bestimmten Signalemissionswerte bezogen auf die *pre-miR-NC1*-transfizierten Zellen für die Gliomzelllinien A172 und T98G nach 10 nM bzw. 25 nM Transfektion von *pre-miR-346*.

A172	<i>pre-miR-346</i> 10 nM	<i>p</i> -Wert	<i>pre-miR-346</i> 25 nM	<i>p</i> -Wert
Vitalität %	93±18	ns	87±22	ns
Proliferation %	70±33	*	80±41	ns
Apoptose %	185±61	***	206±71	***

T98G	<i>pre-miR-346</i> 10 nM	<i>p</i> -Wert	<i>pre-miR-346</i> 25 nM	<i>p</i> -Wert
Vitalität %	173±71	*	94±28	ns
Proliferation %	79±14	*	99±13	ns
Apoptose %	149±19	***	141±12	***

Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, nicht signifikant.

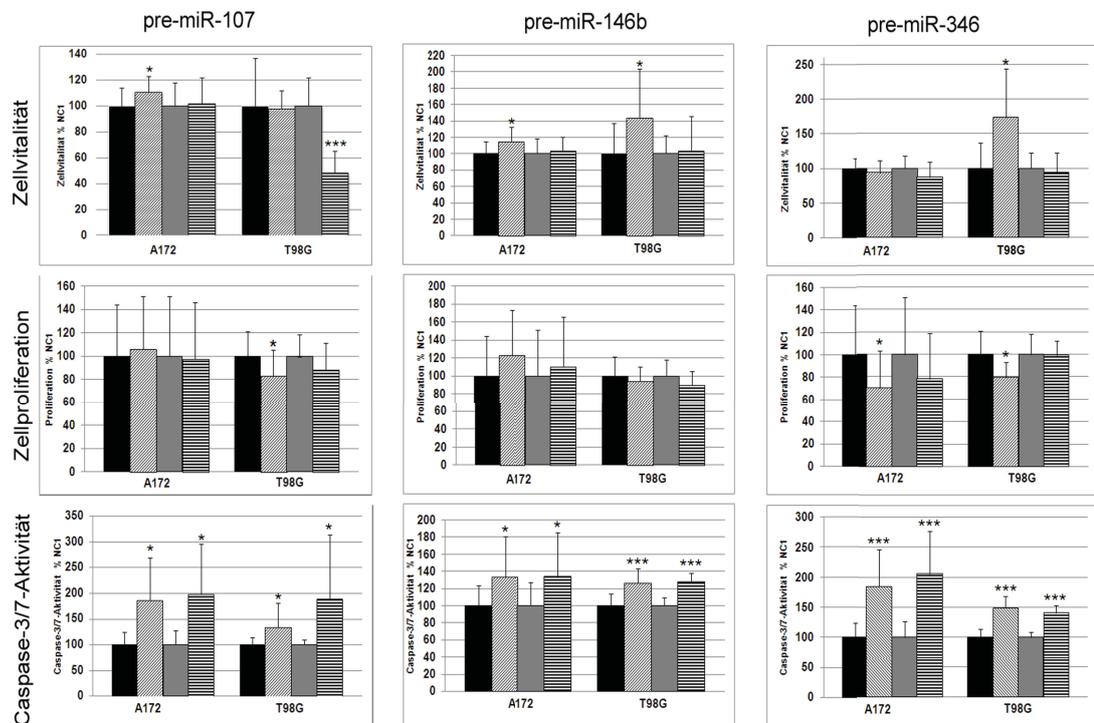


Abbildung 28: Graphische Darstellung der photometrisch gemessenen Signalstärken in den Zelllinien A172 und T98G für Vitalität, Proliferation und Apoptose nach Transfektion der Vorläufer-miRNAs *pre-miR-107*, *-146b* oder *-346* in Relation zur Kontrolltransfektion mit *pre-miR-NC1* jeweils für 10 nM bzw. 25 nM. Die jeweilige Signalintensität der *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen jeweils die mittlere Signalstärke und die entsprechende Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

3.4 Identifizierung und Validierung potentieller Zielgene der MicroRNAs *hsa-miR-107*, *-146b* und *-346*

MicroRNAs erzielen in Säugerzellen ihre Wirkung im Wesentlichen durch Reduzierung der Stabilität ihrer Ziel-mRNA und weniger durch die Hemmung der Translation. Sie destabilisieren ihre Ziel-Transkripte durch zahlreiche Mechanismen wie die Entfernung der 5'-Cap-Struktur und des 3'-poly(A)-Schwanzes oder der Unterstützung der Anlagerung von processing bodies, ohne maßgeblich die translationalen Prozesse der mRNA zu beeinflussen. Um die bisherigen Resultate der eigenen Untersuchungen, wie die Verminderung der Expression von *hsa-miR-107*, *hsa-miR-146b* und *hsa-miR-346* in Gliomen und die biologischen Effekte nach Überexpression, weiter zu beleuchten und die grundlegenden Effektormechanismen der miRNAs besser zu verstehen, erfolgte die Identifizierung und Validierung potentieller Zielgene der untersuchten miRNAs. Ausgewählt für eine genauere Untersuchung wurden solche Zielgene, die von mehreren Zielgen-Vorhersageprogrammen genannt und in Gliomen eine höhere mRNA-Expression als in nicht-neoplastischem Hirngewebe zeigten. In einem ersten Schritt wurde die Expression potentieller Zielgene mittels RT-PCR in den pre-miRNA-transfizierten Zellen bestimmt und mit der Expression in Kontroll-transfizierten Zellen verglichen. Zielgene, die eine signifikante Reduktion der Expression in den mit der entsprechenden pre-miRNA transfizierten Zellen zeigten, wurden zur Validierung in einem Luciferase-Reporter-Gen-Assay ausgewählt. Die auf mRNA-Ebene gewonnenen Ergebnisse wurden auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse validiert.

3.4.1 *CDK6* als Zielgen der miRNA *hsa-miR-107*

CDK6 wurde von drei Programmen (PicTar, TargetScan, miRBase) als potentielles Zielgen von *hsa-miR-107* vorhergesagt und zeigte in primären und sekundären Glioblastomen der sog. Glioma Core Collection des NGFN^{plus} Hirntumornetzwerkes eine signifikant erhöhte mRNA Expression im Vergleich zu normalem Hirngewebe¹⁷⁸. In der RT-PCR zeigte sich eine deutlich Abnahme der *CDK6* mRNA-Expression in den *pre-miR-107* transfizierten T98G Gliomzellen in Relation zu den Kontroll-transfizierten Zellen (NC1, Abb. 29). Das Expressionsniveau von *CDK6* reduzierte sich auf 47 % respektive 31 % des Niveaus der Kontroll-transfizierten Zellen.

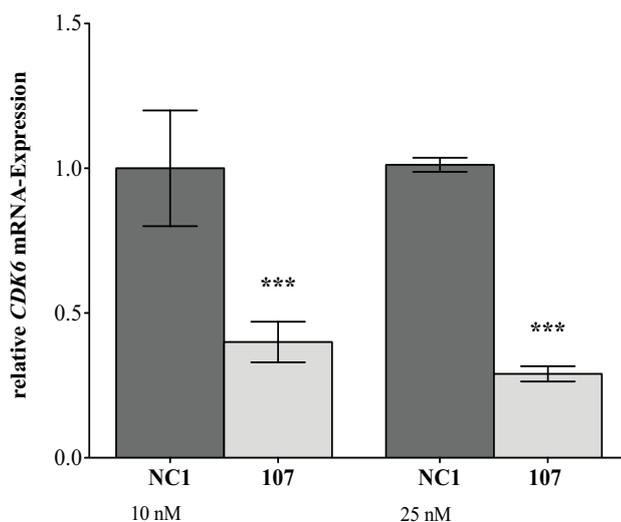


Abbildung 29: Relative *CDK6* mRNA-Expression in *pre-miR-107* (107) und *pre-NC1*-transfizierten (NC1) T98G Gliomzellen. Die Expressionsergebnisse der RT-PCR wurden in relativen Einheiten dargestellt, wobei die Durchschnittswerte der *pre-NC1*-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: ***, $p < 0,001$.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte im Anschluss die Validierung der Bindung von *hsa-miR-107* an die entsprechende Seed-Sequenz in der 3'-UTR von *CDK6* durch einen Luciferase-Reportergen-Assay. Nach Klonierung der entsprechenden 3'-UTR Sequenz von *CDK6* in den psiCHECK2-Vektor und Transfektion der Gliomzelllinie T98G zeigte sich eine signifikante Abnahme des Luciferase-Signals in den mit *pre-miR-107* Molekülen transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen. Im Mittel sank der Expressionswert auf ca. 40 % der *pre-NC1*-transfizierten Zellen ($p < 0,001$; Abb. 30).

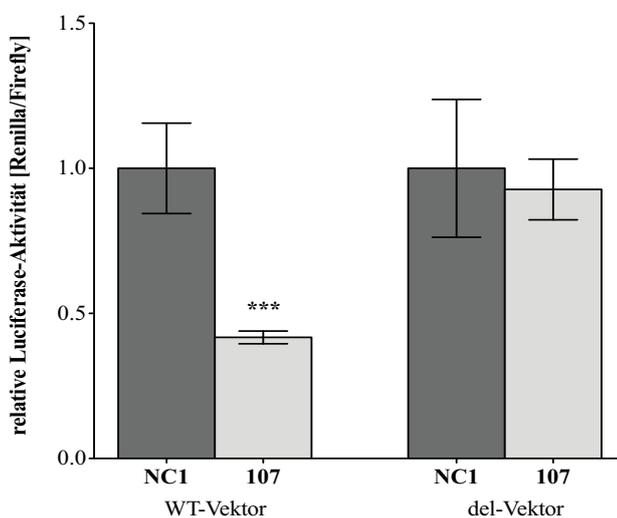


Abbildung 30: Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität eines Konstruktes mit der in der 3'-UTR von *CDK6* gelegenen *hsa-miR-107* Bindungsstelle in T98G Gliomzellen nach Transfektion mit der *pre-miR-107* (107) beziehungsweise *pre-NC1* (NC1). Die Darstellung erfolgt in arbiträren Einheiten, wobei die Durchschnittswerte der Kontroll-transfizierten Zellen gleich 100 gesetzt wurden. WT-Vektor, Vektor mit Wildtyp-Bindungsstelle für *hsa-miR-107*; del-Vektor, Vektor mit deletierter *hsa-miR-107* Bindungsstelle in der 3'-UTR von *CDK6*. Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: ***, $p < 0,001$.

Um die Spezifität der Bindung von *hsa-miR-107* an die 3'-UTR Sequenz von *CDK6* zu validieren, erfolgte ein analoger Versuchsablauf unter Verwendung des

psiCHECK2-Vektors mit deletierter *hsa-miR-107* Bindungsstelle in der 3'-UTR Sequenz von *CDK6*. Nach Transfektion der Zellen zeigte sich im Luciferase-Assay keine Abweichung des Signalwertes für die mit der *pre-miR-107* behandelten Zellen in Relation zu den Kontroll-transfizierten Zellen ($p = 0,7371$; Abb. 30). Somit konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Luciferase-Aktivität einzig auf die spezifische Interaktion der miRNA mit der Bindungsstelle in der 3'-UTR ihres Zielgens zurückzuführen sind. Um abschließend zu klären, ob der dokumentierte Effekt auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene nachzuweisen ist, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Für beide Zelllinien A172 und T98G zeigt sich bei ~37 kDa in den *pre-NC1*-transfizierten Zellen eine Bande für Cdk6, die nach Transfektion der Zellen mit der *pre-miR-107* nicht mehr nachweisbar war (Abb. 31).

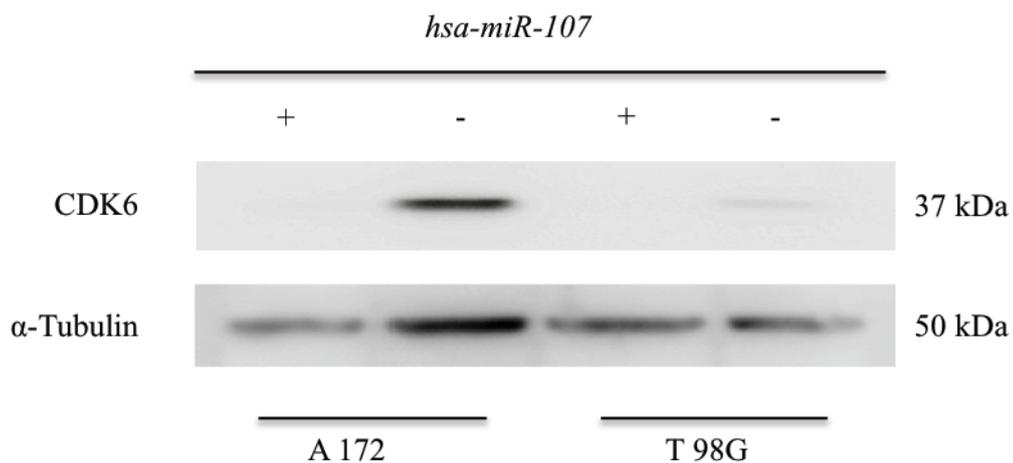


Abbildung 31: Western Blot-Analyse mit einem Cdk6-spezifischen Antikörper. + entspricht der Transfektion mit *pre-miR-107* und – mit *pre-NC1*.

3.4.2 EGFR als Zielgen der miRNA *hsa-miR-146b*

EGFR wird im Zielgen-Vorhersageprogramm miRanda als potentielles Zielgen der *miR-146b* vorhergesagt und ist häufig in primären Glioblastomen amplifiziert und überexprimiert^{6,33}. In *pre-miR-146b* transfizierten Gliomzellen der Linie T98G wurde das Expressionsverhalten von *EGFR* untersucht und mit dem in Kontroll-transfizierten Zellen korreliert. Es zeigte sich, dass die *EGFR*-Expression in *pre-miR-146b* behandelten Zellen eine signifikante Reduktion auf bis zu 25 % bzw. 37 % des Kontrollwertes abhängig von der transfizierten Menge an *pre-miR-146b* aufwies (Abb. 32).

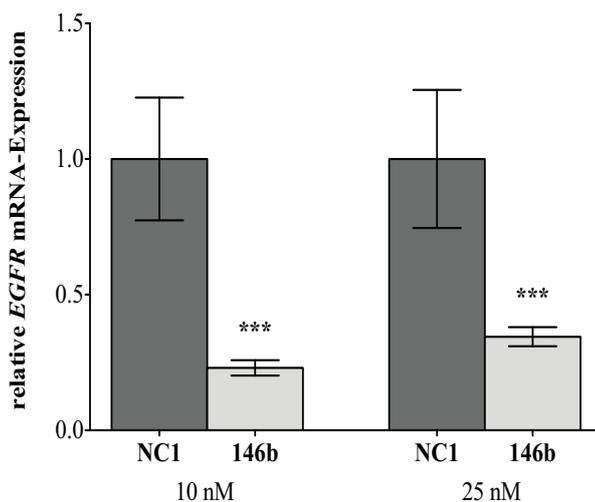


Abbildung 32: Relative *EGFR*-mRNA-Expression in *pre-miR-146b* (146b) und *pre-NC1*-transfizierten (NC1) T98G Gliomzellen. Die Expressionsergebnisse der RT-PCR wurden in relativen Einheiten dargestellt, wobei die Durchschnittswerte der *pre-NC1*-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: ***, $p < 0,001$.

Auch hier schloss sich eine weitere Validierung der erhobenen Befunde mittels Luciferase-Reportergen-Assay an. Nach Klonierung der entsprechenden 3'-UTR Sequenz

von *EGFR* mit der potentiellen Bindungsstelle von *hsa-miR-146b* in den psiCHECK2-Vektor erfolgte die Transfektion der Gliomzelllinie T98G. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme des Luciferase-Signals in den mit *pre-miR-146b* Molekülen transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen. Insgesamt zeigte sich eine Reduktion des Luciferase-Signals für die *pre-miR-146b* transfizierten Zellen in Relation zu den *pre-NC1*-transfizierten Kontrollen von ca. 38% ($p < 0,01$; Abb. 33). Bei Verwendung eines Vektors mit deletierter *hsa-miR-146b* Seed-Sequenz zeigte sich keine Abweichung der Signalemission zwischen den *pre-miR-146b* transfizierten Zellen und den Kontroll-transfizierten Zellen ($p = 0,7798$; Abb. 33). *EGFR* wird somit spezifisch durch die miRNA *hsa-miR-146b* inhibiert.

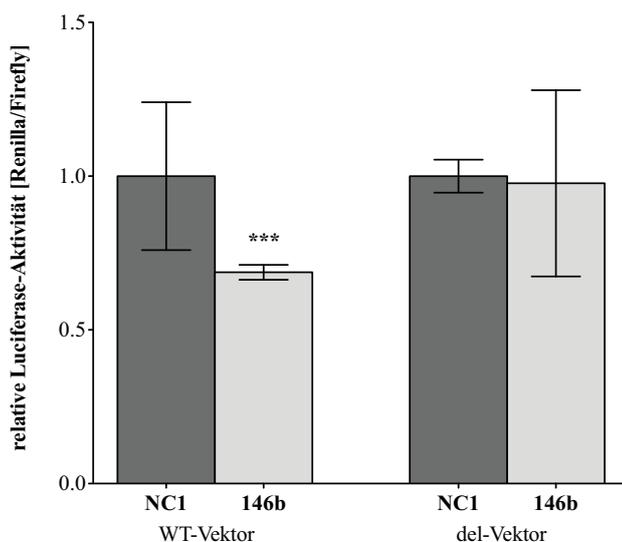


Abbildung 33: Relative Darstellung der Luciferase-Aktivität für 3'-UTR Konstrukte des *EGFR*-Transkriptes mit der *hsa-miR-146b* Bindungsstelle in T98G Gliomzellen nach Transfektion mit der *pre-miR-146b* (146b) beziehungsweise *pre-NC1* (NC1). Die Darstellung erfolgt in arbiträren Einheiten, wobei die Durchschnittswerte der Kontroll-transfizierten Zellen gleich 100 gesetzt wurden. Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: ***, $p < 0,001$.

Auf Durchführung einer Western Blot-Analyse zum Nachweis des Effektes auf Proteinebene wurde verzichtet, da Katakowski *et al.* in einer im Dezember 2010 veröffentlichten Arbeit in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen zeigen konnten, dass die miRNA *hsa-miR-146b* in der Lage ist, durch Bindung an die 3'-UTR die *EGFR*-Expression zu supprimieren¹⁷⁹.

3.4.3 *SEMA6A* und *BCL6* als Zielgene der miRNA *hsa-miR-346*

Die Auswahl potentieller Ziel-mRNAs erfolgte für die miRNA *hsa-miR-346* in analoger Weise wie für die beiden zuvor beschriebenen miRNA-Kandidaten. In der Validierung der Zielgene mittels RT-PCR zeigte sich in den *pre-miR-346* transfizierten Gliomzellen T98G eine Reduktion der Expression sowohl für *SEMA6A* als auch für *BCL6*. Hierbei sank die Expression auf 40 % respektive 70 %, bezogen auf das Expressionsniveau der kontroll-transfizierten Zellen. Für *SEMA6A* zeigte sich in beiden Konzentrationen eine signifikante Reduktion des Expressionsniveaus. Für *BCL6* kam es im zweiten Validierungslauf zu einer, im Verhältnis zu den anderen beiden Läufen, Steigerung der Expression um den Faktor 2. Dies verhinderte das Erreichen eines Signifikanzniveaus ($p = 0,0507$).

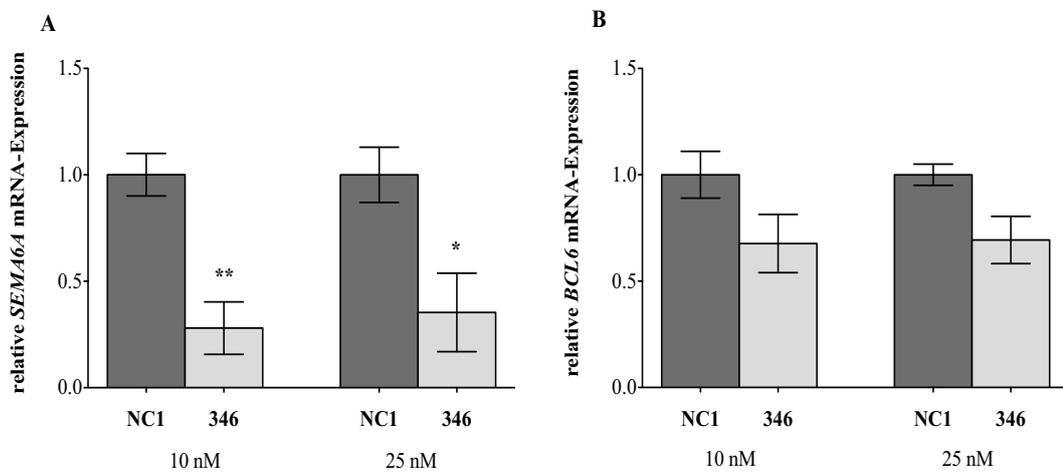


Abbildung 34: Relative mRNA-Expression von **(A)** *SEMA6A* und **(B)** *BCL6* in *pre-miR-346* (346) und *pre-NC1*-transfizierten (NC1) T98G Gliomzellen. Die Expressionsergebnisse der RT-PCR wurden in relativen Einheiten dargestellt, wobei die Durchschnittswerte der *pre-NC1*-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Aufgrund der onkologischen Relevanz und der Auswertung des ersten und dritten RT-PCR-Laufes wurde *BCL6* in den weiteren Validierungsschritten mit berücksichtigt.

Zur weiteren Überprüfung der erhobenen Ergebnisse wurde im Anschluss ein Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Nach Klonierung der entsprechenden Sequenzen in den psiCHECK2-Vektor erfolgte die Transfektion der Gliomzelllinie T98G. Nach Transfektion mittels *pre-miR-346* kam es im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen zu einer signifikanten Reduktion des Luciferase-Signals sowohl für *SEMA6A* als auch für *BCL6* (Abb. 35). Nach Transfektion kam es zu einer Reduktion des Luciferase-Signals für *SEMA6A* auf 39 % bzw. 37 % für *BCL6*. Hierbei handelt es sich jedoch lediglich um die Ergebnisse des ersten Laufes, die durch Wiederholung der entsprechenden Versuchsreihe noch weiter validiert werden

müssen. Die Bestätigung der Ergebnisse mit einem Vektor mit deletierter Seed-Sequenz steht zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit ebenfalls noch aus.

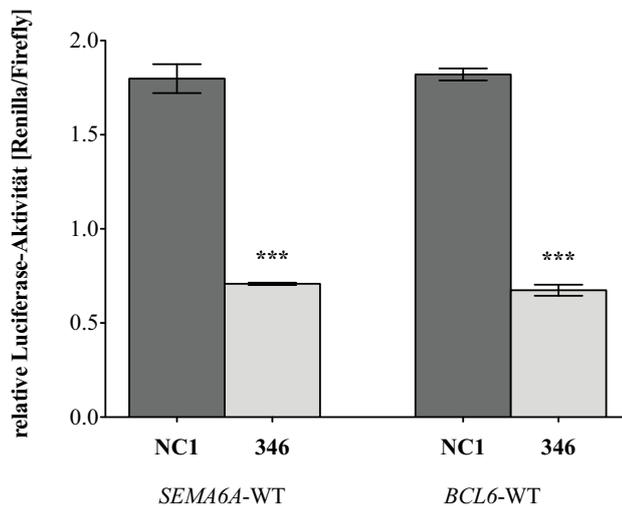


Abbildung 35: Relative Darstellung der Luciferase-Aktivität für 3'-UTR Konstrukte des *SEMA6A*- und *BCL6*-Transkripts mit der *miR-346* Bindungsstelle in T98G Gliomzellen nach Transfektion mit der *pre-miR-346* (346) beziehungsweise *pre-NC1* (NC1). Die Darstellung erfolgt in arbiträren Einheiten. Signifikant unterschiedliche Werte sind markiert: ***, $p < 0,001$.

4 Diskussion

4.1 MicroRNAs mit veränderten Expressionsprofilen in malignen Gliomen

Astrozytäre Gliome sind die häufigsten primären Hirntumoren im Erwachsenenalter. Auch wenn in den letzten Jahren immer mehr Erkenntnisse über die Ätiologie dieser bösartigen Tumoren ans Licht gebracht wurden, so ist man von einem umfassenden Verständnis dieser Erkrankung noch weit entfernt. In jüngerer Vergangenheit wurde ein großer werdendes Augenmerk auf die Gruppe der nicht-kodierenden, regulatorischen Nukleotidfragmente, die sogenannten MicroRNAs (miRNAs), gelegt. In zahlreichen Publikationen wurde gezeigt, welche wesentlichen Rollen diese kleinen RNAs gerade aufgrund ihrer komplexen simultanen Beziehungen zu mehreren unterschiedlichen Signalkaskaden besitzen. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass die Dysregulation der Expression von miRNAs an der Entstehung von einem Großteil, wenn nicht allen, humanen Tumoren beteiligt ist¹⁸⁰.

Aufgrund dieser Erkenntnisse lag es nahe, sich mit der miRNA-Expression in Gliomen näher zu befassen. Um jedoch die Fülle möglicher miRNAs einzugrenzen, wurden solche miRNAs für eine Expressionsanalyse in Gliomen ausgewählt, die in einer genomisch begrenzten Region lokalisiert sind, die insbesondere in den bösartigsten Gliomen, den Glioblastomen, sehr häufig Deletionen aufweist. Der rekurrente Verlust genetischen Materials einer spezifischen Genregion ist ein häufiges gemeinsames Merkmal in der Onkogenese von Tumoren und gilt als Anhaltspunkt für das Vorhandensein wichtiger Tumorsuppressor-Kandidaten in dieser Region¹⁸¹. Da mehr als 60 % aller primären Glioblastome (pGBIV) einen Verlust der Heterozygotie auf dem langen Arm von Chromosom 10 aufweisen¹, bildeten die in dieser Region distal des bekannten Tumorsuppressorgens *PTEN* lokalisierten miRNAs den Schwerpunkt der eigenen Untersuchungen.

In einer initialen Screening-Phase wurden alle zum Zeitpunkt des Promotionsstarts in dieser chromosomalen Region lokalisierten 12 miRNAs mittels stem-loop Real-Time RT-PCR in einem Tumorkollektiv bestehend aus sechs Astrozytomen, acht anaplastischen Astrozytomen, 10 sekundären und 40 primären Glioblastomen evaluiert und mit der Expression in nicht-neoplastisch verändertem Hirngewebe verglichen. Drei (*hsa-miR-107*, *hsa-miR-146b*, *hsa-miR-346*) der 12 miRNAs zeigten eine signifikant verminderte Expression in den Tumoren im Vergleich zu normalem Hirngewebe, wobei sich allerdings Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorgruppen bzw. WHO-Graden zeigten.

4.1.1 Expression von *hsa-miR-107* in astrozytären Gliomen

Die miRNA *hsa-miR-107* zeigte in allen Tumorgruppen eine reduzierte Expression gegenüber normalem Hirngewebe, die mit Ausnahme der sekundären Glioblastomgruppe statistisch signifikant war. Primäre Glioblastome wiesen das niedrigste Expressionsniveau auf und unterschieden sich hierdurch signifikant von der Gruppe der sekundären Glioblastome (Abb. 18; Tabelle 12). In den sekundären Glioblastomen war zwar im Mittel ein deutlich reduziertes Expressionsniveau im Vergleich zu den nicht-neoplastisch veränderten Proben (Mittelwert: 0,55 vs. 1,51) vorhanden, aufgrund der hohen Standardabweichung ($\pm 0,219$) wurde allerdings in dieser Gruppe keine Signifikanz erreicht ($p > 0,05$).

Aberrante Expressionen von miRNAs sind eine häufige, wenn nicht gar ubiquitär vorkommende Erscheinung in menschlichen Malignomen. Sie können hierbei hochreguliert sein, im Sinne eines Protoonkogens, aber auch in einer verminderten Expression vorliegen, entsprechend eines Tumorsuppressorgens^{89,182}.

Die eigenen Befunde einer verglichen mit nicht-neoplastischen Hirngewebsproben verminderten Expression von *hsa-miR-107* in Gliomen passt zu Befunden mehrerer

Veröffentlichungen, in denen *hsa-miR-107* mit der Entstehung verschiedener Tumorentitäten in Zusammenhang gebracht wurde^{183,184}. Zum Beispiel konnte für das duktales Adenokarzinom des Pankreas eine mit den eigenen Befunden in Gliomen vergleichbare miRNA-Signatur nachgewiesen werden. Die miRNA *hsa-miR-107* zeigte hier ebenfalls ein signifikant reduziertes Expressionsniveau im Vergleich zu nicht-tumorös verändertem Pankreasgewebe¹⁸⁵. Diese verminderte Expression ging mit einer erhöhten Expression der miRNA *hsa-miR-155* im Tumorgewebe einher. Interessanterweise erfährt dieses Verhältnis in nicht-duktalem Pankreaskarzinomen eine Umkehr. In endokrinen und azinären Tumoren des Pankreas findet sich eine signifikante Überexpression von *hsa-miR-107* und ihrem Homolog *hsa-miR-103*, bei vollständigem Verlust der Expression von *hsa-miR-155*¹⁸⁶. Dieses Verhältnis der miRNAs zueinander ist so distinkt, dass es eine Unterscheidung zwischen tumorös-verändertem und gesundem Pankreasgewebe ermöglicht. Aufgrund der geringen Fallzahlen sollte jedoch vor Festschreibung dieser möglichen Dichotomie eine Validierung in zukünftigen Studien erfolgen^{185,186}. Eine jedoch bereits jetzt zu gebende Erklärung für diese unterschiedlichen Expressionsprofile könnte aus der jeweilig unterschiedlichen Onkogenese und den sich ergebenden charakteristisch divergenten genetischen Profilen dieser beiden Entitäten resultieren¹⁸⁷⁻¹⁹⁰.

Eine weitere Tumorentität, in der die verminderte Expression von *hsa-miR-107* in Zusammenhang mit der Tumorphathogenese gebracht wurde, ist das Bronchialkarzinom. In Krebszelllinien vom Typ A549 beobachteten Cheng et al. 2005, dass eine Inhibierung von *hsa-miR-107* mit Antisense-Nukleotiden ein beschleunigtes Zellwachstums zur Folge hatte¹⁸³.

Eine aktuelle Arbeit, welche die Relevanz einer verminderten Expression von *hsa-miR-107* in der Onkogenese unterstreicht, ist die Arbeit von Feng et al. aus 2011. Die Autoren fanden, dass die verminderte Expression dieser miRNA und damit die Aufhebung ihrer spezifischen post-transkriptionellen Regulationsaufgaben einen direkten modulierenden Effekt auf das Wachstums- und Invasionsverhalten von Magenkarzi-

nomzellen hat¹⁹¹. In Urothelkarzinomzellen konnte zudem nachgewiesen werden, dass durch eine Herunterregulierung von *hsa-miR-107* die p53-vermittelte Inhibierung von HIF-1 reduziert und dadurch die Angiogeneese gefördert wird^{192,193}.

In den eigenen Untersuchungen zeigte sich ein konkordantes Expressionsverhalten zwischen der miRNA *hsa-miR-107* und dem assoziierten Wirtsgen *PANK1*, d.h. auch für *PANK1* ergab sich eine signifikant verminderte Expression in den untersuchten astrozytären Tumorentitäten im Vergleich zum Kontrollgewebe, wiederum mit Ausnahme der Gruppe der sekundären Glioblastome (Abb. 20). Zudem fand sich eine statistisch signifikante Differenz der *PANK1* Expression zwischen primären und sekundären Glioblastomen. Diese Parallelen legen eine Koregulation der intronisch gelegenen miRNA und ihrem Wirtsgen nahe, was ein häufig beobachtetes Phänomen ist^{91,92,194}. In einer Studie zur Untersuchung der Regulierung metabolischer Signalwege betrachteten Wilfred et al. die Rolle der Paraloge *hsa-miR-103/107* im Fettstoffwechsel. Es zeigte sich eine enge Korrelation zwischen der Expression der miRNA *hsa-miR-103* und der der Gene *PANK2* und *PANK3*¹⁹⁵. *Hsa-miR-107/PANK1* Expressionslevels wurden in der damaligen Arbeit nicht korreliert, jedoch bestand ein enger Zusammenhang zwischen den Expressionsniveaus der beiden miRNAs, so dass auch für das Paar *hsa-miR-107* und *PANK1* von einer ähnlichen Abhängigkeit ausgegangen werden kann, da sich weiterhin zeigte, dass *hsa-miR-103/7* symbiotisch mit den PANK-Proteinen zusammen agieren, um den Fettsäuremetabolismus zu modulieren¹⁹⁵. Ein weiterer die Koexpression unterstützender Aspekt ist die zumindest teilweise bestehende Abhängigkeit der Expression beider Faktoren von p53, welche unlängst von Yamakuchi et al. berichtet wurde¹⁹². Eine gemeinsame Regulation der Expression erscheint vor diesem Hintergrund zweckmäßig.

Abschließend bleibt anzumerken, dass es sich bei der Expressionsanalyse lediglich um eine statistische Beschreibung des Gegebenen handelt und aus ihr keine Kausali-

tät abgeleitet werden kann. Es ist jedoch augenfällig, dass die miRNA immer wieder mit der Pathogenese unterschiedlichster Tumoren in Zusammenhang gebracht wird.

4.1.2 Expression von *hsa-miR-146b* in astrozytären Gliomen

Für die MicroRNA *hsa-miR-146b* zeigte sich in den untersuchten astrozytären Tumoren mit Ausnahme der pGBIV eine signifikante Reduktion der Expression in Relation zu den nicht-neoplastisch veränderten Hirngewebsproben. Die Expressionsniveaus in AII, AAIII und sGBIV wiesen eine Assoziation zum WHO-Grad entsprechend der malignen Progression auf, d.h. der niedrigste mittlere Expressionswert fand sich in der Gruppe der sGBIV (Abb. 12; Tabelle 9). Obwohl die Gruppe der pGBIV mit ihrem mittleren Expressionsmittelwert unterhalb dem der Kontrollgruppe lag (0,27 vs. 0,40), ergab sich keine statistische Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test. In Glioblastomzelllinien konnten zwar in verschiedenen Arbeiten signifikante Dysregulationen der miRNA *hsa-miR-146b* nachgewiesen werden, diese sind aber nicht ohne Weiteres auf humane Tumorgewebsproben übertragbar^{179,196}.

Die signifikant unterschiedliche Expression zwischen primären und sekundären Glioblastomen könnte Folge der unterschiedlichen Ursprünge der beiden Gliomentitäten sein. Während sGBIV letztlich aus AII oder AAIII entstehen, bilden sich pGBIV *de novo* und stehen in keiner Beziehung zu niedriggradigeren Vorläuferläsionen. Entsprechend zeigen primäre und sekundäre Glioblastome markante genomische Unterschiede⁵¹. Ob und inwieweit die Expression der miRNA *hsa-miR-146b* ein möglicher Marker zur Unterscheidung primärer und sekundärer astrozytärer Glioblastome sein kann, müsste in größeren Gruppenkollektiven weitergehend validiert werden.

Trotz der bis hierher lediglich statistisch festgestellten Unterscheidungen der Expressionsverhalten zwischen den einzelnen Tumorentitäten und dem Kontrollgewebe,

zeigt die aktuelle wissenschaftliche Literatur, dass der miRNA *hsa-miR-146b* und damit ihrem Expressionsprofil eine Bedeutung in der Tumorphathogenese zugeschrieben werden muss.

2008 untersuchten Bhaumik et al. die Bedeutung der MicroRNAs *hsa-miR-146a/b* für die Aktivität des NF- κ B-Signalweges in Mammakarzinomzellen. Hierzu wurden Zellen der stark metastasierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mit *hsa-miR-146a/b* transfiziert und im Verlauf eine signifikante Abnahme der Expression von IL-1 Rezeptor-assoziiierter Kinase und TNF-assoziiertem Faktor 6 festgestellt, welche zwei zentrale Schlüsselproteine in der Aktivierung von NF- κ B darstellen¹⁹⁷. Die tumorsuppressive Wirkung dieser miRNAs wurde noch zusätzlich durch merkliche Abnahme der Invasivität und Migration gestützt¹⁹⁷.

Auch in Gliomen konnte die antionkogene Wirkung von *hsa-miR-146b* bereits nachgewiesen werden^{179,196}. Unter Verwendung von miRNA Mikroarrays identifizierten Xia et al. *hsa-miR-146b* als eine von mehreren miRNAs, die in Glioblastomzelllinien signifikant dysreguliert waren¹⁹⁶. Nach Transfektion von Gliomzelllinien mit *hsa-miR-146b* und daraus resultierender Überexpression der miRNA reduzierte sich das Migrations- und Invasionsverhalten bei unveränderter Proliferation. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe um Katakowski, welche ebenfalls eine tumorsuppressive Wirkung in Glioblastomzelllinien durch *hsa-miR-146b* mit Abnahme der Migration und Invasion feststellte, bei gleichzeitiger Abnahme des Phosphorylierungsgrades der Proteinkinase B (AKT)¹⁷⁹.

In papillären Schilddrüsenkarzinomen (PSC) verhielt es sich nun jedoch genau entgegengesetzt. Chou et al. berichteten, dass gerade in Hochrisiko-PSC eine signifikante Hochregulierung der miRNA *hsa-miR-146b* vorlag und auch die extrathyreoidale Invasion eine signifikante Assoziation mit der miRNA zeigte¹⁹⁸. Das Signifikanzniveau lag hierbei jedoch lediglich bei $p = 0,042$, und über das Stadium der statistischen Beschreibung ging die Arbeit nicht hinaus. An dieser Stelle soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass in verschiedenen Organen unterschiedliche

Expressionsniveaus ein und derselben miRNA vorliegen können¹⁹⁹. Weiterhin zeigen manche miRNAs in unterschiedlichen Tumoren entgegengesetzte Expressionsprofile^{142,200}.

4.1.3 Expression von *hsa-miR-346* in astrozytären Gliomen

Die intronische MicroRNA *hsa-miR-346* wies ein annähernd spiegelbildliches Expressionsprofil zur *hsa-miR-146b* in den untersuchten Gliomgruppen auf. Die Gruppe der pGBIV wies hier im Mittel die niedrigsten Expressionswerte auf und zeigt als einzige eine signifikant verminderte Expression dieser miRNA in Relation zum nicht-neoplastisch veränderten Hirngewebe. Interessanterweise zeigten AII, AAIII und sGBIV eine signifikant im Vergleich zu pGBIV erhöhte Expression und ein ähnliches Expressionsniveau wie die Normalgewebsgruppe (Abb. 14; Tabelle 10). Eine mögliche Erklärung für das divergente Expressionsverhalten dieser miRNA zwischen pGBIV und sGBIV, AAIII und AII liegt vermutlich wiederum in den unterschiedlichen zugrundeliegenden genetischen und epigenetischen Alterationen^{6,51,79}.

Die erhobenen Expressionsdaten suggerieren, dass es sich bei der miRNA *hsa-miR-346* um eine sogenannte Signatur-miRNA handeln könnte, welche lediglich in pGBIV herunterreguliert ist und deren Expression in sGBIV keine Veränderung erfährt. Diese nicht untypische Beobachtung charakteristischer miRNA-Profile in unterschiedlichen Tumoren^{142,201} bedarf jedoch einer weiteren Validierung in größeren Kollektiven.

Die erstmalige Beschreibung der miRNA *hsa-miR-346* im Zusammenhang mit Mechanismen der Tumorphagenese erfolgte 2006. Weber et al. untersuchten folliculäre Schilddrüsenkarzinome (FSK) auf charakteristische miRNA-Profile, um Marker für eine Unterscheidung zum folliculären Adenom (FA) zu finden. Es zeigte sich,

dass *hsa-miR-346* in FSK ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau aufwies im Vergleich zu FA, und dass die Repression dieser miRNA in *in vitro* Assays zu einem Wachstumsarrest führte²⁰². Diese Relationen gelten jedoch ausschließlich für den Vergleich von FSK und FA. Eine Untersuchung der miRNA-Expression in nicht-pathologisch verändertem Schilddrüsengewebe hat in dieser Arbeit nicht stattgefunden und somit sind diese Daten nur bedingt mit den eigenen an Gliomen erhobenen vergleichbar. Trotzdem bleibt auch hier zu erwähnen, dass, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, es keine Seltenheit ist, dass miRNAs in unterschiedlichen Tumorentitäten unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen, eine Eigenschaft, die ihren komplexen Regulationsmechanismen und mannigfaltigen Interaktionsmöglichkeiten geschuldet ist^{142,201}. So regulieren miRNAs sowohl tumorsuppressive als auch onkogene mRNAs und können somit je nach Expressionsprofil des jeweiligen Organs oder Tumors eine primär onkogene beziehungsweise anti-onkogene Wirkung besitzen.

Arbeiten, welche eine mögliche tumorsuppressive Wirkung der miRNA *hsa-miR-346* stützen und die Bedeutung ihrer Dysregulation auf Differenzierung und Selbsterneuerung der Zelle untersuchten, wurden 2008 publiziert. Als ein Zielgen dieser miRNA wurde der Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) identifiziert²⁰³. LIF sorgt über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden wie beispielsweise JAK/STAT und MAPK in verschiedenen Zellreihen für den Erhalt der Pluripotenz und Selbsterneuerung²⁰⁴. In T-Lymphozyten von Mäusen wurde nachgewiesen, dass die regulierende Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors NANOG, elementar für Selbsterneuerung und Pluripotenz, über den LIF-induzierten PI3K/AKT-Signalweg stattfindet²⁰⁵. Weiterhin führte die Unterbrechung der negativen-Feedbackschleife für LIF durch knock-out von MARCH-7 zu einer kompensatorischen Hochregulierung von *hsa-miR-346*, um durch Inhibierung von LIF eine überschießende Aktivierung von NANOG zu unterbinden²⁰⁵.

Das Wirtsgen von *hsa-miR-346*, *GRID1*, imponierte in den Gliomen mit einem ähnlichen Expressionsprofil wie die miRNA. Auch für *GRID1* fand sich in der Gruppe der pGBIV das niedrigste Expressionsniveau (Abb. 16). Wie für *hsa-miR-346* wiesen die anderen Tumorgruppen auch für *GRID1* ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau in Relation zur Gruppe der pGBIV auf. Die Similarität des Expressionsverhaltens von miRNA und Wirtsgen spricht für eine gemeinsame transkriptionelle Regulation. *GRID1*, besser bekannt im Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen, allen voran der Schizophrenie²⁰⁶⁻²⁰⁸, zeigte bereits in anderen Publikationen bezüglich der Expression eine enge Assoziation zu seiner intronisch gelegenen miRNA *hsa-miR-346*²⁰⁶. In einer Screeninguntersuchung wurden mittels quantitativer RT-PCR Expressionsprofile von MicroRNAs von schizophrenen Patienten angefertigt und diese mit nicht affizierten Kontrollen verglichen. Sowohl für die miRNA *hsa-miR-346* als auch für ihr Wirtsgen *GRID1* zeigte sich eine signifikant verminderte Expression in den Proben der betroffenen Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Es sind diese Daten sowie die weiter oben dargestellten Expressionsprofile, die eine Koregulation und -expression der miRNA und ihres Wirtsgens begründen.

4.2 Epigenetische DNA-Modifikationen als Ursache dysregulierter Genexpression

Epigenetische Regulationsmechanismen spielen eine entscheidende Rolle in der Genexpression von Säugetieren²⁰⁹. Aberrationen des Epigenoms sind zudem weit verbreitet in humanen Tumoren mit transkriptionellem Silencing von Tumorsuppressorgenen durch Promotormethylierung in fast allen Malignomen^{210,211}. In jüngerer Vergangenheit konnten zahlreiche Studien zeigen, dass auch miRNAs mittels epigenetischer Mechanismen in Tumoren reguliert werden. Typischerweise geschieht dies durch Methylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion der primären miRNA-Transkripte^{133,212-221}. Zusammen mit genetischen Mutationen und veränderter Regulation durch Transkriptionsfaktoren bilden epigenetische Modifikationen einen von drei „Wächtern“ der miRNA-Expression^{180,222,223}.

4.2.1 Methylierungsanalyse der 5'-genomischen Sequenzen der *hsa-miR-146b*

Die eigenen mit Hilfe der Pyrosequenzierung²²⁴ von Natriumbisulfit-modifizierter DNA erhobenen Befunde zeigten, dass eine Hypermethylierung der ungefähr 3700 Basenpaare stromabwärts der miRNA *hsa-miR-146b* gelegenen CpG-Insel-45 als mögliche Ursache der verminderten Expression dieser miRNA in Gliomen nicht in Betracht kommt (Abb. 22). Man könnte zwar argumentieren, dass aufgrund der Lage der verwendeten Primer nicht die komplette CpG-Insel abgedeckt wurde und daher etwaige hypermethylierte Bereiche übersehen wurden. Dem ist aber entgegenzuhalten, dass ein relevanter Methylierungsstatus der CpG-Insel sich auch bereits in diesem Bereich hätte andeuten müssen. Die untersuchte Sequenz befand sich zentral in der CpG-Insel und umfasste somit eine repräsentative Stelle der gesamten Insel¹⁶². Weiterhin liegt auch keine zusätzliche CpG-Insel in unmittelbarer Nachbarschaft der

pre-miR-146b, so dass hier kein Selektionsfehler anzunehmen ist¹⁷⁴. Auch in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur findet sich kein Anhalt für eine methylierungsbedingte Änderung der *hsa-miR-146b* Expression. Die veröffentlichten Arbeiten, welche einen Zusammenhang zwischen dem Expressionsverhalten der miRNA und der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten untersuchten, beschränkten sich bislang auf die Feststellung der Expressionsunterschiede, ohne eine ursächliche Erklärung dafür zu liefern^{198,225-227}. Lediglich für Metastasen des Mammakarzinoms konnte nachgewiesen werden, dass die Hochregulierung der miRNA *hsa-miR-146b* eine Folge der erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors Breast Cancer Metastasis Suppressor 1 ist²²⁸.

Wahrscheinlicher als epigenetische Modifikationen im Sinne einer DNA-Hypermethylierung scheint somit eine veränderte transkriptionelle Aktivität dieser miRNA als Folge veränderter Expressionsmuster bzw. Funktionen von Transkriptionsfaktoren, möglicherweise bedingt durch genetische Veränderungen, wie den Verlust der Heterozygotie des langen Arms von Chromosom 10 (LOH 10q) oder andere Deletionen, wie sie häufig bei astrozytären Tumoren anzutreffen sind^{5,146,181}. Gerade auch vor dem Hintergrund der immunologischen Funktionen der miRNA *hsa-miR-146b* erscheint eine verminderte Expression aufgrund einer Änderung von transkriptionellen Faktoren nicht ausgeschlossen²²⁹⁻²³¹.

4.2.2 Methylierungsanalyse der 5'-CpG-Insel von *PANK1/hsa-miR-107*

Mittels Pyrosequenzierung und methylierungsspezifischer PCR (MSP) ließ sich keine Hypermethylierung der CpG-Insel-93, die in der potentiellen Promotorregion von *PANK1* lokalisiert ist, in den untersuchten glialen Tumorproben oder in den nicht-neoplastisch veränderten Hirnproben nachweisen. Die hier dargestellten Daten legen nahe, dass eine Hypermethylierung der CpG-Insel-93 als Ursache für die signifikante Herunterregulierung der *hsa-miR-107* Expression in Gliomen auszuschließen

ist (Abb. 23). Diese Ergebnisse stehen in Gegensatz zu einer 2009 publizierten Arbeit von Lee et al., die berichtete, dass in den humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPACA-2 und PANC-1 epigenetische Veränderungen im Sinne einer DNA-Hypermethylierung zur verminderten Expression von *hsa-miR-107* führen¹⁸⁵. Hierzu wurden die Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (AZA) und Trichostatin A (TSA) behandelt und im Anschluss mittels Mikroarrays auf veränderte miRNA-Expressionsprofile hin untersucht. Neben anderem zeigte die miRNA *hsa-miR-107* eine um das Zweifache erhöhte Expression in Relation zu nicht behandelten Kontrollen. Zur Überprüfung des Methylierungsstatus der CpG-Insel-93 wurde eine MSP durchgeführt. Die für die MSP verwendeten Primer entsprechen denen in der eigenen Arbeit. Es konnten methylierungsspezifische Veränderungen in den Zelllinien nachgewiesen werden, welche nach Behandlung mit dem Demethylierungsgenz beziehungsweise dem Histon-Deacetylase-Inhibitor verschwanden. Es konnte jedoch auch ein PCR-Produkt für die unmethylierte Sequenz in den nicht behandelten Zellen nachgewiesen werden, ein Umstand, der darauf hindeutet, dass es sich bei der Methylierung der CpG-Insel-93 um eine partielle epigenetische Modifikation handelt. Eine Sequenzierung fand nicht statt¹⁸⁵.

Erklärungen für diese unterschiedlichen Beobachtungen gibt es viele. Zum einen behandeln diese Arbeiten zwei unterschiedliche Entitäten, mit dem bis hierhin einzig verbindenden Merkmal der verminderten Expression von *hsa-miR-107*. Es ist bekannt, dass epigenetische Veränderungen Tumoren eine Art spezifischen Fingerabdruck verleihen, welcher es ermöglicht, sie voneinander zu unterscheiden und zu klassifizieren^{142,209-211,215,223,232,233}. Eine Methylierung in einer bestimmten Karzinomform bedeutet daher nicht zwangsläufig, dass diese auch in einer anderen malignen Neoplasie vorliegen muss. Zusätzlich wurde in der Arbeit von Lee et al. bereits auf die lediglich teilweise vorliegende Hypermethylierung der CpG-Insel-93 verwiesen. Es wäre also ebenfalls denkbar, dass die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierungs- und MSP-Primer die falsche Region untersuchten und den eigentlichen Be-

fund verfehlten. Dieser Begründung sind allerdings zwei Argumente entgegenzuhalten: (1) Die Primer für die Pyrosequenzierung wurden in einem zentralen Bereich der CpG-Insel platziert, welcher durch die MSP-Primer noch zusätzlich ausgeweitet wurde, so dass letztlich ca. 40% der CpG-Sequenz abgedeckt wurden; (2) nach 5-AZA- und TSA-Behandlung von Gliomzelllinien zeigte sich kein Anstieg der Expressionsniveaus für die miRNA *hsa-miR-107* oder ihr Wirtsgen *PANK1* in den behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Es scheint somit wahrscheinlicher, dass es sich bei der epigenetisch vermittelten Expressionsminderung von *hsa-miR-107* um ein Pankreas-spezifisches Phänomen handelt, welches in astrozytären Gliomen nicht nachvollzogen werden kann. Die Ursachen für die verminderte Expression dieser miRNA in Gliomen ist demnach eher in genetischen Veränderungen wie dem oben beschriebenen LOH von 10q oder transkriptionellen Modifikationen zu suchen, die nicht auf einer aberranten DNA-Methylierung basieren^{27,81,180,181,192}.

4.2.3 Methylierungsanalyse der 5'-gelegenen CpG-Inseln von *GRID1/hsa-miR-346*

In der 5'-genomischen Region von *GRID1* sind zwei CpG-Inseln lokalisiert. Die CpG-Insel-47 befindet sich im ersten Intron von *GRID1* in der chromosomalen Bande 10q23.2, während die CpG-Insel 356 direkt am 5'-Start von *GRID1* lokalisiert ist. Für die CpG-Insel-47 zeigte sich in der Pyrosequenzierung eine deutlich erhöhte Methylierungsfrequenz in den untersuchten Gliomen in Relation zu nicht-neoplastisch veränderten Kontrollen (Abb. 24). Während alle Tumorentitäten im Mittel eine erhöhte Methylierungsfrequenz aufwiesen, war diese für die Gruppe der pGBIV statistisch signifikant (Tabelle 14). Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der Expressionsanalyse von *hsa-miR-346* und *GRID1*, in denen jeweils die pGBIV eine

signifikant erniedrigte Expression im Vergleich zu normalem Hirngewebe aufwiesen (Abb. 16). In der aktuellen wissenschaftlichen Literatur gibt es bislang keine Beschreibungen einer möglichen epigenetischen Modulation der Expression von *hsa-miR-346*. Publikationen über eine Beeinflussung der miRNA-Expressionen durch epigenetische Veränderungen wie Hypermethylierung sind jedoch zahlreich gegeben. So geht eine transkriptionelle Herunterregulierung der miRNA-Expression nicht selten auf eine erhöhte Methylierungsfrequenz einer CpG-Insel in der Promotorregion der miRNA zurück^{180,185,210,212,214,215,217,218,221,223,234}

Um die Bedeutung der erhöhten Methylierungsfrequenz in dieser Region abschließend beurteilen zu können, erfolgte die Untersuchung der zweiten in der Promotorregion lokalisierten CpG-Insel-356. Um eine Evaluierung dieser CpG-Insel mittels Pyrosequenzierung möglich zu machen, erfolgte ihre Aufteilung in zwei getrennte Bereiche mit unterschiedlichen Sequenzierungsprimern. Der weiter distal im Genabschnitt von *GRID1* untersuchte Bereich wurde als CpG-Insel-356.1 bezeichnet, während der zweite Abschnitt direkt um den mRNA-Start von *GRID1* gesetzt wurde und im weiteren als CpG-Insel-356.2 bezeichnet wird (vgl. Abschnitt 3.2.3.2). Für den untersuchten Bereich 356.1 ergab sich keine malignomtypische Veränderung des Methylierungsprofils. Keine der vier untersuchten Gliomgruppen wies eine gesteigerte Methylierungsrate im Vergleich zu den nicht-neoplastisch veränderten Hirngewebsproben auf (Abb. 26). Für den Bereich 356.2 ergab sich nach Durchführung der Pyrosequenzierung ein völlig anderes Bild. Ähnlich der CpG-Insel-45 imponierten alle astrozytären Tumorgruppen mit einer erhöhten Methylierungsrate im Vergleich zu den nicht-neoplastisch veränderten Kontrollen, wobei die Erhöhung sowohl für AAIH als auch für sekundäre und primäre Glioblastome statistisch signifikant im Vergleich zu den Normalkontrollen ausfiel (Tabelle 15). Das höchste Signifikanzniveau und damit auch die höchste Methylierungsrate wiesen die pGBIV auf. Das Methylierungsmuster weist somit deutliche Parallelen zum Expressionsmuster der miRNA *hsa-miR-346* und seinem Wirtsgen *GRID1* auf (Abb. 16). Die höchste Me-

thylierungsdichte korreliert mit dem niedrigsten Expressionsniveau, ein Umstand, wie er bereits oben dargestellt, in zahlreichen Publikationen bestätigt und untermauert wurde. Dass sich lediglich eine Hypermethylierung für die CpG-Insel-356.2 und nicht für -356.1 nachweisen ließ, deutet auf eine partiell vorliegende Hypermethylierung des entsprechenden DNA-Segmentes hin. Um weiterführend die Rolle des Methylierungsstatus der CpG-Inseln für das Expressionsniveau des Wirtsgens *GRID1* zu eruieren, erfolgte die Überprüfung des Expressionsverhaltens dieses Gens nach Behandlung von Gliomzellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A, ein Verfahren, wie es zur Validierung des Einflusses methylierungsspezifischer Modifikationen epigenetischer Strukturen angewendet wird^{185,235}. Es zeigte sich, dass die Gliomzelllinien T98G und U138 mit einem rapiden Anstieg der Expression von *GRID1* auf die 5-AZA/TSA-Behandlung reagierten. So stieg das relative Expressionsniveau in Relation zu unbehandelten Kontrollen um den Faktor 19-32 respektive 12-25, jeweils abhängig von der angewandten Behandlung (Abb. 25). Auch wenn im Anschluss an die die DNA-Methylierung verändernde Behandlung nicht noch einmal explizit eine Überprüfung des DNA-Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Inseln durchgeführt wurde, um den Erfolg der Behandlung an speziell diesen CpG-Inseln zu dokumentieren, so sind die erhobenen Daten insoweit beweisend, dass die verminderte Expression der miRNA *hsa-miR-346* und ihres Wirtsgens *GIRDI* in astrozytären Tumoren Folge einer epigenetischen Modifikation im Sinne einer DNA-Hypermethylierung sind. Die oben dargelegten Ergebnisse sowie der Umstand, dass im Bereich der Promotorregion keine weiteren CpG-Inseln existieren, die für einen Expression-modulierenden Effekt sorgen könnten²³⁶, belegt die relevante Beteiligung der CpG-Inseln-47 und -356 bei der Dysregulation der Expression der miRNA *hsa-miR-346* und des Wirtsgens *GRID1* in Gliomen hinreichend.

4.3 Biologische Effekte der Überexpression der MicroRNAs *has-miR-107*, *-146b* und *-346* in humanen Gliomzelllinien

Um den bis hier lediglich statistisch bestehenden Zusammenhängen eine kausale Ebene hinzuzufügen, wurden zusätzlich funktionelle Analysen zur Auswirkung einer Überexpression der drei Kandidaten-miRNAs in Gliomzelllinien durchgeführt. Zur Feststellung eines biologischen Effekts wurden die Gliomzelllinien A172 und T98G mit den entsprechenden pre-miRNAs in 10 nM respektive 25 nM Konzentration transfiziert und die funktionellen Auswirkungen bezüglich Zellvitalität, Zellproliferation und Apoptoseaktivität dokumentiert.

4.3.1 Vitalität von Gliomzellen nach Transfektion von Vorläufer-miRNAs

Bereits in früheren Arbeiten wurde berichtet, dass miRNAs eine Auswirkung auf die Zellviabilität haben^{183,237,238}. In einer Arbeit von 2009 beispielsweise konnten Wu et al. zeigen, dass die miRNA *hsa-miR-122* in der hepatozellulären Karzinomzelllinie Huh-7 eine hemmende Wirkung auf die Zellviabilität ausübt. Zellen der Linie Huh-7 wurden mit *anti-miR-122* transfiziert und zeigten eine signifikante Zunahme der Viabilität im ATP-basierenden Lumineszenz-Assay²³⁷; ein Effekt, welcher sehr gut mit der in weiteren Experimenten festgestellten Apoptose-induzierenden Wirkung dieser miRNA korrelierte. In der Arbeit von Kefas et al. aus 2010 wurde ein ähnlicher Zusammenhang für die miRNA *hsa-miR-326* in Gliomen nachgewiesen. Die tumorsuppressive Wirkung der miRNA wurde hier durch Inhibierung ihrer Zielstruktur Pyruvat-Kinase M2 erklärt²³⁸.

Diese oder zumindest ähnliche Ergebnisse wurden zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit auch für die Tumorsuppressorkandidaten *hsa-miR-107*, *-146b* und *-346* angenommen, eine Abnahme der Zellviabilität bei Zunahme der Apoptoseaktivität

nach Überexpression der miRNAs. Interessanter Weise bestätigten sich diese Überlegungen im vollen Umfang für die Zunahme der Apoptoseaktivität nach Überexpression einer dieser drei miRNAs in Gliomzellen, jedoch lediglich bedingt für die Viabilität dieser Zellen. Wie im Resultateteil dargestellt, kam es für die 10 nM Transfektionsansätze überraschenderweise zum Teil zu einer wenn auch geringen Steigerung der Zellviabilität (Abb. 28). Bemerkenswerterweise imponierten die miRNAs, die den höchsten ATP-Gehalt in der einen Zelllinie verursachten, mit dem niedrigsten Lumineszenzsignal in der anderen (A172 – *hsa-miR-107*, T98G – *hsa-miR-346*). Dass ein und dieselbe miRNA in unterschiedlichen Zelllinien des gleichen Organs abweichende Resultate in funktionellen Assays erzielen kann, wurde bereits von Wu et al. gezeigt. Dieser Effekt wird vornehmlich auf unterschiedliche genetische Veränderungen in der jeweiligen Zelllinie zurückgeführt²³⁷.

Beachtenswert war weiterhin eine für alle miRNAs nach Transfektion in einer Konzentration von 25 nM nachweisbare Reduktion der Zellviabilität. Gerade für die *pre-miR-146b* und *-346* zeigte sich eine signifikante Reduktion des ATP-Gehaltes nach Transfektion in der 25 nM Konzentration in Relation zu der 10 nM Konzentration. Für die *pre-miR-107* ergab sich entsprechend eine signifikante Reduktion der Zellviabilität unter Verwendung des 25 nM Transfektionsansatzes ($p < 0,001$); Ergebnisse, die eine konzentrationsabhängige Wirkung der miRNAs auf die Zellviabilität darlegen.

Weiterhin ist zu der verwendeten Methode kritisch zu sagen, dass die gewonnenen Werte einer starken Schwankungsbreite unterlagen; ein Problem, welches bereits in zahlreichen anderen Arbeiten dokumentiert wurde²³⁹⁻²⁴³. Die alleinige Bestimmung von ATP als Indikator für die Zelllebensfähigkeit ist in den letzten Jahren immer mehr in die Kritik geraten, da sich aufgrund der rapide fluktuierenden intrazellulären ATP-Spiegel nur eingeschränkt belastbare Ergebnisse erzeugen lassen²⁴⁴. Weiterhin können ATP-Spiegel durch andere Faktoren wie Kontaktinhibierung, Veränderungen

des zytoplasmatischen Volumens oder Sauerstoffdepletion verändert werden und den linearen Zusammenhang zwischen Zellzahl und Lumineszenz stören²⁴⁵. Dementsprechend wird vermehrt darauf verwiesen, zur Bestimmung der Zellviabilität das Verhältnis von ATP zu DNA zu bestimmen, um so verlässlichere und reproduzierbarere Ergebnisse zu erzielen²⁴⁶. Gleichwohl ist die alleinige Bestimmung des ATP-Gehaltes als Viabilitätsparameter im Kontext weiterführender funktioneller Zell-Assays, wie der Überprüfung der Apoptoserate und Zellproliferation, ein wichtiger Orientierungspunkt, welcher, im Zusammenhang interpretiert, wesentliche Rückschlüsse auf mögliche pathogenetische Beteiligungen von miRNAs an der Karzinogenese zulässt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die getesteten miRNAs einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Zellviabilität im Sinne eines Tumorsuppressorkandidaten haben. Dieser war jedoch lediglich für die miRNA *hsa-miR-107* in der Gliomzelllinie T98G statistisch signifikant in Relation zu den *pre-NCI*-transfizierten Kontrollen.

4.3.2 Proliferationsaktivität von Gliomzellen nach Transfektion von Vorläufer-miRNAs

Die Überprüfung der biologischen Effekte einer Überexpression der miRNAs *hsa-miR-107*, *-146b* und *346* erfolgte unter Verwendung des Cell Proliferation ELISA BrdU-Assay (Chemilumineszenz) von Roche. Der Versuchsaufbau erfolgte in Analogie zur Viabilitätsbestimmung unter Verwendung von zwei verschiedenen konzentrierten Transfektionsansätzen in den jeweiligen Gliomzelllinien A172 und T98G. Für die Transfektion mit einer Konzentration von 10 nM ergab sich für *pre-miR-346* eine signifikante Reduktion der Proliferation im Vergleich zu den *pre-NCI*-transfizierten Kontrollen ($p < 0,05$; Abb. 28). Die anderen beiden *pre-miRNAs*

zeigten in der Zelllinie A172 keine signifikante Änderung des Proliferationsverhaltens. In der Gliomzelllinie T98G bestätigte sich der antiproliferative Effekt nach *pre-miR-346* Transfektion ($p < 0,01$; Abb. 28). Zusätzlich zeigten auch die mit *pre-miR-107* transfizierten T98G-Zellen eine signifikante Reduktion ihres Proliferationsverhaltens ($p < 0,05$). Einzig die Transfektion von *pre-miR-146b* zeigte keine signifikante Veränderung der proliferativen Aktivität in der Gliomzelllinie T98G. Wurde die Konzentration der transfizierten pre-miRNAs auf 25 nM erhöht, ließ sich keiner der beschriebenen Effekte beobachten. Keine der transfizierten Zellen zeigte eine signifikante Änderung ihres Proliferationsverhaltens. Zwar wiesen die mit *pre-miR-346* transfizierten A172-Gliomzellen erneut eine verminderte Proliferationsrate auf, die aber aufgrund der hohen Standardabweichung in der Kontrollgruppe (± 44 a. E.) nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle war. Auch die in der Zelllinie T98G in der Konzentration von 10 nM signifikant proliferationshemmend wirkenden pre-miRNAs *pre-miR-107* und *-346* resultierten in der Konzentration von 25 nM zwar auch in einer im Vergleich zu den *pre-NC1*-transfizierten Zellen verminderten proliferativen Aktivität, die jedoch statistisch nicht signifikant war (Tabelle 16, 18).

Hinsichtlich des Einflusses auf das Proliferationsverhalten von kultivierten Tumorzellen nach Transfektion von Vorläufer-miRNAs gibt es bereits mehrere Publikationen anderer Arbeitsgruppen. So untersuchten Feng et al. (2011) die Auswirkungen einer Überexpression der miRNA *hsa-miR-107* auf das Infiltrations- und Proliferationsverhalten der humanen Magen-Adenokarzinomzelllinie MKN-45¹⁹¹. Zur Bestimmung der relativen Proliferationsrate wurde das Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) verwendet. Die Autoren fanden, dass eine *hsa-miR-107*-Überexpression zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,05$) des Proliferationspotentials der MKN-45 Zellen führt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den eigenen Resultaten für die in einer Konzentration von 10 nM transfizierten T98G Gliomzellen (Abb. 28). Eine weitere Arbeit, die den antiproliferativen Effekt von *hsa-miR-107*

bestätigt, erschien in 2010. Yamakuchi et al. zeigten, dass mit *pre-miR-107* transfizierte humane Kolonkarzinomzellen HCT-116 ihre Eigenschaft verloren, Endothelproliferation zu induzieren¹⁹². Dieser Verlust wurde zusätzlich durch Hypoxie induziert und mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT) Assay quantifiziert. Warum der antiproliferative Effekt der miRNA lediglich in einer Zelllinie dokumentiert werden konnte, wurde mit dem Verweis auf unterschiedliche genetische Veränderungen der jeweiligen Zelllinien bereits im Abschnitt zur Viabilität dargelegt^{202,237}. Ein konzentrationsabhängiger Einfluss der miRNA *hsa-miR-107* scheint trotz der mangelnden Signifikanz im 25 nM Versuchsaufbau nicht zu bestehen. So veränderte sich das Proliferationsignal zwischen beiden Konzentrationen nur marginal (Tabelle 16), was auf einen eher generell gering einzuschätzenden proliferationshemmenden Effekt der miRNA hindeutet, welcher ebenfalls in der Literatur berichtet wurde¹⁹¹.

Auch für die miRNA *hsa-miR-146b* liegt eine Arbeit mit zu den eigenen Befunden vergleichbaren Ergebnissen vor. Xia et al. zeigten, dass diese miRNA in humanen Glioblastomen vermindert exprimiert wird und ihre Überexpression die Zellmigration und -invasion von Gliomzellen *in vitro* inhibiert¹⁹⁶. Die funktionalen Untersuchungen wurden an der Gliomzelllinie U373 durchgeführt. Zur Überprüfung einer möglichen Auswirkung einer *pre-miRNA*-Überexpression auf das Proliferationsverhalten der Zellen wurden diese mit 50 nM *pre-miR-146b*, *Scramble-146b*, *LNA-anti-146b* oder *pre-NC* transfiziert. Zu keinem Zeitpunkt zeigte sich für einen der Behandlungsansätze eine signifikante Veränderung des Proliferationsverhaltens im MTT-Assay im Vergleich zu nicht behandelten Zellen¹⁹⁶. Diese Beobachtungen bestätigen meine Ergebnisse, wo in beiden Gliomzelllinien in unterschiedlichen Konzentrationen keinerlei abweichendes Proliferationsverhalten zu beobachten war. Einen antiproliferativen Effekt der miRNA *hsa-miR-146b* gibt es somit nicht.

Im Unterschied zu den eigenen Resultaten zu *hsa-miR-346* wurde dieser miRNA von anderen Autoren eine proliferationsfördernde Wirkung attestiert. In follikulären Schilddrüsenkarzinomen (FSK) zeigte *hsa-miR-346*, im Gegensatz zu ihrem Expressionsprofil in astrozytären Gliomen, eine signifikant gesteigerte Expression in Relation zu follikulären Adenomen. Eine Überexpression der miRNA in der follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC-133 führte zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl, welche mittels Auszählung bestimmt wurde²⁰². Interessanterweise bestätigte sich diese Beobachtung in einer anderen FSK-Zelllinie nicht. In der Zelllinie NPA-87 zeigte sich kein modifizierender Effekt der miRNA auf die Wachstumsrate. In dieser Zelllinie wurde jedoch, und dies ist wesentlich, im Vorhinein keine erhöhte Expression der miRNA festgestellt. Dies bedeutet wiederum, dass ein wachstumsfördernder Effekt der miRNA *hsa-miR-346* lediglich in solchen Fällen zu erwarten ist, wo bereits im Vorfeld eine signifikante Dysregulation im Sinne einer Überexpression festgestellt worden ist. Demnach ist für eine in einer anderen Entität *a priori* bekannte herunterregulierte Expression der miRNA kein proliferationsfördernder Effekt, sondern im Umkehrschluss, wie hier dargestellt, ein proliferationshemmender Einfluss zu erwarten. Auf die divergenten Verhaltensweisen von miRNAs in unterschiedlichen Zelltypen wurde bereits zuvor ausführlich eingegangen^{142,180,199-201,247}.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der Wirkung der drei untersuchten miRNAs auf die Proliferation von Gliomzellen für *hsa-miR-107* und *-346* eine proliferationshemmende Wirkung attestieren, die sich für *hsa-miR-346* in beiden untersuchten Gliomzelllinien zeigte. Dieser Effekt erwies sich jedoch lediglich für den 10 nM Transfektionsansatz als statistisch signifikant. Ein möglicher konzentrationsabhängiger Effekt für einzelne miRNAs, bzw. unspezifische Effekte der Transfektion mit höherer Konzentration sind demnach nicht auszuschließen. Das Ausmaß der anti-proliferativen Wirkung von *hsa-miR-107* war zudem insgesamt nur gering ausgeprägt. Für *hsa-miR-146b* ließ sich keine Auswirkung auf das Proliferationsverhalten

von Gliomzellen nachweisen, eine Beobachtung die sich mit publizierten Daten anderer Untersucher deckt¹⁹⁶.

4.3.3 Apoptoseaktivität von Gliomzellen nach Transfektion von Vorläufer-miRNAs

Der Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay von Promega ermöglicht die Quantifizierung des programmierten Zelltodes durch die Bestimmung der Aktivität von Caspase 3 und 7, welche als Effektor-Caspasen die Endstrecke der apoptotischen Reaktionskaskade einleiten. Der Versuchsaufbau erfolgte Analog zur Viabilitäts- und Proliferationsbestimmung. Alle drei untersuchten miRNAs zeigten in beiden Zelllinien für beide Konzentrationen eine signifikante Zunahme der Caspase-Aktivität. In Gliomzellen der Linie A172 zeigte die miRNA *hsa-miR-346* die größte Steigerung der Apoptoserate (185 ± 61 a. E.; $p < 0,001$, Tabelle 18). Für *hsa-miR-107* ergab sich ein ähnliches Bild, wobei die erhöhte Standardabweichung das Signifikanzniveau auf $p < 0,01$ senkte (Tabelle 16). Für *hsa-miR-146b* ergab sich der geringste Zuwachs der Caspase-Aktivität (133 ± 48 a. E.; $p < 0,05$, Tabelle 17). Diese für den 10 nM Transfektionsansatz erhobenen Ergebnisse bestätigten sich bei Verwendung eines 25 nM Transfektionsansatzes. Es gab keine wesentliche Steigerung der Apoptoseraten, und auch die Signifikanzniveaus blieben trotz teilweiser Zunahme der Standardabweichung konstant (Abb. 28).

Die Bedeutung von miRNAs für zelluläre Prozesse ist unbestritten und erfreut sich gerade in den letzten Jahren eines stetig wachsenden Interesses. In der Literatur gibt es einige Arbeiten, die für die hier untersuchten miRNAs ebenfalls eine Apoptose-induzierende Wirkung beschrieben. Für die miRNA *hsa-miR-107* zeigten Yamakuchi et al. neben einer reduzierten Proliferationsrate zusätzlich eine gesteigerte Apoptoserate nach Überexpression der *pre-miR-107* in HCT-116 Zellen¹⁹². Nach Transfektion

der Zellen wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) nach vorrausgegangener Färbung mit Propidiumiodid und Anti-Annexin-V Antikörpern bestimmt. Somit bestätigen diese Beobachtungen die hier dargestellten Ergebnisse und die wesentliche Bedeutung der miRNA *hsa-miR-107* für die Regulation der Apoptose.

Die einzige Arbeit, die bisher Apoptose und *hsa-miR-146b* in Zusammenhang brachte, ist die Publikation von Bhaumik et al. aus dem Jahr 2008. Im Rahmen der Untersuchung der suppressiven Wirkung der miRNA *hsa-miR-146* auf die NF- κ B-Aktivität wurde in einem nicht näher dargelegten Verfahren auch das Apoptoseverhalten nach Überexpression von *miR-146a/b* untersucht. Die Ergebnisse wurden mit einem Kontrollkollektiv verglichen und zeigten keinerlei Veränderung¹⁹⁷. Die dort publizierten Daten lassen jedoch kaum einen Vergleich zu den eigenen Befunden zu: (1) wurden die Ergebnisse in einer Brustkrebszelllinie erhoben und (2) wurde in einem nicht beschriebenen Verfahren eine gemeinsame Transfektion sowohl mit der miRNA *hsa-miR-146a* als auch *-146b* durchgeführt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur und der daraus resultierenden Wirkung wäre es denkbar, dass sich etwaige gegensätzlich gerichtete Effekte teilweise kompensieren.

Weiterhin ist anzuführen, dass die mittels Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay gewonnen Ergebnisse stabile Signalemissionswerte zeigten, die das höchste Signifikanzniveau erreichten ($p < 0,001$). Es ist daher festzuhalten, dass die miRNA *hsa-miR-146b* in Gliomzelllinien eine Apoptose-fördernde Wirkung aufweist und ihr somit neben den bereits bekannten Merkmalen der Inhibierung der Invasion und Migration^{179,196} eine weitere tumorsuppressive Eigenschaft zuzuschreiben ist.

Die miRNA *hsa-miR-346* zeigt für beide Zelllinien und beide Konzentrationen jeweils die ausgeprägteste Steigerung der Apoptoserate und das stabilste Signalemissionsverhalten ($p < 0,001$). Aktuell gibt es für die miRNA *hsa-miR-346* keinerlei publizierte Daten bezüglich ihres Apoptose-induzierenden Potentials. Eine Arbeit aus 2010 von Thompson et al. beschreibt die Involvierung dieser miRNA in

die Regulation des Zellzyklus. Über ihre inhibitorische Wirkung auf LIF und somit direkte Einflußnahme in den LIF/NANOG-Signalweg nimmt sie eine wesentliche Stellung in der Regulation von Pluripotenz und Selbsterneuerung von Stammzellen ein^{203,205}.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die eigenen Befunde dafür sprechen, dass alle drei miRNAs eine wesentliche Rolle in der Apoptoseregulation von Gliomzellen spielen, was somit ihre potentiell tumorsuppressive Wirkung unterstreicht. Für die miRNA *hsa-miR-107* handelt es sich hierbei um eine, wenn auch in einer anderen Entität, bereits dokumentierte Eigenschaft, die für die anderen beiden MicroRNAs *hsa-miR-146b* und *-346* in dieser Form vormals noch nie beschrieben wurde.

4.4 *hsa-miR-107* reguliert die *CDK6*-Expression in Gliomzellen

Zur Validierung bioinformatisch vorhergesagter potentieller miRNA-Zielstrukturen wurden mittels quantitativer RT-PCR die zuvor mit *pre-miR-107* transfizierten Gliomzellen auf Expression ausgewählter putativer Zielgene hin untersucht und mit dem Expressionsverhalten in *pre-NCI*-transfizierten Kontrollzellen verglichen. Für das Gen *CDK6* ergab sich eine signifikante Herunterregulierung der Expression in den *pre-miR-107* behandelten Zellen (Abb. 29). In einem Luciferase-Reportergen-Assay konnte *CDK6* nachfolgend als direktes Zielgen der *hsa-miR-107* validiert werden (Abb. 30). Die erniedrigte Expression des Genproduktes Cdk6 in *miR-107* überexprimierenden Gliomzellen konnte auf Protein-Ebene mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 31).

Cdk6 gehört zur Familie der Serin-Threonin Kinasen und ist an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt. Das Protein ist eine Cyclin-D1-abhängige Kinase, welche das Retinoblastom-Protein während des G1-S-Phase-Übergangs phosphoryliert. Hierdurch wird der inhibierende Effekt des Transkriptionsfaktors E2F konterkariert, was eine Progression des Zellzyklus und damit Zellproliferation und Tumorstadium fördert²⁴⁸. Eine tumorfördernde Rolle von Cdk6 in verschiedenen Tumorentitäten ist in der Literatur bereits gut dokumentiert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mäuse, welche defizient für *CDK6* sind, eine Resistenz gegenüber ErbB2-induzierten Mammakarzinomen aufweisen²⁴⁹. Zusätzlich wurde *CDK6* als prognostisch-negativer Marker in Medulloblastomen identifiziert²⁵⁰.

Zwei in jüngerer Vergangenheit publizierte Arbeiten brachten bereits die Expression der miRNA *hsa-miR-107* mit der des Gens *CDK6* in Zusammenhang. Lee et al. (2009) fanden in Pankreaskarzinomzelllinien, dass eine epigenetische Hypermethylierung mit einer daraus resultierenden Repression der miRNA *hsa-miR-107* eine gesteigerte Expression von Cdk6 zur Folge hat¹⁸⁵. Die reziproke Beziehung beider Akteure wurde durch Überexpression der miRNA *in vitro* weiter bestätigt.

In einer Arbeit von Feng et al. (2011) wurde der Zusammenhang zwischen *hsa-miR-107* und *CDK6* im invasiven Magenkarzinom dargelegt¹⁹¹. In Magenkarzinomzelllinien zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Expression der miRNA *hsa-miR-107* und der von *CDK6*. Eine Überexpression der miRNA führte konsequenterweise zur Suppression des Lumineszenzsignals im Luciferase-Assay; ein Effekt, welcher sich auch auf Proteinebene mittels Western Blot bestätigen ließ.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten eigenen Daten, unterstützt durch Publikationen in anderen Entitäten, untermauern somit eine tumorsuppressive Funktion der miRNA *hsa-miR-107* durch direkte Inhibierung von *CDK6* in astrozytären Tumoren. Dies wird durch eine in T98G Gliomzellen nachweisbare Verminderung der Zellproliferation durch *hsa-miR-107* unterstrichen, erklärt aber nicht unbedingt die beobachtete Erhöhung der Aktivität von Caspase 3/7 nach Überexpression dieser miRNA, was vermuten lässt, dass neben *CDK6* noch weitere Zielgene reguliert werden, die Apoptose-regulierende Funktionen aufweisen.

4.4.1 *hsa-miR-146b* reguliert die *EGFR*-Expression in Gliomzellen

Analog zur Identifizierung potentieller Zielstrukturen der miRNA *hsa-miR-107* wurde auch für *hsa-miR-146b* nach möglichen in Gliomen durch diese miRNA regulierten Transkripten gesucht und mit dem *EGFR*-Gen ein interessanter, für die Pathogenese von malignen Gliomen, insbesondere primären Glioblastomen, außerordentlich relevanter Kandidat gefunden. In den eigenen Untersuchungen zeigte sich eine signifikant erniedrigte *EGFR*-Expression in *pre-miR-146b* transfizierten Gliomzellen (Abb. 32). Nachfolgend konnte *EGFR* als direktes durch *hsa-miR-146b* reguliertes Transkript im Luciferase-3'-Reporter-Gen-Assay validiert werden (Abb. 33).

EGFR-Amplifikation und Überexpression sind von wesentlicher Bedeutung in der Pathogenese astrozytärer Gliome und dienen schon heute als prognostischer Marker und möglicher Angriffspunkt selektiver Therapeutika^{68,251,252}.

EGFR-Genamplifikationen finden sich in bis zu 40 % aller primären Glioblastome⁵. Es ist bekannt, dass *EGFR*-Mutanten die Tumorgenität humaner Gliomzellen durch Steigerung der Proliferation und Inhibierung der Apoptose verstärken^{35-37,253}.

Vor dem Hintergrund der herausragenden Bedeutung der *EGFR*-Dysregulation in primären Glioblastomen unterstreichen die in der eigenen Arbeit gezeigten regulatorischen Effekte der miRNA *hsa-miR-146b* auf die *EGFR*-Expression die elementare Bedeutung der miRNAs für die Onkogenese der astrozytären Tumoren im Allgemeinen und die der *hsa-miR-146b* im Speziellen. Ihre tumorsuppressive Regulation eines der wesentlichen Signalwege in primären Glioblastomen zeigt auf eindrucksvolle Weise, welche Rolle miRNAs für das Tumorwachstum von Gliomen spielen können. Die eigenen Ergebnisse wurden zudem kürzlich in einer unabhängigen Studie bestätigt¹⁷⁹.

4.4.2 *hsa-miR-346* reguliert die *SMEA6A*- und *BCL6*-Expression in Gliomzellen

In den Untersuchungen zur Überprüfung der prognostizierten Zielstrukturen von *hsa-miR-346* zeigte sich in der quantitativen RT-PCR eine signifikante Abnahme der Expression für das Gen *SEMA6A* sowie eine deutliche Herunterregulierung der Expression von *BCL6* (Abb. 34). Weiterhin konnte im Luciferase-Reportergen-Assay gezeigt werden, dass eine Überexpression von *pre-miR-346* mit einer signifikanten Abnahme des Luciferasesignals sowohl für *SEMA6A* als auch für *BCL6* einhergeht (Abb. 35). Hierbei handelt es sich um zwei vollständig neue Zielstrukturen der miRNA *hsa-miR-346*, die so zuvor noch nie beschrieben worden sind.

SEMA6A gehört zu der Familie der Semaphorine, einer Gruppe von sezernierten und membrangebundenen Molekülen, deren erste Entdeckung im Zusammenhang mit der Entwicklung des ZNS und der axonalen Orientierung beschrieben wurde²⁵⁴⁻²⁵⁶. In den letzten Jahren konnte jedoch zusätzlich ihre Bedeutung für die Regulation von Zelladhäsion, Zellmotilität, Angiogenese, Immunabwehr und Tumorwachstum belegt werden, so dass die Rolle der Semaphorine für die Tumorgenese immer mehr an Bedeutung gewinnt. Unterschiedliche Semaphorine zeigen hierbei häufig entgegengesetzte Funktionen: So wirken die einen protoonkogen, während die anderen tumorsuppressive Eigenschaften besitzen²⁵⁷⁻²⁶⁰.

Allgemein hin wird *SEMA6A* eine tumorsuppressive Wirkung durch Inhibierung der Angiogenese zugeschrieben. Diese Attribuierung basiert im Wesentlichen auf der Arbeit von Dhanabal et al. (2005), die zeigen konnten, dass eine intraperitoneale Gabe der löslichen extrazellulären Domäne von *SEMA6A* (Sema-ECD) VEGF-induzierte Neovaskularisation in Mäusen inhibiert²⁶¹. Interessanterweise imponierte jedoch auch hier, analog zum Expressionsverhalten von *SEMA6A* in Glioblastomen, eine signifikante Überexpression der *SEMA6A*-mRNA in den untersuchten renalen Tumorgewebeproben im Vergleich zu den nicht-neoplastisch veränderten Gewebeproben. Während der Zusammenhang zwischen Sema-ECD-Gabe und Inhibierung der Neovaskularisation gut reproduzierbar war, so war es Dhanabal et al. nicht möglich, den Rezeptor und die sich anschließende Signalkaskade zu identifizieren, welche für die tumorsuppressive Wirkung verantwortlich sein soll. Es konnte keine Wechselwirkung zwischen Sema-ECD und der transmembranen Einheit von *SEMA6A* nachgewiesen werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass Sema-ECD durch Bindung an einen aktuell noch nicht identifizierten Rezeptor seine Wirkung entfaltet und nicht über den membranassoziierten Rezeptorkomplex *SEMA6A*. Ein Umstand, welcher die widersprüchliche protoonkogene Signatur der *SEMA6A*-Genexpression und ihre vermeintliche tumorsuppressive Wirkung nicht erklärt.

In einer Arbeit aus dem Jahr 2007 untersuchten Gandemer et al. die biologischen Prozesse einer t(12;21)(p13;q22) Translokation in der akuten lymphatischen Leukämie der B-Zellreihe (B-ALL)²⁶². Auch hier zeigte sich ein protoonkogenes Expressionsprofil für SEMA6A mit einer Zunahme der Expression und einer Assoziation zur Zellmotilität.

Die zelluläre Signalwirkung der Semaphorine wird im Wesentlichen über Plexine, aber auch über Neuropiline und Tyrosinkinasen vermittelt^{255,256,260}. *SEMA6A* gehört zur Gruppe der membranassoziierten Semaphorine und entfaltet seine wesentliche Wirkung über die Assoziation mit PlexinA2 und PlexinA4^{255,263}.

Für PlexinA4 konnten Kigel et al. (2011) zeigen, dass eine Inhibierung von PlexinA4 in U87MG Glioblastomzellen mit einer deutlichen Abnahme der Proliferationsrate und Reduktion der Tumorzellformationen einhergeht²⁶⁴. PlexinA4 bildete stabile Komplexe mit dem Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) und verstärkte die VEGF-induzierte VEGFR2-Phosphorylierung in Endothelzellen. Ein Effekt, welcher durch die autokrine Wirkung von *SEMA6B* noch zusätzlich verstärkt wurde. Eine Verarbeitung des *SEMA6A*-Signals durch PlexinA4 konnten die Autoren in der verwendeten humanen Umbilikalvenen-Endothelzelllinie (HUVEC) nicht nachweisen. Es ist bekannt, dass dieselben Semaphorine in unterschiedlichen Zelllinien und Geweben unterschiedlichste Aktivitäten zeigen. Ein Umstand, der momentan durch die verschiedenen Semaphorin-Rezeptorkomplexe sowie deren Aktivierung über mannigfaltige Signalwege in unterschiedlichen Zellen zu verschiedenen Stadien der Entwicklung erklärt wird. Sie gelten daher als Musterbeispiel für pleiotrope Signalmoleküle^{255,260}. Es ist somit nicht auszuschließen, dass entgegen der fehlenden Aktivierung von PlexinA4 durch SEMA6A in HUVEC eine Aktivierung in astrozytären Tumorzellen möglich ist.

In Zusammenschau der aktuellen wissenschaftlichen Literatur für *SEMA6A* ist die vorherrschende Meinung einer ausschließlich tumorsuppressiven Eigenschaft nicht

aufrechtzuhalten. Viel mehr muss aufgrund der für mehrere Entitäten gut belegten protoonkogenen Expressionssignatur^{257,261,262} sowie der bekannten Wirkung des Effektorplexins A4²⁶⁴ zumindest von einer in bestimmten Geweben bestehenden protoonkogenen Eigenschaft ausgegangen werden. Die eigenen Ergebnisse legen eine direkte Regulation von *SEMA6A* durch die miRNA *hsa-miR-346* nahe. Zwar fehlen zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit noch die Bestätigung der Luciferase-Reportergen-Assays mit deletiertem Vektor und der abschließende Nachweis der Zielstruktur auf Proteinebene. Trotzdem deutet alles auf die Identifikation einer neuen Zielstruktur für *hsa-miR-346* und ihre daraus resultierende tumorsuppressive Wirkung in astrozytären Gliomen hin.

Das *B-Cell Lymphoma 6*-Gen kodiert für den sequenzspezifischen Transkriptionsrepressor BCL6. BCL6 spielt eine entscheidende Rolle während der Reifung der B-Zellen in den Keimzentren der Lymphknoten. Es verhindert die terminale B-Zell-Differenzierung durch Hemmung von *PRDM1*, *CD40* und *p53* sowie die Apoptose durch *BCR*. Auf der einen Seite wird somit eine verfrühte Ausscheidung der Zentroblasten aus dem Keimzentrum vermieden, während es auf der anderen Seite die Entstehung einer malignen Transformation begünstigt²⁶⁵⁻²⁶⁷.

Allgemeinhin gilt *BCL6* als Protoonkogen und wesentlicher Faktor in der Entstehung von hämatoonkologischen Erkrankungen²⁶⁷. Erstmals wurde seine protoonkogene Relevanz für die Lymphomentstehung 1995 von Ye et al. beschrieben²⁶⁸. Hier konnte gezeigt werden, dass eine chromosomale Translokation ursächlich ist für die Überexpression von BCL6 in diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen. 2006 gelang es Phan et al. eine wesentliche Zielstruktur von *BCL6* zu identifizieren, *p53*²⁶⁹. Sie konnten zeigen, dass BCL6 in der Lage ist, die *p53*-Expression zu unterdrücken und hierdurch die durch DNA-Schäden verursachte Induzierung der Apoptose zu modulieren. Hierzu bindet das BCL6-Protein an spezifische DNA-Bindungsstellen im Bereich der Promotorregion von *p53* und unterdrückt die Transkription. Dieser Effekt kann durch Inhibierung von BCL6 mittels spezifischer siRNA aufgehoben werden.

Hurtz et al. (2011) gelang es, die Rolle von *BCL6* in für die chronisch myeloische Leukämie (CML) weiter zu charakterisieren. Sie konnten zeigen, dass *BCL6* entscheidend für die Ausbildung von Leukämie-induzierenden Zellen (LIZ) ist. Hierbei gilt *BCL6* als Effektorgen von FoxO3A, einem Protein der Familie der Forkhead Box Proteine, welche als Transkriptionsfaktoren eine wesentliche Rolle für Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Tumorentstehung spielen²⁷⁰⁻²⁷³. Durch seine Repression des ARF/p53-Signalweges verhindert *BCL6* die zelluläre Seneszenz und steigert das Selbsterneuerungspotential^{274,275}.

Die MicroRNA *hsa-miR-346* wurde in den bis dato publizierten wissenschaftlichen Arbeiten vornehmlich mit der Immunantwort^{205,276,277}, psychischen Erkrankungen²⁰⁶ und dem follikulären Schilddrüsenkarzinom in Zusammenhang gebracht²⁰². Die Ergebnisse der eigenen Arbeit deuten jedoch auf eine sehr viel weitreichendere Beteiligung an der Onkogenese als Tumorsuppressorkandidat hin. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit stehen die Bestätigungstests des Luciferase-Reporter-Gen-Assays mit deletiertem Vektor und der abschließende Nachweis der Zielstruktur auf Proteinebene noch aus, dennoch weist alles auf eine direkte Regulierung des Gens *BCL6* durch *hsa-miR-346* hin. Es konnte somit aller Voraussicht nach eine weitere neue Zielstruktur der miRNA *hsa-miR-346* identifiziert werden und ihre Bedeutung als tumorsuppressive miRNA zusätzlich gestärkt werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde die Expression von zwölf auf dem langen Arm von Chromosom 10 in der Region 10q24-qter lokalisierten Micro-RNAs (miRNAs) in einer Serie von 64 astrozytären Gliomen unterschiedlichen Malignitätsgrades im Vergleich zu normalem Hirngewebe bestimmt. Die untersuchte Tumorserie umfasste sechs diffuse Astrozytome (WHO Grad II), acht anaplastische Astrozytome (WHO Grad III), 10 sekundäre Glioblastome (WHO Grad IV) und 40 primäre Glioblastome (WHO Grad IV). Insgesamt zeigten drei der 12 miRNAs, d.h. *hsa-miR-107*, *hsa-miR-146b* und *hsa-miR-346*, jeweils eine signifikant verminderte Expression in den Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe und stellen daher Tumorsuppressorkandidaten dar. Die miRNAs *hsa-miR-107* und *-146b* wurden bereits zuvor in verschiedenen bösartigen Tumoren als potentielle Tumorsuppressorkandidaten beschrieben, während für die miRNA *hsa-miR-346* bislang noch keine Rolle in der Tumorphathogenese bekannt war. In weitergehenden molekularen Analysen mittels Pyrosequenzierung von Natriumbisulfit-modifizierter DNA ließ sich für diese miRNA in den untersuchten Gliomen eine epigenetische DNA-Modifikation im Sinne einer Hypermethylierung von 5'-CpG-reichen Sequenzen als ursächlich für die signifikant verminderte Expression nachweisen. *In vitro* Analysen in Gliomzelllinien ergaben funktionelle Hinweise für tumorsuppressive Eigenschaften der drei miRNA-Kandidaten. So zeigte sich eine signifikante Verminderung der Viabilität der Tumorzellen durch Überexpression von *pre-miR-107*, eine Hemmung der Zellproliferation bei Überexpression von *pre-miR-107* und *-346* sowie eine ausgeprägte Steigerung der Apoptoserate von Gliomzellen als Folge einer Überexpression einer der drei untersuchten miRNAs. Für die drei untersuchten miRNAs gelang es nachfolgend, potentiell regulierte Zielgene zu identifizieren. So führte eine Überexpression der jeweiligen *pre-miRNAs* zu einer deutlich erniedrigten Expression der Gene *CDK6*

(*hsa-miR-107*), *EGFR* (*hsa-miR-146b*) bzw. *SEMA6A* und *BCL6* (*hsa-miR-346*). In 3'-UTR-Luciferase Assays ließ sich die direkte Regulation dieser Zielgene durch *hsa-miR-107* bzw. *hsa-miR-146b* nachweisen und mittels Western-Blot bestätigen. Für *hsa-miR-346* stehen zum jetzigen Zeitpunkt die Validierung der Ergebnisse des Luciferase-Reportergen-Assays mit deletiertem Vektor und der abschließende Nachweis der Zielstrukturen auf Proteinebene noch aus.

Die eigenen Ergebnisse untermauern die Bedeutung einer aberranten Expression von bestimmten miRNAs in der Pathogenese maligner astrozytärer Tumoren und implizieren mit *hsa-miR-107*, *hsa-miR-146b* und *hsa-miR-346* drei neue Tumorsuppressorkandidaten auf dem langen Arm von Chromosom 10 als Gliom-assoziierte tumorsuppressive miRNAs. Weitere Studien werden nötig sein, um die genauen molekularen Mechanismen der beobachteten Dysregulation weiter zu charakterisieren. Zusätzlich rechtfertigt die immer größer werdende Rolle der miRNAs in Diagnostik und Therapie weiterführende Untersuchungen, um am Ende vielleicht doch das komplexe Netzwerk dieser kleinen Nukleotidfragmente zu entschlüsseln.

6 Literaturverzeichnis

1. Böcker W, Heitz PU. Pathologie. Elsevier, Urban&FischerVerlag; 2008.
2. Tonn J-C, Westphal M, Rutka JT. Oncology of CNS Tumors. Springer; 2009.
3. CBTRUS (2011). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2007. Source: Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale; Available from: <http://www.cbtrus.org/2011-NPCR-SEER/WEB-0407-Report-3-3-2011.pdf>
4. Hirntumor - Infos für Patienten | Krebsgesellschaft [Internet]. krebsgesellschaft.de. [cited 2011 Apr. 1]; Available from: http://www.krebsgesellschaft.de/hirntumor_uebersicht,4183.html
5. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007;114(2):97–109.
6. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007;21(21):2683–710.
7. Barnett GH, editor. High-Grade Gliomas: Diagnosis and Treatment (Current Clinical Oncology). 1st ed. Humana Press; 2010.
8. Yamanaka R, Saya H. Molecularly targeted therapies for glioma. *Ann Neurol* 2009;66(6):717–29.
9. Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Astrocytic tumors. *Recent Results Cancer Res* 2009;171:3–24.
10. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64(6):479–89.
11. Frolov MV, Dyson NJ. Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 11):2173–81.

12. Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, et al. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol* 1994;36(5):714–21.
13. Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahloun AG, Meltzer PS, Collins VP. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res* 1996;56(22):5141–5.
14. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 1994;54(24):6321–4.
15. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Bruner JM, et al. Hypermethylation of the CpG island of p16/CDKN2 correlates with gene inactivation in gliomas. *Oncogene* 1996;13(8):1615–9.
16. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):594–604.
17. Hoh J, Jin S, Parrado T, Edington J, Levine AJ, Ott J. The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(13):8467–72.
18. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 2006;13(6):1027–36.
19. He J, Reifenberger G, Liu L, Collins VP, James CD. Analysis of glioma cell lines for amplification and overexpression of MDM2. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;11(2):91–6.
20. Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(14):8292–7.
21. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998;92(6):713–23.
22. Riemenschneider MJ, Büschges R, Wolter M, et al. Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res* 1999;59(24):6091–6.

23. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 2009;100(12):2235–41.
24. Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* 2004;3(10):1221–4.
25. Gallia GL, Rand V, Siu I-M, et al. PIK3CA gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Res* 2006;4(10):709–14.
26. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998;273(22):13375–8.
27. Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol* 2003;13(4):507–18.
28. Xiao A, Wu H, Pandolfi PP, Louis DN, Van Dyke T. Astrocyte inactivation of the pRb pathway predisposes mice to malignant astrocytoma development that is accelerated by PTEN mutation. *Cancer Cell* 2002;1(2):157–68.
29. Xiao A, Yin C, Yang C, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Van Dyke T. Somatic induction of Pten loss in a preclinical astrocytoma model reveals major roles in disease progression and avenues for target discovery and validation. *Cancer Res* 2005;65(12):5172–80.
30. Wang H, Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WSL, Fuller GN. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest* 2004;84(8):941–51.
31. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305(5684):626–9.
32. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000;60(5):1383–7.
33. Grandal MV, Zandi R, Pedersen MW, Willumsen BM, van Deurs B, Poulsen HS. EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes. *Carcinogenesis* 2007;28(7):1408–17.

34. Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(10):5724–9.
35. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(16):7727–31.
36. Nagane M, Coufal F, Lin H, Böglér O, Cavenee WK, Huang HJ. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 1996;56(21):5079–86.
37. Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang H-JS, Furnari FB, Cavenee WK. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res* 2002;62(22):6764–9.
38. Westermarck B, Heldin CH, Nistér M. Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia* 1995;15(3):257–63.
39. Hermanson M, Funa K, Hartman M, et al. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 1992;52(11):3213–9.
40. Plate KH, Breier G, Farrell CL, Risau W. Platelet-derived growth factor receptor-beta is induced during tumor development and upregulated during tumor progression in endothelial cells in human gliomas. *Lab Invest* 1992;67(4):529–34.
41. Clarke ID, Dirks PB. A human brain tumor-derived PDGFR- α deletion mutant is transforming. *Oncogene* 2003;22(5):722–33.
42. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 2007;318(5848):287–90.

43. Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2000;60(4):847–53.
44. Röhn TA, Wagenknecht B, Roth W, et al. CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release. *Oncogene* 2001;20(31):4128–37.
45. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 2):265–7.
46. Weller M, Malipiero U, Aguzzi A, Reed JC, Fontana A. Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J Clin Invest* 1995;95(6):2633–43.
47. Ellison DW, Steart PV, Gatter KC, Weller RO. Apoptosis in cerebral astrocytic tumours and its relationship to expression of the bcl-2 and p53 proteins. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995;21(4):352–61.
48. Stegh AH, DePinho RA. Beyond effector caspase inhibition: Bcl2L12 neutralizes p53 signaling in glioblastoma. *Cell Cycle* 2011;10(1):33–8.
49. Stegh AH, Kim H, Bachoo RM, et al. Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma. *Genes Dev* 2007;21(1):98–111.
50. Melino G, Knight RA, Nicotera P. How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ* 2005;12 Suppl 2:1457–62.
51. Maher EA, Brennan C, Wen PY, et al. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res* 2006;66(23):11502–13.
52. Fischer I, Gagner J-P, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in Gliomas: Biology and Molecular Pathophysiology. *Brain Pathology* 2006;15(4):297–310.
53. Machein M, Miguel LS. *Recent Results in Cancer Research*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009.

54. Stiver SI. Angiogenesis and its role in the behavior of astrocytic brain tumors. *Front Biosci* 2004;9:3105–23.
55. Watnick RS, Cheng Y-N, Rangarajan A, Ince TA, Weinberg RA. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2003;3(3):219–31.
56. Shchors K, Shchors E, Rostker F, Lawlor ER, Brown-Swigart L, Evan GI. The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta. *Genes Dev* 2006;20(18):2527–38.
57. Blum R, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Kloog Y. Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha, causing glycolysis shutdown and cell death. *Cancer Res* 2005;65(3):999–1006.
58. Phung TL, Ziv K, Dabydeen D, et al. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell* 2006;10(2):159–70.
59. Volpert OV, Alani RM. Wiring the angiogenic switch: Ras, Myc, and Thrombospondin-1. *Cancer Cell* 2003;3(3):199–200.
60. Crivellato E. The role of angiogenic growth factors in organogenesis. *Int J Dev Biol* 2011;55(4-5):365–75.
61. Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol* 2003;20(2):65–72.
62. Kanamori M, Vanden Berg SR, Bergers G, Berger MS, Pieper RO. Integrin beta3 overexpression suppresses tumor growth in a human model of gliomagenesis: implications for the role of beta3 overexpression in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 2004;64(8):2751–8.
63. Song SW, Fuller GN, Khan A, et al. Iip45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(24):13970–5.
64. Hu Z, Yue X, Shi G, et al. Corpus callosum deficiency in transgenic mice expressing a truncated ephrin-A receptor. *J Neurosci* 2003;23(34):10963–70.

65. Liu BP, Cafferty WBJ, Budel SO, Strittmatter SM. Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 2006;361(1473):1593–610.
66. Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, et al. Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(12):880–7.
67. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):997–1003.
68. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 2005;353(19):2012–24.
69. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994;145(5):1175–90.
70. Nishizaki T, Kubota H, Harada K, et al. Clinical evidence of distinct subgroups of astrocytic tumors defined by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* 2000;31(5):608–14.
71. Hui AB, Lo KW, Yin XL, Poon WS, Ng HK. Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 2001;81(5):717–23.
72. Burton EC, Lamborn KR, Feuerstein BG, et al. Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res* 2002;62(21):6205–10.
73. Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, et al. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 2003;63(7):1602–7.
74. Misra A, Pellarin M, Nigro J, et al. Array comparative genomic hybridization identifies genetic subgroups in grade 4 human astrocytoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(8):2907–18.
75. Nigro JM, Misra A, Zhang L, et al. Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma. *Cancer Res* 2005;65(5):1678–86.

76. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006;9(3):157–73.
77. Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, et al. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 2001;61(18):6885–91.
78. Godard S, Getz G, Delorenzi M, et al. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res* 2003;63(20):6613–25.
79. van den Boom J, Wolter M, Kuick R, et al. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 2003;163(3):1033–43.
80. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343(19):1350–4.
81. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170(5):1445–53.
82. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97.
83. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003;9(3):277–9.
84. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004;16(6):861–5.
85. Lewis BP, Shih I-H, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003;115(7):787–98.
86. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431(7006):350–5.
87. Munker R, Calin GA. MicroRNA profiling in cancer. *Clin Sci* 2011;121(4):141–58.

88. Babashah S, Soleimani M. The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *Eur J Cancer* 2011;47(8):1127–37.
89. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:199–227.
90. Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside. *Brain Pathol* 2008;18(1):122–9.
91. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;14(10A):1902–10.
92. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 2005;11(3):241–7.
93. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 2002;16(6):720–8.
94. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294(5543):853–8.
95. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002;21(17):4663–70.
96. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10(12):1957–66.
97. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13(12):1097–101.
98. Haurie V, Durrieu-Gaillard S, Dumay-Odelot H, et al. Two isoforms of human RNA polymerase III with specific functions in cell growth and transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(9):4176–81.
99. Han J, Lee Y, Yeom K-H, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006;125(5):887–901.

100. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415–9.
101. Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* 2003;9(1):112–23.
102. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 2005;24(1):138–48.
103. Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 2004;32(16):4776–85.
104. Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 2004;14(4):156–9.
105. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004;303(5654):95–8.
106. Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(3):223–9.
107. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17(24):3011–6.
108. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293(5531):834–8.
109. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115(2):199–208.
110. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003;115(2):209–16.
111. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(5):376–85.
112. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120(1):15–20.

113. Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the argonautes. *Nat Chem Biol* 2007;3(1):36–43.
114. Azuma-Mukai A, Oguri H, Mituyama T, et al. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(23):7964–9.
115. Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem* 2009;284(27):17897–901.
116. Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(4):545–62.
117. Yekta S, Shih I-H, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004;304(5670):594–6.
118. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004;15(2):185–97.
119. Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 2004;10(10):1518–25.
120. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007;27(1):91–105.
121. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 2007;129(6):1141–51.
122. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 2007;447(7146):823–8.
123. Petersen CP, Bordeleau M-E, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006;21(4):533–42.
124. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 2006;20(14):1885–98.

125. Gonzalez S, Pisano DG, Serrano M. Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. *Cell Cycle* 2008;7(16):2601–8.
126. Place RF, Li L-C, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(5):1608–13.
127. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF- κ B signaling. *J Mol Cell Biol* 2011;
128. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9(2):102–14.
129. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005;435(7043):839–43.
130. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 2007;6(13):1586–93.
131. Camps C, Buffa FM, Colella S, et al. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(5):1340–8.
132. Chang T-C, Yu D, Lee Y-S, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 2008;40(1):43–50.
133. Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006;9(6):435–43.
134. Obernosterer G, Leuschner PJF, Alenius M, Martinez J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* 2006;12(7):1161–7.
135. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 2006;20(16):2202–7.
136. Tuccoli A, Poliseno L, Rainaldi G. miRNAs regulate miRNAs: coordinated transcriptional and post-transcriptional regulation. *Cell Cycle* 2006;5(21):2473–6.

137. Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, et al. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 2007;131(7):1273–86.
138. Zhang L, Huang J, Yang N, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(24):9136–41.
139. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(9):2999–3004.
140. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 2007;315(5818):1576–9.
141. Clop A, Marcq F, Takeda H, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 2006;38(7):813–8.
142. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer* 2008;122(5):969–77.
143. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6(11):857–66.
144. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334(4):1351–8.
145. Shi L, Cheng Z, Zhang J, et al. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* 2008;1236:185–93.
146. Dong H, Luo L, Hong S, et al. Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Syst Biol* 2010;4:163.
147. Sun L, Yan W, Wang Y, et al. MicroRNA-10b induces glioma cell invasion by modulating MMP-14 and uPAR expression via HOXD10. *Brain Res* 2011;1389:9–18.
148. Song L, Huang Q, Chen K, et al. miR-218 inhibits the invasive ability of glioma cells by direct downregulation of IKK- β . *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402(1):135–40.

149. Kwak H-J, Kim Y-J, Chun K-R, et al. Downregulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas. *Oncogene* 2011;
150. Nan Y, Han L, Zhang A, et al. MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells. *Brain Res* 2010;1359:14–21.
151. Würdinger T, Tannous BA, Saydam O, et al. miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 2008;14(5):382–93.
152. Fang L, Deng Z, Shatseva T, et al. MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- β 8. *Oncogene* 2011;30(7):806–21.
153. Lawler S, Chiocca EA. Emerging functions of microRNAs in glioblastoma. *J Neurooncol* 2009;92(3):297–306.
154. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18(24):5294–9.
155. Merante F, Raha S, Reed JK, Proteau G. The simultaneous isolation of RNA and DNA from tissues and cultured cells. *Methods Mol Biol* 1994;31:113–20.
156. Hurley J, Roberts D, Bond A, Keys D, Chen C. Stem-loop RT-qPCR for microRNA expression profiling. *Methods Mol Biol* 2012;822:33–52.
157. www3.appliedbiosystems.com. [cited 2012 May 17]; Available from: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf
158. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
159. Identification and Functional Analyses of MicroRNAs Involved in the ... - Bastian Malzkorn - Google Books [Internet]. books.google.de. [cited 2012 Apr. 21]; Available from: http://books.google.de/books/about/Identification_and_functional_analyses_o.html?id=4zTcXwAACA&redir_esc=y

160. Desaminierung von Cytosin zu Uracil [Internet]. grailmaster.com. [cited 2012 Apr. 29]; Available from:
<http://www.grailmaster.com/genetics/diplomhtml/Image139.gif>
161. UCSC Genome Browser Home [Internet]. genome.ucsc.edu. [cited 2012 May 17]; Available from: <http://genome.ucsc.edu/>
162. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. Nat Protoc 2007;2(9):2265–75.
163. QIAGEN - PyroMark Q24 - For methylation analysis, sequence variation analysis, and microbial identification using Pyrosequencing technology [Internet]. qiagen.com. [cited 2012 May 17]; Available from:
<http://www.qiagen.com/products/pyromarkq24.aspx>
164. qiagen.com [Internet]. [cited 2012 May 17]. Available from:
<http://www.qiagen.com>
165. Pyrosequenzierung [Internet]. invitrogen.com. [cited 2012 Apr. 29]; Available from:
http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/applications/nucleic_acid_purification/data_diagram/275_wide.Par.41588.Image.275.266.1.enzyme-cascade-system-jpg.gif
166. roche-applied-science.com. [cited 2012 May 17]; Available from:
http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/CELL_MAN/apoptosis_094_097.pdf
167. promega.com. [cited 2012 May 17]; Available from:
<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%20Glo%20Luminescent%20Cell%20Viability%20Assay%20Protocol.pdf>
168. Promega Corporation. Technical Bulletin [Internet]. promega.com. 2009 [cited 2011 May 10];:18. Available from:
<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/ApoONE%20Homogeneous%20Caspase%203%207%20Assay%20Protocol.ashx>
169. Promega Corporation. Technical Bulletin [Internet]. promega.com. 2009 [cited 2011 May 10]; Available from:
<https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/siCHECK%20Vectors%20Protocol.ashx>

170. invittek.de. [cited 2012 May 17]; Available from:
http://www.invittek.de/e1531/e1658/e2414/e2443/e2452/ip_manual6617/MSBRapace,Vario,FragmentCleanupundDNAExtraction.pdf
171. Promega Corporation. Promega Corporation [Internet]. promega.com. 2010 [cited 2011 May 10]; Available from:
<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Dual%20Glo%20Luciferase%20Assay%20System%20Protocol.ashx>
172. Human chr10:87,349,292-88,116,230 - UCSC Genome Browser v266 [Internet]. genome.ucsc.edu. [cited 2012 May 11]; Available from:
<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?hgHubConnect.destUrl=..%2Fcgi-bin%2FhgTracks&clade=mammal&org=Human&db=hg18&position=chr10%3A87349292-88116230&hgt.suggest=GRID1&hgt.suggestTrack=knownGene&Submit=submit&hgsid=265129473&knownGene=pack>
173. Human chr10:91,332,729-91,395,195 - UCSC Genome Browser v266 [Internet]. genome.ucsc.edu. [cited 2012 May 12]; Available from:
<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?hgHubConnect.destUrl=..%2Fcgi-bin%2FhgTracks&clade=mammal&org=Human&db=hg18&position=chr10%3A91332729-91395195&hgt.suggest=PANK1&hgt.suggestTrack=knownGene&Submit=submit&hgsid=265389815&knownGene=pack>
174. Human chr10:104,171,445-104,201,144 - UCSC Genome Browser v251 [Internet]. genome.ucsc.edu. [cited 2011 May 21]; Available from:
http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?insideX=118&revCmplDisp=0&hgsid=195956073&hgt_doJsCommand=&hgt.in2=+3x+&position=chr10%3A104171445-104201144&hgtgroup_map_close=1&hgtgroup_phenDis_close=1&hgtgroup_genes_close=0&hgtgroup_rna_close=1&hgtgroup_expression_close=1&hgtgroup_regulation_close=0&hgtgroup_compGeno_close=0&hgtgroup_neandertal_close=0&hgtgroup_denisova_close=0&hgtgroup_varRep_close=0&hgtgroup_encodeGenes_close=1&hgtgroup_encodeTxLevels_close=1&hgtgroup_encodeChip_close=1&hgtgroup_encodeChrom_close=1&hgtgroup_encodeCompAndVar_close=1

175. CpG Island Info [Internet]. genome.ucsc.edu. [cited 2012 May 19]; Available from: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=270638829&o=91394217&t=91395028&g=cpgIslandExt&i=CpG%3A+93>
176. CpG Island Info 47 [Internet]. genome.ucsc.edu. [cited 2011 May 22]; Available from: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=196005711&o=88012620&t=88013259&g=cpgIslandExt&i=CpG%3A+47>
177. CpG Island Info 356 [Internet]. genome.ucsc.edu. [cited 2011 May 22]; Available from: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=196005711&o=88112904&t=88117344&g=cpgIslandExt&i=CpG%3A+356>
178. Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Novel insights into the pathogenesis of gliomas based on large-scale molecular profiling approaches. *Curr Opin Neurol* 2009;22(6):619–24.
179. Katakowski M, Zheng X, Jiang F, Rogers T, Szalad A, Chopp M. MiR-146b-5p suppresses EGFR expression and reduces in vitro migration and invasion of glioma. *Cancer Invest* 2010;28(10):1024–30.
180. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10(10):704–14.
181. Yin XL, Pang JC, Liu YH, et al. Analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 10q, 11, and 16 in medulloblastomas. *J Neurosurg* 2001;94(5):799–805.
182. Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs as a potential magic bullet in cancer. *Future Oncol* 2006;2(1):73–82.
183. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005;33(4):1290–7.
184. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2007;26(28):4148–57.

185. Lee K-H, Lotterman C, Karikari C, et al. Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2009;9(3):293–301.
186. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006;24(29):4677–84.
187. Neoptolemos JP. *Handbook of Pancreatic Cancer*. Springer Verlag; 2009.
188. Bellizzi AM, Frankel WL. *Pancreatic Pathology: A Practical Review*. *Labmedicine* 2009;40(7):417–26.
189. Iacobuzio-Donahue C, Hruban R. Gene expression in neoplasms of the pancreas: Applications to diagnostic pathology. *Adv Anat Pathol* 2003;10(3):125–34.
190. Gumbs AA, Moore PS, Falconi M, et al. Review of the clinical, histological, and molecular aspects of pancreatic endocrine neoplasms. *J Surg Oncol* 2002;81(1):45–53.
191. Feng L, Xie Y, Zhang H, Wu Y. miR-107 targets cyclin-dependent kinase 6 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in gastric cancer cells. *Med Oncol* 2012;29(2):856–63.
192. Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, et al. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107(14):6334–9.
193. Ayala de la Pena F, Kanasaki K, Kanasaki M, Tangirala N, Maeda G, Kalluri R. Loss of p53 and acquisition of angiogenic microRNA profile is insufficient to facilitate progression of bladder urothelial carcinoma in situ to invasive carcinoma. *J Biol Chem* 2011;286(23):20778–87.
194. Ying S-Y, Lin S-L. Current perspectives in intronic micro RNAs (miRNAs). *J Biomed Sci* 2006;13(1):5–15.
195. Wilfred BR, Wang W-X, Nelson PT. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* 2007;91(3):209–17.

196. Xia H, Qi Y, Ng SS, et al. microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs. *Brain Res* 2009;1269:158–65.
197. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* 2008;27(42):5643–7.
198. Chou C-K, Chen R-F, Chou F-F, et al. miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. *Thyroid* 2010;20(5):489–94.
199. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007;129(7):1401–14.
200. Osaki M, Takeshita F, Ochiya T. MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers* 2008;13(7):658–70.
201. Krutovskikh VA, Herceg Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers. *Bioessays* 2010;32(10):894–904.
202. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3584–91.
203. Oskowitz AZ, Lu J, Penfornis P, et al. Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: Regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(47):18372–7.
204. Silva J, Smith A. Capturing pluripotency. *Cell* 2008;132(4):532–6.
205. Thompson LH, Whiston RA, Rakhimov Y, et al. A LIF/Nanog axis is revealed in T lymphocytes that lack MARCH-7, a RINGv E3 ligase that regulates the LIF-receptor. *Cell Cycle* 2010;9(20):4213–21.
206. Zhu Y, Kalbfleisch T, Brennan MD, Li Y. A MicroRNA gene is hosted in an intron of a schizophrenia-susceptibility gene. *Schizophr Res* 2009;109(1-3):86–9.

207. Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, et al. Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am J Hum Genet* 2005;77(6):918–36.
208. Guo S-Z, Huang K, Shi Y-Y, et al. A case-control association study between the GRID1 gene and schizophrenia in the Chinese Northern Han population. *Schizophr Res* 2007;93(1-3):385–90.
209. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007;128(4):635–8.
210. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128(4):683–92.
211. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007;128(4):669–81.
212. Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther* 2007;6(8):1284–8.
213. Lu L, Katsaros D, la Longrais de IAR, Sochirca O, Yu H. Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. *Cancer Res* 2007;67(21):10117–22.
214. Lujambio A, Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle* 2007;6(12):1455–9.
215. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007;67(4):1424–9.
216. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008;13(6):496–506.
217. Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, et al. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* 2008;27(27):3880–8.
218. Kozaki K-I, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 2008;68(7):2094–105.

219. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, et al. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* 2008;214(1):17–24.
220. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68(11):4123–32.
221. Datta J, Kutay H, Nasser MW, et al. Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 2008;68(13):5049–58.
222. Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* 2006;5(19):2220–2.
223. Fabbri M. MicroRNAs and cancer epigenetics. *Curr Opin Investig Drugs* 2008;9(6):583–90.
224. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005;7(3):413–21.
225. Raponi M, Dossey L, Jatkoa T, et al. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res* 2009;69(14):5776–83.
226. Levati L, Alvino E, Pagani E, et al. Altered expression of selected microRNAs in melanoma: antiproliferative and proapoptotic activity of miRNA-155. *Int J Oncol* 2009;35(2):393–400.
227. Jukic DM, Rao UNM, Kelly L, et al. MicroRNA profiling analysis of differences between the melanoma of young adults and older adults. *J Transl Med* 2010;8:27.
228. Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2009;69(4):1279–83.
229. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany NY)* 2009;1(4):402–11.

230. Perry MM, Williams AE, Tsitsiou E, Lerner-Svensson HM, Lindsay MA. Divergent intracellular pathways regulate interleukin-1beta-induced miR-146a and miR-146b expression and chemokine release in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 2009;583(20):3349–55.
231. Takahashi Y, Satoh M, Minami Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. *Clin Sci* 2010;119(9):395–405.
232. Zhu J, Yao X. Use of DNA methylation for cancer detection: promises and challenges. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(1):147–54.
233. Karius T, Schnekenburger M, Ghelfi J, Walter J, Dicato M, Diederich M. Reversible epigenetic fingerprint-mediated glutathione-S-transferase P1 gene silencing in human leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol* 2011;81(11):1329–42.
234. Pallasch CP, Patz M, Park YJ, et al. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;114(15):3255–64.
235. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(36):13556–61.
236. human chr10:86,582,353-88,883,169 - ucsc genome browser v251CpG 356, miR-346 [Internet]. genome.ucsc.edu. [cited 2011 May 22]; Available from: http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?insideX=118&revCmplDisp=0&hgid=196005711&hgt_doJsCommand=&hgt.in1=1.5x&position=chr10%3A86582353-88883169&hgtgroup_map_close=1&hgtgroup_phenDis_close=1&hgtgroup_genes_close=0&hgtgroup_rna_close=1&hgtgroup_expression_close=1&hgtgroup_regulation_close=0&hgtgroup_compGeno_close=0&hgtgroup_neandertal_close=0&hgtgroup_denisova_close=0&hgtgroup_varRep_close=0&hgtgroup_encodeGenes_close=1&hgtgroup_encodeTxLevels_close=1&hgtgroup_encodeChip_close=1&hgtgroup_encodeChrom_close=1&hgtgroup_encodeCompAndVar_close=1
237. Wu X, Wu S, Tong L, et al. miR-122 affects the viability and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Scand J Gastroenterol* 2009;44(11):1332–9.

238. Kefas B, Comeau L, Erdle N, Montgomery E, Amos S, Purow B. Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells. *Neuro-oncology* 2010;12(11):1102–12.
239. Pousette A, Akerlöf E, Lundin A, Rosenborg L, Fredricsson B. On the use of adenosine triphosphate for estimation of motility and energy status in human spermatozoa. *Int J Androl* 1986;9(5):331–40.
240. Beckers B, Lang HR, Weber W, Pranada F, Schweizer K. Application of intracellular ATP determination in lymphocytes for HLA-typing. *J Biolumin Chemilumin* 1986;1(2):47–51.
241. Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995;55(22):5276–82.
242. Sughrue ME, Rutkowski MJ, Kane AJ, Parsa AT. Human glioma demonstrates cell line specific results with ATP-based chemiluminescent cellular proliferation assays. *J Clin Neurosci* 2010;17(12):1573–7.
243. Kurbacher CM, Cree IA. Chemosensitivity testing using microplate adenosine triphosphate-based luminescence measurements. *Methods Mol Med* 2005;110:101–20.
244. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition. 4th ed. Garland Science; 2002.
245. Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1993;160(1):81–8.
246. Suszynski TM, Wildey GM, Falde EJ, et al. The ATP/DNA ratio is a better indicator of islet cell viability than the ADP/ATP ratio. *Transplant Proc* 2008;40(2):346–50.
247. Chiocca EA, Lawler SE. The many functions of microRNAs in glioblastoma. *World Neurosurg.* 2010;73(6):598–601.
248. Tomita T. Cyclin-dependent kinase (cdk6) and p16 in pancreatic endocrine neoplasms. *Pathology* 2004;36(6):566–70.

249. Landis MW, Pawlyk BS, Li T, Sicinski P, Hinds PW. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006;9(1):13–22.
250. Mendrzyk F, Radlwimmer B, Joos S, et al. Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2005;23(34):8853–62.
251. Jungbluth AA, Stockert E, Huang H-JS, et al. A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(2):639–44.
252. Nagane M, Narita Y, Mishima K, et al. Human glioblastoma xenografts overexpressing a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor sensitized to cisplatin by the AG1478 tyrosine kinase inhibitor. *J Neurosurg* 2001;95(3):472–9.
253. Huang Y, Zou Q, Song H, et al. A study of miRNAs targets prediction and experimental validation. *Protein Cell* 2010;1(11):979–86.
254. Püschel AW. The semaphorins: a family of axonal guidance molecules? *Eur J Neurosci* 1996;8(7):1317–21.
255. Zhou Y, Gunput R-AF, Pasterkamp RJ. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* 2008;33(4):161–70.
256. Goodman C, Kolodkin A, Luo Y, Puschel A, Raper J. Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* 1999;97(5):551–2.
257. Neufeld G, Shraga-Heled N, Lange T, Guttmann-Raviv N, Herzog Y, Kessler O. Semaphorins in cancer. *Front Biosci* 2005;10:751–60.
258. Kruger RP, Aurandt J, Guan K-L. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(10):789–800.
259. Tamagnone L, Comoglio PM. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. *EMBO Rep* 2004;5(4):356–61.
260. Rizzolio S, Tamagnone L. Semaphorin signals on the road to cancer invasion and metastasis. *Cell Adh Migr* 2007;1(2):62–8.

261. Dhanabal M, Wu F, Alvarez E, et al. Recombinant semaphorin 6A-1 ectodomain inhibits in vivo growth factor and tumor cell line-induced angiogenesis. *Cancer Biol Ther* 2005;4(6):659–68.
262. Gandemer V, Rio A-G, de Tayrac M, et al. Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia. *BMC Genomics* 2007;8:385.
263. Suto F, Ito K, Uemura M, et al. Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. *J Neurosci* 2005;25(14):3628–37.
264. Kigel B, Rabinowicz N, Varshavsky A, Kessler O, Neufeld G. Plexin-A4 promotes tumor progression and tumor angiogenesis by enhancement of VEGF and bFGF signaling. *Blood* 2011;118(15):4285–96.
265. Basso K, Dalla-Favera R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol* 2010;105:193–210.
266. Wagner SD, Ahearne M, Ko Ferrigno P. The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *Br J Haematol* 2011;152(1):3–12.
267. Niu H. The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. *Hematol Oncol* 2002;20(4):155–66.
268. Ye BH, Chaganti S, Chang CC, et al. Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J* 1995;14(24):6209–17.
269. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004;432(7017):635–9.
270. Myatt SS, Brosens JJ, Lam EW-F. Sense and sensitivity: FOXO and ROS in cancer development and treatment. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(4):675–87.
271. Zhang Y, Gan B, Liu D, Paik J-H. FoxO family members in cancer. *Cancer Biol Ther* 2011;12(4):253–9.
272. Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. Fox's in development and disease. *Trends Genet* 2003;19(6):339–44.

273. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Hou J. Clever cancer strategies with FoxO transcription factors. *Cell Cycle* 2008;7(24):3829–39.
274. Oguro H, Iwama A, Morita Y, Kamijo T, van Lohuizen M, Nakauchi H. Differential impact of Ink4a and Arf on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in Bmi1-deficient mice. *J Exp Med* 2006;203(10):2247–53.
275. Hurtz C, Hatzi K, Cerchietti L, et al. BCL6-mediated repression of p53 is critical for leukemia stem cell survival in chronic myeloid leukemia. *J Exp Med* 2011;208(11):2163–74.
276. Semaan N, Frenzel L, Alsaleh G, et al. miR-346 controls release of TNF- α protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetraproline stabilization. *PLoS ONE* 2011;6(5):e19827.
277. Alsaleh G, Suffert G, Semaan N, et al. Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 2009;182(8):5088–97.

7 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.